

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA

TRATAMENTO EXPERIMENTAL DE CÃES NATURALMENTE
INFECTADOS COM O VÍRUS DA CINOMOSE NA FASE NEUROLÓGICA
COM O USO DE RIBAVIRINA E DIMETIL-SULFÓXIDO (DMSO)

SIMONE HENRIQUES MANGIA

BOTUCATU – SP
2008

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA

TRATAMENTO EXPERIMENTAL DE CÃES
NATURALMENTE INFECTADOS COM O VÍRUS DA
CINOMOSE NA FASE NEUROLÓGICA COM O USO DA
RIBAVIRINA E DIMETIL-SULFÓXIDO (DMSO)

SIMONE HENRIQUES MANGIA

Dissertação apresentada junto ao Programa de
Pós-Graduação em Medicina Veterinária para
obtenção de título de Mestre em Medicina
Veterinária

Orientador: Prof. Ass. Dr. Antonio Carlos Paes

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉCNICA DE AQUISIÇÃO E TRATAMENTO
DA INFORMAÇÃO
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CAMPUS DE BOTUCATU - UNESP
BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: Selma Maria de Jesus

Mangia, Simone Henriques.

Tratamento experimental de cães naturalmente infectados com o vírus da cinomose na fase neurológica com o uso da Ribavirina e Dimetil-Sulfóxido (DMSO) / Simone Henriques Mangia. – Botucatu : [s.n.], 2008

Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Botucatu, 2008.

Orientador: Antonio Carlos Paes

Assunto CAPES: 50501062

1. Cão - Doenças 2. Cinomose - Tratamento

CDD 636.70896

Palavras-chave: Cães; Cinomose; Dimetil-Sulfóxido; Encefalite; Morbillivirus; Ribavirina; Tratamento

Nome do Autor: Simone Henriques Mangia

Título: TRATAMENTO EXPERIMENTAL DE CÃES NATURALMENTE INFECTADOS COM O VÍRUS DA CINOMOSE NA FASE NEUROLÓGICA COM O USO DA RIBAVIRINA E DIMETIL-SULFÓXIDO (DMSO).

COMISSÃO EXAMINADORA

Prof. Ass. Dr. Antonio Carlos Paes
Presidente e Orientador
Departamento de Higiene Veterinária e Saúde Pública
FMVZ – UNESP – Botucatu

Prof^a. Ass. Dr^a. Regina Kiomi Takahira
Membro
Departamento de Clínica Veterinária
FMVZ – UNESP – Botucatu

Prof. Associado I Dr. Rogério Tortelly
Membro
Departamento de Patologia e Clínica Veterinária
Faculdade de Veterinária – UFF

Data da Defesa: 07 de março de 2008

Dedicatória

Dedico esta pesquisa à minha mãe, Sandra da Cunha Henriques, por ter me apoiado e orientado em todos os momentos da minha vida. Esta dedicatória serve como agradecimento para tudo que recebi na minha trajetória.

Dedico esta pesquisa ao meu orientador, Prof. Ass. Dr. Antonio Carlos Paes, por ser o idealizador deste estudo, que me fez aprender a superar e criar opções em momentos de dificuldade.

Agradecimentos

Agradeço a Deus pela oportunidade de enriquecer meus conhecimentos nesta inestimável universidade e por ter feito tantos amigos aqui.

Agradeço a minha mãe e avó, Sandra e Dilma, por todos os valores que me ensinaram, pelo amor e dedicação, além de toda compreensão pela minha ausência. Também sinto muita a falta de vocês! Obrigada por toda a ajuda que me deram nesse período, permitindo que eu pudesse terminar mais uma fase da minha vida.

Agradeço a toda família Mangia, principalmente meus padrinhos, Eunice e Marciano, por estarem sempre por perto nos momentos mais importantes da minha vida, pelos ensinamentos e amor que sempre recebi. Obrigada pelo apoio e compreensão!

Agradeço aos meus tios, Marcos e Aparecida e os primos, Anna Luiza e Marcos Jr., por toda a ajuda que me ofereceram, pelos momentos de alegria vividos e pela compreensão da minha ausência.

Agradeço às minhas amigas “cariocas”, Danielle, Mirian e Cheryl pelo apoio que recebi durante todo esse período, pelos maravilhosos e inesquecíveis momentos de diversão e pelo apoio nas horas tristes. Vocês são eternas!

Agradeço às minhas amigas de Botucatu, Fernanda, Andreza e Ana Paula, por estarem sempre do meu lado, nos momentos bons e ruins, pelos conselhos e pela ajuda que me ofereceram aos finais de semana para a boa execução do experimento.

Agradeço ao meu orientador, Prof. Ass. Dr. Antonio Carlos Paes, por confiar em mim para execução desta pesquisa, pelos ensinamentos e orientação profissional. Obrigada pela convivência agradável.

Agradeço à Profa. Regina Kiomi Takahira, Eduardo “Cirrose” e todos os residentes do Laboratório Clínico Veterinário da UNESP – Botucatu, pela realização dos exames complementares à pesquisa, trabalhos científicos e boa convivência.

Agradeço à Profa. Jane Megid por disponibilizar os exames de imunofluorescência direta, me dando a oportunidade de melhorar os resultados desta pesquisa, por incentivar em outras pesquisas e boa convivência. Foi muito bom te conhecer melhor neste período!

Aos professores, Hélio Langoni, Márcio Garcia Ribeiro, Jane Megid, Rafael Modolo, Paulo Francisco Domingues, agradeço pelos ensinamentos, por me aceitarem no departamento e por apoiarem nessa pesquisa.

Agradeço às amigas, Amanda Keller Siqueira e Tatiana Salerno, pela companhia na “hora do café”, que significou momentos de descontração, conselhos, idéias de novos trabalhos e até alguns “desabaços”.

Agradeço aos dois grandes amigos, Roberto Bolsanello e André Luiz Mangia, um em cada lugar diferente, mas considerados “irmãos”, pelo apoio e pelos momentos de alegria durante este período.

Aos amigos, Aruaque e Guilherme e todos os colegas do forró que conheci em Botucatu, obrigada pelos momentos de diversão.

Aos amigos de pós-graduação, Acácia Elias, Ana Paula Contente, Ana Paula Flamínio, André Peres Barbosa, Audrey Rennó, Fábio Shimabukuro, Gustavo Lara, Janaína Biotto, Juliana Machado, Juliano “Sorovar”, Luciano Eloy, Marcela Zampolli Trocarelli, Melissa Hartmann, Rodrigo Costa da Silva, Vanessa Salgado, Veruska Maia, Walkíria Prado e todos os pós-graduandos do departamento, obrigada por colaborarem com a realização deste experimento com amizade e auxílio.

Aos residentes da Disciplina de Enfermidades Infecciosas dos Animais, Rodrigo, Jeniffer, Camila, Marta e Suzan, agradeço por colaborarem com o desenvolvimento da pesquisa, pois sem vocês não teria conseguido concluir o experimento.

Aos residentes da Disciplina de Zoonoses, Leila, Felipe, Dulce, Haroldo, obrigada pela ajuda e orientação no diagnóstico de toxoplasmose.

Agradeço aos técnicos e funcionários, Fernando, Tânia, Adriana, Rodrigo Carreira, Adilson (Pardal), Carlos Eduardo (Kadu), Josiane, Benedito e Marcus, pela amizade, momentos de descontração e todo apoio.

Wander e Serginho, obrigada pela convivência agradável, apoio e momentos de descontração que auxiliaram na conduta do experimento.

Aos funcionários da pós-graduação, do arquivo, da biblioteca obrigada pela inestimável ajuda.

Agradeço ao Prof. Aristeu Vieira da Silva a ajuda na realização e interpretação das análises estatísticas desta pesquisa.

Agradeço a BIOLUNIS Farmacêutica Ltda. por ceder o medicamento antiviral, essencial para a realização da pesquisa.

Clínica Veterinária Pharmazoo, agradeço por me receber como parte da equipe, pelo apoio e compreensão e pelo crescimento profissional, permitindo que conseguisse me manter em Botucatu para a realização da pesquisa.

À Capes pelo apoio financeiro e importante para realização da pesquisa.

A todos aqueles que me ajudaram e por um lapso de memória não citei, muito obrigada!

Epígrafe

“Aproveite bem, o máximo que puder, o poder e a beleza da juventude. Ou então, esquece. Você nunca vai entender mesmo o poder e a beleza da juventude até que tenham se apagado. Mas pode crer, daqui a vinte anos, você vai evocar as suas fotos e perceber de um jeito que você nem desconfia hoje em dia quantas, tantas alternativas se escancaravam à sua frente. E como você realmente estava com “tudo em cima”. Você não está gordo, ou gorda.

Não se preocupe com o futuro. Ou então preocupe-se, se quiser, mas saiba que “preocupação” é tão eficaz quanto mascar chiclete para tentar resolver uma equação de álgebra. As encrencas de verdade em sua vida tendem a vir de coisas que nunca passaram pela sua cabeça preocupada, que te pegam no ponto fraco às quatro da tarde de uma terça-feira modorrenta.

Todo dia enfrente pelo menos uma coisa que te meta medo de verdade.

Cante.

Não seja leviano com o coração dos outros, não ature gente de coração leviano.

Use fio dental.

Não perca tempo com inveja. Às vezes, se está por cima; às vezes, por baixo... A peleja é longa e, no fim, é só você contra você mesmo.

Não esqueça os elegios que receber, esqueça as ofensas. Se conseguir isso, me ensine.

Guarde as antigas cartas de amor. Jogue fora os extratos bancários velhos.

Estique-se.

Não se sinta culpado por não saber o que fazer da vida. As pessoas mais interessantes que conheço não sabiam aos 22 o que queriam fazer da vida. Alguns dos quarentões mais interessantes que conheço ainda não sabem.

Tome bastante cálcio. Seja cuidadoso com os joelhos: você vai sentir falta deles.

Talvez você case, talvez não. Talvez tenha filhos, talvez não. Talvez se divorcie aos 40, talvez dance ciranda em suas bodas de diamante. Faça o que fizer, não se auto-congratule demais e nem seja severo demais com você. As suas escolhas têm sempre metade das chances de dar certo. É assim para todo mundo.

Desfrute de seu corpo, use-o de toda maneira que puder mesmo. Não tenha medo de seu corpo ou do que as outras pessoas possam achar dele. É o mais incrível instrumento que você jamais vai possuir.

Dance... Mesmo que não tenha onde, além de seu próprio quarto.

Leia as instruções, mesmo que não vá segui-las depois. Não leia revistas de beleza.

Elas só vão fazer você se achar feio.

Dedique-se a conhecer os seus pais. É impossível prever quando eles terão ido embora, de vez. Seja legal com os seus irmãos. Eles são a melhor ponte com o seu passado e, possivelmente, quem vai sempre mesmo te apoiar no futuro.

Entenda que amigos vão e vêm. Mas nunca abra mão de uns poucos e bons. Esforce-se de verdade para diminuir as distâncias geográficas e destinos de vida, porque quanto mais velho você ficar, mais você vai precisar das pessoas que conheceu quando jovem. More uma vez em Nova Iorque, mas vá embora antes de endurecer. More uma vez no Havaí, mas se mande antes de amolecer. Viaje.

Aceite certas verdades inescapáveis: os preços vão subir, os políticos vão saracotear, você também vai envelhecer. E quando isso acontecer, você vai fantasiar que quando era jovem os preços eram razoáveis, os políticos eram decentes e as crianças respeitavam os mais velhos.

Respeite os mais velhos.

Não espere que ninguém segure a sua barra. Talvez você arrume uma boa aposentadoria privada, talvez case com um bom partido, mas não esqueça que um dos dois pode, de repente, acabar.

Não mexa demais nos cabelos, senão quando você chegar aos 40, vai aparentar 85.

Cuidado com os conselhos que comprar, mas seja paciente com aqueles que os oferecem. Conselho é uma forma de nostalgia. Compartilhar conselhos é um jeito de pescar o passado do lixo, esfregá-lo, repintar as partes feias e reciclar tudo por mais do que vale.”

*Publicado no jornal americano Chicago Tribune em 1º de junho de 1997
Autora: Mary Schmich*

LISTA DE TABELAS

Tabela 01 -	Relação de animais que compuseram os dois grupos experimentais, com idade, sexo, raça e resultado da reação de imunofluorescência direta no esfregaço sangüíneo.....	88
Tabela 02 -	Tempo de evolução dos sinais neurológicos entre os grupos.....	89
Tabela 03 -	Resultado da reação de imunofluorescência direta de esfregaço sangüíneo dos animais nos grupos 1 e 2.....	89
Tabela 04 -	Evolução da cinomose na fase neurológica entre os grupos.....	90
Tabela 05 -	Relação entre a evolução da doença com o histórico vacinal dos animais.....	91
Tabela 06 -	Relação entre a evolução da doença frente ao tempo de desenvolvimento dos sinais neurológicos até o início do tratamento.....	92
Tabela 07 -	Relação dos sinais clínicos neurológicos encontrados nos diferentes grupos, no momento que foram atendidos no Hospital Veterinário.....	94
Tabela 08 -	Relação das lesões neurológicas nos grupos e a evolução da doença.....	95
Tabela 09 -	Média, desvio padrão e nível de significância da contagem de hemácias.....	98
Tabela 10 -	Média, desvio padrão e nível de significância da concentração de hemoglobina.....	99
Tabela 11 -	Média, desvio padrão e nível de significância do volume globular.....	100
Tabela 12 -	Média, desvio padrão e nível de significância na contagem de plaquetas.....	101

Tabela 13 -	Média, desvio padrão e nível de significância entre os grupos com relação à contagem total de leucócitos.....	101
Tabela 14 -	Média, desvio padrão e nível de significância entre os grupos com relação à contagem de linfócitos.....	103
Tabela 15 -	Média, desvio padrão e nível de significância na contagem de monócitos.....	104
Tabela 16 -	Média e desvio padrão dos valores encontrados nos dois grupos na dosagem de uréia no soro.....	105
Tabela 17 -	Representação média dos valores de proteína na urina entre os dois grupos e nível de significância.....	108
Tabela 18 -	Relação do número de hemácias no sedimento urinário nos dois grupos e nível de significância.....	109
Tabela 19 -	Relação do número de leucócitos no sedimento urinário nos dois grupos e nível de significância.....	110
Tabela 20 -	Média, desvio padrão e nível de significância dos valores de proteína no líquido dos dois grupos.....	112
Tabela 21 -	Média, desvio padrão e nível de significância da contagem de células nucleadas no líquido dos animais dos dois grupos.....	113
Tabela 22 -	Média, desvio padrão e nível de significância da porcentagem de linfócitos no líquido dos animais dos dois grupos.....	115
Tabela 23 -	Médiana e nível de significância da contagem diferencial de linfócitos no líquido dos animais dos dois grupos, nos diferentes momentos.....	116

LISTA DE FIGURAS

Figura 01 -	Representação gráfica da avaliação clínica diária dos animais dos dois grupos experimentais.....	90
Figura 02 -	Representação gráfica da variação das médias da contagem de hemácias entre os dois grupos.....	98
Figura 03 -	Representação gráfica da variação das médias da contagem total de leucócitos entre os dois grupos.....	102
Figura 04 -	Representação gráfica da variação das médias da contagem de linfócitos entre os dois grupos.....	103
Figura 05 -	Gráfico representando as variações das médias de proteína, albumina e globulina do soro dos dois grupos.....	106
Figura 06 -	Representação gráfica da contagem de células nucleadas no líquido nos dois grupos.....	114
Figura 07 -	Representação gráfica da porcentagem de linfócitos no líquido nos dois grupos.....	115

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

% - porcentagem
çm – nanômetro
°C – graus Celsius
< - menor que
> - maior que
µL – microlitro
mg – miligramas
mL - mililitros
dL - decilitro
® - marca registrada
á - alfa
ALT – alanina-aminotransferase
ATP – adenosina trifosfato
CPK – creatinina fosfo-quinase
CDV – vírus da cinomose
DL 50 – dose letal 50
DMSO – Dimetil Sulfóxido
DMS – dimetil sulfoxide
DMF – dimetil formamide
DMSO₂ – dimetil sulfone
DMS – dimetil sulfide
EDTA – ácido etilenodiaminotetracético
ELISA – “Enzyme-linked immunosorbent assay”
F – proteína de fusão
FA – fosfatase alcalina
Fc – receptor de anticorpos de alta afinidade de macrófagos
FDA – “Food and Drug Administration”
g – gama
G1 – grupo 1
G2 – grupo 2
GC – grupo controle
GGT – gama-glutamyltransferase

GSH – Gonadotropina coriônica humana
GTP – guanosina tri-fosfato
g/Kg – gramas por quilo
HA – hemaglutinina
IFD – imunofluorescência direta
IFN – interferon
IgA – imunoglobulina A
IgG – imunoglobulina G
IgG1 – imunoglobulina G1
IgG2 – imunoglobulina G2
IgM – imunoglobulina M
IL – interleucina
IMP – inosina mono-fosfato
IND – “Investigated new drugs”
L – polimerase ou grande
LCR – líquido cefalorraquidiano
mg/Kg – miligramas por quilo
µg/mL – microgramas por mililitro
M – proteína de membrana
MHC – Complexo de histocompatibilidade principal
MMP – matrix metaloproteases
mRNA – RNA mensageiro
NADPH₂ – nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato, forma reduzida
NC – nervo craniano
NP – nucleoproteína
P – fosfoproteína
PBS – Solução salina tamponada
PCR – reação em cadeia pela polimerase
PGE₂ – prostaglandina E₂
pH – pressão de hidrogênio
ROS – radicais livres de oxigênio
RT-PCR – reação em cadeia pela polimerase precedida de transcrição reversa
rpm – rotação por minuto
SLAM – molécula sinalizadora da ativação de linfócitos

SNC – Sistema nervoso central

spp. – espécie

SRD – sem raça definida

SSPE – paencefalite subaguda esclerosante

U.S. – “United States”

TIMP – inibidores tissulares da matrix metaloproteases

TNF – fator de necrose tumoral

* Em virtude do uso consagrado na literatura técnica, algumas abreviaturas seguem sua grafia no inglês.

SUMÁRIO

RESUMO.....	19
ABSTRACT.....	20
INTRODUÇÃO.....	21
REVISÃO DE LITERATURA.....	27
1 ESTRUTURA VIRAL.....	28
2 RESISTÊNCIA VIRAL.....	29
3 TROPISMO VIRAL.....	29
4 EPIDEMIOLOGIA.....	30
5 PENETRAÇÃO CELULAR.....	32
6 PATOGENIA.....	32
7 PATOGENIA DA IMUNOSSUPRESSÃO.....	33
8 NEUROPATOGENIA.....	34
8.1 ENCEFALITE DO CÃO VELHO.....	38
8.2 DESMIELINIZAÇÃO.....	39
9 SINAIS CLÍNICOS.....	42
10 ENFERMIDADES RELACIONADAS COM O VÍRUS DA CINOMOSE.....	44
11 PATOLOGIA CLÍNICA.....	45
12 ACHADOS ANÁTOMO-PATOLÓGICOS.....	47
13 PROGNÓSTICO.....	51
14 DIAGNÓSTICO.....	51
15 TRATAMENTO.....	54
16 PROFILAXIA.....	56
17 RIBAVIRINA FRENTE AOS <i>Paramyxovirus</i>	59
18 MECANISMO DE AÇÃO.....	60
19 PROPRIEDADES DA RIBAVIRINA.....	61
19.1 Viramidine: Pró-droga da ribavirina.....	63
20 RIBAVIRINA E O SISTEMA IMUNE.....	64
21 CONTRA-INDICAÇÕES E EFEITOS COLATERAIS DA RIBAVIRINA.....	64
22 DIMETIL SULFÓXIDO COMO SOLVENTE DE NUCLEOTÍDEOS.....	66

23	PROPRIEDADES DO DIMETIL SULFÓXIDO.....	66
23.1	DMSO e membranas celulares.....	66
23.2	Captura de radicais livres.....	66
23.3	Solvente orgânico.....	67
23.4	Protetor tecidual, antiinflamatório e antisquêmico.....	68
23.5	Efeitos no Trato Gastro-intestinal.....	69
23.6	Antimicrobiano.....	70
23.7	Antifúngico.....	70
23.8	Indicações aprovadas para uso.....	70
23.9	Efeitos no sistema nervoso.....	71
23.10	Metabolismo e excreção.....	71
24	DIMETIL SULFÓXIDO E OS ERITRÓCITOS.....	71
25	EFEITOS COLATERAIS E CONTRA-INDICAÇÕES DO DIMETIL SULFÓXIDO.....	72
	OBJETIVOS.....	74
	MATERIAIS E MÉTODOS.....	76
1	DELINEAMENTO EXPERIMENTAL.....	77
2	ANIMAIS.....	77
3	GRUPOS EXPERIMENTAIS.....	78
4	DOSES E DROGAS EXPERIMENTAIS.....	79
5	AMBIENTE E ALIMENTAÇÃO DOS CÃES.....	80
6	EXAMES COMPLEMENTARES.....	80
6.1	Hemograma.....	82
6.2	Análises bioquímicas.....	82
6.3	Urinálise.....	83
6.4	Análise do líquido.....	83
7	REAÇÃO DE IMUNOFLUORESCÊNCIA DIRETA.....	84
8	ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	85
	RESULTADOS.....	86
1	ANIMAIS.....	87
2	AVALIAÇÃO DOS GRUPOS EXPERIMENTAIS.....	89
3	EVOLUÇÃO DA DOENÇA FRENTE AOS DADOS EPIDEMIOLÓGICOS.....	91

4	EVOLUÇÃO DA DOENÇA FRENTE AOS SINAIS CLÍNICOS E AS LESÕES NEUROLÓGICAS.....	92
5	EXAMES COMPLEMENTARES.....	97
6	EFEITOS COLATERAIS.....	116
	DISCUSSÃO.....	118
	CONCLUSÕES.....	135
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	137
	ARTIGO PARA PUBLICAÇÃO.....	153

MANGIA, S. H. Tratamento experimental de cães naturalmente infectados com o vírus da cinomose na fase neurológica com o uso da Ribavirina e Dimetil-Sulfóxido (DMSO). Botucatu, 2008. 152p. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Campus Botucatu, Universidade Estadual Paulista.

RESUMO

Este estudo teve por objetivos testar a eficácia da ribavirina em cães acometidos de cinomose na fase neurológica; avaliar os efeitos colaterais da mesma através do monitoramento hematológico e provas bioquímicas; avaliar a resposta imunológica no sistema nervoso central dos cães através do exame de líquido; adaptar uma dose e via de administração adequada da ribavirina em cães e testar a eficácia do DMSO como permeante de membranas biológicas atuando como vetor da ribavirina. Foram utilizados 20 cães com sinais clínicos neurológica, divididos em dois grupos de tratamento, sendo que um grupo recebeu a ribavirina e outro a associação da ribavirina e o DMSO, sem distinção de sexo e raça, com idades até seis anos e tempo de evolução máximo de 10 dias. Todos os animais foram avaliados clinicamente e realizado o teste de imunofluorescência direta de sangue para inclusão no estudo. Os exames complementares foram realizados de forma rotineira, o líquido foi colhido antes e após o tratamento, as drogas foram administradas durante 15 dias consecutivos e realizada a avaliação clínica diária dos animais. Pelos resultados observamos que a ribavirina demonstrou atividade efetiva contra o vírus da cinomose, exercendo leves efeitos colaterais na medula óssea, sistema imune e sistema gastro-intestinal. No líquido observamos diminuição da produção de anticorpos e verificamos que o DMSO tornou a ação da ribavirina mais eficaz.

PALAVRAS-CHAVE: Cães; Cinomose; Dimetil-Sulfóxido; Encefalite; Morbillivirus; Ribavirina; Tratamento

MANGIA, S. H. Experimental treatment of naturally infected dogs with canine distemper virus, in neurological stage, using Ribavirin and Dimethylsulphoxide (DMSO). Botucatu, 208. 152p. Dissertation (Master) – College of Veterinary Medicine and Animal Science, Campus of Botucatu, São Paulo State University.

ABSTRACT

This study aimed to test the ribavirin efficacy in dogs infected with canine distemper virus in neurological stage; to evaluate this collateral effects by hematological and biochemical evaluation; to evaluate the immunological response on dogs central nervous system (CNS) by cerebrospinal fluid (CSF) analysis; to adapt a dose and an adequate administration route of ribavirin in dogs and to test the efficacy of dimethylsulphoxide (DMSO) in increasing the permeability of biological membranes acting as ribavirin vector. Twenty dogs with neurological signs, divided in two treatment groups, without sex and breed distinction, till six years old and a maximum evolution time of 10 days were used. All animals were selected based on clinical sings and the blood direct fluorescent test (DFA). The hemogram, biochemical and urinalysis test were carried out. At the complementary tests, CSF was collected before and after the treatment, and ribavirin and its association with DMSO were administered during 15 days, consecutive, and the animal clinical evaluation was carried out daily. Based on the results, ribavirin demonstrated effective activity against canine distemper virus, besides its light collateral effects in bone marrow, immune and gastrointestinal systems. In CSF, the lowering of antibody production, and the positive effects of DMSO on ribavirin efficacy were observed.

KEYWORDS: Dogs; Canine Distemper; Dimethylsulphoxide; Encephalitis; Morbillivirus; Ribavirin; Treatment.

Introdução

Segundo Spinola, a cinomose foi observada na Europa desde a segunda metade do século XVIII, proveniente da Ásia. Sua natureza contagiosa já era reconhecida desde meados do século XIX, porém, foi Carré quem, após uma série de estudos, considerou-a como enfermidade ocasionada por vírus (CORRÊA & CORRÊA, 1992).

Os estudos de Carré não foram aceitos, pois todos os pesquisadores e profissionais atribuíam os sinais e sintomas encontrados à patogenicidade da *B. brochiseptica*. Após os trabalhos de Laidlaw e Dunkin, 1926, foi aceita a etiologia viral da enfermidade (CORRÊA & CORRÊA, 1992 apud CARRÉ, 1905).

No entanto, outros autores relatam que a cinomose é uma enfermidade conhecida desde 1760, altamente contagiosa e febril, de caráter aguda ou subaguda (SHIN et al., 2004 apud MURPHY et al., 1999).

A partir de 1930, a enfermidade passou a ser perfeitamente conhecida em suas formas clínicas e etiológicas (CORRÊA & CORRÊA, 1992).

Appel & Summers (1999), relatam que na primeira metade do século XX, a cinomose foi considerada uma das doenças fatais mais comuns em cães em todo o mundo. Posteriormente, nos anos 60 e com o surgimento de vacinas específicas, este quadro modificou-se (TIPOLD et al., 1992).

Durante séculos, as infecções pelos Morbillivírus têm tido imenso impacto na vida de humanos e animais. Entre os carnívoros, o vírus da cinomose causa sérias enfermidades em várias espécies, selvagens e domésticas. Mesmo sendo controlada com vacinação em cães domésticos e animais de cativeiro, é uma doença de difícil erradicação já que o vírus possui distribuição global e ampla variedade de hospedeiros (BARRETT, 1999).

Diferentes espécies da ordem *Carnívora*, como *Ailuridae*, *Canidae*, *Hyaenidae*, *Mustelidae*, *Procyonidae*, *Ursidae*, *Viverridae* e *Felidae* são relatadas como susceptíveis à infecção pelo vírus da cinomose e a mortalidade varia bastante entre as espécies (APPEL & SUMMERS, 1995).

Em 1955, uma grande quantidade de focas do gênero *Lobdon carcinophagus* morreram na proximidade de uma base na Antártica, onde havia uma matilha de cães. Os cães não eram vacinados contra cinomose e foi sugerido que os mesmos transmitiram a infecção para as focas. Bengtson et al. (1991) através de testes sorológicos confirmaram alta prevalência de anticorpos contra o vírus da cinomose nestas focas.

Desde a epizootia em focas nos anos de 1988 e 1989 no Mar do Norte da Europa, descobriu-se que os Morbillivirus podiam acometer mamíferos aquáticos (HASS & BARRETT, 1996). Nos anos de 1987 e 1988, o vírus da cinomose foi responsável pela morte de cem focas (*Phoca sibirica*) no Lago Baikal na Rússia (GRACHEV et al., 1989) e foi isolado em outro tipo de foca no Canadá (LYONS et al., 1993). O vírus da cinomose foi responsável pela morte de focas do gênero *Phoca caspica*, em junho de 1997. As mortes foram observadas próximo ao Azerbaijão, ao leste no Mar Cáspio. A análise da amostra de uma das focas revelou a presença do ácido nucléico do vírus da cinomose (FORSYTH et al., 1998).

A relação genética entre as cepas virais de diferentes partes do mundo pôde ser estabelecida através das técnicas de biologia molecular e permitiu traçar com mais certeza a origem de novos surtos. Vários laboratórios relataram estudos similares para diferenciar geograficamente linhagens distintas do vírus da cinomose que acomete animais domésticos e selvagens (BARRETT, 1999).

Em 1992, diversas espécies de grandes felídeos morreram com cinomose nos zoológicos da América. Dois anos após, leões do Parque Nacional do Serengeti na Tanzânia, morreram em grande número, e a cinomose foi identificada como causa (BARRETT, 1999).

O estudo retrospectivo de Myers et al. (1997), utilizando amostras de leões e tigres que morreram em zoológico da Suíça entre os anos de 1972 a 1992, revelou que 19 das 42 amostras eram positivas ao antígeno do Morbillivirus.

Atualmente, a cinomose é rara em vários países devido à vacinação, mas ainda é considerada uma enfermidade importante por acometer várias espécies da família *Felidae* e pode ocorrer eventualmente na população canina vacinada (VAN MOLL et al., 1995; VANDEVELDE & ZURBRIGGEN, 2005).

Em regiões endêmicas, como no Brasil, é crescente o número de mortes de cães vítimas da cinomose. Além disso, a mesma tem sido considerada como re-emergente em países onde já esteve controlada (SILVA et al., 2007).

Embora a vacinação contra a cinomose venha sendo utilizada amplamente por várias décadas, a doença ainda é importante e surtos foram recentemente relatados em vários países, como Dinamarca, Estados Unidos, Japão, Finlândia e Alemanha (JÓZWIK & FRYMUS, 2005; VANDEVELDE & ZURBRIGGEN, 2005). No Brasil, alguns relatos clínico-patológicos e sorológicos indicam a elevada presença da infecção na população canina (HEADLEY & GRAÇA, 2000; SILVA et al., 2004). Alguns

fatores como a persistência do vírus no ambiente e em animais portadores, o aparecimento de novas cepas e o desenvolvimento de infecção e doença mesmo em animais vacinados têm contribuído para a manutenção do caráter enzoótico da virose e a ocorrência ocasional de surtos (BÖHM et al., 2004).

Alguns achados sugerem que existam diferenças antigênicas em áreas geográficas distintas, nos tipos virais selvagens com relação às cepas vacinais, responsáveis pelo ressurgimento da doença. O sequenciamento genético e análise filogenética são métodos que não indicam a relação evolucionária entre amostras coletadas em diversas regiões geográficas, mas ajudam a entender as diferenças antigênicas entre amostras biologicamente diferentes (CASTILLO et al., 2007).

A reação cruzada imunológica entre os vírus do sarampo e da cinomose foi descrita pela primeira vez em 1957. No mesmo ano, Polding & Simpson e Goret et al., apresentaram evidências da relação imunológica entre a cinomose e a peste dos ruminantes. Em 1953, o soro e a gama-globulina de um adulto humano demonstraram a presença de anticorpos específicos neutralizantes para o vírus da cinomose. Alterações citopáticas produzidas pelo vírus da cinomose em culturas celulares de fígado de cão eram semelhantes às causadas pelo vírus do sarampo. No estudo realizado por Imagawa et al. (1960), foi relatado que o soro anti-cinomose poderia neutralizar o vírus do sarampo.

Em 1979, foi relatado por Stephenson & Meulen a relação antigênica entre os vírus do sarampo e da cinomose através da comparação entre a resposta imune de humanos e animais. As análises comparativas do polipeptídeo L do vírus do sarampo e do vírus da cinomose mostravam reação cruzada antigênica e demonstraram as funções das outras proteínas estruturais.

O vírus da cinomose pertence à família *Paramyxoviridae*, gênero *Morbillivirus*, e apresenta relação antigênica com os vírus do sarampo, da peste bovina e da peste de pequenos ruminantes (TIPOLD et al., 1992; HASS & BARRETT, 1996; BARRETT, 1999). O sarampo é considerado uma doença séria em todo mundo, com mortalidade aproximada de 800.000 crianças por ano, sendo primariamente associado com desnutrição e infecção secundária por bactérias e protozoários. A infecção pelo vírus do sarampo também pode ocasionar complicações no sistema nervoso central (SNC) com apresentações distintas: encefalomielite aguda desmielinizante, encefalite do sarampo com corpúsculos de inclusão e panencefalite subaguda esclerosante (RIMA & DUPREX, 2006).

Não existe agente antiviral específico para o tratamento da cinomose e mesmo com vacinação permanece como a pior doença em cães. A ribavirina é uma alternativa de tratamento, pois mostrou alguma eficácia contra Vírus Respiratório Sincicial, Vírus da Febre de Lassa e Vírus do Sarampo (ELIA et al., 2007).

O interesse na quimioterapia antiviral começou em 1950, quando a pesquisa de agentes anti-tumorais gerou interesse em inibidores da síntese de DNA e foram produzidos vários compostos capazes de inibir a síntese de DNA viral. Agentes antivirais foram administrados pela primeira vez com sucesso nos anos 1960, quando Bauer impediu doenças administrando thiosemicarbazone (methisazone) em pacientes expostos à varíola e Kaufman obteve melhora de pacientes com herpes utilizando idoxirudine tópico (BEAN, 1992).

Em 1970, a ribavirina foi sintetizada pela primeira vez como parte de esforço intensivo de buscar por novos agentes antivirais. No primeiro momento, surgiu para ser um análogo a nucleotídeo capaz de abrir o anel de pirimidina, porém, estruturalmente e funcionalmente é mais parecido a guanosina (BEAN, 1992).

Nestas pesquisas iniciais, envolvendo poucos agentes antivirais com eficácia, muitos tinham apenas efetividade “in vitro”. Entretanto, a ribavirina (1-β-D-ribofuranosyl-1H-1,2,4-triazole-3-carboxamide) é um agente antiviral que mostrou atividade “in vitro” contra grande variedade de DNA e RNA vírus (GILBERT & KNIGHT, 1986).

A ribavirina foi aprovada pela U.S. Food and Drug Administration para o tratamento pediátrico da infecção pelo vírus sincicial respiratório e sua combinação com alfa-interferon para infecção crônica pelo vírus da hepatite C. Recentemente, benefícios terapêuticos do antiviral estão sendo avaliados para o tratamento de síndrome respiratória severa aguda e infecção do vírus da varíola, em casos de bioterrorismo (WU et al., 2005).

O registro histórico do dimetil sulfóxido (DMSO) foi iniciado em 1867 quando o químico russo, Alexander Saytzeff descreveu a oxidação do dimetil sulfide, identificou o produto e descreveu algumas propriedades solventes extraordinárias do DMSO. Houve pouco interesse nas descobertas até 1950, quando essas propriedades foram exploradas em vários processos industriais. Pesquisadores de indústrias descobriram que servia como solvente para vários herbicidas, fungicidas, antibióticos e hormônios de plantas, nas quais aumentava a penetração e a eficácia. Cientistas trabalharam com DMSO e relataram outras propriedades incomuns: penetrava rapidamente na pele sem

causar danos; sua aplicação tópica em qualquer parte do corpo rapidamente resultava em distinta e agressiva halitose lembrando alho ou ostra, devido ao odor do metabólito dimetil sulfide. O DMSO é capaz de carrear vários solutos através da pele, sendo necessário cuidado no manuseio e conhecer as soluções ou compostos com potencial tóxico, também é capaz auxiliar na cura de queimaduras lenta ou rapidamente e aliviar dor e edema de injúrias. Essas observações estimularam novas pesquisas com o DMSO para outras aplicações médicas e biológicas. Robert Herschler da companhia de papel Crown Zellerbach, e Stanley Jacob da Universidade de Oregon Medical School, foram fortes proponentes para o início dos estudos do DMSO como agente terapêutico. O primeiro relato de investigação laboratorial do DMSO em sistemas orgânicos de mamíferos foi publicado em 1959 (BRAYTON, 1986; ALI, 2001).

Lovelock e Bishop mostraram que o DMSO é superior ao glicerol para criopreservação de espermatozoides bovino e eritrócito humano e observaram que a solução de DMSO era capaz de manter a motilidade espermática por várias horas em temperatura ambiente, o que sugeria baixa toxicidade celular (BRAYTON, 1986).

O primeiro relato do DMSO como agente farmacológico foi publicado em 1964 e a condição para investigação de novas drogas (IND) foi garantida pela Food and Drug Administration (FDA). Em novembro de 1965 a FDA terminou seus estudos clínicos sobre o DMSO, pois Rubin demonstrou que induzia as alterações lenticulares em alguns animais de laboratórios. Em 1966, a mesma moderou o policiamento para permitir evolução nas pesquisas para tratamento de condições sérias como escleroderma, infecção persistente de Herpes Zoster e severa artite reumatóide, para as quais não havia terapêutica satisfatória. Em 1968, foi permitida sua utilização tópica por até 14 dias de tratamento. Em 1970, a FDA aprovou a utilização na veterinária em doenças musculares em cavalos e em 1972 foi aprovado para uso em cães. No ano de 1978, a FDA autorizou o uso da solução de 50% de DMSO nos casos de cistite intersticial em humanos e em maio de 1980 estabeleceu regulamentos específicos nos testes clínicos do DMSO (BRAYTON, 1986; ALI, 2001).

Revisão de Literatura

A cinomose é uma enfermidade infecto-contagiosa, causada por um RNA-vírus do gênero *Morbillivirus*, família *Paramyxoviridae*, ordem *Mononegavirales*. Possui três formas de apresentação clínica: aguda, subaguda e crônica, com manifestações gastroentéricas, respiratórias e neurológicas. São descritas três formas de encefalite causada pelo vírus da cinomose: encefalite dos cães jovens, encefalite em cães adultos e encefalite do cão velho (CORRÊA & CORRÊA, 1992).

Os Morbillivirus receberam esse nome do diminutivo “morbus”, que significa praga, e historicamente, o termo foi utilizado para diferenciar o sarampo da varíola e da escarlatina. Como um dos seis gêneros da família *Paramyxoviridae*, os Morbillivirus são responsáveis por várias doenças graves em humanos e animais (RIMA & DUPREX, 2006).

1 Estrutura viral

O vírus da cinomose possui diâmetro variável (150-250 μm) com genoma constituído por uma fita simples de RNA contendo aproximadamente 15.690 nucleotídeos (VON MESSLING & CATTANEO, 2002). O genoma é envolto por nucleocapsídeo helicoidal, que consiste na nucleoproteína (NP), associado à proteína matrix e ao complexo polimerase, incluindo as proteínas P (fosfoproteína) e L (polimerase ou grande). A proteína de membrana (M) está localizada na face interna do envelope e exibe as duas glicoproteínas, hemaglutinina (HA) e proteína de fusão (F), que são responsáveis pela fixação na membrana dos plasmócitos (VANDEVELDE & ZURBRIGGEN, 2005; MARTELLA et al., 2007).

A HA possui atividade de hemoaglutinação, sendo responsável pela fixação do vírus na célula hospedeira e pelo tropismo celular, também é reconhecida atualmente por possui mais variações antigênicas. A proteína F proporciona a ligação entre a membrana celular do hospedeiro e o envelope viral e a formação de sincícios (STERN et al., 1995; WILD et al., 1995; LAN et al., 2006). Essas glicoproteínas são derivadas da membrana da célula hospedeira na formação de novos vírions (HASS & BERRETT, 1996).

A proteína matrix dos paramyxovirus ocupa um papel crucial nos processos de montagem e produção de novas partículas virais (BELLINI et al., 1986). As proteínas P e L possuem a função de transcrição e replicação viral (BARRETT, 1999), ao mesmo passo que a NP é a principal reguladora da replicação viral e da transcrição, e

consequentemente, é a primeira proteína exposta ao sistema imune que estimula a produção de anticorpos nos primeiros estágios da infecção (LATHA et al., 2007).

Imhoff et al. (2007), afirmam que o colesterol está envolvido na formação e manutenção de membranas celulares e consequentemente para a formação das proteínas HA e F do envelope viral. Os autores demonstraram que a redução do colesterol do envelope viral reduz a infectividade do vírus da cinomose, e quando este interage com células de menor teor de colesterol há diminuição na formação de sincícios.

2 Resistência viral

O vírus é sensível ao éter e aos solventes lipídicos, instável a pH menor que 4,5 e inativado pelo calor em uma hora a 55°C e em 30 minutos a 60°C. Em climas quentes não sobrevive nos canis após os enfermos terem sido retirados, pois é viável apenas por uma hora a temperatura de 20°C e por 20 minutos nos exsudatos. É inativado com formol a 0,5% em quatro horas, com fenol a 0,75% em 10 minutos a 4°C e com desinfetantes constituídos por amônia quartenária a 0,3% em 10 minutos (CORRÊA & CORRÊA, 1992; GREENE, 2006).

3 Tropismo viral

A molécula sinalizadora da ativação de linfócitos (SLAM) tem mostrado ser um receptor eficiente para as cepas selvagens, considerada um membro da superfamília das imunoglobulinas, podendo controlar a indução de polissacarídeos na produção de IL-12, fator de necrose tumoral (TNF) e óxido nítrico pelos macrófagos. Estudos por imunohistoquímica demonstraram que a expressão da SLAM no SNC é limitada quando comparada com tecidos linfóides. Por isso, sugere-se que existam outros receptores para o vírus (VANDEVELDE & ZURBRIGGEN, 2005; YANAGI et al., 2006). Todos os Morbillivirus apresentam forte linfotropismo relacionado ao receptor SLAM, o que sugere a penetração do vírus no SNC através de células mononucleares de sangue periférico (RUDD et al., 2006).

Plattet et al. (2005) demonstraram que na ausência do receptor SLAM, a proteína HA tem um papel importante na fusão celular. Foi sugerido no referido estudo que a presença ou ausência do receptor SLAM pode determinar a citólise ou a infecção persistente “in vivo”, porém ainda falta identificar o receptor do SNC ao vírus da cinomose em cães.

No estudo realizado por Von Messling et al. (2006), a replicação da cepa selvagem do vírus da cinomose foi demonstrada em células epiteliais do trato respiratório nos estágios tardios da infecção, sugerindo que o acometimento do epitélio pulmonar é precedido pela proliferação nos órgãos linfóides. Foi sugerido por esses autores que o vírus inicialmente induz a expressão da SLAM em linfócitos e macrófagos encontrados nas tonsilas e, posteriormente, utiliza outro receptor ainda desconhecido para infectar células epiteliais.

O vírus da cinomose é pantrópico, porém, existem diversas cepas, algumas mais neurotrópicas e virulentas que outras; sendo as mais patogênicas, a Snyder Hill e R252, que são altamente neurotrópicas e imunossupressoras (CORRÊA & CORRÊA, 1992; MORO & VASCONCELOS, 1998; ALVES et al., 2006).

4 Epidemiologia

Enfermidade de ocorrência mundial afeta animais das famílias *Canidae*, *Mustelidae*, *Hyaenidae*, *Procyonidae*, *Ailuridae*, *Viverridae*, *Felidae*, *Ursidae*, *Phocidae*, *Tayassuidae*, e *Cercopithecidae*. A patogenicidade da infecção pelo vírus da cinomose varia de acordo com a espécie e pode resultar em infecções inaparentes ou causar alta mortalidade. No entanto, é o mais importante agente infeccioso que acomete a população canina, devido à alta morbidade e mortalidade (TIPOLD et al., 1992; SUMMERS et al., 1995; VAN MOLL et al., 1995; HEADLEY & GRAÇA, 2000; GEBARA et al., 2004; CHO & PARK, 2005).

Todos os vírus isolados pertencem a um mesmo sorotipo. As várias amostras isoladas produzem enfermidades com duração e sinais clínicos distintos: algumas causam enfermidade de mediana patogenicidade, enquanto outras causam enfermidade aguda, altamente mortal, com ou sem encefalite aguda, e outras, ainda, causam encefalite tardia, após uma enfermidade branda, ou mesmo após a recuperação da enfermidade aguda. Há ainda aquelas que levam muito tempo para exteriorizar seus efeitos encefalitogênicos, como o que ocorre na encefalite do cão velho ou na “hard pad disease” (CORRÊA & CORRÊA, 1992). As estirpes Onderstepoort e Rockborn são as mais utilizadas em todo o mundo para a elaboração de vacinas contra o vírus da cinomose (MOCHIZUKI et al., 2002). A estirpe Snyder Hill, por apresentar grande potencial neurotrópico, é a mais utilizada em experimentos de inoculação intracerebral,

tanto em estudos da patogênese viral quanto em desafio pós-vacinal (NEGRÃO et al., 2006 apud SLATER, 1970).

A encefalomielite é considerada causa comum na morte de cães e aproximadamente 15% de todas as inflamações do SNC são causadas pelo vírus da cinomose, sendo que essa porcentagem pode ser mais alta em regiões endêmicas (SAITO et al., 2005). Estudos realizados por Silva et al. (2007) confirmam que aproximadamente 12% dos cães necropsiados morreram devido às complicações neurológicas causadas pelo vírus da cinomose.

A cinomose pode ocorrer em qualquer época do ano, mas no inverno há elevação na ocorrência da enfermidade. O cão representa o principal reservatório para o vírus da cinomose e serve como fonte de infecção para animais selvagens. Não há diferença de susceptibilidade da infecção entre machos e fêmeas, no entanto, cães das raças dolicocefálicas são mais afetados que os braquiocefálicos (CORRÊA & CORRÊA, 1992; GRANCHER et al., 2004; GREENE, 2006).

A idade de maior incidência da cinomose nos cães coincide com a época em que diminui a taxa de anticorpos maternos passivamente transmitidos, isto é, entre 60 e 90 dias de idade, demonstrando a relação entre susceptibilidade e a idade, porém, o vírus da cinomose pode acometer animais de todas as idades (CORRÊA & CORRÊA, 1992; BIAZZONO et al., 2001; GEBARA et al., 2004).

Mais de 50% das infecções são subclínicas ou com sinais clínicos moderados (SILVA et al., 2007), ou seja, a taxa de infecção é maior do que o número dos animais que manifestam a enfermidade, estimando-se em até 75% de cães suscetíveis que eliminam o vírus sem qualquer sinal clínico da doença (CORRÊA & CORRÊA, 1992; GEBARA et al., 2004). Acima de 30% dos cães exibem sinais de envolvimento neurológico durante ou após a infecção sistêmica pelo vírus da cinomose e a maior parte dos carnívoros selvagens que morrem pela doença possui evidências de infecção no SNC (RUDD et al., 2006).

A transmissão ocorre principalmente por aerossóis e gotículas que contêm os vírus, através de secreções respiratórias, fezes e urina (CORRÊA & CORRÊA, 1992).

5 Penetração celular

O mecanismo de fusão de membrana é caracterizado pela ação das glicoproteínas virais. A quebra e a ativação destas, em alguns *Paramyxovirus* e *Ortomyxovirus*, dependem de proteases tissulares específicas, que determinam o tropismo restringindo a fusão para tecidos selecionados. O processo de fusão começa com o contato do receptor celular com a proteína HA, esta muda sua conformação transmitindo lateralmente um sinal para a proteína F, que sofre quebra e ativação, expondo o peptídeo de fusão hidrofóbico e inserindo-o na membrana plasmática. O peptídeo reduz o espaço entre a membrana e o envelope, promovendo a fusão (VON MESSLING et al., 2001; VON MESSLING et al., 2004b; YANAGI et al., 2006).

A entrada específica do Morbillivirus em linfócitos é o receptor universal SLAMF, determinante da imunossupressão. O SLAMF é encontrado nas células T, timócitos imaturos, uma porção das células B, monócitos ativados e células dendríticas, permitindo a disseminação viral no sistema linfóide (VON MESSLING et al., 2005).

6 Patogenia

Durante a exposição natural, o vírus da cinomose se propaga por gotas de aerossóis e entra em contato com o epitélio do trato respiratório superior. No período de 24 horas, as partículas virais se replicam nos macrófagos e se disseminam pela via linfática local, para as tonsilas e linfonodos bronqueais (TIPOLD et al., 1992; VANDEVELDE & ZURBRIGGEN, 1995; MORO & VASCONCELOS, 1998; VANDEVELDE & ZURBRIGGEN, 2005; GREENE, 2006).

O estudo de imunohistoquímica realizado por Daimán et al. (2005), mostrou que o vírus se replica primeiro nos macrófagos alveolares, seguidamente nos pneumócitos do tipo II e epitélio respiratório.

Com dois a quatro dias pós-infecção, o número de partículas virais aumenta nas tonsilas, linfonodos retrofaríngeos e bronqueais, mas um número baixo de células mononucleares infectadas é encontrado em outros órgãos linfóides. No período de quatro a seis dias ocorre a replicação viral no sistema linfóide, medula óssea, timo, baço, linfonodos mesentéricos, placas de Peyer, células estomacais, células de Kupffer e células mononucleares ao redor dos vasos pulmonares e bronqueais. A ampla proliferação viral nos órgãos linfóides induz um aumento inicial na temperatura

corporal, entre o segundo e o sexto dia, ocorrendo leucopenia, causada por danos virais nas células linfóides, afetando as células T e B (CORRÊA & CORRÊA, 1992; TIPOLD et al., 1992; VANDEVELDE & ZURBRIGGEN, 1995; MORO & VASCONCELOS, 1998; GREENE, 2006).

A disseminação do vírus no epitélio e nos tecidos do SNC ocorre no período de oito a dez dias pós-infecção, por via hematógena ou pelo líquido dependendo da resposta imune humoral ou celular do animal (TIPOLD et al., 1992; VANDEVELDE & ZURBRIGGEN, 1995; JONES et al., 2000; VANDEVELDE & ZURBRIGGEN, 2005; GREENE, 2006).

Nos cães com níveis intermediários de resposta imune mediada por células e com títulos de anticorpos que aparecem tardiamente após nove a 14 dias, o vírus se dissemina pelos tecidos. Os sinais clínicos podem desaparecer com o aumento da titulação de anticorpos e o vírus é eliminado da maioria dos tecidos, assim que os títulos de anticorpos aumentam, mas podem persistir por longos períodos em tecidos uveais e neurônios e tegumentos, bem como nos coxins plantares. A recuperação da infecção está associada com a imunidade a longo prazo e interrupção da replicação viral. A proteção pode ser comprometida se o cão for exposto a cepa altamente virulenta, dose infectante elevada e/ou sofrer imunossupressão (CORRÊA & CORRÊA, 1992; GREENE, 2006).

7 Patogenia da imunossupressão

Um quadro proeminente da infecção de cães gnobióticos com vírus da cinomose é a linfopenia prolongada e depleção linfóide sistêmica. A infecção fatal pelo vírus da cinomose esta associada à depleção sistêmica de áreas de linfócitos T e B. A infecção resulta em leucopenia devido à linfopenia que se inicia uma semana após a infecção (MORO & VASCONCELOS, 1998). Segundo Schobesberger et al. (2005) a queda significativa de linfócitos foi observada antes da viremia, três dias pós-infecção.

A causa da linfopenia em animais infectados pelo vírus da cinomose ocorre provavelmente devido a habilidade do vírus em se replicar e destruir os tecidos linfóides. A replicação viral causa extenso período de imunossupressão, durante o qual podem ocorrer infecções oportunistas que agravam o quadro clínico. Simultaneamente ocorre a perda de resposta dos linfócitos aos agentes mitogênicos. A infecção pelo vírus “in vitro” e “in vivo” reduz drasticamente a habilidade dos macrófagos e monócitos de

produzir IL-1 e aumenta a síntese de prostaglandina E₂ (PGE₂). Sabe-se que a PGE₂ é um agente imunossupressor, com capacidade de inibir a produção de IL-2 e interferon gama (IFN-g) (MORO & VASCONCELOS, 1998).

Entretanto, nos relatos atuais foi observado que a cinética da infecção viral não está correlacionada com a da depleção de linfócitos e a morte celular. No período de três a seis dias após a infecção, há um aumento na apoptose, porém o vírus não é detectável. Esses efeitos podem ser mediados pela produção de citocinas inflamatórias, que afetam a homeostasia dos linfócitos (KUMAGAI et al., 2004; SCHOBESBERGER et al., 2005). Já nos relatos de Kajita et al. (2006), foi descrito o mecanismo utilizado pela cepa Onderstepoort, capaz de induzir apoptose através da utilização de mediador de apoptose de células de mamíferos (caspase-3), o qual faz uma cascata com transmissão de sinais proteolíticos. Baseado nos relatos de Schobesberger et al. (2005), a determinação do número de linfócitos tem um valor prognóstico no desenvolvimento da doença.

Na cinomose aguda, as células Th1 e CD4⁺ representam o principal alvo para o vírus. A infecção lítica de CD4⁺ pode ter inúmeras conseqüências, pois essa célula tem papel importante na indução e regulação da resposta imune. A depleção de células CD4⁺ associada à atrofia de folículos secundários pode ser relevante para imunossupressão (MORO & VASCONCELOS, 1998; KUMAGAI et al., 2004). Como conseqüência da infecção, a arquitetura do baço e linfonodos são parcialmente destruídas; observando-se drástica infecção nas placas de Peyer e tonsilas sugerindo comprometimento da resposta de anticorpos da mucosa (IgA), que protege contra patógenos que atravessam barreiras epiteliais (VON MESSLING et al., 2004b).

A imunossupressão e resposta imune anormal contribuem na susceptibilidade às infecções secundárias, que podem influenciar bastante na morbidade e mortalidade da doença (HASS & BARRETT, 1996; KAJITA et al., 2006).

8 Neuropatogenia

Alguns estudos sugerem que a infecção do SNC ocorre precocemente, na fase sistêmica da doença. Neste caso, a cinomose progride da doença sistêmica para neurológica, aparentemente por falha do sistema imune na invasão viral no cérebro e na medula espinhal (TIPOLD et al., 1992; SUMMERS et al., 1995; VANDEVELDE & ZURBRIGGEN, 1995).

Os sinais da cinomose quando acomete o SNC são polimórficos. O curso clínico e neuropatológico da encefalomielite está relacionado com a variedade da cepa viral e a idade do animal afetado (TIPOLD et al., 1992; SUMMERS et al., 1995; VANDEVELDE & ZURBRIGGEN, 1995).

Os resultados encontrados por Silva et al. (2007) permitiram concluir que a diferença entre o tipo de lesão desenvolvida por filhotes e adultos pode ser tênue, e que embora possa haver maior frequência de desmielinização em filhotes deve-se levar em consideração que filhotes também desenvolvem lesões mais crônicas, assim como cães adultos podem desenvolver lesões mais agudas.

A difusão viral depende do grau de resposta imune sistêmica do hospedeiro e a presença de anticorpos antivirais. Além disso, a deposição de imunocomplexos pode facilitar a sua difusão no endotélio vascular do SNC. Livre ou associado às plaquetas ou linfócitos, o vírus penetra nas células endoteliais vasculares das meninges, nas células do plexo coróide do quarto ventrículo e nas células endimárias lineares do sistema ventricular (GREENE, 2006). A freqüente ocorrência de lesões periventriculares e subpiais, e o fato do vírus ser encontrado facilmente nas células do plexo coróide e do epêndima, sugerem que penetre nos tecidos cerebrais através do líquido. Neste, o agente pode ser encontrado em células mononucleares fundidas com células endimárias (VANDEVELDE & ZURBRIGGEN, 1995).

A infecção do epitélio do plexo coróide tem mostrado ser produtiva através de todo o curso de infecção com o vírus continuamente sendo produzido. A propagação do vírus através das vias do SNC, provavelmente explica a precoce distribuição de lesões em áreas subependimárias, tais como o córtex cerebral, trato óptico e nervos, velo medular rostral, pedúnculos cerebelares e medula espinhal (GREENE, 2006).

No entanto, nos estudos de Rudd et al. (2006) foram encontradas evidências de que o vírus penetra através do bulbo olfatório e se dissemina pela rota olfatória até o SNC, nos casos de infecção por via aerógena, diferente do que foi proposto anteriormente.

Quando uma efetiva resposta imune antiviral neutralizante é ausente na fase aguda da cinomose, anticorpos IgM anti-vírus da cinomose aparecem nas duas primeiras semanas da infecção. Apesar da ausência de mangitos perivasculars, numerosas células CD8⁺ são encontradas nas lesões agudas desmielinizantes e também distribuídas difusamente no parênquima cerebral, correlacionado de forma desigual com áreas de infecção viral. No líquido destes animais altos títulos de IL-8 foram

encontrados, isto sugere que a ativação inicial das células da micróglia serve como uma alavanca para a invasão de células T no SNC (VANDEVELDE & ZURBRIGGEN, 2005).

A IL-1 é importante na patogênese de todos os tipos de lesões neurológicas causadas pelo vírus da cinomose. É responsável por estimular a proliferação de astrócitos, que pode significar o início das lesões, como as encontradas na cinomose não inflamatória subaguda, que evidenciam frequentemente astrogliose reativa. Encontrada principalmente nos espaços perivasculares da inflamação subaguda e nas lesões crônicas, a IL-1 age de forma importante na propagação da doença (GRÖNE et al., 2000).

A encefalite aguda, que ocorre inicialmente no curso da infecção em animais jovens ou imunossuprimidos, é caracterizada por injúria viral direta (SUMMERS et al., 1995; GEBARA et al., 2004; GREENE, 2006). O vírus causa lesão multifocal nas substâncias cinzenta e branca. Lesões na substância cinzenta são resultados de infecção neuronal e necrose, e podem levar a uma poliencefalomalácea predominante. Lesões na substância branca são caracterizadas por danos mielínicos e estão associados com replicação viral nas células da glia. Mudanças inflamatórias são mínimas devido à imunodeficiência resultante de imaturidade fisiológica do sistema imune e/ou decorrente da imunossupressão viral induzida (VANDEVELDE & ZURBRIGGEN, 1995; GEBARA et al., 2004; GREENE, 2006).

Durante a fase inicial da encefalite a expressão do RNA mensageiro (mRNA) e da proteína viral são altas nas áreas afetadas e uma possível consequência é o aumento da produção do Fator de Necrose Tumoral (TNF) pelos astrócitos. A sua importância na progressão das lesões cerebrais é também sustentada pela abundância do vírus na forma imunorreativa presente nas lesões não inflamatórias, que se caracterizam pela desmielinização. O TNF tem sido evidenciado como causa da destruição de oligodendrócitos e perda de mielina (GRÖNE et al., 2000).

A encefalite multifocal em cães adultos acomete frequentemente animais entre quatro e seis anos, com curso crônico. Esta enfermidade não é precedida nem coincidente com os sinais sistêmicos que são vistos nos cães jovens (CORRÊA & CORRÊA, 1992). O antígeno do vírus fica restrito a poucos astrócitos e a expressão do MHC é proeminente em todas as células da micróglia, sendo responsável pela desmielinização contínua e disseminada infiltração mononuclear perivascular. As alterações iniciam com hiperplasia dos astrócitos e proliferação microglial em estruturas

subpiais e subependimárias na substância branca. Esta forma também está associada com a concentração alta de anticorpos antimielínicos, podendo ser uma reação secundária ao processo inflamatório. Anticorpos contra o vírus interagem com macrófagos infectados em lesões no SNC, causando sua ativação com liberação de radicais livres de oxigênio, do tipo superóxido. Esta atividade por sua vez pode levar à destruição de oligodendrócitos e bainha de mielina (TIPOLD et al., 1992; SUMMERS et al., 1995; GEBARA et al., 2004; GREENE, 2006; STEIN et al., 2006).

Os estudos de Bürge et al. (1989) demonstraram que os anticorpos antivirais estimulam a produção de radicais livres de oxigênio (ROS) em culturas cerebrais de cães infectadas com o vírus da cinomose. O mecanismo de produção de ROS depende da expressão do antígeno viral na superfície de células infectadas marcadas com receptores Fc (receptor de anticorpos de alta afinidade) nos macrófagos. Os ROS fazem degradação de fosfolipídios na parte cortical do cérebro, destruindo proteínas da bainha de mielina e interferindo na produção da mesma.

Nesta fase da doença, nos infiltrados perivasculares encontramos CD8+, CD4+ e linfócitos B, e citocinas pro-inflamatórias, IL-1, IL-6 e IL-12, indicando uma resposta imune-mediada (WÜNSCHMANN et al., 1999; MARKUS et al., 2002).

A produção de TNF e também de IL-1 e IL-6 pelas células locais é importante na indução de moléculas de adesão endotelial, como pré-requisito para a migração de células inflamatórias para o SNC e a progressão das lesões no estágio crônico, caracterizado por inflamação severa. Além disso, a produção de TNF por células inflamatórias não é responsável apenas pelo processo de desmielinização pela destruição direta de oligodendrócitos resultando na perda de mielina, mas pode levar ao recrutamento de mais leucócitos (GRÖNE et al., 2000).

Os estudos realizados por Vandeveld & Zurbriggen (1995) mostraram que o vírus persiste em áreas na camada branca fora das lesões inflamatórias desmielinizantes. Isto acontece no desenvolvimento progressivo da doença crônica se a resposta imune for mais lenta do que a replicação viral. A persistência viral é a chave para a patogênese das lesões crônicas (ZURBRIGGEN et al., 1995a; ZURBRIGGEN et al., 1995b; VANDEVELDE & ZURBRIGGEN, 2005).

É possível que o vírus reduza sua expressão nestas áreas do SNC, em analogia a panencefalite subaguda esclerosante em humanos. A persistência está associada com a diminuição da regulação dos genes que codificam proteínas de membrana e superfície, diminuindo, desta forma, a sua expressão na superfície celular. Estas células

persistentemente infectadas podem continuar a sobreviver, pois a infecção é restrita e a difusão viral não provoca lise celular (ZURBRIGGEN et al., 1995a; ZURBRIGGEN et al., 1995b; MEERTENS et al., 2003; VANDEVELDE & ZURBRIGGEN, 2005).

No estudo ultra-estrutural de Meertens et al. (2003), foram encontrados relativamente pequenos indícios do vírus nas células persistentemente infectadas, mesmo que o nucleocápsídeo seja encontrado em grandes quantidades e as glicoproteínas expostas. O autor demonstra a diferença entre as cepas Onderstepoort e A75/17 com relação à persistência viral. A cepa A75/17 foi capaz de diminuir a expressão de suas proteínas de superfície (H e F) em relação à Onderstepoort, com isso, pode-se observar características distintas entre as cepas virais com relação a persistência viral.

Foi sugerido que a infecção de astrócitos pelo vírus da cinomose não inicia uma reação inflamatória, ocorre por uma ação viral em limitar o seu desenvolvimento, diminuir a destruição celular, não liberar proteínas virais e debris celulares no meio extracelular. A persistência do vírus nos casos de cinomose é favorecida pela estratégia do mesmo, que se dissemina com impedimento ou retardamento da sua detecção pelo sistema imune, de maneira similar ao que propôs Oldstone e Rall para outros sistemas virais (ZURBRIGGEN et al., 1995a; ZURBRIGGEN et al., 1995b; VANDEVELDE & ZURBRIGGEN, 2005).

8.1 Encefalite do Cão Velho ou “Old Dog Encephalitis”

A encefalite do cão velho é comumente observada em cães com mais de seis anos e se caracteriza por ser principalmente uma panencefalite. É uma forma rara, crônica, de caráter inflamatório progressivo na camada cinzenta dos hemisférios cerebrais e do tronco encefálico, resultante da persistência viral nos neurônios após infecção aguda pelo vírus da cinomose. Esta enfermidade acomete animais que são imunocompetentes e que apresentam a persistência viral no SNC, com lesões restritas e caracterizadas por infiltração perivascular disseminada com linfócitos e plasmócitos, proliferação difusa da micróglia, astrogliose, degeneração neuronal e neuronofagia. Estas lesões estão em todo córtex cerebral e também no núcleo basal, tálamo e hipotálamo. A resposta imune é dominada por infiltrado de células T e aumento da regulação do MHC classe II (CORRÊA & CORRÊA, 1992; SUMMERS et al., 1995; GREENE, 2006). Geralmente o cerebelo não é acometido nesta forma (CORRÊA & CORRÊA, 1992).

8.2 Desmielinização

O início das lesões desmielinizantes ocorre aproximadamente três semanas pós-infecção e durante o período de intensa imunossupressão e ausência de inflamação. A desmielinização coincide com a replicação viral nas células da glia, com predileção por algumas regiões como cerebelo, sistema óptico e medula espinhal (TIPOLD et al., 1992; SUMMERS et al., 1995; VANDEVELDE, 2004; VANDEVELDE & ZURBRIGGEN, 2005).

O sistema matrix metaloproteases (MMP) está envolvido na patogênese da desmielinização, por abrir a barreira hemato-encefálica pela quebra de componentes da membrana basal, favorecendo a migração de células inflamatórias para o interior do SNC, desencadeando a liberação de TNF- α , que desintegra a bainha de mielina (MIAO et al., 2003; VANDEVELDE, 2004).

A reconstituição da matrix extracelular ocorre sob o controle do fator de crescimento por equilibrar a secreção de MMP e seus inibidores tissulares (TIMP). Então, um desbalanço entre MMP e TIMP resulta em início e progressão das lesões. Uma redução de TIMP nas lesões crônicas com aumento do nível de expressão de MMP favorece a hipótese para a progressão das lesões na encefalite desmielinizante da cinomose (MIAO et al., 2003).

No estudo realizado por Khuth et al. (2001) foi possível observar a expressão de MMP e TIMP, que estão com a regulação aumentada em locais específicos, ocorrendo principalmente na região rostral do cérebro, córtex, hipocampo e hipotálamo. Concomitantemente há um aumento da regulação ou indução de citocinas pró-inflamatórias, havendo uma relação entre a replicação viral no SNC, a produção citocinas inflamatórias e essa a quantidade de MMP e TIMP. Sugere-se que a indução de citocinas inflamatórias é causada pela replicação viral, sendo responsáveis pela regulação de MMP e TIMP.

O exato mecanismo do início das lesões da mielina no estágio agudo imunossupressor da cinomose ainda está incerto (STEIN et al., 2004; VANDEVELDE, 2004; VANDEVELDE & ZURBRIGGEN, 2005). Segundo Gröne et al. (2000), as áreas com desmielinização recente e sem inflamação são consideradas uma consequência da replicação viral no interior de oligodentrócitos levando a destruição celular e a perda de

habilidade para manter a bainha de mielina (MIAO et al., 2003; VANDEVELDE & ZURBRIGGEN, 2005).

A explicação óbvia segundo Vandeveld & Zurbruggen (1995) para o fenômeno de desmielinização é a infecção de oligodendrócitos, que são células produtoras de mielina. Porém, em estudos de microscopia óptica, observaram que a maioria das células infectadas são astrócitos. Estudos realizados em microscópios eletrônicos revelaram que a infecção de oligodendrócitos é rara na cinomose. Concluíram em seus estudos que o vírus causa uma infecção discreta nos oligodendrócitos, que mesmo assim pode ser responsável pelo fenômeno de desmielinização.

Estudo ultra-estrutural revelou microvacuolização e perda de organelas por degeneração de oligodendrócitos. As mudanças morfológicas são precedidas por disfunções metabólicas nestas células, com a diminuição drástica da atividade da cerebrosídeo sulfo-transferase (uma enzima específica de oligodendrócitos) após infecção do vírus. É possível que a transcrição do vírus interfira nas funções especializadas destas células, que são necessárias para manutenção das membranas mielínicas (VANDEVELDE & ZURBRIGGEN, 1995; VANDEVELDE, 2004; VANDEVELDE & ZURBRIGGEN, 2005).

Nos achados de Stein et al. (2004), o vírus induziu a ativação das células da micróglia, que podem ter um importante impacto na patogênese de desmielinização aguda da cinomose, devido a um difuso aumento da regulação do MHC na camada branca. A ativação destas células libera fatores tóxicos que podem induzir a destruição da mielina (MIAO et al., 2003; VANDEVELDE & ZURBRIGGEN, 2005; STEIN et al., 2006).

A formação de radicais livres de oxigênio (ROS) pela micróglia pode alterar a transmissão sináptica e destruir diretamente os neurônios. Esta formação de ROS pode ser considerada responsável pela atividade convulsiva em alguns animais (STEIN et al., 2006).

A desmielinização crônica coincide com a recuperação do sistema imune, seis a sete semanas pós-infecção, manguitos perivasculares linfocitários, plasmócitos e monócitos ocorrem inicialmente nas lesões induzidas pelo vírus no cérebro. A reação inflamatória nas lesões desmielinizantes pode levar a progressão da destruição do tecido. Citocinas pro-inflamatórias estão aumentadas, mas as citocinas anti-inflamatórias permanecem em níveis normais. É possível que astrócitos, o primeiro alvo do vírus,

participem da amplificação desta resposta imune (VANDEVELDE & ZURBRIGGEN, 2005).

Lesões crônicas desmielinizantes são caracterizadas pela redução ou possível perda das proteínas virais, com aumento da regulação do MHC e infiltração massiva de CD8+, CD4+ e células B (MIAO et al., 2003; VANDEVELDE, 2004).

O estágio crônico da doença está caracterizado por complicações imunológicas. A inflamação está associada com a síntese de anticorpos citotóxicos-dependentes, que podem induzir a desmielinização por ação dos anticorpos anti-mielina. Vandeveld & Zurbriggen (1995) concluíram que as reações auto-imunes na cinomose são provavelmente um epifenômeno e que não são primárias neste processo de desmielinização (TIPOLD et al., 1992; VANDEVELDE, 2004).

O experimento realizado por Krakowka et al. (1973) descreve a presença de anticorpos anti-mielina no soro de cães infectados apresentando encefalomielite desmielinizante. Baixos níveis de anticorpos (<1:8) foram detectados nos soros do grupo controle, possivelmente estes aparecem no momento da mielinização no cérebro. A demonstração de imunoglobulinas nas lesões desmielinizantes no SNC de cães infectados com o vírus é uma tentativa de provar que estas possuem um papel ativo na progressão da doença. Os autores concluíram que estes anticorpos são fatores que contribuem na patogênese da desmielinização da cinomose e funcionam amplificando as lesões básicas não inflamatórias induzidas pelo vírus no cérebro.

Anticorpos anti-mielina no soro podem estar presentes por longo tempo na cinomose. Estes anticorpos são produzidos no local das lesões cerebrais inflamatórias e podem ser encontrados no líquido de cães infectados. Resposta mediada por células contra a proteína básica da mielina foi encontrada em cães experimentalmente infectados (VANDEVELDE & ZURBRIGGEN, 2005).

No entanto, Summers et al. (1995), descrevem que fragmentos de mielina são fagocitados, principalmente por células da micróglia, menos por astrócitos e raramente por oligodendrócitos, induzindo a retirada destes fragmentos pelos macrófagos.

Macrófagos, que estão em grande número nas lesões de cinomose, possuem um papel importante. Anticorpos antivirais destinados a superfícies de células infectadas com o vírus interagem com os receptores Fc de macrófagos e essa interação resulta numa explosão respiratória dos mesmos que liberam ROS. Esses radicais podem ser responsáveis pela destruição de oligodendrócitos e compartimentos de mielina. Quimicamente a produção de ROS no sistema xantina/xantina-oxidase, seletivamente

destrói culturas de oligodentrócitos, que são ricos em compostos ferrosos (VANDEVELDE, 2004; VANDEVELDE & ZURBRIGGEN, 2005).

Existem algumas evidências experimentais que o vírus induz alterações nas funções de macrófagos. A produção de IL-1 por macrófagos “in vitro” pode diminuir e de prostaglandina E aumentar como resultado de infecção viral. A fagocitose, dependente ou independente de receptores Fc, assim como a habilidade de liberar ROS e a atividade procoagulante dos macrófagos também é alterada após a infecção. Considerando a relação entre o sistema de coagulação e funções inflamatórias, essas observações mostram que a infecção pelo vírus da cinomose pode desencadear um potencial destrutivo dos macrófagos e providenciar, além disso, suporte para a hipótese que a desmielinização “espectadora” ocorra na cinomose crônica (VANDEVELDE & ZURBRIGGEN, 1995).

9 Sinais Clínicos

Os cães clinicamente acometidos encontram com as seguintes características: falta de vacinação ou doses incompletas, vacinas inapropriadas, colostro da mãe com títulos inadequados de anticorpos, imunossupressão e história de exposição a cães infectados (GREENE, 2006).

Poderão ocorrer sinais clínicos digestivos, respiratórios, ou neurológicos, isoladamente, conjuntamente ou alternadamente. Às vezes surgem sinais neurológicos diretamente, o que não é comum (CORRÊA & CORRÊA, 1992).

Após período de incubação de seis dias ou mais, surge a primeira fase clínica da doença, que corresponde ao pico febril e à localização nos órgãos linfóides, onde ocorre hipertermia até 41°C, anorexia, congestão conjuntival discreta e corrimento seroso ocular e nasal, sendo que geralmente esta fase passa despercebida ao proprietário. Seguem-se dois a três dias, onde tudo parece voltar ao normal, mas se houver progresso do vírus por falta de anticorpos, haverá disseminação para as células epiteliais e ocorrendo o segundo pico febril com sintomas característicos (CORRÊA & CORRÊA, 1992).

Os sinais no sistema respiratório são: rinite, conjuntivite, descarga nasocular serosa e mucopurulenta, pneumonia intersticial no início e posterior evolução para broncopneumonia devido à infecção secundária, caracterizada por tosse estridente,

úmida e produtiva, além de crepitações na auscultação (CORRÊA & CORRÊA, 1992; GREENE, 2006).

No sistema gastrointestinal há ocorrência de vômitos intermitentes, anorexia, diarreia pastosa a líquida, escura, com ou sem presença de sangue, ocorrendo desidratação em poucos animais (CORRÊA & CORRÊA, 1992; GREENE, 2006).

Os sinais neurológicos são múltiplos e conseqüentes da replicação viral em neurônios e células gliais, refletindo desta forma, a distribuição do vírus e as conseqüentes lesões no SNC. Estes podem apresentar-se tardiamente, semanas, meses ou anos após a recuperação de infecções inaparentes, ou da cinomose aguda (TIPOLD et al., 1992; GREENE, 2006), porém, esta apresentação tardia é rara com intervalos de meses ou anos.

Hiperestesia e rigidez cervical e para-espinhal podem ser encontrados em cães como resultado de inflamação das meninges, entretanto, sinais de lesões encefálicas são predominantes em relação aos sinais meningeais (GREENE, 2006).

Quando há acometimento da medula espinhal sinais como paresia e incordenação de membros são os únicos achados neurológicos. Outros sinais comuns incluem a doença vestibular com movimento de cabeça, nistagmo, déficits em outros nervos cranianos e da propriocepção; e na doença cerebelar encontramos ataxia com hipermetria e cabeça pendente. Cegueira uni ou bilateral, às vezes com midríase, ocorrem devido o freqüente envolvimento do trato e nervo ópticos. Atrofia muscular generalizada é rara como apresentação clínica de lesão focal no córtex (CORRÊA & CORRÊA, 1992; TIPOLD et al., 1992; GREENE, 2006).

Podem ocorrer convulsões parciais ou generalizadas, porém, a convulsão do tipo “goma de mascar”, classicamente associada com a infecção pelo vírus da cinomose, frequentemente ocorre em cães que desenvolvem poliencefalomalácia nos lobos temporais (GREENE, 2006).

Outros sinais neurológicos incluem: apatia, estupor, alterações de comportamento, reflexos espinhais anormais, hiperestesia, mioclonias e incontinência urinária (MORO et al., 2003).

As mioclonias ou contrações tônico-clônicas são sinais comuns da cinomose e podem estar presentes quando não há outros sinais neurológicos. Acometem um único músculo ou grupo de músculos, como auriculares, temporais, reto-abdominal, flexores dos membros (CORRÊA & CORRÊA, 1992; TIPOLD et al., 1992; SUMMERS et al., 1995; GREENE, 2006). O mecanismo neural para as mioclonias se origina com

irritação local de neurônios motores da medula espinhal ou do núcleo do nervo craniano. É considerado um sinal patognomônico da cinomose, porém também pode ser observada em outras doenças inflamatórias do sistema nervoso dos cães (TIPOLD et al., 1992; GREENE, 2006).

Silva et al. (2007) demonstram que a mioclonia foi o sinal neurológico mais prevalente com 38,4% dos cães afetados. Segundo estes autores, a cinomose sempre deve ser considerada a primeira opção no estabelecimento dos diagnósticos diferenciais frente a um cão com mioclonia.

Na encefalite do cão velho, o sinal neurológico mais comum é a diminuição visual. É uma enfermidade progressiva e acompanhada pelo desenvolvimento de depressão mental, andar compulsivo em círculos, mioclonias, hipercinesia e obstinada vontade de querer manter a cabeça pressionada contra paredes ou objetos. O animal afetado pode manifestar uma mudança de personalidade e falha em reconhecer pessoas, objetos e outros animais (CORRÊA & CORRÊA, 1992; SUMMERS et al., 1995; VITE, 2005).

10 Doenças relacionadas com o vírus da cinomose

Silva et al. (2007) demonstraram que a toxoplasmose é a enfermidade mais freqüentemente associada à cinomose, no entanto, dos 620 casos estudados apenas cinco apresentaram a co-infecção e em apenas um animal foi observado lesões no encéfalo.

Poucos estudos mencionam a presença do antígeno do vírus da cinomose ou do RNA viral na medula óssea e suas lesões em cães infectados. Contudo, o RNA do vírus da cinomose tem sido demonstrado na doença de Paget em tecidos da medula em humanos. Em cães, observa-se uma osteoesclerose metafísica em 42% dos cães infectados com o vírus. Esta lesão foi encontrada em metáfises de úmero, rádio, ulna, fêmur, tibia e fíbula, com aumento da densidade medular. As lesões podem variar de moderada a severa e pode ser encontrada em animais com sintomatologia sistêmica ou neurológica (BAUMGÄRTNER et al., 1995).

Em cães experimentalmente infectados, as alterações foram detectadas com oito dias após a infecção e se caracterizam por necrose de osteoclastos. Entre 23 e 32 dias após a infecção, necrose e atrofia de osteoblastos e de células da medula óssea estão presentes. As células da medula, osteoclastos e osteoblastos sofrem uma redução moderada a severa, principalmente nas metáfises. A técnica de imuno-histoquímica

demonstra a presença do antígeno viral no citoplasma e núcleo de células mielóides, osteoblastos, osteoclastos e, ocasionalmente, em osteócitos. Não são encontradas lesões em animais velhos e não há indícios de persistência viral nos tecidos da medula óssea ou alterações permanentes na membrana (BAUMGÄRTNER et al., 1995).

11 Patologia Clínica

Sabe-se que a resposta hematológica varia de um indivíduo para outro, bem como a fase da infecção viral (SILVA et al., 2005).

A anemia pode ser atribuída ao aumento da destruição dos eritrócitos ou pela diminuição de sua produção. A destruição é determinada pela presença do vírus no eritrócito ou pela deposição de imunocomplexos na membrana destas células. A queda da produção pode ser atribuída à falência da medula óssea devido ao estresse desencadeado pela doença. Na maioria dos casos, os eritrócitos apresentam-se normocíticos e normocrômicos e não há sinais de regeneração medular, como hemácias nucleadas, policromasia, anisocitose ou corpúsculos de Howell-Jolly (SILVA et al., 2005).

Os achados hematológicos freqüentes são linfopenia, às vezes combinado com leucopenia ou leucocitose, anemia, monocitose e raramente trombocitopenia (TIPOLD et al., 1992). O leucograma é a característica mais variável e as infecções bacterianas oportunistas no trato digestivo e respiratório podem ser observadas, justificando a leucocitose por neutrofilia e o desvio a esquerda (SILVA et al., 2005).

A linfopenia é uma característica consistente, mas pode estar ausente em alguns casos. Em estudos, Silva et al. (2005) observaram que cães jovens infectados experimentalmente com o vírus da cinomose desenvolveram marcada linfopenia, achado freqüente e relevante no experimento.

Segundo Corrêa & Corrêa (1992) a linfopenia absoluta é causada pela depleção dos tecidos linfóides e depende da cepa viral ser mais ou menos imunossupressora e ocorre, principalmente, em cães jovens que desenvolvem rapidamente a enfermidade sistêmica ou sinais neurológicos precoces.

Nas observações encontradas por Silva et al. (2005), a trombocitopenia é um achado freqüente. Os autores sugerem que na infecção por *Morbillivirus* ocorre aumento de anticorpos anti-plaquetas e a trombocitopenia é imunomediada com remoção das plaquetas pelo sistema reticulo endotelial.

As inclusões citoplasmáticas denominadas corpúsculo de Lentz ou Sinigaglia-Lentz, que aparecem em algumas células do sangue, em pequeno número nos linfócitos, neutrófilos e hemácias, possuem particular relevância no diagnóstico clínico da cinomose. A ocorrência dessas inclusões em leucócitos evidencia a presença do vírus, mas quando não encontradas possuem pouco valor na determinação da ausência do vírus, já que são observadas somente na fase virêmica da doença (CORRÊA & CORRÊA, 1992; JONES et al., 2000).

No exame bioquímico os achados não são específicos para a infecção, porém, pode ocorrer hipoalbuminemia ou hiperglobulinemia. Evidente hipoglobulinemia é encontrada em filhotes infectados antes de nascer ou neonatos com imunossupressão persistente causada pelo vírus (TIPOLD et al., 1992; GREENE, 2006).

Segundo Silva et al. (2005), lesões no epitélio intestinal causadas pelo vírus, com conseqüente diarreia, além da própria apatia determinada pela doença levam o animal a recusar o alimento. Desta forma, a diminuição da ingestão protéica bem como o comprometimento intestinal são fatores determinantes na redução dos níveis séricos da albumina na cinomose. A elevação plasmática das globulinas é freqüente em várias reações inflamatórias e, em particular, o componente alfa 2 aumenta significativamente nas infecções bacterianas e víricas, notadamente na cinomose.

O líquido cefalorraquidiano (LCR) é um fluido aquoso e incolor que ocupa o espaço subaracnóide, os ventrículos cerebrais e o canal central da medula. Possui funções de proteção do sistema nervoso contra agentes infecciosos, permitindo a distribuição de elementos de defesa como leucócitos e anticorpos, e auxilia na troca de metabólitos entre o sangue e o cérebro (FEITOSA et al., 1997a; GAMA et al., 2005).

A análise do LCR é um dos melhores métodos de diagnóstico das afecções do encéfalo e da medula espinhal. O exame do LCR está indicado em todo paciente com doença neurológica, na qual não há diagnóstico óbvio, incluindo casos com suspeita de afecção intracraniana (PELLEGRINO et al., 2003).

Segundo Gama et al. (2005), as características físico-químicas do líquido tais como, coloração, aspecto, densidade, pH e glicose, não foram capazes de contribuir para indicar qualquer anormalidade líquórica nas diferentes fases da cinomose. Por outro lado, o componente protéico e a celularidade líquórica mostraram alterações importantes na presença de sinais neurológicos, porém na ausência destes, não adicionam informações capazes de levar a detecção precoce de lesões do SNC em colaboração ao diagnóstico da referida enfermidade.

A turbidez no líquido ocorre geralmente devido a um aumento na celularidade da amostra, com presença de 500 ou mais células/ μL . No entanto, como demonstrado no estudo de Feitosa et al. (1997b) a turbidez não pode ser creditada exclusivamente a esse aumento do número de células, já que algumas amostras de líquido límpido apresentavam 380 leucócitos/ μL , enquanto outras, uma discreta turbidez com 400 leucócitos/ μL . Desta forma, afirmaram que o aspecto do líquido não é um bom indicativo da sua normalidade.

Feitosa et al. (1997a) constataram diferenças estatísticas significantes entre os níveis de CPK no líquido de cães saudáveis e com cinomose. Segundo a literatura existente, lesões no tecido nervoso podem levar a um aumento na concentração líquórica de CPK, além disso, a degeneração da bainha de mielina também pode ser responsável por essa elevação. Foi observada correlação positiva entre os níveis de CPK no líquido e no soro, que pode estar relacionada com casos de convulsões, quando ocorre aumento da atividade da CPK sérica devido aos movimentos musculares intensos e pela liberação das enzimas contidas nos músculos esqueléticos. No entanto, nem todos os animais manifestam episódios convulsivos, sugerindo que este aumento não se deva somente à ocorrência de movimentos musculares intensos, mas também a um decúbito prolongado, decorrente de paresia de membros manifestada em muitos animais.

Durante o estágio de desmielinização aguda não ocorrem reações inflamatórias, e consequentemente, as proteínas e as células do líquido podem estar normais (TIPOLD et al., 1992; GREENE, 2006).

No estágio crônico com a inflamação, ocorre aumento de proteína (acima de 25 mg/dL), principalmente representado por IgG antivírus e aumento de células (mais que 10/ μl) com predomínio de linfócitos (CORRÊA & CORRÊA, 1992; TIPOLD et al., 1992; SUMMERS et al., 1995; GREENE, 2006).

O aumento dos anticorpos anti-vírus no líquido oferece evidência da encefalite pela cinomose, pois estes anticorpos são produzidos no local, e o aumento não é encontrado em animais vacinados ou na cinomose sistêmica sem alterações neurológicas (GREENE, 2006).

12 Achados anátomo-patológicos

No sistema respiratório, pode ser detectado um exsudato purulento ou catarral nas mucosas nasal e da faringe. Nas secções microscópicas, com frequência são

observados corpúsculos de inclusão citoplasmáticos e intranucleares nas células associadas ao exsudato (JONES, et al., 2000).

No pulmão, as lesões podem se manifestar por broncopneumonia purulenta onde brônquios e alvéolos adjacentes apresentam-se repletos de neutrófilos, mucina, e debris teciduais. No primeiro estágio o exsudato pode conter sangue, neutrófilos e células mononucleares que revestem as paredes alveolares constituindo a única evidência da infecção. Em alguns casos formam células gigantes multinucleadas no revestimento brônquico, nos septos alveolares e livremente nos alvéolos. São encontradas inclusões citoplasmáticas e, menos freqüentemente, intranucleares nessas células gigantes, em células mononucleares e nas células epiteliais dos brônquios e bronquíolos (JONES, et al., 2000). Segundo Damián et al. (2005), as lesões no pulmão são caracterizadas por bronquiolite necrotizante, necrose em pneumócitos do tipo II, pneumonia intersticial e broncopneumonia supurativa. Entretanto, o vírus causa imunossupressão, permitindo a associação com outros vírus e com as bactérias, *Bordetella bronchiseptica*, *Staphylococcus* spp., *Streptococcus* spp., *Klebsiella pneumoniae* e *Escherichia coli*.

Na pele, particularmente no abdomen, pode ocorrer dermatite vesicular e pustular. As vesículas e pústulas estão confinadas à camada de Malpighi da epiderme, mas é comum alguma congestão da derme subjacente, e ocasionalmente ocorre infiltração por linfócitos. Corpúsculos de inclusão nucleares ou citoplasmáticos podem estar presentes no interior das células epiteliais, especialmente as das glândulas sebáceas. Nos coxins plantares, a intensa proliferação da camada de queratina da epiderme resulta numa lesão clinicamente identificável e característica (JONES, et al., 2000).

O epitélio do trato urinário, particularmente da pelve renal e bexiga, pode conter vasos congestionados e corpúsculos de inclusão citoplasmáticos ou intranucleares (JONES, et al., 2000).

O estômago e intestinos podem conter grande número de inclusões citoplasmáticas e intranucleares no epitélio de revestimento. No intestino grosso, há excesso de exsudato mucoso, podendo demonstrar congestão e infiltração de linfócitos na lâmina própria (JONES, et al., 2000).

Em alguns casos, corpúsculos de inclusão podem ser observados no epitélio da conjuntiva (JONES, et al., 2000).

A cinomose não causa lesões significativas no fígado, embora inclusões possam estar presentes no epitélio biliar (JONES, et al., 2000).

No SNC as lesões podem ser detectadas somente por meios de estudos microscópicos. A substância branca subcortical do cérebro é habitualmente poupada e as lesões caracterizam-se por áreas de destruição com nítida delimitação, particularmente nos tratos mielinizados. Grande número de micróglia, astrócitos e linfócitos são encontrados nos espaços de Virchow-Robin em torno dos vasos e estão associados ao aspecto esponjoso da camada branca. Ocasionalmente, células “gitter” estão reunidas em torno de áreas de necrose na substância branca. Estas grandes células fagocitárias são originadas da micróglia e possuem citoplasma distendido com grânulos de lipídios, características de algumas lesões cerebrais. Inclusões intranucleares no interior dos astrócitos multinucleados e micróglias constituem um achado característico dessa lesão. É possível observar inclusões intranucleares no interior de astrócitos multinucleados e de micróglias, constituindo um achado característico. No entanto, raramente podem ser detectados nos neurônios corpúsculos de inclusão citoplasmáticos ou nucleares (SUMMERS et al., 1995; JONES et al., 2000).

No cérebro, a lesão é um tanto parecida, mas a característica microscópica mais notável é o aparente aumento de capilares. Esse aspecto pode ser resultante da proliferação de capilares, ou mais provavelmente, da distensão e congestão de vasos sangüíneos e da perda do parênquima circundante, o que faz com que a vascularização assuma um aspecto mais saliente. Em muitos casos, as lesões se limitam às folhas cerebelares, ou véu medular anterior (VON MOLL et al., 1995; JONES, et al., 2000).

Corpúsculos de inclusão viral intranucleares e intracitoplasmáticos estão presentes em astrócitos e células da superfície ependimal (SUMMERS et al., 1995; GEBARA et al., 2004).

Nos achados de Liang et al. (2007), as lesões no cérebro de cães infectados são desmielinização e infiltrado de células gliais no cerebelo, pedúnculos cerebelares e no tronco encefálico. O antígeno viral pode estar presente nas camadas cinzenta e branca e no canal central da medula espinhal. Foi encontrada uma alta porcentagem de corpúsculos de inclusão (87,5%) neste estudo, sendo que as inclusões intranucleares foram mais comuns do que as intracitoplasmáticas.

Na cinomose aguda, lesões na camada branca são caracterizadas por alterações vacuolares, moderada microgliose e uma vasta inflamação mononuclear perivascular. As alterações subagudas são caracterizadas pelo aparecimento, de moderada a severa desmielinização, malácia com infiltrado de células gitter, com variadas hipertrofias e hiperplasias de astrócitos, com poucos astrócitos e gemistócitos multinucleados e um

mínimo a severo infiltrado linfoplasmático nos espaços perivasculares. As lesões crônicas são caracterizadas por uma ampla e densa proliferação de astrócitos e desmielinização com ou sem infiltrado linfoplasmático nos espaços perivasculares (LIANG et al., 2007).

Por achados imunohistoquímicos de Von Moll et al. (1995), o antígeno viral foi encontrado predominantemente na camada cinzenta do cerebelo, menos freqüente no cérebro e na camada branca do cerebelo. O antígeno foi observado em astrócitos e neurônios. Contudo, também foi detectado no endotélio vascular, células da meninge e linfócitos.

Também ocorrem alterações degenerativas nos neurônios, aparentemente resultantes da invasão primária viral e de lesões retrógradas secundárias à lesão axonal. Ocorre picnose, cromatólise, gliose, e neuronofagia. Raramente, podem ser detectados nos neurônios corpúsculos de inclusão citoplasmáticos ou intranucleares. Na maioria dos casos pode estar presente uma leptomeningite, principalmente caracterizada pela infiltração de linfócitos (JONES, et al., 2000).

Na retina, ocorre congestão, edema, formação de manguitos perivasculares com linfócitos, degeneração de células ganglionares, e gliose. Também podem estar presentes neurite do nervo óptico acompanhada de desmielinização e gliose. Estão presentes inclusões intranucleares na glia da retina e do nervo óptico. As lesões conduzem à atrofia retinal de todas as camadas. Habitualmente, também ocorrem tumefação e proliferação do epitélio pigmentar da retina. Uma uveíte anterior, caracterizada pela infiltração de células mononucleares juntamente com células gigantes multinucleadas (JONES, et al., 2000).

Na encefalite do cão velho, a lesão que mais chama atenção no SNC é a significativa formação de manguitos perivasculares, quase que exclusivamente por populações de linfócitos. Os manguitos, que são muito espessos, estão presentes tanto na substância cinzenta, como na substância branca. Pode ocorrer desmielinização focal e necrose disseminada dos neurônios. São encontrados corpúsculos de inclusão intranucleares nas células gliais e nos neurônios (SUMMERS et al., 1995; JONES, et al., 2000).

A presença de inclusões intranucleares é algo paradoxal, já que o vírus replica no citoplasma. Isto pode ser explicado por um estresse celular responsivo desencadeado pela infecção. A indução de choque de proteínas comanda uma translocação da proteína

NP viral para o interior do núcleo, onde fica associada com estruturas conhecidas como corpúsculos nucleares (SUMMERS, et al., 1995).

13 Prognóstico

O prognóstico é reservado na fase sistêmica da enfermidade, pois pode progredir para a fase neurológica. Nesta fase torna-se desfavorável, pois a mesma comumente é progressiva, raramente estacionando, levando à morte em curso agudo ou crônico. Quando eventualmente o animal escape à morte pode ficar com seqüelas inabilitantes (CORRÊA & CORRÊA, 1992).

14 Diagnóstico

Em alguns países o principal diagnóstico é baseado nas manifestações clínicas dos cães (LATHA et al., 2007). No entanto, a apresentação variável da clínica da cinomose pode dificultar o diagnóstico da doença (SHIN et al., 2004).

Segundo Kim et al. (2006), em vários casos a combinação de alguns principais sintomas como: inflamação conjuntival, secreção respiratória, diarreia, doença com três semanas ou mais e sinais nervosos sugerem um diagnóstico presuntivo da cinomose.

Vários testes foram avaliados em todo mundo para o diagnóstico do vírus da cinomose, como reação de imunofluorescência indireta, isolamento viral, teste de soro neutralização, reação em cadeia pela polimerase e ELISA. Os métodos sorológicos, que mensuram em amostras de soro IgG ou IgM específicos para o vírus, são importantes diagnósticos quando o animal está na fase aguda da doença (KIM et al., 2006; LATHA et al., 2007).

No entanto, segundo Greene (2006), o aumento dos títulos de IgM e de IgG no soro são ambíguos e podem ambos indicar infecções passadas e presentes com ou sem vacinação para cinomose. A análise dos níveis de IgG específica no líquido pode ser usado para mensurar anticorpos na fase crônica da infecção do SNC.

No intuito de criar novas técnicas de diagnóstico, Latha et al. (2007) identificaram a nucleoproteína como uma excelente escolha, já que ela aparece nos estágios iniciais da infecção nas células hospedeiras e em infecções naturais há produção de anticorpos diretos. Então, o desenvolvimento de ELISA com nucleoproteína recombinante foi superior aos outros métodos sorológicos, oferecendo alta reprodutibilidade, ausência de reação cruzada, facilidade de realização em relação à

detecção de anticorpos pela imunofluorescência indireta, além disso, esse método não requer o cultivo viral. Pode ser utilizada para detectar o aumento do título de IgG ou níveis de IgM específico visando monitorar a eficácia do programa de vacinação.

Inclusões de Lentz representam o efeito citopático do vírus sobre a célula e sua visualização em hemácias ou leucócitos confere ao diagnóstico um caráter definitivo. Essas inclusões são encontradas em aproximadamente 21% dos animais infectados, principalmente em neutrófilos, conforme o relato de Silva et al. (2005), com exceção de animais recentemente vacinados.

No sistema nervoso central o vírus causa lesões caracterizadas por áreas de necrose bem delimitadas, desmielinização e inclusões intranucleares principalmente em astrócitos. A observação dessas lesões em cortes histológicos confirma o diagnóstico da infecção pelo vírus (SUMMERS et al., 1995; JONES et al., 2000; GEBARA et al., 2004; GREENE, 2006). O estudo de Damián et al. (2005) mostrou que a imunohistoquímica é mais sensível que a detecção pela histopatologia de corpúsculos de inclusão, logo deve ser um complemento do diagnóstico histopatológico.

A técnica de isolamento viral em cultivo celular é específica, porém demorada e pode resultar em falso-negativo se o animal não estiver na fase aguda da doença. O isolamento viral é difícil na rotina de cultura celular. O sucesso da replicação viral ocorre durante o cultivo direto de tecidos infectados do hospedeiro. Culturas de macrófagos detectam o vírus em 24 a 48 horas, porém foram substituídas pela cultura de linfócitos caninos para o isolamento do vírus. A formação de células gigantes, a característica citopática efetiva do vírus da cinomose em várias culturas de tecido, é detectada com dois a cinco dias, até que o mesmo possa ser isolado por outras células.

Atualmente, a técnica da reação em cadeia pela polimerase precedida de transcrição reversa (RT-PCR) vem sendo empregada com sucesso na detecção do vírus da cinomose em diferentes tipos de amostras biológicas provenientes de cães com sinais clínicos sistêmicos e neurológicos (BARRETT, 1999; GEBARA et al., 2004). Segundo Gebara et al. (2004), é possível detectar o ácido nucléico do vírus em urina de cães tanto com encefalite aguda quanto crônica, evidenciando a virúria. Estes resultados demonstram que a técnica de RT-PCR é um método eficiente para realização do diagnóstico rápido, precoce e “in vivo” (SAITO et al., 2005; ELIA et al., 2006; SAITO et al., 2006).

Segundo Frisk et al., 1999, o RT-PCR é um método rápido, sensível e específico para o diagnóstico da infecção pelo vírus da cinomose em cães. Nos seus resultados, foi

encontrado o RNA viral pelo RT-PCR em 86% das amostras de soro sanguíneo e 88% de sangue circulante e líquido de cães com cinomose confirmada pela imunohistoquímica. O RNA viral não foi encontrado na imunohistoquímica em animais antígeno-negativo ou em cães vacinados, sugerindo previamente que a vacinação não causa resultados falso-positivos. A degradação autolítica do RNA viral causada por RNAases endógenas deve ser considerada na possibilidade de resultado falso-negativo. No entanto, Saito et al. (2006) afirmam que o soro e o sangue periférico não são amostras boas para a detecção do vírus da cinomose pelo RT-PCR quando o cão apresentar apenas distúrbios neurológicos sem envolvimento sistêmico da doença. A baixa celularidade do líquido pode ser insuficiente para a preparação da amostra, que pode causar um inadequado isolamento do RNA viral.

A maior vantagem do PCR em tempo real é a habilidade de quantificar partículas virais em amostras clínicas, ao contrário do RT-PCR convencional que é uma análise qualitativa. Alta carga viral foi demonstrada em tecidos linfóides, como tonsilas, baço, linfonodos mesentéricos; em vísceras e na urina. No SNC, o lobo frontal foi encontrado uma alta concentração viral, sugerindo ser a área mais sensível para diagnóstico (ELIA et al., 2006).

As várias amostras incluindo sangue periférico, swab conjuntival, secreção nasal, urina, líquido, e swab de vagina, tecidos pulmonares, estomacais, intestinal e urinário podem ser utilizados para o diagnóstico de cinomose pela técnica RT-PCR. Entretanto, o swab conjuntival é o mais apropriado para o diagnóstico precoce da cinomose (KIM et al., 2006).

Shin et al. (2004) levantaram a hipótese de utilização do nested PCR para diagnóstico da referida enfermidade. A efetividade da técnica foi demonstrada em amostras clínicas incluindo sangue, urina, swab nasal e saliva. Sendo um método ideal para detecção do vírus da cinomose em amostras clínicas, apresentou alta sensibilidade e consistência no desempenho laboratorial. Comparativamente ao RT-PCR, mostrou positividade relevante em todas as amostras testadas (JÓZWIK & FRYMUS, 2005).

Segundo Józwik & Frymus (2005), o resultado de ambos RT-PCR e reação de imunofluorescência direta foram positivos em animais poucos dias após a vacinação e confirmou que ambos os métodos podem levar a um diagnóstico falso-positivo de cinomose em cães vacinados com vacina de vírus vivo modificado. Portanto, o tempo mínimo entre vacinação e o exame em cães doentes deve ser de seis semanas para excluir o resultado falso-positivo. Em seus resultados sugerem que a sensibilidade do

teste de imunofluorescência é 50% menor que o nested PCR. Contudo, RT-PCR combinado com o nested PCR mostrou-se mais específico e sensível método para diagnóstico ante-mortem da cinomose, especialmente nas formas subagudas e crônicas, quando o vírus não se encontra mais em mucosas e membranas e a reação de imunofluorescência foi um resultado negativo.

O diagnóstico rotineiro do vírus da cinomose pela imunofluorescência é aplicado em várias amostras, incluindo conjuntival, nasal e vaginal, usando anticorpos policlonais ou monoclonais. Este teste não é sensível e só pode detectar antígeno viral somente em infecções com três semanas, quando o vírus está presente em células epiteliais (ELIA et al., 2006 apud APPEL, 1987).

O antígeno viral pode ser difícil de detectar em outros tecidos em casos de cinomose em fase nervosa sem sinais sistêmicos, mas pode ser detectado nas células do líquor com o teste de anticorpos fluorescentes indiretos usando anticorpos anti-vírus (TIPOLD et al., 1992; GREENE, 2006).

15 Tratamento

Infelizmente, ainda não existe uma terapia efetiva para a cinomose, apenas tratamento sintomático, sendo assim, a cinomose pode ser considerada uma importante enfermidade na clínica veterinária (TIPOLD et al., 1992; CORRÊA & CORRÊA, 1992; KAJITA et al., 2006).

Apesar de atualmente não existirem muitos trabalhos sobre o assunto, Corrêa & Corrêa (1992) propõem a administração de soro hiperimune específico (gama globulinas específicas) de uma só vez, distribuindo-o em vários locais por via subcutânea conforme o volume necessário. Como norma, aplicar o soro hiperimune necessário de uma só vez, pois sua ação é fundamentalmente de soroneutralização. Devemos de uma só vez obter a soroneutralização de todos os vírus livres, e que se libertam eventualmente nos próximos dias. O soro homólogo permanece ativo no animal por 15 a 30 dias, baixando seu título paulatinamente, seja por soroneutralização, formando complexos antígeno – anticorpo, com o vírus, seja por metabolização e eliminação progressiva. Assim, deve-se estimar a dose para obter um possível excesso de anticorpos soroneutralizantes e nunca falta dos mesmos.

No entanto, quando há alterações do sistema nervoso, o soro hiperimune pode não impedir o avanço da doença, pois apenas neutraliza os vírus circulantes, não

atuando sobre as partículas virais que ultrapassaram a barreira hematoencefálica. Se o animal já foi vacinado pelo menos uma vez, não usar o soro, mas sim aplicar uma dose de vacina, que poderá estimular células-memória e rapidamente produzir imunidade ativa (CORRÊA & CORRÊA, 1992).

Animais com infecção no trato respiratório superior ou pneumonia que freqüentemente é causada por complicações bacterianas secundárias, geralmente por *Bordetella bronchiseptica*, deve-se tratar a pneumonia com antimicrobianos de amplo espectro, ativos principalmente contra *Bordetella bronchiseptica*, *Staphylococcus spp.* e *Streptococcus spp.* Podem ser usados como antimicrobianos: ampicilina, cloranfenicol, florfenicol, ceftiofur, fluorquinolonas e aminoglicosídeos. A terapia antimicrobiana pode ser alterada quando é realizado antibiograma de lavado transtraqueal ou quando não há resposta ao antimicrobiano de escolha. Devem ser utilizados também expectorantes ou nebulização (CORRÊA & CORRÊA, 1992; GREENE, 2006).

Nos casos de diarreia grave usar antidiarréicos complexos que contenham pectina, caolim ou outros adsorventes. Comida, água e medicamentos orais devem ser suspensos caso haja vômito e diarreia e antieméticos parenterais devem ser utilizados (CORRÊA & CORRÊA, 1992; GREENE, 2006).

A hidratação pode ser necessária e é preciso que seja realizada com solução de Ringer, para hidratar e ao mesmo tempo manter o equilíbrio eletrolítico. A dose costuma ser equivalente a 5% do peso animal, a cada 12 horas, caso esteja muito desidratado. Pode-se adicionar 2,5 a 5% de glicose ao Ringer e administrar glicose como fonte energética para animais anoréxicos, fazendo glicose a 25% por via intravenosa, duas vezes ao dia (CORRÊA & CORRÊA, 1992; GREENE, 2006), na dose de 5 mg/Kg.

Na encefalite multifocal progressiva causadora de tetraplegia, semicoma e incapacitação a eutanásia é recomendada. Anticonvulsionantes devem ser utilizados, como o fenobarbital na dose de 2 mg/Kg pelas vias intravenosa, intramuscular e oral, a cada 12 horas. Corticosteróides, como a dexametasona na dose de 2,2 mg/Kg, por via intravenosa, podem ser utilizados por causa da base imunopatológica das lesões neuronais e para reduzir o edema cerebral, mantendo a terapia com doses antiinflamatórias, posteriormente, reduzindo a dose até o final do tratamento. A imunossupressão causada pelos esteróides é a principal desvantagem, porque a resposta inflamatória é responsável pela retirada do vírus (TIPOLD, 1992; GREENE, 2006).

A terapia com glicocorticóides com dosagens antiinflamatórias pode ter algum sucesso no controle na dilatação pupilar causada pela neurite óptica ou de alguns sinais associados à inflamação crônica da encefalite. A prednisolona é comumente escolhida entre os glicocorticóides na dose de 2 – 4 mg/Kg, a cada 24 horas, com administração oral. A mioclonia é normalmente intratável e irreversível (GREENE, 2006).

Como os macrófagos e seus produtos, especialmente radicais livres de oxigênio, são importantes na indução da destruição do tecido nervoso na cinomose, antioxidantes como vitamina E e vitamina C podem ser utilizados terapeuticamente (TIPOLD, 1992).

Outras medidas terapêuticas apropriadas podem ser recomendadas ou executadas, conforme a gravidade da doença: vitamina A para a proteção e regeneração de epitélios, vitamina C como fator trófico dos tecidos mesenquimais, do retículoendotélio e indiretamente do sistema imunopoiético, vitaminas do complexo B como tônicas e regeneradoras da fisiologia nervosa, para antiálgia e mielopoiese e estimulantes de apetite (CORRÊA & CORRÊA, 1992; GREENE, 2006).

16 Profilaxia

Como não existem terapias antivirais comprovadamente eficazes a prevenção é a mais importante atividade veterinária.

Segundo Vandeveld (2004), o desenvolvimento de estratégias terapêuticas deve estar relacionado com a modulação imunológica. Entretanto, enquanto a modificação da resposta inflamatória danosa pode ser viável, o problema básico relacionado à presença do vírus no SNC não é resolvido. Terapias antivirais específicas contra Morbilivirus não foram avaliadas ainda e por isso a mais importante intervenção veterinária é a prevenção.

Nos anos 1950 o vírus da cinomose foi cultivado pela primeira vez em células e foi atenuado como vírus vacinal para produção de vacinas com vírus vivo modificado (MOCHIZUKI et al., 2002). Vacinas produzidas com as amostras do vírus da cinomose, isoladas de cães naturalmente infectados, como as amostras Snyder Hill, Rockborn, Onderstepoort, adequadamente atenuadas em culturas de células, são eficientes em induzir o estado de imunidade dos animais vacinados, protegendo-os contra a infecção natural (BIAZZONO et al., 2001). Estas cepas, atualmente são consideradas velhas, chamadas de “old CDV” e as cepas novas, chamadas de “new CDV” de várias partes do

mundo que possuem o gene e a proteína H com características diferentes (MOCHIZUKI et al., 2002).

A atual estratégia vacinal é baseada em múltiplas doses de vacinas, administradas os intervalos de três a quatro semanas, devido às dificuldades de mensurar os títulos de anticorpos do filhote de forma rotineira. Após a administração da primeira dose de vacina, os cães já apresentam títulos de anticorpos em níveis protetores e, após a revacinação anual, os títulos perduram por mais de 12 meses, não indicando a necessidade de reforço imediatamente após um ano (BIAZZONO et al., 2001).

Segundo Chappuis (1995) a via intravenosa não é recomendada para a vacinação. O uso por esta via deve ser com vacinas que possuem apenas o antígeno de cinomose e é possível observar uma completa proteção após 48 horas da aplicação, em relação a aplicação subcutânea que tem uma resposta com cinco dias após a aplicação. Porém, a vacinação intravenosa pode ser necessária nos casos emergenciais, como a contaminação de um filhote antes da primeira dose de vacina.

A epidemiologia molecular tem sido utilizada para traçar a origem das cepas virais e investigar a dinâmica de circulação das mesmas em animais susceptíveis. Segundo Martella et al. (2007), a variação de aminoácidos entre as linhagens do vírus da cinomose foi maior que 4 %, onde a maior variação (> 8 %) foi observada entre as cepas de América-1, usadas no desenvolvimento de vacinas vivas modificadas atualmente comercializadas, e todos os outros genótipos do vírus da cinomose.

A variação genética e antigênica na proteína H entre as cepas “novas” e “velhas”, pode estar causando uma dúvida na eficácia das vacinas atuais (IWATSUKI et al., 2000).

A partir da demonstração da variação antigênica, pode-se questionar a efetividade das vacinas utilizadas nos cães, que são protetoras por uma forte e ativa resposta imune encontrada após administrações repetidas. É possível, entretanto, que a substituição de aminoácidos em certas porções da proteína H de cepas circulantes pode permitir uma falha na resposta de anticorpos maternos em filhotes não vacinados (MARTELLA et al., 2007).

Segundo Negrão et al. (2006), falhas vacinais podem ser geradas por múltiplos fatores como interferência de anticorpos passivos, falhas individuais na resposta imune, qualidade, conservação e variabilidade antigênica do imunógeno e infecção anterior à vacinação.

No final dos anos 1990, epidemias de cinomose ocorreram em cães vacinados e a análise molecular do vírus isolado destes cães mostrou-se diferente das cepas vacinais, como Onderstepoort e Convac (IWATSUKI et al., 1997). Estes achados sugerem a possibilidade da eficácia protetora das atuais vacinas contra o vírus da cinomose foram insuficientes. Recentemente, foram realizadas mudanças para desenvolvimento de novas estratégias vacinais contra esta infecção usando subunidades vacinais ou vacinas de DNA (CHERPILLOD et al., 2000). Entretanto, a evolução da resposta por linfócitos T citotóxicos pode ser indispensável para confirmar a eficácia da vacina “in vivo”. A estratégia proposta por Hirama et al. (2003) é a utilização do método de linfócitos T citotóxicos de forma rotineira para avaliar a eficácia de novas vacinas em desenvolvimento e para determinar a função destes em outras infecções caninas.

O método de neutralização sem complemento foi capaz de distinguir duas cepas antigenicamente diferentes. Houve diferença na neutralização dos antígenos entre as cepas distintas quando o complemento foi incluído na reação. Este pode ser um mecanismo imune que explica porque as vacinas de cinomose com cepas “velhas” ainda são funcionais e suficientes para proteger contra a enfermidade (MOCHIZUKI et al., 2002).

O estudo realizado por Dahl et al. (2004) foi o primeiro a demonstrar que a vacina de DNA pode induzir a produção de altos níveis de anticorpos neutralizantes e uma completa proteção contra o vírus da cinomose no hospedeiro natural.

As vacinas de vírus vivo atenuado induzem boa resposta em cães, porém podem induzir infecção virulenta em outras espécies. Como gene da proteína H, quando aplicado no músculo, pode produzir anticorpos IgG1 e, surpreendentemente, o DNA da proteína F produz resposta de IgG1 e IgG2a, a vacina de DNA pode ser favorável na estratégia vacinal de animais selvagens (SIXT et al., 1998).

No entanto, Barrett (1999) relata que a maior desvantagem da vacina recombinante é a sua pequena duração da sua imunidade quando comparada com a vacina de vírus vivo atenuado convencional.

Em 1987, Max Appel descreveu a questão da erradicação da cinomose: “a erradicação do vírus da cinomose, como vem sendo sugerido pelos relatos com o vírus do sarampo em humanos, pode ser desejável, mas não será possível. Várias espécies de carnívoros selvagens que são susceptíveis ao vírus da cinomose representam uma constante fonte de infecção junto aos cães doentes que não foram apropriadamente vacinados.” (CHAPPUIS, 1995).

17 Ribavirina frente aos *Paramyxovirus*

A ribavirina é uma droga antiviral, análoga à guanosina, inibidora da replicação *in vitro* de alguns RNA e DNA-vírus, incluindo *Herpesvirus*, *Poxivirus*, Influenza vírus, Parainfluenza vírus, *Reovirus*, *Togavirus*, *Paramyxovirus* e Tumor RNA-vírus. “In vivo”, o espectro antiviral é restrito, com ação contra *Herpesvirus*, *Influenza*, *Parainfluenza*, *Paramyxovirus* do Sarampo e *Adenovirus* (HAYDEN & DOUGLAS, 1990). No grupo dos *Paramyxovirus* todos os componentes são sensíveis a ribavirina, sendo o vírus do sarampo o mais sensível (CHANG & HEEL, 1981).

No estudo de Leyssen et al. (2005) foi evidenciado o mecanismo de ação da ribavirina frente aos *Flavivirus* e *Paramyxovirus* “in vitro”. O antiviral causa depleção intracelular dos reservatórios de guanosina tri-fosfato (GTP).

A infecção do sarampo pode complicar-se por otite, diarreia, pneumonia ou encefalite em 10% dos casos, e a infecção do sistema nervoso central é muito difícil de ser tratada por causa da barreira hemato-encefálica (PARDRIDGE, 2003). Apenas um estudo revelou a passagem da ribavirina através da barreira hemato-encefálica após administração por aerosol em ratos (GILBERT & WYDE, 1988).

A efetividade da ribavirina oral contra o sarampo foi reportada no México, Brasil e nas Filipinas. Nestes relatos a dosagem diária usada foi de 10 mg/Kg de peso corporal, por cinco a sete dias. Não foi encontrada anemia e nenhuma alteração clínica ou laboratorial, sugerindo que não houve evidências de toxicidade. A ribavirina oral é efetiva no tratamento da infecção aguda pelo vírus da hepatite A, sarampo e febre de Lassar (GILBERT & KNIGHT, 1986).

Ainda não foi estabelecida nenhuma terapia específica para a SSPE em humanos (TEKGÜL et al., 1999). Porém, a ribavirina tem sido testada nas infecções virais e mostra-se eficiente na estabilização do quadro clínico neurológico (TAKAHASHI et al., 1998; SOLOMON et al., 2002).

Nos estudos realizados por Hosoya et al. (1989) foram descritas a eficiência da droga frente ao vírus da SSPE e a utilização da ribavirina em concentrações baixas que não causam citotoxicidade. A ribavirina inibe a replicação de várias cepas do vírus de SSPE “in vitro” e “in vivo” em animais experimentais, quando a sua concentração líquórica atinge 7,5 µg/mL (TAKAHASHI et al., 1998; GRANCHER et al., 2004). Concordando com estes autores, Wyde et al. (2000) demonstraram que a ribavirina foi eficaz contra o sarampo em ratos quando administrada por via parenteral.

No experimento de Elia et al. (2007) a ribavirina mostrou-se altamente efetiva na prevenção da replicação do vírus da cinomose “in vitro” em baixas concentrações, aproximadamente 6,5-12,5 µg/mL, concordando com os valores encontrados para a inibição do vírus do sarampo.

18 Mecanismo de ação

Segundo Gilbert & Knight (1986) existem três possíveis mecanismos de ação da ribavirina: a diminuição na concentração intracelular de GTP por uma inibição competitiva da inosina-monofosfato desidrogenase e duas ações específicas de vírus: inibição da formação de mRNA e inibição da função de codificação da RNA polimerase.

A fosforilação intracelular, que forma derivados mono, di e trifosfatos, é mediada por enzimas da célula hospedeira (adenosina-quinase). A ribavirina monofosfato compete inibindo inosina-monofosfato (IMP) desidrogenase e interfere com a síntese da GTP. Conseqüentemente a composição do local do nucleotídeo é marcadamente alterado, impedindo a síntese de ácido nucléico. A queda da concentração do competidor da guanosina pode potencializar outros efeitos antivirais (HAYDEN & DOUGLAS,1990; BEAN, 1992; WU et al., 2005). No entanto, quando aumenta a fosforilação ocorre uma leve diminuição na sua ação antiviral (CHANG & HEEL, 1981).

A ribavirina pode agir como um vírus mutante por imitar os pares de bases adenosina e guanosina, que interagem com as duas timidina e citosina, no genoma viral. Por isso, a incorporação da ribavirina trifosfato no genoma viral pode induzir uma mutação e pode levar a um erro catastrófico no vírus. Contudo, como um análogo do nucleotídeo de guanosina, a ribavirina trifosfato é incorporada no lugar da guanosina monofosfato produzindo um defeito na estrutura para transcrição do RNA viral, contribuindo para a diminuição da translação do genoma viral (CROTTY, et al., 2001; WU et al., 2005). E segundo Crotty et al. (2001) o principal efeito antiviral da ribavirina é a mutação letal no genoma viral. No entanto, a efetividade “in vivo” contra RNA vírus depende da acumulação da ribavirina e a ribavirina trifosfato em alguns tecidos.

Segundo Bean (1992) a ribavirina inibe a formação do mRNA, como um passo importante na replicação de muitos vírus. Ela é capaz de inibir diretamente vírus que são dependentes de RNA polimerase, como o Vírus da Influenza.

Entretanto, todos ou nenhum dos precedentes mecanismos de ação descritos podem estar acontecendo a qualquer momento, porém dependem do vírus infectante. Esse é um potencial mecanismo para a melhor inibição e explicar a falha na detecção de resistência viral (GILBERT & KNIGHT, 1986).

Segundo Elia et al. (2007) a ribavirina causa mutações no vírus da cinomose e estas acumuladas levam a um erro catastrófico no RNA do genoma viral. Pode ser especulado que a ribavirina interfere com a RNA polimerase pela competição com nucleosídeos naturais e produz erro na terminação da cadeia do vírus.

19 Propriedades da Ribavirina

Em 1972 a ribavirina foi sintetizada pela combinação química dos derivados carboxamida e ribofuranosídeo, e mostrou que poderia ser um promissor agente antiviral de amplo espectro. A atividade antiviral da ribavirina é especificamente associada a sua estrutura. Alterações na ribose ou na base resultam em perda significativa da atividade antiviral (GILBERT & KNIGHT, 1986).

A ação antiviral “in vivo” depende de alguns fatores como a cepa e quantidade de vírus, a via de infecção, a idade e sexo dos animais e a frequência e via de administração da droga (CHANG & HEEL, 1981).

A ribavirina começou a ser comercializada em 1986 na forma de aerosol. As formas oral e intravenosa ainda estão sendo estudadas, mas a droga mostrou-se mais efetiva quando administrada pela forma de aerosol (BEAN, 1992).

Na administração oral, a biodisponibilidade é de aproximadamente 33 a 45% em humanos. O pico plasmático ocorre entre uma a duas horas após doses únicas. Até o momento, sabe-se que no líquido é alcançado até 70% da concentração do plasma e o pico plasmático ocorre 30 minutos após a administração intravenosa (HAYDEN & DOUGLAS, 1990; GRANCHER et al., 2004). Cerca de 40% da ribavirina é excretada pelos rins após 72 horas da administração, e o metabolismo hepático é uma rota importante para sua eliminação (HAYDEN & DOUGLAS, 1990).

Quando administrada por via oral, o tempo de absorção da droga é de aproximadamente duas horas, podendo chegar a 12 horas, desta forma, sugere-se que a absorção ocorra por toda a extensão do trato gastrointestinal. Um mecanismo para a absorção foi identificado e envolve os transportadores de nucleotídeos dependentes de sódio (PRESTON et al., 1999).

Contudo, pelo estudo de radioatividade de Lin et al. (2003), foi observado que a ribavirina é excretada principalmente pela urina, pois a bile é uma via insignificante e a excreção pelas fezes foi de 1,4% da dose intravenosa em ratos, e de 0,8% em macacos.

A ribavirina é excretada lentamente e retida em todos os tecidos, exceto o cérebro. Após a administração oral a maior parte dos produtos excretados da ribavirina não possui base e ribose de sua estrutura. A estimada meia-vida da ribavirina na urina e eritrócitos é aproximadamente 10 a 12 horas e 40 dias, respectivamente (GILBERT & KNIGHT, 1986).

Em contraste com as células do sangue e do fígado, ocorre uma pequena acumulação da ribavirina no cérebro de ratos e macacos. Esta informação sugere que a ribavirina é capaz de ultrapassar a barreira hemato-encefálica (FERRARA et al., 1981).

No estudo realizado por Bean (1992) a ribavirina ultrapassou bem a barreira hemato-encefálica, chegando à concentração no líquido de 50 a 100% da encontrada no soro.

Estudos que utilizaram administração de altas doses intravenosas de ribavirina, em pacientes com SSPE, mostraram concentrações líquóricas aproximadamente 74% das encontradas no plasma (HAYDEN & DOUGLAS, 1990; HOSOYA et al., 2001), sendo eficientes no combate à infecção. Segundo Hosoya et al. (2001), o nível da ribavirina no líquido alcançou concentração ideal de 7,5 µg/mL pela administração intravenosa na dose de 20 mg/Kg.

No entanto, Jeulin et al. (2006) observaram que a ribavirina não foi capaz de impedir a morte de hamsters com encefalite pelo sarampo, quando administrada por via intraperitoneal na dose de 50 mg/Kg ao dia. A melhora da atividade da ribavirina pelas ciclodextrinas é provavelmente relacionada à ação destas em membranas biológicas, facilitando sua passagem pela barreira hemato-encefálica.

A meia-vida no plasma foi observada como sendo aproximadamente de 24 horas, mas uma pequena quantidade da droga persiste no plasma por mais de 16 dias (CHANG & HEEL, 1981).

A ribavirina foi capaz de inibir a replicação do vírus da cinomose “in vitro” de forma dose e tempo-dependente. Ainda que a concentração não citotóxica da droga bloqueie completamente a replicação em 24 horas após a exposição, a concentração é mantida até 72 horas. Desta forma, pode-se sugerir que a ribavirina afeta o vírus ainda no meio extracelular, de maneira precoce no seu ciclo de replicação. Após 24 horas de

exposição, mesmo em baixa concentração a ribavirina reduz o número de cópias de RNA (ELIA et al., 2007).

Em 1978, Larsson et al. demonstraram em seus experimentos que a ribavirina possuía um efeito forte na síntese de DNA e RNA de células não infectadas, sendo que a produção de DNA foi mais sensível ao efeito da ribavirina. O efeito da ribavirina na replicação viral pode ser reversível pela guanosina e que guanosina e xantosina causam uma redução na proliferação celular. Concluíram que a ribavirina possui um efeito reversível após um longo período de tratamento.

Segundo Hosoya et al. (1989) a ribavirina não alterou a morfologia celular ou inibiu a síntese de proteínas na concentração de 200 µg/mL, que é alta em relação a concentração necessária para inibir a síntese de DNA e RNA.

No estudo realizado por Elia et al. (2007) a ribavirina demonstrou relativamente baixa toxicidade na cultura de células VERO; esta citotoxicidade só foi observada em concentrações 100 vezes maiores das necessárias para inibir a replicação do vírus da cinomose. A toxicidade em células VERO causada pela ribavirina pôde ser verificada pela multiplicação celular.

Nos relatos de Browne (1978) foi observado que o aumento da concentração da ribavirina levou a um declínio na síntese de proteínas virais e concomitantemente uma reintegração da síntese de proteínas da célula hospedeira. No entanto, é possível que a alta concentração seja menos específica na sua ação e cause alterações no metabolismo do RNA, exceto a capacidade de inibir a IMP desidrogenase.

Na busca de uma dose letal da droga, Jeulin et al. (2006) utilizaram em ratos a dose de 480 mg/Kg de ribavirina por via intraperitoneal, no período de 21 dias e não observaram nenhuma morte entre os animais. E não conseguiram chegar a uma dose letal devido ao volume da droga a ser injetada.

19.1 Viramidine: pró-droga da ribavirina

Viramidine é uma pró-droga, que dá origem a ribavirina. Este pode ser ativado e convertido em ribavirina pela adenosina desaminase “in vitro” (WU et al., 2003). Análises farmacocinéticas indicam que essa pró-droga possui distribuição no fígado melhor do que a ribavirina com a redução da propensão para entrar nos eritrócitos. Por isso, o viramidine é o mais indicado para o tratamento crônico da Hepatite C (WU, et al., 2005).

Segundo Barnard (2002), o viramidine possui uma ação antiviral e imunomoduladora “in vitro” e “in vivo”, é um potente inibidor da fosforilação de nucleotídeos de purina e é capaz de prevenir a fosforilação da ribavirina “in vitro”. Este causa uma estabilidade transitória na ribavirina (WU et al., 2004).

20 Ribavirina e o sistema imune

Mesmo em baixas concentrações, a ribavirina pode inibir de forma reversível a síntese de macromoléculas e a divisão rápida de células não infectadas. Este composto causa supressão da síntese de ácido nucléico e estimula a mitose de linfócitos humanos “in vitro”, mas não afeta a função de leucócitos polimorfonucleares. Também é capaz de inibir a secreção de mastócitos. No entanto, tem efeito imunossupressivo em animais experimentais e mostra ação terapêutica para vírus que induzem tumores transplantáveis e doenças auto-imunes (HAYDEN & DOUGLAS, 1990).

A ribavirina possui efeitos imunoreguladores, pois é capaz de inibir a síntese de macromoléculas e a divisão celular, proliferação de linfócitos e a síntese de ácido nucléico. Às vezes, pode suprimir a produção de linfócitos B e consequentemente a formação de anticorpos (BEAN, 1992). Em humanos, a ribavirina administrada por via oral foi capaz de diminuir o número de células CD4 e a proliferação de linfócitos, principalmente em altas doses, sugerindo uma possível toxicidade dos linfócitos (HEAGY et al., 1991).

Segundo Tam et al. (1999), a ribavirina possui uma atividade imunoreguladora, sugerida por possuir uma função imunomoduladora capaz de estimular a imunidade celular mediada por células T, favorecendo a eliminação de patógenos intracelulares virais.

No entanto, Vollmer et al. (2004) afirmam que a ribavirina não possui efeito sobre as células B ou na secreção de citosinas, sugerindo que esta droga não apresenta efeito estimulante sozinha e diminui a secreção de IL-5.

21 Contra-indicações e efeitos colaterais da ribavirina

A aplicação clínica da ribavirina mostra restrições devido a alguns efeitos adversos, especialmente, indução de anemia hemolítica. O acúmulo dos fosfatos da droga em eritrócitos leva a anemia, que pode ser causa para descontinuação do

tratamento (WU et al., 2005). A severidade da anemia é mais grave em macacos, seguidos dos humanos, roedores e cães (LIN et al., 2003)

Esse efeito é relatado como uma habilidade de células vermelhas de primatas para acumular a ribavirina. A diferença entre espécies está relacionada com a variação da atividade enzimática de nucleotídeos nos tecidos (FERRARA et al., 1981)

Quando incorporada nos eritrócitos, a ribavirina é convertida em metabólitos fosforilados. Estes diminuem os níveis de ATP intracelular, resultando na redução da integridade dos eritrócitos por uma desestabilização da membrana e podendo chegar à hemólise extravascular. A concentração celular de ribavirina alcança níveis estáveis em duas a três semanas após o início do tratamento, quando ocorre a diminuição de hemoglobina. De forma interessante, as mudanças na concentração de ribavirina celular são inversamente proporcionais às alterações nos níveis de hemoglobina (INOUE et al., 2004).

No experimento de Homma et al. (1999) por cromatografia líquida, foi demonstrado que a concentração de ribavirina no eritrócito é três vezes maior que a concentração no plasma. Sendo que 74% da ribavirina dos eritrócitos eram metabólitos fosforilados, os quais não foram encontrados no plasma. A partir deste estudo, os autores sugeriram que a droga é transportada para o interior dos eritrócitos por um transportador de nucleotídeos presente na membrana celular.

A ribavirina administrada sistemicamente, em altas doses, pode causar efeitos indesejáveis, como anemia por hemólise extravascular, supressão da medula óssea, aumento de bilirrubina, ferro e ácido úrico no soro, que são reversíveis quando cessa a administração da droga (BEAN, 1992; TAKAHASHI et al., 1998; HOSOYA et al., 2001).

Ratas prenhes tratadas com ribavirina desenvolveram deformidades embrionárias no esqueleto, podendo levar até uma reabsorção fetal. Por isso, esta droga é contra-indicada em mulheres grávidas (BEAN, 1992).

A ribavirina oral foi observada por piorar as condições dos gatos experimentalmente infectados com calicivírus. Supressão da medula óssea, perda de peso, enzimas hepáticas aumentadas e icterícia foram observadas. Porém, esses efeitos colaterais não foram observados em cães quando receberam 60 mg/Kg durante duas semanas (PAPICH et al., 2003)

Outros efeitos foram reportados, como pruridos, erupção cutânea aguda, náuseas, depressão, tosse e sintomas respiratórios em humanos (HAYDEN & DOUGLAS,1990).

22 Dimetil Sulfóxido como solvente de nucleotídeos

A solubilização de nucleotídeos em solventes orgânicos é importante para a entrada de drogas nucleotídeas em membranas celulares. Pelos estudos de West et al. (1994), a base guanosina é hidrofóbica e sua interação com DMSO pode torná-la permeável a substâncias lipofílicas, indicando que este pode servir como veículo de transporte de drogas nucleotídeas por membranas celulares.

23 Propriedades do Dimetil Sulfóxido

23.1 DMSO e membranas celulares

Barreiras biológicas como as membranas lipoprotéicas são altamente permeáveis ao DMSO e não são alteradas e nem destruídas pela sua passagem. A droga pode penetrar em mucosas, ultrapassar a barreira hematoencefálica, membranas microbianas, células e membranas de organelas e, além disso, pode facilitar a penetração de várias outras substâncias através de membranas (BRAYTON, 1986; PAES, 1999).

No experimento de Leekunjorn & Sum (2006) foi observado que a passagem do DMSO pela região da interface da membrana é um processo rápido e considerado passivo, por perspectiva macroscópica, e, entretanto, em perspectiva molecular foi encontrado processo ativo que requer energia. Essa energia é obtida pelo destacamento da ligação de hidrogênio da água para o DMSO para a passagem deste pela região interfacial. O grupo metil do DMSO, que é hidrofóbico, interage de forma favorável nas camadas lipídicas.

23.2 Captura de radicais livres

A partir de 1964, o DMSO passou a ser amplamente estudado e utilizado em uma gama imensa de pesquisas científicas através das quais foram descobertas muitas das suas propriedades farmacológicas, como a captura e remoção de radicais hidróxidos livres. Pela ação de seu metabólito dimetil sulfide (DMS), o DMSO remove radicais livres de oxigênio, o que explica suas propriedades protetoras como ação

antinflamatória, antiisquêmica, crioproteção e radioproteção (BRAYTON, 1986; PAES, 1999; LIND et al., 2000; ALI, 2001; KISHIOKA et al., 2007).

A propriedade antioxidante do DMSO pode auxiliar em casos de endotoxemia e choque séptico como confirmado no recente estudo realizado por Ali (2001), em que a efetividade do DMSO foi positiva na adesão intracelular de moléculas e fatores nucleares em testes com ratos modelos de peritonite séptica.

23.3 Solvente orgânico

Nos anos de 1980 foi demonstrado que enzimas quando associadas aos solventes orgânicos tinham uma melhora na sua eficiência (BRINK et al., 1988). As vantagens do uso de solventes incluem, por exemplo, aumento da solubilidade de substratos hidrofóbicos e uma favorável alteração no equilíbrio da reação. Os solventes DMSO e Dimetil formamida (DMF) afetaram gravemente na atividade da catalase no estudo realizado por Rehan & Younus (2006). Neste mesmo estudo, mostraram que a interação antígeno-anticorpo foi mais forte em concentrações de 40% de glicerol, DMF e DMSO. Os efeitos dos solventes orgânicos dependem da conformação do antígeno e a ação da catalase nestes compostos.

Este composto serve como veículo e/ou potencializador de antibióticos, antiprotozoários, antifúngicos, antivirais e agentes quimioterápicos. O DMSO foi relatado por ter efeito sinérgico com esteróides nas células (BRAYTON, 1986; SANTOS et al., 2002).

Trata-se de um solvente altamente higroscópico, melhor que a água para muitas substâncias e ao ser hidratado há ocorrência de reação exotérmica (BRAYTON, 1986; PAES, 1999; ALI, 2001).

No estudo de Venkatesh et al. (2007) que testam a capacidade aumentar a permeabilidade de drogas como propanolol, afirmam os autores que o DMSO pode ser usado como co-solvente para determinar a permeabilidade de drogas pouco solúveis e novos compostos químicos, desta forma, sugerem uma classificação da droga no sistema de classificação biofarmacêutica.

Segundo Pérez-Pastén et al. (2006) o DMSO é um veículo comumente usado em estudos embriotóxicos in vitro e sugere estudos que avaliam a modulação da formação de ROS, capaz de induzir a teratogênese “in vitro”, pelo DMSO.

23.4 Protetor tecidual, antiinflamatório e antiisquêmico

O estudo realizado por Lind et al. (2000) utilizou o DMSO como hepatoprotetor, e este composto demonstrou efetividade frente ao tóxico utilizado, fazendo com que os valores de ALT voltassem ao normal mais rápido, com menor lesão ao fígado, quando comparado ao grupo controle. Estes pesquisadores observaram que as lesões no fígado eram acompanhadas de infiltrados inflamatórios e que podiam contribuir com a lesão. No entanto, o DMSO foi capaz de diminuir esse recrutamento, a quimiotaxia e a ativação de células inflamatórias.

Kishioka et al. (2007) demonstrou que o DMSO previne totalmente o estresse oxidativo causado pelo thioacetamine, resultando numa diminuição da necrose de células hepáticas.

DMSO tem mostrado ser protetor contra lesões causadas por xenobióticos em vários órgãos e tecidos, incluindo fígado, coração, duodeno e pulmões, quando administrado antes ou simultaneamente com o tóxico. Possui uma ação protetora dos nefrons contra a ação nefrotóxica da gentamicina, relatada em ratos (ALI, 2001).

O estudo de Yoon et al. (2006) mostrou que o DMSO possui efeitos complexos no metabolismo de xenobióticos. Esta substância possui efeitos variados na atividade de isoenzimas, sua presença nas reações enzimáticas produz efeitos inibitórios diretos no metabolismo mediado por estas. A afinidade relativa do DMSO com o substrato das enzimas pode ter um papel importante como consequência dessa interação. E neste estudo revelou que o DMSO diminui a hepatotoxicidade do acetaminofen, na dose de 0,4 mg/Kg, e inibiu a sua ativação metabólica na concentração 0,02% na reação. Considerando a variedade de uso dessa substância em experimentos biológicos, estes autores sugerem uma cuidadosa consideração nos efeitos do DMSO no metabolismo hepático, podendo ser utilizado com solvente.

O DMSO tem sido utilizado com um crioprotetor de espermatozóides, embriões, plaquetas, outros componentes do sangue, células tumorais e células de cultura de tecidos. Em algumas situações tem sido considerado superior a glicerina (BRAYTON, 1986).

Da mesma forma, Pérez-Pastén et al. (2006) demonstrou que o DMSO impede a formação de ROS e reduz as mal-formações em embriões induzidas por arsênio, mas não foi capaz de diminuir a incidência de anormalidades.

Segundo Camici et al. (2006) o DMSO é capaz de suprimir a atividade do fator tecidual e protege contra a oclusão trombótica “in vivo”. Este efeito do composto pode ser atribuído em parte a sua habilidade de impedir a aderência e a agregação plaquetária e sugerem o composto como uma nova estratégia para o tratamento de síndromes coronarianas agudas.

Nos relatos de Nagel et al. (2007) o DMSO demonstrou efeitos neuroprotetores em ratos em diferentes doses quando administrado antes e depois da isquemia permanente de 24 horas. Estes autores mostram que houve uma atenuação na destruição da barreira hemato-encefálica também. A ação ocorre frente a formação de ROS em locais sem fagocitose de forma que o DMSO diminui o estresse oxidativos dos tecidos infartados e os que estão ao redor.

No estudo de Farkas et al. (2004) observou que o DMSO é capaz de prevenir a produção de cicloxigenase-2 e a perda de neurônios. Além disso, confirmaram outros estudos que o composto pode reduzir o tamanho do infarto em isquemias cerebrais focais.

Segundo Amemori et al. (2006), a administração oral do DMSO é um tratamento para amiloidose secundária do trato gastro-intestinal com sintomas e pacientes no estágio inicial da amiloidose renal.

Em situações clínicas, benefícios anti-inflamatórios da terapia com DMSO são descritos em lesões musculares agudas, em alterações agudas, traumáticas e inflamatórias do sistema nervoso central e em condições infecciosas ou sépticas. Em inflamações crônicas os resultados são menos consistentes, algum sucesso foi relatado em doenças reumáticas, artrites crônicas e cistite intersticial. Este composto contribui na manutenção da microcirculação e reduz a destruição celular pela inflamação. Como mecanismo de ação foi observado que inibe a migração de células inflamatórias, modula a resposta imuno-mediada, inibe a produção de anticorpos e inibe a proliferação de fibroblastos, que pode ser importante nas condições crônicas (BRAYTON, 1986).

23.5 Efeitos no Trato Gastro-intestinal

Cochran et al. (1983) foi o primeiro a relatar que o DMSO pode proteger contra a ulceração gástrica causada por estresse em ratos. O mecanismo dessa ação foi sugerido baseado na captura de radicais livres pelo DMSO. No entanto, foi comprovado

que este composto é antagonista da depleção do GSH resultante de úlceras causadas por estresse ou químicos (ALI, 2001).

23.6 Antimicrobiano

“In vitro”, em concentrações de 5-50%, apresenta atividade bacteriostática ou bactericida contra várias bactérias patogênicas, incluindo *M. tuberculosis*, *Staphylococcus* spp., *Streptococcus* spp., *Salmonella* spp., *Proteus* spp. e *E. coli*. “In vivo”, o DMSO reduz a flora oral e a flora axilar normal. Não mostrou nenhuma significância em efeitos benéficos ou deletérios na atividade antimicrobiana (BRAYTON, 1986).

23.7 Antifúngico

O DMSO na concentração até 10% afetou significativamente o crescimento de dermatófitos “in vitro” testados no experimento de Randhawa (2006). Entretanto, na concentração de 1% inibiu o crescimento de *M. canis* e *T. mentagrophytes*. É possível que iniba a formação de microfilamentos que são essenciais para o crescimento normal de hifas e pode potencializar os efeitos antimicóticos de azoles, que interferem na formação de ergosterol na síntese de membranas fúngicas.

Na concentração de 1% o DMSO não mostrou atividade antifúngica “in vitro”, mas na concentração de 5-45% é efetivo contra a levedura *Candida albicans* (BRAYTON, 1986).

23.8 Indicações aprovadas para uso

Nos Estados Unidos, o DMSO foi aprovado apenas para o uso em cistite intersticial em humanos, tratamento de edemas e traumas em cavalos, e como aplicação óptica em cães (ALI, 2001). Apesar de todas as propriedades apresentadas pelo DMSO é surpreendente o registro de poucos trabalhos orientados para seu uso em pesquisas científicas como carreador de drogas. Coube a Paes (1999), lançar mão do DMSO objetivando aumentar o poder de penetração da isoniazida em lesões tuberculosas e, provavelmente, também para melhor penetração através da espessa e complexa membrana celular do *Mycobacterium bovis*.

23.9 Efeitos no sistema nervoso

O DMSO pode manifestar efeitos na função neurocondutora e pode ser levado em conta quando usado como veículo para componentes neurotóxicos (ALI, 2001). Este vem sendo usado em estudos de neurofisiologia com objetivo de aumentar a solubilidade de drogas insolúveis à água (LU & MATTSON, 2001). No estudo de Tsvetlynska et al. (2005) em medula espinhal, sugere que o DMSO age na transmissão sináptica do glutamato, ajudando na locomoção dos animais. No entanto, Rosenberg et al. (2007) demonstraram no seu estudo que o DMSO possui uma habilidade de controlar os danos na barreira hemato-encefálica.

“In vitro”, na concentração maior que 25% de DMSO, inibe a velocidade condutora de nervos que pode até ser completamente eliminada. O grande efeito analgésico do DMSO no sistema nervoso central é relatado, porém os receptores de opióides não estão envolvidos. Em situações agudas, a captura de ROS pode prevenir a destruição de tecidos por radicais e a irritação local de nervos (BRAYTON, 1986).

23.10 Metabolismo e excreção

Quanto à metabolização, o DMSO é oxidado em DMSO₂ (dimetil-sulfone) no sistema microssomal hepático na presença de NADPH₂ e oxigênio molecular (PAES, 1999).

O DMSO é excretado sob a forma de dois metabólitos: DMS (dimetil-sulfide) e DMSO₂ rápida e eficientemente, sendo os pulmões e rins os principais órgãos envolvidos e sua excreção fecal é irrisória. Quando cessa a exalação do produto, isto coincide com o desaparecimento dos metabólitos na urina e é indício que o DMSO circulante foi inteiramente metabolizado (PAES, 1999). Sabe-se que após 12 horas da administração cerca de 25 a 27% da dose é excretada na urina sem alterações na forma (ALI, 2001).

24 Dimetil Sulfóxido e os eritrócitos

Santos et al. (2002), chegaram ao resultado que o DMSO penetra pela membrana do eritrócito e causa um aumento da osmolaridade dentro e fora da célula, prevenindo hemólise devido ao gradiente osmótico. Além disso, foi observado que os índices de

agregação eritrocitária das amostras com DMSO foram significativamente menores do que os índices de alíquotas sem o referido composto.

25 Efeitos colaterais e contra-indicações do Dimetil Sulfóxido

Em humanos efeitos colaterais foram observados no estudo de Amemori et al. (2006) após doses orais, como náuseas, vômito, anorexia, erupções de pele e bradiarritmia ou hipotensão. Porém, o efeito colateral significativo foi o odor na respiração e o sabor na boca semelhante ao alho, devido à excreção pulmonar de uma pequena porcentagem do DMSO como DMS. Este odor às vezes poder ser intenso e causar desconforto ao paciente, fazendo com que ele descontinue o tratamento (DAVIS et al., 1990; STRONCEK et al. 1991).

O DMSO é uma substância relativamente tóxica e sua aplicação tópica pode causar uma dermatite irritante e uma reação urticariforme de contato que não é mediada por reação imunológica, sendo possível à liberação da histamina pela ativação de mastócitos (RANDHAWA, 2006).

O DMSO é bem tolerado em altas doses, não causando alterações cardíacas e no peso corporal (ALI, 2001). Em cães, elevadas doses, podem levar a halitose, anemia, hemoglobinúria e aumento dos níveis de transaminase. E, precedendo a morte ocorre prostração, convulsão, dispnéia, hipotensão, edema pulmonar e parada respiratória, porém sua DL 50 é entre 2,5 a 8,9 g/Kg (BRAYTON, 1986; PAES, 1999). A terapia intravenosa é cerca de 1 g/Kg, em solução de 10-45%, administrado lentamente, em gatos, cães e cavalos (BRAYTON, 1986).

Observações clínicas e estudos em animais sugerem que o DMSO pode ser responsável por uma neurotoxicidade após a infusão de células tronco de sangue periférico criopreservadas com o composto (CAVALETTI et al., 2000; TOPACOLGU et al., 2004). Os resultados de Muller et al. (2007) confirmaram algumas reações adversas e a neurotoxicidade, em particular após a infusão das células, ocorreu com baixa frequência. Além disso, nenhuma neurotoxicidade foi encontrada em pacientes com doença cerebral pré-existente. Portanto, estes autores sugerem que a neurotoxicidade fatal causada pelo DMSO representa um efeito colateral raro.

Outros autores observaram que o DMSO pode afetar a irrigação do cérebro por uma vasoconstrição, podendo causar uma alteração na função neuronal (WEI et al., 1998).

No entanto, Ali (2001) sugere que o DMSO possui efeitos sobre a função neurológica e esta pode ter como causa a veiculação de drogas neurotóxicas. Sugerindo, desta forma, que a toxicidade não deve ser induzida pelo DMSO, mas como consequência da capacidade de aumentar a permeabilidade membranas celulares tornando os tecidos mais vulneráveis para substâncias tóxicas.

Em altas concentrações de DMSO é possível observar efeitos tóxicos irremediáveis tanto “in vitro” como “in vivo”. No estudo realizado por Aita et al. (2005), o grupo de ratos tratados com 8 g/Kg de DMSO manifestou efeitos tóxicos, no entanto, os grupos tratados com 2 ou 4 g/Kg não apresentaram alterações. Foi sugerido que a apoptose de linfócitos no timo é manifestada na dose de 8 g/Kg, resultante de um choque tóxico.

Objetivos

O presente trabalho tem por objetivos:

1. Testar a eficácia da ribavirina em cães acometidos de cinomose na fase neurológica.
2. Testar a eficácia do DMSO como permeante de membranas biológicas e atuando como vetor da ribavirina para o interior do sistema nervoso central (SNC).
3. Avaliar os efeitos colaterais e tóxicos da ribavirina nos cães através de monitoramento hematológico e provas bioquímicas de função hepática e renal.
4. Avaliar a resposta imunológica no sistema nervoso central através do exame de líquido, colhido de forma seriada, com intervalo de 15 dias, antes e após o tratamento com a ribavirina e sua associação com o DMSO.
5. Adaptar uma dose e via de administração adequada da ribavirina em cães.

Materiais e Métodos

1 Delineamento experimental

O experimento foi composto com a formação aleatória de dois grupos de cães naturalmente infectados com o vírus da cinomose apresentando sinais neurológicos. Não houve critério clínico para a divisão dos grupos, os animais foram incluídos pela ordem de atendimento.

Após o atendimento clínico, foi realizada a triagem, com a verificação da possibilidade de tratamento com a ribavirina, pois não entraram nos grupos animais que estavam sendo tratados com outros medicamentos ou com mais de 10 dias de sinais clínicos nervosos. Foram colhidas as amostras de sangue, urina e líquido dos animais. Estes receberam o tratamento sintomático e a ribavirina e sua associação com o DMSO de acordo com os grupos durante 15 dias consecutivos. Neste período, os animais ficaram internados para melhor avaliação clínica diária, realização de exames complementares e garantia de administração das drogas.

2 Animais

A princípio foram selecionados 26 animais com sinais neurológicos compatíveis com cinomose, no entanto, seis destes animais vieram a óbito em um curto período, com menos de sete dias e, por isso, não foram considerados na avaliação estatística. Este critério foi realizado por não termos informações a respeito do tempo necessário de administração da ribavirina para inibir a replicação viral “in vivo”, então o descarte teve como objetivo manter a fidelidade dos dados.

Os 20 cães utilizados com sinais clínicos neurológicos foram diagnosticados a partir do histórico de vacinação, desenvolvimento clínico da doença, exame físico e pela reação de imunofluorescência direta do sangue. Os animais com estratégia vacinal correta não foram incluídos no estudo.

Para a inclusão na pesquisa, alguns sinais neurológicos característicos deveriam estar presentes, como: paresia, ataxia, mioclonias e/ou cegueira. Os animais que apresentavam convulsões não foram incluídos na avaliação estatística porque vieram a óbito com menos de sete dias de tratamento. Com o intuito de diminuir a influência da resposta imune da fase crônica nos resultados, incluímos apenas animais que apresentavam no máximo 10 dias de sinais neurológicos.

Foram incluídos no estudo apenas animais de dois meses a seis anos de idade, com exceção de um com 13 anos de idade, que apresentou imunofluorescência direta positiva no líquido, demonstrando que estava na fase aguda da enfermidade. Não houve distinção entre sexo e raça dos animais.

3 Grupos Experimentais

Os 20 animais foram divididos em dois grupos de 10, atendidos na Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da UNESP – Botucatu, pelo serviço de Enfermidades Infecciosas dos Animais, no período de março a novembro de 2007.

O grupo 1 (G1) foi composto por animais com sinais clínicos neurológicos que receberam o antiviral (Ribavirina) durante 15 dias consecutivos e um tratamento de suporte e sintomático, incluindo suplementação vitamínica (A, B, C, E) como imunostimulantes, fluidoterapia nos casos de desidratação e, às vezes, combinada com glicose nos casos de anorexia, antimicrobianos no combate as infecções secundárias, protetores de mucosa, como a ranitidina e antieméticos, como metoclopramida.

O grupo 2 (G2) foi formado pelos animais que também apresentaram sintomas neurológicos e que receberam, além do tratamento de suporte e sintomático, a ribavirina em associação com o DMSO.

O grupo controle (GC) foi composto por animais que foram tratados anteriormente pelo serviço de Doenças Infecciosas dos Animais, porém sem o uso do antiviral. O levantamento destes animais foi realizado ao acaso, levando em consideração apenas os critérios utilizados nos outros dois grupos. Foram selecionados 10 animais pelo prontuário do Hospital Veterinário onde foi possível avaliar o tempo de evolução da doença e a mortalidade neste grupo. Como não é uma rotina o uso da imunofluorescência direta nos diagnósticos de cinomose na Disciplina de Enfermidades Infecciosas dos Animais, todos os animais deste grupo não possuíam o diagnóstico laboratorial.

4 Doses e drogas experimentais

A Ribavirina² foi administrada em altas doses por via oral com objetivo de atingir a concentração adequada no líquido e interferir na replicação viral. A dosagem intravenosa adequada em humanos é de 20 mg/Kg nos casos de panencefalite subaguda esclerosante, causada pelo vírus do sarampo, no entanto, a droga disponível na forma injetável no Brasil é extremamente cara e inviabiliza sua utilização em animais domésticos. A concentração no líquido capaz de inibir a replicação viral deve ser alta, aproximadamente 7,5 µg/mL, e considerando-se a sua prolongada eliminação do soro, foi administrada na dose de 30 mg/Kg, a cada 24 horas, durante 15 dias.

Para melhor ajuste da dose, sem interferir na concentração do medicamento, a ribavirina na forma de cápsulas foi diluída em água destilada estéril ou em Solução Fisiológica a 0,9%, na proporção de oito cápsulas de 250 mg do princípio ativo para 50 mL, armazenada em frascos estéreis de cor âmbar em geladeira. Sendo assim, a solução obtida possuía a concentração de 40 mg/mL da ribavirina para ser administrada por via oral. A manipulação da droga foi realizada no Laboratório de Diagnóstico Microbiológico da Disciplina de Enfermidades Infecciosas dos Animais Domésticos da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da UNESP-Botucatu/SP.

Com objetivo de manter a estabilidade do medicamento, algumas medidas foram tomadas para evitar a contaminação da solução antes e durante a manipulação. Para diminuir a carga microbiológica do ambiente foi utilizada luz ultra-violeta durante 20 minutos e limpeza da bancada com álcool 70% antes do procedimento. No momento da diluição, foi utilizado bico de Bunsen ou capela de fluxo laminar, com objetivo de diminuir a contaminação do material. Além do uso de luvas de estéreis, os materiais como tesouras, pinças, tampas e lacres foram previamente esterelizados com luz ultravioleta e álcool 70%. O frasco para armazenamento da droga foi autoclavado após a lavagem, em temperatura de 121°C por 15 minutos.

Após a diluição, o frasco foi fechado com tampas de borracha, lacrado e armazenado em geladeira. Para a retirada da medicação foram utilizadas seringas e agulhas estéreis para evitar a contaminação.

O DMSO foi administrado por via intravenosa na dose de 20 mg/Kg de peso vivo, a cada 24 horas, no mesmo momento que o antiviral, no período de 15 dias. Para

² Ribavirina: Ribaviron C[®] BIOLUNIS Farmacêutica Ltda.

evitar reações à medicação, o composto foi diluído na concentração de 10 a 20% em água destilada ou em Solução Fisiológica a 0,9% estéreis.

5 Ambiente e alimentação dos cães

Os animais foram internados nos período de 15 dias para garantir que o medicamento fosse administrado corretamente, na dose e horário determinados. Da mesma forma, foi realizada avaliação clínica diária dos animais e exames complementares rotineiramente. Os animais ficaram em canis de alvenaria, com grades de aço inox, em uma sala separada do prédio da Disciplina de Enfermidades Infecciosas dos Animais, do Departamento de Higiene Veterinária e Saúde Pública da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da UNESP-Botucatu/SP.

A sala de internação dos animais possui telas em portas e janelas, com área externa isolada, porém sem controle de temperatura e umidade. A higienização do ambiente foi realizada todos os dias, com desinfetante (Hipoclorito de sódio) e água. Os canis foram forrados com papel de jornal, que era trocados duas a três vezes ao dia, evitando que os animais ficassem sobre as fezes e urina.

A alimentação dos animais foi caseira, basicamente de arroz e carne, oferecida duas vezes ao dia, sem quantidade pré-determinada. A água foi oferecida à vontade e trocada duas vezes ao dia.

Os animais que apresentavam anorexia e desidratação por não ingerir água recebiam fluidoterapia, com reposição energética de glicose na dose de 5 mg/Kg. Os animais que apresentavam vômito foram mantidos em jejum no período de 12 horas até não apresentarem mais os sinais clínicos e receberam fluidoterapia durante este período.

6 Exames Complementares

Todos os animais foram avaliados laboratorialmente, por meio de hemograma, análises bioquímicas e exames de urina, com o objetivo de identificar os efeitos colaterais da droga e acompanhar a evolução da doença. No período de 15 dias, referentes ao tempo de tratamento com a ribavirina, foram realizados hemogramas no 1º, 4º, 7º, 10º, 12º e 15º dias nos dois grupos. Os exames bioquímicos e de urina foram realizados nos dias 1º, 5º, 10º e 15º após o atendimento dos animais no Hospital Veterinário, UNESP – Botucatu. A colheita de líquido foi realizada no momento em que o animal chegou ao Hospital Veterinário e após 15 dias de tratamento com ribavirina.

O sistema hepatobiliar foi avaliado a partir da atividade sérica da alanina-aminotransferase (ALT), fosfatase alcalina (FA) e gama-glutamyltransferase (GGT), e da concentração de albumina e bilirrubinas. O sistema renal foi avaliado pela mensuração dos resíduos nitrogenados, uréia e creatinina no soro, e pelo exame de urina tipo I.

As amostras de sangue foram colhidas com seringas e agulhas estéreis e descartáveis, no volume de aproximadamente oito mL, sendo então acondicionadas em tubos com EDTA e sem o anticoagulante. O local da punção foi a veia jugular e, após a colheita, as amostras foram levadas diretamente ao Laboratório Clínico Veterinário, da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, UNESP – Botucatu/SP, para o devido processamento.

As amostras de urina foram colhidas com auxílio de sondas uretrais estéreis e descartáveis ou por cistocentese com seringas estéreis e descartáveis, também levadas imediatamente ao Laboratório Clínico Veterinário para a análise.

Para obtenção do líquido foi utilizado o procedimento descrito por Pellegrino et al. (2003), o qual relatam que para maior segurança deve-se retirar de uma só vez, um mL de líquido para cada cinco quilos de peso corporal. Em nosso procedimento foram obtidas cerca de 20 gotas de líquido por animal. O material foi colhido em tubo esterilizado, sem adição de anticoagulantes.

O líquido foi obtido da cisterna cerebelomedular, por ser mais indicativo de lesões cerebrais. O animal foi posicionado em decúbito lateral e o pescoço flexionado em 90° à coluna, com o nariz mantido paralelo à mesa. No local da punção, fez-se tricotomia e assepsia da pele e introdução de uma agulha descartável e estéril, na linha média, direcionada para o espaço atlantoccipital. O fluido foi obtido por gotejamento e dividido no momento da colheita em três tubos, para evitar contaminação pelo sangue durante o procedimento, por isso, preferencialmente, utilizou-se o terceiro tubo para a análise.

Para a colheita de líquido foi necessário anestésiar todos os animais. O protocolo anestésico foi igual para todos, sendo a dose ajustada com relação às condições física e de consciência. Utilizou-se como medicamento pré-anestésico a associação de acepromazina com o diazepam administrada por via intramuscular, na dose 0,05 mg/Kg e 0,2 mg/Kg, respectivamente. Após 30 minutos, o tiopental foi administrado por via intravenosa, na dose máxima de 10 mg/Kg, com o objetivo de obtenção do estado de hipnose dos animais.

6.1 Hemograma

Para a realização do hemograma as amostras de dois a quatro mL de sangue foram acondicionadas em tubos com EDTA a 7,5%². Após chegada ao laboratório, foi confeccionada a lâmina de esfregaço sangüíneo e corada por corante a base de Romanowsky (Panótico rápido), para realização da contagem diferencial de leucócitos, observação da morfologia das células e a realização da estimativa do número de plaquetas. Parte da amostra foi colocada em tubos capilares e centrifugada em microcentrífugas por cinco minutos na rotação de 11.500 rpm e após foi verificado o volume globular pelo cartão de leitura de micro-hematócrito e a densidade plasmática por refratometria, resultando no valor de proteína total plasmática.

A contagem total de leucócitos e hemácias foi realizada em contador automático³. Quando foi observada na lâmina de esfregaço sangüíneo uma pequena quantidade de plaquetas dificultando a estimativa, foi realizada a diluição do sangue com Líquido de Brecher (oxalato de amônio 1%) e feita a contagem manual das mesmas em hemocítômetro padrão (Câmara de Neubauer). Para a determinação de hemoglobina, utilizou-se o hemoglominômetro⁴, considerado um método colorimétrico.

6.2 Análises Bioquímicas

Para a realização das provas bioquímicas as amostras foram acondicionadas em tubos sem anticoagulante, com gel ativador da coagulação, no volume de três a quatro mL de sangue. Após a coagulação do mesmo, as amostras foram centrifugadas na rotação de 3.000 rpm durante oito minutos, e o soro foi separado e transferido para tubos menores e processado em espectrofotômetro⁵. Nestas análises foram utilizados kits comerciais para determinação por método cinético, da creatinina⁶, enzimáticos da uréia⁵, ALT⁵, FA⁵, GGT⁵, e colorimétricos da proteína total sérica⁷, albumina⁶ e bilirrubinas⁶.

² Vacuette®

³ CELM CC510®

⁴ CELM HB520®

⁵ CELM SB190®

⁶ Katal®

⁷ Labtest®

6.3 Urinálise

As amostras de urina foram acondicionadas nas próprias seringas onde foram colhidas, com o objetivo de diminuir a contaminação, no volume aproximado de 10 mL. Da mesma forma, foram levadas e processadas imediatamente após a colheita. Foi separado cinco mL da amostra em tubos e centrifugados na rotação de 1.500 rpm durante cinco minutos, permitindo desta forma, descartar o sobrenadante e o 0,5 mL restante foi utilizado para confeccionar lâmina para a observação do sedimento urinário em microscópio óptico, em aumento 40x. A outra parte da amostra foi utilizada para o exame físico-químico, sendo o exame físico realizado pela observação, verificando cor e turbidez. Foram utilizadas tiras reagentes⁸ para a avaliação de pH, proteínas, glicose, alteração de urobilinogênio, presença de bilirrubina e sangue oculto. A densidade foi obtida por refratometria e para determinação de sais biliares foi utilizado o teste com sal de enxofre.

6.4 Análise do líquido

Devido à rápida lise celular no ambiente de baixo teor protéico do líquido, a contagem de células e as preparações citológicas do fluido foram realizadas dentro de 30 a 60 minutos após a colheita.

Foram avaliados o volume, cor, aspecto, densidade e a presença de coágulos na amostra. As alterações registradas como partes do exame físico foram classificadas como discretas, moderadas ou intensas. A mensuração da densidade foi realizada com uso do refratômetro.

O exame químico do líquido foi realizado com tiras reagentes⁸ e foram avaliados pH, estimativa de proteínas, glicose e sangue oculto. A quantificação de proteínas totais do líquido requer um método bioquímico com a utilização de espectrofotômetro, pois a tira reagente é um método semi-quantitativo. Também como parte do exame químico, foi realizado um teste qualitativo de proteínas (Teste de Pandy), que detecta o aumento de globulinas. Para a realização, utilizou-se uma gota da amostra em um mL do reativo de Pandy (solução saturada de fenol), e a presença de turbidez da solução foi considerada positiva e então classificada em cruzes (+, ++ ou +++).

⁸ Combur Teste - Roche®

Para contagens de hemácias e células nucleadas utilizou-se o hemocítmetro padrão (Câmara de Neubauer). Para contagens de células nucleadas em líquido não-diluído, foram preenchidas ambas as câmaras do hemocítmetro. Todas as células nucleadas presentes na área da câmara foram contadas para obtenção de número total por microlitro. A contagem de hemácias foi realizada de modo semelhante.

Como o líquido normalmente apresenta baixa celularidade, há a necessidade de concentração destas células através da citocentrifugação, que foi realizada colocando-se a amostra em um citofunil acoplado a uma lâmina de microscopia e centrífuga a 800 rpm durante cinco minutos. As preparações de citocentrifugação foram secas ao ar livre e coradas com o corante de base Romanowsky. Na objetiva de imersão do microscópio óptico, realizou-se a leitura da lâmina preparada, visando à contagem de no mínimo 50 células nucleadas.

7 Reação de Imunofluorescência Direta

A técnica de reação de imunofluorescência direta foi realizada nas amostras de sangue de todos os animais. Para esta forma de diagnóstico foi necessária pequena quantidade de sangue periférico, colhido preferencialmente nas veias cefálicas e safenas, em seringas agulhadas estéreis e imediatamente foram realizadas as lâminas de esfregaço sangüíneo.

As lâminas foram encaminhadas para o Laboratório de Imunologia da Disciplina de Enfermidades Infecciosas da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da UNESP-Botucatu/SP. Após secagem das lâminas em temperatura ambiente por no mínimo 30 minutos, estas foram fixadas com solução de acetona e metanol na proporção de 75/25 respectivamente. As lâminas foram marcadas com esmalte em formatos de poços e nestes foram adicionados 50-70 µL de conjugado comercial diluído nas proporções de 1:5 de diluente PBS e foram incubadas por 30 minutos em câmara úmida a 37°C. Após este período as lâminas foram enxaguadas três vezes com PBS a 8,5%, durante 3 minutos cada enxágüe, e posteriormente lavadas com água destilada. As lâminas foram secas nas extremidades e realizadas as montagens com glicerina e lamínula. A leitura foi realizada em microscópio de fluorescência em aumento de 400x.

8 Análise estatística

Os grupos experimentais foram comparados entre si pelos testes: t de Student, U de Mann-Whitney, de χ^2 ou Exato de Fischer, segundo a característica de distribuição das variáveis, ou seja, se tinham distribuição Normal, Livre ou eram variáveis categóricas, respectivamente. A evolução dos animais, bem como o aparecimento de efeitos colaterais foi comparado entre os grupos pelo teste de Log-Rank (método de Collet). Para todas as análises foi utilizado um nível de confiança de 5% (TRIOLA, 2005).

Resultados

1 Animais

Foram selecionados para o estudo 26 animais que apresentavam sinal clínico neurológico compatível com cinomose, apresentando entre dois meses a seis anos de idade, exceto um animal com 13 anos que apresentava sinais nervosos, histórico de vacinação incompleta e imunofluorescência direta do líquido positiva. Destes, apenas 20 animais compuseram o experimento, pois receberam a ribavirina por mais de sete dias.

Os 20 animais foram divididos em dois grupos de 10, sendo o grupo 1 (G1) composto por animais que receberam apenas a ribavirina e o grupo 2 (G2) os animais que receberam o antiviral e sua associação com o DMSO. No G1 apenas três animais apresentavam raça definida, enquanto no G2 apenas quatro possuíam raça (Tabela 01).

Os animais foram divididos aleatoriamente, sendo que o G1 foi composto por cinco fêmeas e cinco machos e apenas três animais apresentaram imunofluorescência direta de sangue negativo. O G2 foi composto por quatro fêmeas e seis machos e dois deles foram negativos na imunofluorescência direta (Tabela 01).

No levantamento dos animais do GC foram incluídas seis fêmeas e quatro machos, porém nestes animais não foi realizado imunofluorescência direta, pois são dados obtidos de prontuários anteriores ao experimento, no período de dezembro de 2006 a fevereiro de 2007. Porém, para inclusão no grupo controle foi utilizado todas as outras características clínicas encontradas nos outros dois grupos experimentais. Este grupo serviu como parâmetro de mortalidade dos animais com cinomose que receberam apenas o tratamento sintomático.

TABELA 01 – Relação de animais que compuseram os dois grupos experimentais, com idade, sexo, raça e resultado da reação de imunofluorescência direta no esfregaço sangüíneo.

Grupo	Animal	Idade	Sexo	Raça**	IFD*
G1	Catita	8 meses	Fêmea	SRD	+
G1	Bill	5 anos	Macho	Poodle	-
G1	Berbela	2 anos	Fêmea	SRD	+
G1	Max	2 anos	Macho	SRD	+
G1	Rananka	3 anos	Fêmea	SRD	+
G1	Mel	2 anos	Fêmea	Daschund	+
G1	Titica	3 anos	Fêmea	SRD	+
G1	Mico	4 anos	Macho	SRD	+
G1	Fofinho	2 anos	Macho	Poodle	-
G1	Nick	1 ano	Macho	SRD	-
G2	Sheik	4 anos	Macho	SRD	+
G2	Preta	4 meses	Fêmea	SRD	+
G2	Filó	13 anos	Fêmea	Waimaraner	+
G2	Princesa	4 anos	Fêmea	Poodle	+
G2	Nina	1 ano	Fêmea	Border Colie	+
G2	Marlon	3 anos	Macho	SRD	+
G2	Zubu	10 meses	Macho	Pit Bull	+
G2	Bethoven	6 anos	Macho	SRD	-
G2	Kiko	2 anos	Macho	SRD	+
G2	Skol	5 anos	Macho	SRD	-

* IFD: imunofluorescência direta

** SRD: sem raça definida

+: animal positivo

-: animal negativo

Com relação ao tempo de evolução da doença, os animais, para serem incluídos nos experimento, deveriam apresentar no máximo 10 dias de sinais nervosos. Os animais do GC apresentaram média de seis dias de evolução dos sinais neurológicos quando foram atendidos no Hospital Veterinário. Contudo, os animais do G1 apresentaram média de cinco dias de sinais nervosos para o início do tratamento e o G2 apresentou média de seis dias de alteração neurológica para o início do tratamento (Tabela 02).

TABELA 02 – Tempo de evolução dos sinais neurológicos entre os grupos.

Grupo	Média ± desvio-padrão*
Controle	6,40 ± 3,06
G1	5,00 ± 3,20
G2	6,20 ± 2,57

* Tempo de evolução em dias

Estatística: Análise de Variância (F=0,6559; p=0,5270)

Foi possível observar que não houve diferença significativa (p=0,5270) entre os grupos, permitindo a melhor padronização dos resultados frente ao estágio da enfermidade.

Para auxiliar no diagnóstico da cinomose foi utilizada a reação de imunofluorescência direta e na Tabela 03 podemos observar a análise destes dados.

TABELA 03 – Resultado da reação de imunofluorescência direta de esfregaço sangüíneo dos animais nos grupos 1 e 2.

Grupo	Positiva	Negativa
G1	7 (70%)	3 (30%)
G2	8 (80%)	2 (20%)

Estatística: teste do χ^2 ($\chi^2=0,2667$; p=0,6056)

Esta análise não apresentou diferença significativa entre os resultados positivos e negativos. Contudo, podemos observar que a maioria dos animais apresentou resultado positivo, permitindo o diagnóstico final da enfermidade. Este resultado nos permite afirmar que 70% dos animais do G1 e 80% dos animais do G2 apresentavam viremia, uma vez que este método identifica o antígeno viral na amostra de sangue, sugerindo que estavam na fase aguda da cinomose, na qual ocorre replicação viral intensa e, por isso, é a fase ideal para a utilização do antiviral.

2 Avaliação dos grupos experimentais

Os grupos 1 e 2 foram analisados frente ao grupo controle com relação ao índice de mortalidade, como demonstra a Tabela 04.

TABELA 04 – Evolução da cinomose na fase neurológica entre os grupos.

Grupo	Melhora	Óbito
Controle	5 (50%)	5 (50%)
G1	7 (70%)	3 (30%)
G2	8 (80%)	2 (20%)

Estatística: teste do χ^2 ($\chi^2=2,100$; $p=0,3499$).

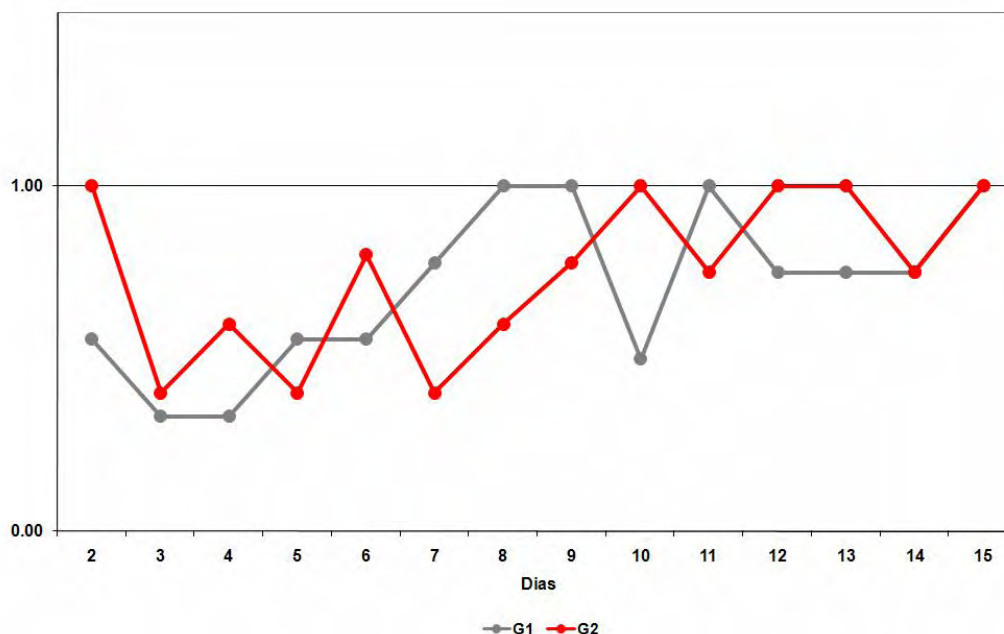
G1: grupo 1

G2: grupo 2

Apesar de não ocorrer diferença significativa ($p=0,3499$) entre os grupos, pôde-se observar uma queda no índice de mortalidade com o tratamento, porém quando se utilizou a ribavirina associada ao DMSO (G2) esta queda se tornou mais evidente com apenas 20% de óbitos.

A partir da avaliação clínica diária dos animais foi criada uma representação gráfica da evolução da doença entre os grupos, demonstrando a ação da ribavirina e sua associação com o DMSO (Figura 01). Neste observamos a melhora clínica indicada no eixo y pelo número 1 e óbito de todos os animais pelo zero. Também foi considerado os animais que vieram a óbito no decorrer do tratamento.

FIGURA 01 – Representação gráfica da avaliação clínica diária dos animais dos dois grupos experimentais.



1.00: melhora do quadro clínico

0.00: piora do quadro clínico

G1: grupo 1

G2: grupo 2

Através do gráfico podemos observar que os animais do G1 começaram a apresentar melhora clínica a partir do sexto dia da administração da ribavirina, porém

no décimo dia de tratamento a maior parte apresentou piora e variações no estado clínico nos dias seguintes.

Os animais do G2 apresentaram elevação na curva a partir do sétimo dia de administração das drogas, que foi mantida até o décimo dia e após este período demonstraram variação no estado clínico.

Os resultados sugerem que a ação da ribavirina resulta em melhora clínica ao redor do sétimo dia de administração. Além disso, a variação encontrada após o décimo dia pode sugerir uma ação do sistema imune no SNC, já que não foi utilizado nenhum anti-inflamatório ou imunomodulador, porém esta informação será verificada através do exame do líquido.

3 Evolução da doença frente aos dados epidemiológicos

O histórico vacinal foi considerado um critério de seleção dos animais, por isso, animais que apresentavam histórico vacinal correto, não foi incluído no experimento.

TABELA 05 – Relação entre a evolução da doença com o histórico vacinal dos animais.

Histórico vacinal	GC		G1		G2	
	Melhora	Óbito	Melhora	Óbito	Melhora	Óbito
Não ética	3 (75%)	1 (25%)	3 (60%)	2 (40%)	2 (100%)	0
Sem vacina	2 (50%)	2 (50%)	4 (80%)	1 (20%)	4 (80%)	1 (20%)
Desconhecido	0	1 (100%)	0	0	1 (100%)	0
Incompleto	0	1 (100%)	0	0	1 (50%)	1 (50%)

Estatística: teste de χ^2 ($\chi^2=2,348$; $p=0,5035$)

GC: grupo controle

G1: grupo 1

G2: grupo 2

%: porcentagem

Este tipo de análise é de fundamental importância com relação à evolução da doença e a presença de imunidade celular. Por isso, os animais agrupados com histórico de vacinação desconhecido estão em menor número, demonstrando que não nos oferece resultado significativo. Os animais foram encontrados na rua e posteriormente apresentaram sintomatologia neurológica depois que chegaram ao domicílio.

Dos três animais agrupados com histórico vacinal incompleto, um foi contaminado quando filhote e não havia recebido a dose de reforço. Os outros dois pertencentes ao G2, eram adultos e não receberam a revacinação anual.

Os resultados não apresentaram nível de significância estatística. No entanto, é possível verificar que os índices de melhora clínica ou óbito não variaram percentualmente entre os grupos quando os animais receberam esquema vacinal incorreto, agrupados na Tabela 05 como animais com histórico de vacinação não ética. Os animais que não foram vacinados demonstraram aumento na porcentagem de melhora clínica quando receberam o tratamento experimental. Neste grupo houve boa resposta terapêutica, embora os animais não apresentassem memória imunológica, como pode ocorrer com aqueles que receberam vacina não ética.

Ao analisarmos animais com relação ao sexo e raça frente à evolução da doença, observamos que não houve diferenças significativas.

TABELA 06 – Relação entre a evolução da doença frente ao tempo de desenvolvimento dos sinais neurológicos até o início do tratamento.

Tempo de evolução	GC		G1		G2	
	Melhora	Óbito	Melhora	Óbito	Melhora	Óbito
0 a 7 dias	3 (42,9%)	4 (57,1%)	5 (71,4%)	2 (28,6%)	5 (71,4%)	2 (28,6%)
7 a 10 dias	2 (66,6%)	1 (33,3%)	2 (66,6%)	1 (33,3%)	3 (100,0%)	0

Estatística: teste de ², sendo que não houve diferença significativa $p > 0,05$

GC: grupo controle

G1: grupo 1

G2: grupo 2

%; porcentagem

A análise do tempo de evolução dos sinais neurológicos frente a melhora clínica dos animais não demonstrou diferença significativa entre os grupos. Nos intervalos criados não vimos correlação ao momento em que se iniciou o tratamento, com o desfecho da doença, porém, assim como em outros tratamentos, sabemos que o ideal é iniciar a utilização das drogas o mais rápido possível. Com estes resultados, observamos apenas que o tempo para o início do tratamento de até 10 dias de sinais neurológicos não alterou a eficácia da droga.

4 Evolução da doença frente aos sinais clínicos e as lesões neurológicas

Os principais sinais neurológicos encontrados no GC foram mioclonias (60%), ataxia (40%) e paralisia de membros (30%), sendo que outros sinais como choro noturno, tremores e nistagmo (20%), convulsões, fraqueza muscular, andar em círculos e sialorréia (10%) também foram encontrados (Tabela 07).

No grupo que recebeu apenas a ribavirina (G1) os principais sinais foram ataxia e déficits de locomoção (80%), sendo que neste último foram agrupadas alterações na propriocepção e sensibilidade superficial e profunda dos membros, em seguida encontramos mioclonias, alterações em nervos cranianos, paresia de membros, tremores, desvio de cabeça e hipermetria (40%), ataxia (30%), com menor frequência nistagmo e espasticidade de membros (20%) e outros sinais como giro ortotônico do pescoço, atrofia muscular, choro noturno, estrabismo e balançar de cabeça (10%), relacionados na Tabela 07.

O grupo que recebeu a associação da ribavirina com DMSO (G2) apresentou sinais como ataxia, tremores e alterações em nervos cranianos (80%), mioclonias (70%), hipermetria, desvio de cabeça, paresia de membros, déficits de locomoção e espasticidade (30%), nistagmo, andar em círculos e balançar de cabeça (20%), e opistótono, giro ortotônico do pescoço, hiperexcitabilidade e estrabismo (10%), que também foram relacionados na Tabela 07.

TABELA 07 – Relação dos sinais clínicos neurológicos encontrados nos diferentes grupos, no momento que foram atendidos no Hospital Veterinário.

Sinais	GC	G1	G2
Ataxia	4 (40%)	8 (80%)	8 (80%)
Alterações em nervos cranianos		4 (40%)	8 (80%)
Andar em círculos	1 (10%)		2 (20%)
Apatia		3 (30%)	
Atrofia muscular		1 (10%)	
Balançar de cabeça		1 (10%)	2 (20%)
Choro noturno	2 (20%)	1 (10%)	
Convulsões	1 (10%)		
Déficits de locomoção		8 (80%)	3 (30%)
Desvio de cabeça		4 (40%)	3 (30%)
Espasticidade de membros		2 (20%)	3 (30%)
Estrabismo		1 (10%)	1 (10%)
Fraqueza muscular	1 (10%)		
Giro ortotônico do pescoço		1 (10%)	1 (10%)
Hipermetria		4 (40%)	3 (30%)
Hiperexcitabilidade			1 (10%)
Mioclonias	6 (60%)	4 (40%)	7 (70%)
Nistagmo	2 (20%)	2 (20%)	2 (20%)
Opistótono			1 (10%)
Paresia de membros	3 (30%)	4 (40%)	3 (30%)
Tremores	2 (20%)	4 (40%)	8 (80%)
Sialorréia	1 (10%)		

GC: grupo controle

G1: grupo 1

G2: grupo 2

%; porcentagem

Com objetivo de identificar o quadro clínico favorável à utilização da ribavirina, localizamos a lesão nervosa através dos sinais presentes e comparamos a evolução da enfermidade para melhora clínica ou óbito pela Tabela 08.

TABELA 08 – Relação das lesões neurológicas nos grupos e a evolução da doença.

Estrutura*	GC		G1		G2	
	Melhora	Óbito	Melhora	Óbito	Melhora	Óbito
Cerebelo						
Com lesão	0	2 (100,0%)	7 (70,0%)	3 (30,0%)	7 (87,5%)	1 (12,5%)
Sem lesão	5 (62,5%)	3 (37,5%)	0	0	1 (50,0%)	1 (50,0%)
Substância branca						
Com lesão	0	1 (100,0%)	7 (70,0%)	3 (30,0%)	0	1 (100,0%)
Sem lesão	5 (55,6%)	4 (44,4%)	0	0	8 (88,9%)	1 (11,1%)
Encéfalo						
Com lesão	3 (100,0%)	0	4 (57,1%)	3 (42,9%)	6 (75,0%)	2 (25,0%)
Sem lesão	2 (28,6%)	5 (71,4%)	3 (100,0%)	0	2 (100,0%)	0
Medula espinhal						
Com lesão	3 (75,0%)	1 (25,0%)	3 (60,0%)	2 (40,0%)	1 (100,0%)	0
Sem lesão	2 (33,3%)	4 (66,7%)	4 (80,0%)	1 (20,0%)	7 (77,8%)	2 (22,2%)
Nervo periférico						
Com lesão	1 (100,0%)	0	2 (66,7%)	1 (33,3%)	2 (100,0%)	0
Sem lesão	4 (44,4%)	5 (55,6%)	5 (71,4%)	2 (28,6%)	6 (75,0%)	2 (25,0%)
Núcleo de nervo						
Com lesão	3(50,0%)	3 (50,0%)	2 (50,0%)	2 (50,0%)	5 (83,3%)	1 (16,7%)
Sem lesão	2 (50,0%)	2 (50,0%)	5 (83,3%)	1 (16,7%)	3 (75,0%)	1 (25,0%)
Par NC II						
Com lesão	0	0	1 (100,0%)	0	1 (100,0%)	0
Sem lesão	5 (50,0%)	5 (50,0%)	6 (66,7%)	3 (33,3%)	8 (80,0%)	2 (20,0%)
Par NC III						
Com lesão	0	0	1 (100%)	0	2 (66,7%)	1 (33,3%)
Sem lesão	5 (50,0%)	5 (50,0%)	6 (66,7%)	3 (33,3%)	6 (85,7%)	1 (14,3%)
Par NC IX						
Com lesão	0	0	0	2 (100,0%)	0	0
Sem lesão	5 (50,0%)	5 (50,0%)	7 (87,5%)	1 (12,5%)	8 (80,0%)	2 (20,0%)
Par NC V						
Com lesão	0	1 (100,0%)	7 (70,0%)	3 (30,0%)	0	0
Sem lesão	5 (55,6%)	4 (44,4%)	0	0	8 (80,0%)	2 (20,0%)
Par NC VIII						
Com lesão	0	1 (100,0%)	1 (100,0%)	0	0	0
Sem lesão	5 (55,6%)	4 (44,4%)	6 (66,7%)	3 (33,3%)	8 (80,0%)	2 (20,0%)
Par NC X						
Com lesão	0	0	0	2 (100,0%)	0	0
Sem lesão	5 (50,0%)	5 (50,0%)	7 (87,5%)	1 (12,5%)	8 (80,0%)	2 (20,0%)
Par NC XI						
Com lesão	0	0	7 (70,0%)	3 (30,0%)	1 (50,0%)	1 (50,0%)
Sem lesão	5 (50%)	5 (50%)	0	0	7 (87,5%)	1 (12,5%)
Par NC XII						
Com lesão	0	0	1 (100,0%)	0	0	0
Sem lesão	5 (50,0%)	5 (50,0%)	6 (66,7%)	3 (33,3%)	8 (80,0%)	2 (20,0%)
Sistema Vestibular						
Com lesão	0	1 (100,0%)	3 (75,0%)	1 (25,0%)	3 (75,0%)	1 (25,0%)
Sem lesão	5 (55,6%)	4 (44,4%)	4 (66,7%)	2 (33,3%)	5 (83,3%)	1 (16,7%)
Tronco encefálico						
Com lesão	1 (100,0%)	0	2 (40,0%)	3 (60,0%)	5 (71,4%)	2 (28,6%)
Sem lesão	4 (44,4%)	5 (55,6%)	5 (100,0%)	0	3 (100,0%)	0

Estatística: teste de χ^2 , não houve diferença significativa ($p>0,05$); *Estrutura: localização clínica da lesão neurológica

GC: grupo controle; G1: grupo 1; G2: grupo 2

%: porcentagem

Os resultados comparativos das lesões no SNC frente à evolução da enfermidade não foram estatisticamente significativos, porém algumas análises clínicas puderam ser realizadas.

A partir destes dados, podemos observar que no GC apenas dois animais apresentavam lesões cerebelares, ao contrário do que foi encontrado nos outros dois grupos, porém acima de 70% dos animais que apresentavam esta lesão chegaram à melhora clínica com o uso da ribavirina e sua associação com o DMSO.

As lesões na substância branca são difíceis de serem distinguidas quando associadas às outras lesões, por isso foram identificadas por tremores em animais que não apresentavam sinais de acometimento do cerebelo e/ou do sistema vestibular. Contudo, poucos animais foram identificados apresentando estas lesões, apesar da cinomose ser considerada uma enfermidade desmielinizante.

No caso de animais com lesão encefálica foram considerados os sinais referentes ao nível de consciência, alterações na visão, convulsões, andar em círculos e algumas alterações na locomoção, como a diminuição da propriocepção. Nos dois grupos tratados, verificamos que os animais sem lesões encefálicas tiveram favorável índice de melhora, porém mesmo sendo uma lesão grave, os animais destes grupos com alterações encefálicas mostraram um melhor resultado frente ao tratamento da enfermidade.

As lesões de medula espinhal também foram pouco comuns e são referentes aos sinais clínicos de paresia de membros e diminuição de sensibilidade, já que as mioclonias foram separadas no grupo de lesões em núcleo de nervos. A associação de sinais nervoso na cabeça com déficits de locomoção também foram considerados neste grupo, já que pode haver um comprometimento de medula espinhal cervical. Contudo, os dados entre os três grupos mostraram uma semelhança no índice de melhora clínica, independente do tratamento utilizado.

Com relação aos dados referentes às lesões de nervos periféricos, os sinais como ataxia, diminuição de propriocepção e déficits de locomoção foram considerados, apesar destes sinais caracterizarem melhor a lesão em outras regiões. Estes dados possuem pouco valor clínico, já que a cinomose é uma enfermidade de acomete principalmente SNC.

A mioclonia foi considerada uma lesão em núcleo de nervos medulares e cranianos. Sendo este sinal considerado característico da cinomose, observamos que não houve diferença percentual nos dados dos grupos controle e de animais tratados com a

ribavirina. A partir destes resultados podemos sugerir que o DMSO aumentou o poder de difusão da ribavirina pelo SNC, proporcionando uma melhor ação local nestas lesões. Além disso, foi possível verificar na avaliação clínica diária que estes animais do G2, além da melhora clínica, tiveram também uma atenuação destes sinais no período de tratamento.

As alterações em nervos cranianos foram pouco encontradas nos animais do grupo controle, e nos grupos tratados estas foram caracterizadas por sinais como cegueira, diminuição de reflexos pupilares, estrabismo, diminuição de sensibilidade de face, desvio de cabeça, nistagmo, dificuldade de deglutição, atrofia dos músculos do pescoço e ptoses palpebral, labial e auricular. Nos casos de nistagmo, foram separados os animais que apresentavam o nistagmo vertical ou posicional, quando os sinais se associavam à presença de síndromes vestibulares ou cerebelares.

No G1 encontramos com mais frequência alterações nos pares de nervos cranianos V e XI, referentes aos sinais de reflexo palpebral, sensibilidade de face e atrofia da musculatura de pescoço, respectivamente, sendo que 70% dos animais que apresentavam estes sinais obtiveram melhora clínica.

As lesões no sistema vestibular foram observadas em quatro animais nos dois grupos tratados, sendo que três deles evoluíram para a melhora clínica. Estas lesões foram caracterizadas por ataxia, andar em círculos, desvio lateral da cabeça, em alguns casos nistagmo horizontal, vertical, rotacional e posicional, dificuldade de manter-se em estação e diminuição da propulsão extensora.

No entanto, as lesões em tronco encefálico mostraram uma relevância, já que no G1 60% dos animais foram a óbito e apresentavam sinais como associação de lesões pupilares com outras alterações em pares de nervos cranianos, ataxia com diminuição de propriocepção, incordenação e paresias. Entretanto, no G2 observamos que 71,4% destes animais sobreviveram com melhora clínica.

5 Exames complementares

Os exames hematológicos e bioquímicos foram analisados através do teste t de Student e a diferença significativa considerada entre os grupos 1 e 2 foi de $p < 0,05$. Os hemogramas foram colhidos nos dias 1, 4, 7, 10, 12 e 15 do tratamento, foi feita a média para cada dia de forma que podemos avaliar efeitos colaterais da ribavirina e sua associação com o DMSO sobre as hemácias e sugerir alterações na medula óssea de

cães. As análises bioquímicas foram avaliadas da mesma forma, porém foram realizadas quatro colheitas nos dias 1, 5, 10 e 15. Estes dados estão relacionados na tabelas seguintes.

TABELA 09 – Média, desvio padrão e nível de significância da contagem de hemácias.

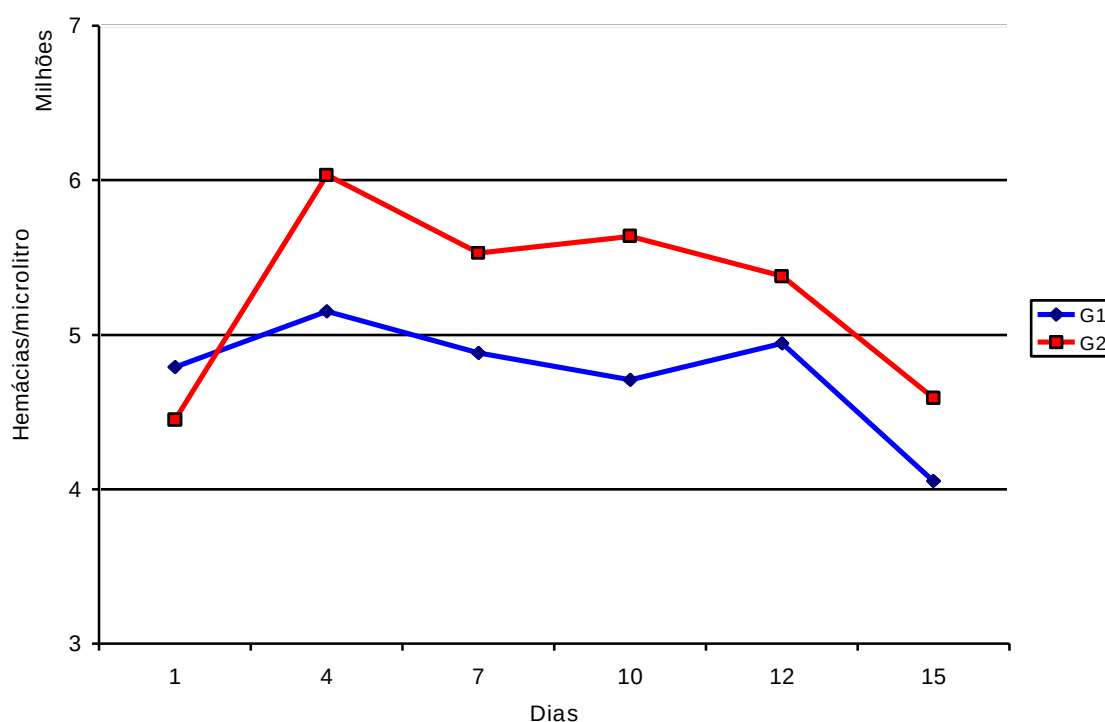
Dias	G1		G2		Estatística
	Média*	Desvio padrão	Média*	Desvio padrão	Valor de p
1	4.791.000	857586,41	4.448.333	1221428,62	0,4008
4	5.152.000	1436259,03	6.034.000	994877,99	0,1277
7	4.884.000	993570,44	5.529.000	1289508,52	0,2262
10	4.708.888	641588,74	5.637.777	517536,90	0,0038
12	4.943.333	1095935,67	5.377.500	1371253,34	0,4795
15	4.052.500	1209530,61	4.592.057	807881,34	0,3118

Estatística: teste t de Student, sendo que valores de $p < 0,05$ indicam diferença significativa entre os grupos

*Média da contagem de células/ μL

G1: grupo 1; G2: grupo 2

FIGURA 02 – Representação gráfica da variação das médias da contagem de hemácias entre os dois grupos.



* Média da contagem de células/ μL

G1: grupo 1; G2: grupo 2

Através destes dados podemos observar que os animais do G1 mantiveram média baixa na contagem de hemácias, demonstrando um quadro de anemia durante quase todo o período de tratamento. No entanto, os animais do G2 tiveram resposta frente à infecção viral resultando em aumento na contagem de hemácias no quarto dia de tratamento.

Contudo, apenas no décimo dia observamos diferença significativa ($p=0,0038$) na contagem de hemácias entre os dois grupos evidenciando a atividade antiviral da ribavirina com associação ao DMSO em resposta a anemia, conseqüente ao estresse causado pelo vírus da cinomose. A partir do 12º dia verificamos queda nesta contagem que foi avaliada junto a outros dados, podendo sugerir alteração na medula óssea pela ação da ribavirina.

Foi possível considerar também que o DMSO potencializou a ação da ribavirina ou minimizou possíveis danos na medula óssea nos animais do G2, já que as médias da contagem de hemácias mantiveram médias superiores a partir do quarto dia de administração das drogas.

TABELA 10 – Média, desvio padrão e nível de significância da concentração de hemoglobina.

Dias	G1		G2		Estatística
	Média*	Desvio padrão	Média*	Desvio padrão	Valor de p
1	10,38	1,83	10,29	2,61	0,8620
4	11,28	2,89	13,07	2,56	0,1599
7	11,06	2,27	12,61	2,51	0,1650
10	10,51	1,67	11,92	1,89	0,1129
12	10,78	2,58	11,64	2,44	0,4931
15	8,65	2,62	10,83	1,14	0,0489

Estatística: teste t de Student, sendo que valores de $p<0,05$ indicam diferença significativa entre os grupos.

*Média da concentração de hemoglobina em g/dL

G1: grupo 1

G2: grupo 2

Desta forma podemos observar que os resultados da dosagem de hemoglobina foram compatíveis com a contagem de hemácias, demonstrando que a anemia encontrada não é causada por hemólise, para confirmação deste resultado podemos avaliar a dosagem de bilirrubina indireta. No entanto, foi encontrada uma diferença

significativa no 15º dia entre os dois grupos, a qual é resultante de uma queda acentuada na concentração globular de hemoglobina no G1.

TABELA 11 – Média, desvio padrão e nível de significância do volume globular.

Dias	G1		G2		Estatística
	Média*	Desvio padrão	Média*	Desvio padrão	Valor de p
1	30,80	5,37	31,58	7,45	0,8270
4	33,10	8,25	39,10	7,17	0,0998
7	32,10	5,88	37,50	7,17	0,0820
10	30,67	5,12	36,33	4,18	0,0205
12	32,22	7,82	36,00	6,76	0,3060
15	24,25	5,63	29,63	4,60	0,0551

Estatística: teste t de Student, sendo que valores de $p < 0,05$ indicam diferença significativa entre os grupos

* Média do volume globular %

G1: grupo 1

G2: grupo 2

Estes resultados confirmam os resultados da contagem de hemácias e a dosagem de hemoglobina, demonstrando que no quarto dia de tratamento os animais do G2 não demonstravam mais o quadro de anemia. E concordando com os dados anteriores, obtivemos uma diferença significativa no décimo dia de tratamento entre os dois grupos, demonstrando estatisticamente que a resposta dos animais que receberam a associação da ribavirina com o DMSO teve uma resposta favorável ao combate da infecção pelo vírus da cinomose.

TABELA 12 – Média, desvio padrão e nível de significância na contagem de plaquetas.

Dias	G1		G2		Estatística
	Média*	Desvio padrão	Média*	Desvio padrão	Valor de p
1	174.730	80763,67	172.450	83599,74	0,8241
4	220.115	112382,90	253.187	79573,41	0,4574
7	242.332	144493,25	266.170	114242,02	0,6872
10	313.494	182334,32	235.216	64305,58	0,2421
12	207.991	82347,40	210.028	117202,94	0,9672
15	193.428	88530,21	179.481	48739,08	0,7022

Estatística: teste t de Student, sendo que valores de $p < 0,05$ indicam diferença significativa entre os grupos

* Média da contagem de plaquetas/ μ L

G1: grupo 1

G2: grupo 2

A média da contagem de plaquetas revela uma leve trombocitopenia no primeiro dia, no qual os animais ainda não haviam recebido o tratamento. E no último dia de tratamento o G2 revelou uma média mais baixa com relação ao G1, porém nenhuma das comparações entre os grupos mostrou nível de significância.

TABELA 13 – Média, desvio padrão e nível de significância entre os grupos com relação à contagem de total de leucócitos.

Dias	G1		G2		Estatística
	Média*	Desvio padrão	Média*	Desvio padrão	Valor de p
1	8.530	3984,43	7.690	5421,89	0,8657
4	7.865	3212,48	13.116	7035,61	0,0457
7	7.271	2834,43	11.622	7732,06	0,1120
10	6.252	2875,65	12.433	8405,21	0,0532
12	8.536	4257,72	9.388	3735,03	0,6693
15	5.291	3097,44	7.079	2614,01	0,2328

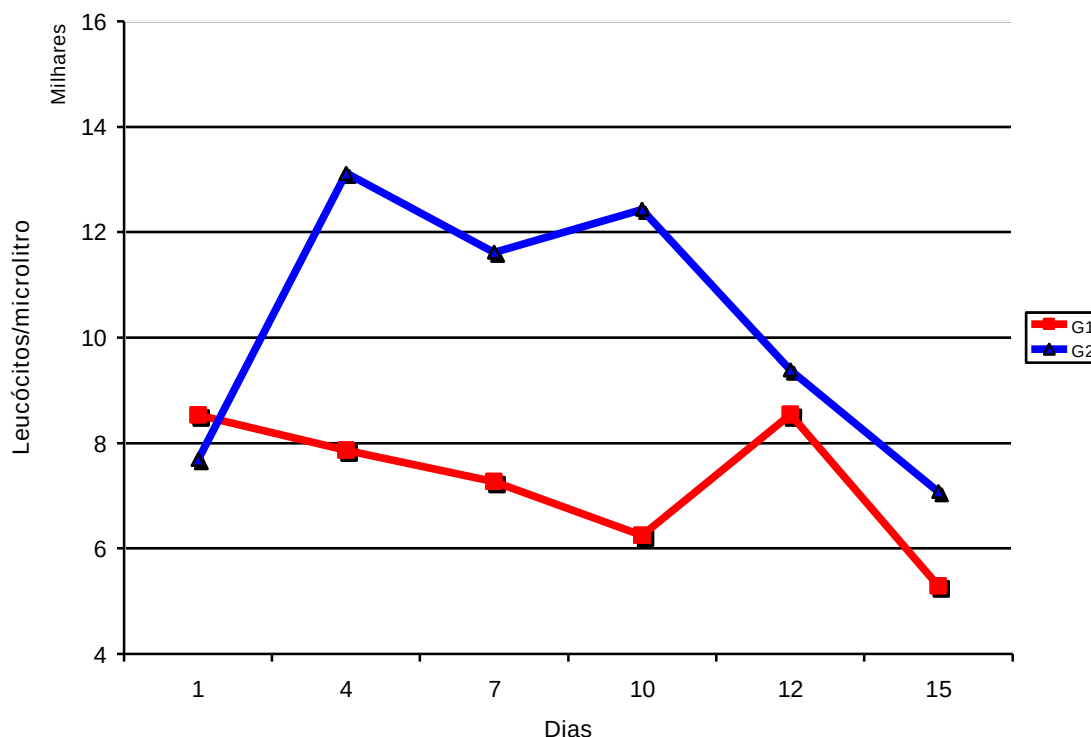
Estatística: teste t de Student, sendo que valores de $p < 0,05$ indicam diferença significativa entre os grupos.

* Média da contagem de células/ μ L

G1: grupo 1

G2: grupo 2

FIGURA 03 – Representação gráfica da variação das médias da contagem total de leucócitos entre os dois grupos.



*Média da contagem de células/ μ L

G1: grupo 1

G2: grupo 2

Com relação à série branca, os resultados demonstraram que não houve leucopenia na média da contagem total de leucócitos no primeiro dia. Porém no quarto dia de administração da droga houve uma diferença significativa entre os resultados do G1 e G2, mostrando que o grupo que recebeu a ribavirina associada com o DMSO obteve uma resposta imunológica melhor do que os animais do G1. Esta diferença na resposta imunológica, apesar de não apresentar nível de significância estatística, foi considerável até o décimo dia de tratamento. No 15º dia as contagens de leucócitos caíram nos dois grupos, sendo que o G1 apresentou leucopenia, que pode ser responsiva ao uso da ribavirina conforme a literatura.

Estes resultados nos permitem afirmar que o DMSO melhorou a ação da ribavirina sobre o vírus, que ficou evidenciado pela resposta imune.

A análise feita com as médias de neutrófilos não mostrou nível de significância entre os grupos, em nenhum momento do tratamento, e a partir destas não foram observadas neutrofilia ou neutropenia.

TABELA 14 - Média, desvio padrão e nível de significância entre os grupos com relação à contagem de linfócitos.

G1			G2		Estatística
Dias	Média	Desvio padrão	Média	Desvio padrão	p
1	712	439,07	866	822,60	0,6029
4	450	277,64	1.439	2274,59	0,1891
7	775	1259,92	1.024	1564,99	0,6998
10	281	210,28	1.071	1885,21	0,2296
12	359	346,42	1.367	2493,28	0,2460
15	188	160,55	687	997,64	0,1840

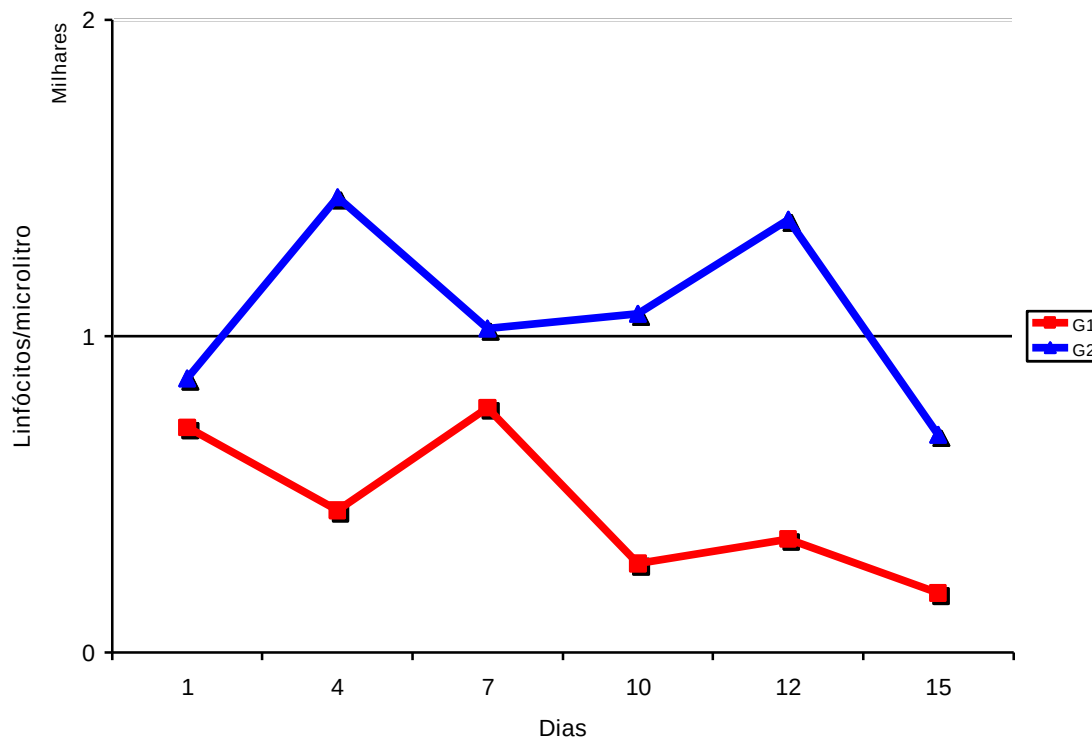
Estatística: teste t de Student, sendo que valores de $p < 0,05$ indicam diferença significativa entre os grupos.

* Média da contagem de células/ μL

G1: grupo 1

G2: grupo 2

FIGURA 04 – Representação gráfica da variação das médias da contagem linfócitos entre os dois grupos.



* Média da contagem de células/ μL

G1: grupo 1

G2: grupo 2

Foi observado que a linfopenia encontrada na primeira colheita não apresentou diferença significativa entre os grupos e os valores médios semelhantes indicam uma alteração encontrada comumente em animais com cinomose.

No entanto, podemos observar que a linfopenia no G1 foi persistente em todos os momentos, ao contrário da encontrada no G2, apesar de não apresentar resultados com significância estatística. Contudo, o aumento no número de linfócitos na referida enfermidade é clinicamente significativo com relação à melhora dos animais, demonstrando novamente que a associação da ribavirina com o DMSO foi mais eficaz na melhora clínica e hematológica destes animais.

O resultado deste experimento demonstra uma sensibilidade dos linfócitos ao tratamento com a ribavirina, já que no 15º dia todos os animais apresentaram uma linfopenia, sendo que a média do G1 mostrou-se extremamente baixa e a média do G2 caiu drasticamente.

Em nossas análises não observamos nenhuma alteração significativa no número de eosinófilos nos dois grupos. No entanto, houve variação na quantidade de monócitos demonstrada na tabela 15.

TABELA 15 – Média, desvio padrão e nível de significância na contagem de monócitos.

Dias	G1		G2		Estatística
	Média*	Desvio padrão	Média*	Desvio padrão	Valor de p
1	579	386,25	653	490,59	0,7060
4	682	402,03	1.717	1140,57	0,0145
7	819	328,20	1.201	1072,80	0,2954
10	676	276,53	1.663	2118,97	0,1847
12	643	290,08	1.022	393,02	0,0377
15	439	514,74	818	665,41	0,2236

Estatística: teste t de Student, sendo que valores de $p < 0,05$ indicam diferença significativa entre os grupos.

*Média da contagem de células/ μ L

G1: grupo 1

G2: grupo 2

Os valores médios da contagem de monócitos estiveram aumentados com relação aos valores de referência apenas no grupo que recebeu a ribavirina associada ao DMSO. Este aumento pode ser observado no quarto dia após a administração das

drogas e apresentou significância frente ao G1. No décimo dia este aumento não teve significância estatística, porém frente aos valores normais destas células, apresenta uma alteração e esta monocitose pode ser considerada uma resposta da medula óssea frente à infecção, quando comparamos com as informações anteriores.

Não foram encontrados corpúsculos de inclusão que caracterizavam a infecção pelo vírus da cinomose nas amostras obtidas dos animais que compuseram os grupos experimentais.

Os testes bioquímicos não apresentaram resultados estatisticamente significantes, porém alguns dados podem ser discutidos clinicamente.

TABELA 16 – Média e desvio padrão dos valores encontrados nos dois grupos na dosagem de uréia no soro.

Dias	G1		G2	
	Média*	Desvio padrão	Média*	Desvio padrão
1	35,30	16,51	32,92	9,02
5	39,14	25,79	30,43	9,60
10	37,88	16,81	35,22	11,79
15	29,11	7,02	27,69	7,38

Estatística: teste t de Student, sendo que não houve diferença significativa entre os grupos.

*Média da dosagem em mg/dL

G1: grupo 1

G2: grupo 2

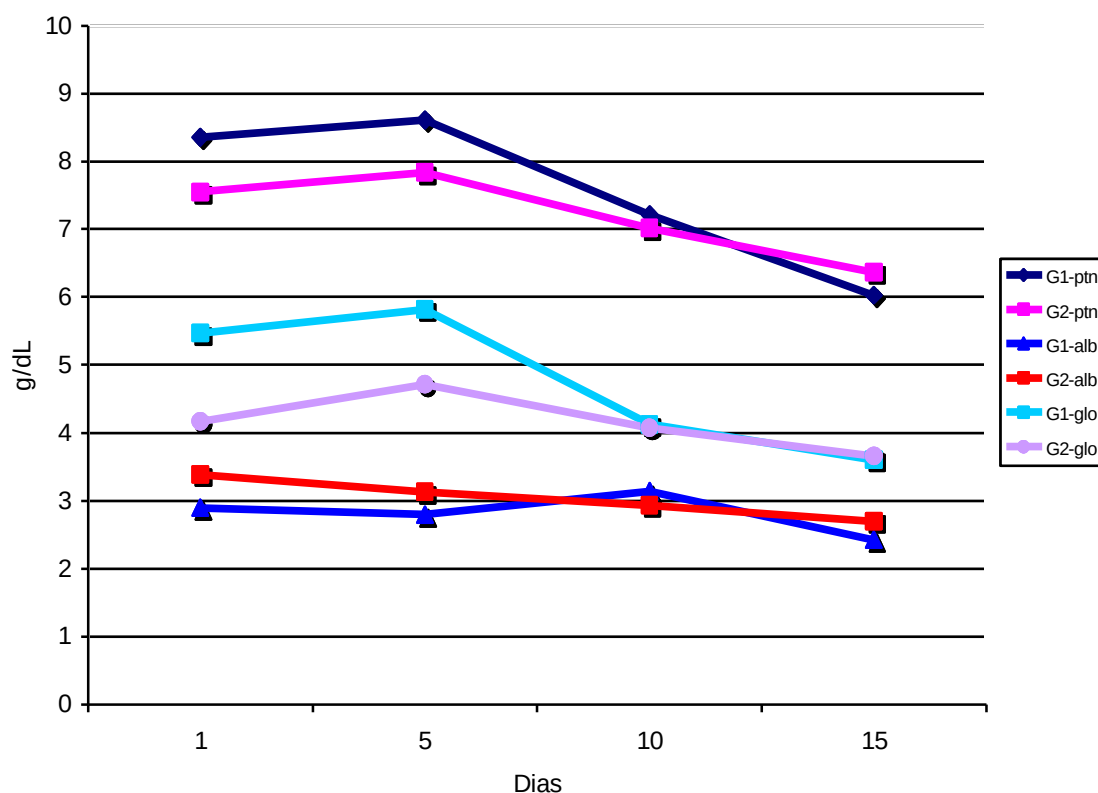
Os dados referentes aos valores médios da dosagem de uréia no soro sangüíneo foram levemente aumentados, podendo identificar um grau de desidratação no início e durante o tratamento. Porém, no 15º dia todos os animais apresentam estes valores normalizados, demonstrando melhora clínica compatível com o que foi verificado nas avaliações diárias, pois a maior parte dos animais quando se iniciou o tratamento ingeriam pouca quantidade de água e ao final deste já tinham normalizado esta ingestão. Além disso, muitos animais chegaram desidratados por apresentarem sintomas sistêmicos simultaneamente, como diarréia ou vômito, que cessaram durante o tratamento.

As dosagens de creatinina, ALT e FA no soro sangüíneo mantiveram suas médias dentro dos valores de referência normais, não apresentando nenhum valor clínico e estatístico, o que demonstra que a ribavirina não exerceu efeitos hepatotóxicos.

No entanto, encontramos algumas alterações nos valores médios de GGT, porém quando comparados estatisticamente não apresentaram significância.

A dosagem de gama-glutamyltransferase (GGT) do soro sangüíneo mostrou valores médios altos a partir do quinto dia de administração da ribavirina associada com o DMSO, no entanto dois fatores podem ter lavado a esse aumento, tanto a associação das duas drogas ou a ação do antibiótico escolhido com mais frequência no grupo, como o cloranfenicol, que pode ter sido potencializado pelo DMSO.

FIGURA 05 – Gráfico representando as variações das médias de proteína, albumina e globulina do soro dos dois grupos.



*Média da dosagem de proteínas, albumina e globulina em g/dL.

G1: grupo 1

G2: grupo 2

Através do gráfico podemos avaliar as duas frações medidas frente aos valores da proteína total sérica. As curvas apresentam uma semelhança justificada por não haver diferença significativa entre as médias dos dois grupos. Para o nosso estudo é importante verificarmos a queda nos valores de globulina no decorrer do tratamento, principalmente a partir do décimo dia de administração das drogas. Esta queda está

diretamente relacionada à resposta do sistema imune por uma diminuição do antígeno viral, que resulta na queda de proteínas totais.

A queda simultânea da fração de albumina pode ser justificada por uma resposta do organismo em manter a osmolaridade sangüínea aos altos valores de globulina.

Da mesma forma que as outras análises bioquímicas, a bilirrubina total sérica e suas frações não demonstraram resultados significativos em suas médias quando comparadas entre os dois grupos. Além disso, estas não apresentaram médias alteradas com relação aos padrões estabelecidos para cães, não demonstrando significância clínica em seus resultados.

No entanto, este resultado negativo para a dosagem de bilirrubinas foi um achado importante considerando que um dos efeitos colaterais mais freqüente da ribavirina em humanos é a hemólise extravascular e conseqüente aumento na dosagem de bilirrubinas.

As amostras de urina foram colhidas em quatro momentos durante o tratamento dos animais do grupo 1 e 2, nos dias 1, 5, 10 e 15. Quando se analisou o aspecto da urina, não foi encontrado resultado significativo entre as amostras, porém observamos que na primeira colheita dois animais apresentavam a urina discretamente turva e dois animais apresentavam a urina turva, sendo que apenas um animal pertencia ao G2. Desta forma, quando analisamos os resultados da presença de bactéria na urina encontramos um resultado significativo ($p=0,0232$) entre os grupos, demonstrando que três animais do G1 apresentavam cistite na primeira colheita. Para sugerirmos este achado clínico verificamos também a presença de leucócitos e hemácias, porém não apresentaram resultado significativo na primeira colheita, nem mesmo encontramos alterações clínicas significantes nestas amostras.

As amostras mantiveram-se límpidas e com baixa quantidade de bactérias em sua maioria por todo o experimento e desta forma podemos afirmar que a colheita seriada, preferencialmente por cistocentese, não causou infecção urinária nos cães, mesmo naqueles que apresentavam imunossupressão, e o uso de antimicrobianos curou a cistite inicial.

Os resultados da densidade urinária não apresentaram significância estatística e clínica, considerando os valores de referência para cães. Da mesma forma, os valores de pH urinário também não apresentaram alterações significativas.

TABELA 17 – Representação média dos valores de proteína na urina entre os dois grupos e nível de significância.

Dais	G1*	G2**	Valor de p
1	0	< 30	0,6305
5	30	30	0,1333
10	30	30	0,9626
15	0	> 30	0,0541

Estatística: teste não paramétrico de Mann-Witney, sendo que valores de $p < 0,05$ indicam diferença significativa entre os grupos.

*Média da dosagem de proteína na urina dos animais do grupo 1, em mg/dL

**Média da dosagem de proteína na urina dos animais do grupo 2, em mg/dL

Estes resultados não apresentaram nível de significância quando comparados os grupos. Os valores de proteína na urina não foram relevantes clinicamente, já que o animal pode excretar alguma proteína na urina sem que haja uma lesão glomerular ou infecção de alguma parte do trato urinário ou em trato genital. No entanto, os valores de proteína na colheita do 15º dia de tratamento foram mais altos e significativos clinicamente no G2. Este leve aumento não está relacionado com outras alterações encontradas na urinálise destes animais, portanto podemos sugerir que a ribavirina quando associada ao DMSO pode causar uma sobrecarga renal.

As alterações na concentração de glicose na urina não foram significativas estatística e clinicamente. Esta dosagem sofreu influência da fluidoterapia aplicada nos animais no 1º e 15º dias, sendo que alguns animais receberam solução de glicose a 5% quando anestesiados.

Os níveis de acetona e alteração do urobilinogênio não mostraram resultado significativo estatisticamente e clinicamente. Da mesma forma, a dosagem de bilirrubina não mostrou significância entre os grupos, porém no G1 observamos a média do 10º dia de tratamento indicando presença de bilirrubina na urina, que clinicamente possui importância, sugerindo uma lesão hepática concordando com os dados bioquímicos de GGT no soro sanguíneo.

Os dados de sangue oculto também não apresentaram significado estatístico, porém observamos que a partir da terceira colheita os valores aumentaram no G2. No entanto, devemos levar em consideração a alta sensibilidade das tiras reagentes e a ausência de outros sinais associados, podendo sugerir uma contaminação das amostras no momento da punção. Da mesma forma, verificamos um aumento no número de

hemácias no sedimento urinário de animais do G2 no décimo dia de tratamento (Tabela 18).

TABELA 18 – Relação do número de hemácias no sedimento urinário nos dois grupos e nível de significância.

Dias	Característica*	G1	G2	Valor de p
1	1-3	1	1	0,6746
	8-12	1	0	
	Raras	3	2	
	Ausentes	5	7	
5	50-60	1	0	0,1483
	15-20	2	0	
	5-10	1	0	
	Raras	4	3	
	Ausentes	1	5	
10	80-100	0	1	0,2276
	20-25	0	1	
	8-12	2	0	
	3-6	0	1	
	Raras	4	1	
	Ausentes	3	4	
15	50-55	0	1	0,1957
	10-12	0	1	
	6-10	1	0	
	Raras	4	1	
	Ausentes	2	5	

Estatística: teste do Qui-quadrado, sendo que valores de $p < 0,05$ indicam diferença significativa entre os grupos.

*Contagem de hemácias por campo no aumento de 40x

G1: grupo 1

G2: grupo 2

TABELA 19 – Relação do número de leucócitos no sedimento urinário nos dois grupos e nível de significância.

Dias	Característica*	G1	G2	Valor de p
1	5-7	0	1	0,5253
	2-4	1	0	
	Raras	3	4	
	Ausentes	6	5	
5	3-5	0	1	0,4597
	Raras	6	5	
	Ausentes	4	2	
10	1-3	1	0	0,4354
	1	0	1	
	Raras	4	2	
	Ausentes	4	5	
15	15-18	0	1	0,6258
	Raras	3	3	
	Ausentes	4	4	

Estatística: teste de Qui-quadrado, sendo que valores de $p < 0,05$ indicam diferença significativa entre os grupos.

*Contagem de hemácias por campo no aumento de 40x

G1: grupo 1

G2: grupo 2

Através dos dados referentes à contagem de leucócitos no sedimento urinário, podemos afirmar que a infecção do trato urinário não foi um achado clínico relevante.

Na análise dos sedimentos urinários não foi encontrado alteração com significância estatística, porém quando analisamos os dados separadamente verificamos que dois animais do G1 apresentaram cilindros hialinos na urina durante o tratamento. Esses cilindros ocorrem por um aumento na permeabilidade do glomérulo e precipitação de proteínas nos túbulos renais, contudo foram encontrados em pouca quantidade e podem ser considerados referentes a alguma mudança na temperatura dos animais, como a febre, e por não estarem associados a outros achados clínicos não apresentam relevância.

Ainda na análise do sedimento, observamos que dois animais do G1 e três animais do G2 apresentaram cilindros granulados na urina. Estes cilindros possuem significado clínico na identificação de lesões renais, porém estas estruturas foram observadas em momentos diferentes do tratamento. Apenas um animal apresentou estes

cilindros no primeiro dia, demonstrando que apresentava lesão renal e obteve melhora, não sendo mais identificado em outros exames e sem mais outros sinais associados. Um animal do G1 apresentou estes em dois momentos, no 5º e 10º dias de tratamento, porém no último dia não foi mais identificada a estrutura. Ao mesmo tempo, um animal do G1 e um do G2 apresentaram os cilindros no 10º dia, sendo que no exame seguinte não apresentavam mais. E somente um animal do G2 apresentou os cilindros no último dia de tratamento. Com estes dados podemos sugerir que a ribavirina por ser eliminada pelo rim pode levar a alteração no órgão.

A presença de cristais está associada à alteração no pH da urina e observamos que alguns animais apresentaram a formação de cristais em alguns momentos. Dois animais do G2 apresentaram a formação de cristais de fosfato triplo, um no 5º dia e outro no 10º dia, e estão relacionados com a alcalinização da urina. Esta alcalinização pode estar relacionada com a alimentação dos animais, que foi basicamente composta por arroz e carne, ou seja, não balanceada. Os cristais de oxalato de cálcio, urato amorfo e de bilirrubina também foram observados, porém com menor incidência.

As colheitas de líquido foram realizadas em dois momentos, no primeiro dia que os animais chegaram ao Hospital Veterinário e após 15 dias de tratamento com a ribavirina e sua associação com DMSO.

Quando analisamos as características do líquido podemos observar que apenas um animal do G1 no primeiro momento apresentou cor avermelhada do líquido, demonstrando que não houve diferença significativa entre os grupos e, a partir desse dados, podemos afirmar que não houve contaminação significativa das amostras no primeiro dia de colheita. Já no segundo momento, após 15 dias de tratamento, três animais do G1 e um animal do G2 apresentaram mudanças na coloração, porém esses resultados não demonstraram níveis de significância.

A turbidez do líquido pode ser atribuída ao aumento da celularidade, geralmente com contagem superior a 500 células/ μ L e ao aumento da proteína. Na primeira colheita observamos que apenas um animal do G1 apresentou turbidez da amostra. E na segunda colheita, quatro animais apresentaram o líquido discretamente turvo, sendo que apenas um animal compõe o G2. No entanto, estes resultados não apresentaram nível de significância.

A densidade líquórica nas duas colheitas de todos os animais se manteve dentro dos padrões normais e não apresentou diferença significativa. Da mesma forma, não

foram observadas alterações no pH líquórico, que deve ser um valor próximo ao pH sanguíneo, e estes variaram de 8 a 9, mantendo-se dentro dos valores normais.

TABELA 20 – Média, desvio padrão e nível de significância dos valores de proteína no líquido dos dois grupos.

Amostra	G1		G2		Valor de p
	Média*	Desvio padrão	Média*	Desvio padrão	
1	44,85	27,66	40,09	26,25	0,6978
2	45,35	25,92	40,98	24,55	0,7512

Estatística: teste t de Student, sendo que valores de $p < 0,05$ indicam diferença significativa entre os grupos.

*Dosagem média de proteínas no líquido, em mg/dL

Amostra 1: antes do tratamento

Amostra 2: após 15 dias de tratamento

G1: grupo 1

G2: grupo 2

O resultado da dosagem de proteína no líquido nos permite afirmar que os animais do G1 apresentavam valores mais altos, superiores aos valores normais. Estes resultados não apresentaram nível de significância, porém quando comparamos com os resultados de turbidez verificamos que os três animais do G1, que apresentaram mudanças no aspecto do líquido, possuem aumento da dosagem de proteína acima de 40 mg/dl. No entanto, o animal do G2 que apresentou turbidez do líquido obteve uma dosagem de 30 mg/dl de proteína. Da mesma forma, observamos que animais que apresentavam níveis proteicos superiores a 40 mg/dl, não mostraram alterações no aspecto do líquido, demonstrando que não há relação entre a dosagem de proteína e a turbidez da amostra.

Os níveis de glicose no líquido devem ser semelhantes, cerca de 70%, aos níveis encontrados no sangue. Os animais incluídos no experimento apresentaram dosagem normal entre 40 mg/dl e 80 mg/dl, e estes resultados não apresentaram diferenças significativas.

O teste de Pandy é um método semi-quantitativo para detectar a presença de globulinas no líquido. Na primeira colheita apenas quatro animais apresentaram positividade neste teste, sendo três animais do G1 e 1 do G2. Dos três animais do G1 apenas um manteve a positividade deste teste na segunda colheita, porém como o teste é medido por cruces, observamos que este animal teve uma diminuição da turbidez produzida pelo reagente, o número de cruces no primeiro momento era de três e se reduziu para uma cruz na segunda amostra.

No G2 observamos que o animal que apresentava positividade na primeira amostra passou a não apresentar mais na segunda. No entanto, verificamos que outro animal apresentou positividade na segunda colheita.

A contagem de hemácias não apresentou resultado significativo e clinicamente não apresenta importância na referida enfermidade. A presença de hemácias no líquido pode ser considerada uma forma de contaminação da amostra no momento da colheita, da mesma forma que a coloração avermelhada observada.

Entretanto, a contagem de células nucleadas é de extremo valor para nosso estudo. Os nossos resultados não apresentaram diferenças significativas entre os dois grupos, porém observamos um aumento dessa contagem em todos os animais e nos dois momentos da análise (Tabela 20).

TABELA 21 – Média, desvio padrão e nível de significância da contagem de células nucleadas no líquido dos animais dos dois grupos.

Amostra	G1		G2		Valor de p
	Média*	Desvio padrão	Média*	Desvio padrão	
1	65,80	62,71	65,00	87,51	0,9815
2	37,86	36,13	19,00	20,76	0,9999

Estatística: teste t de Student, sendo que valores de $p < 0,05$ indicam diferença significativa entre os grupos.

*Média da contagem de células nucleadas/ μ L

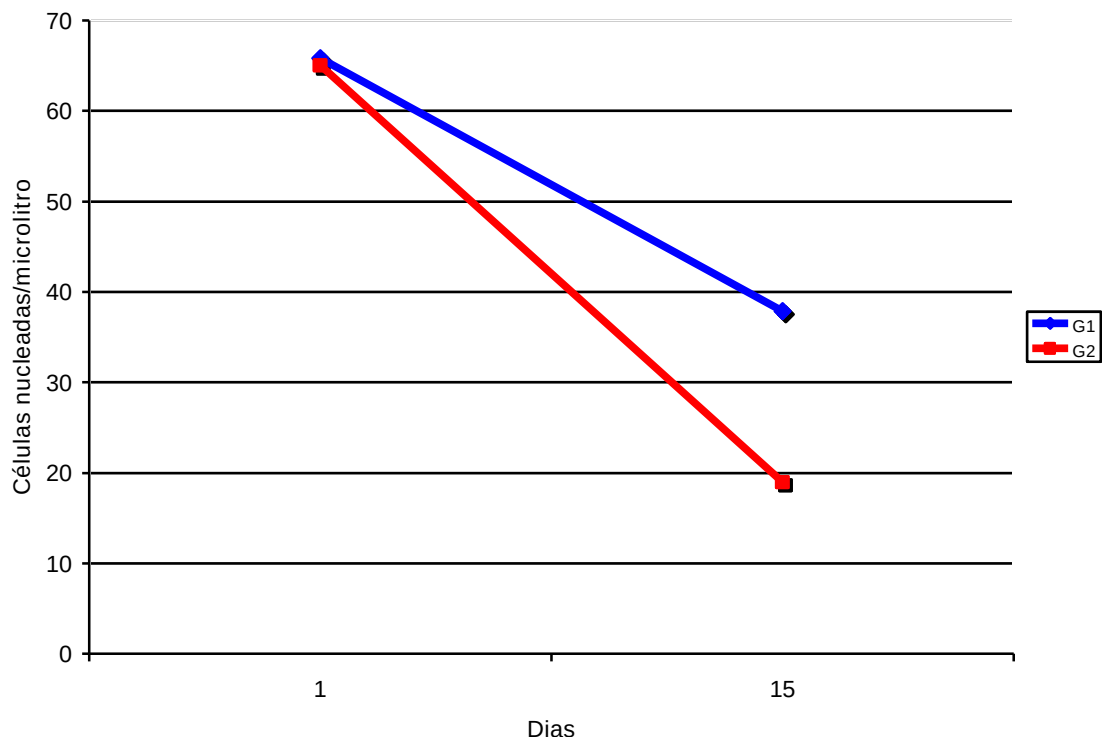
Amostra 1: antes do tratamento

Amostra 2: após 15 dias de tratamento

G1: grupo 1

G2: grupo 2

FIGURA 06 – Representação gráfica da contagem de células nucleadas no líquido nos dois grupos.



*Média da contagem de células nucleadas/ μ L

G1: grupo 1

G2: grupo 2

A partir dos dados relacionados acima podemos observar que houve uma queda na contagem de células nucleadas entre a primeira e a segunda colheita, sendo que nos animais tratados com ribavirina em associação com o DMSO a diferença da contagem foi claramente evidente em relação ao G1, após os 15 dias de tratamento.

Apesar de encontrarmos turbidez no líquido de alguns animais, não foi encontrada nenhuma amostra com mais de 500 células/ μ L que possa explicar a alteração no aspecto do fluido.

Após a contagem diferencial destas células nucleadas, verificamos que todos os animais apresentavam pleocitose linfocítica, sendo este um achado clínico característico de doenças causadas por vírus, como a cinomose.

TABELA 22 – Média, desvio padrão e nível de significância da porcentagem de linfócitos no líquido dos animais dos dois grupos.

Amostra	G1		G2		Valor de p
	Média*	Desvio padrão	Média*	Desvio padrão	
1	69,20	28,66	69,90	34,69	0,9613
2	82,57	19,76	91,00	10,85	0,3157

Estatística: teste t de Student, sendo que valores de $p < 0,05$ indicam diferença significativa entre os grupos.

*Média da porcentagem de linfócitos em 50 células

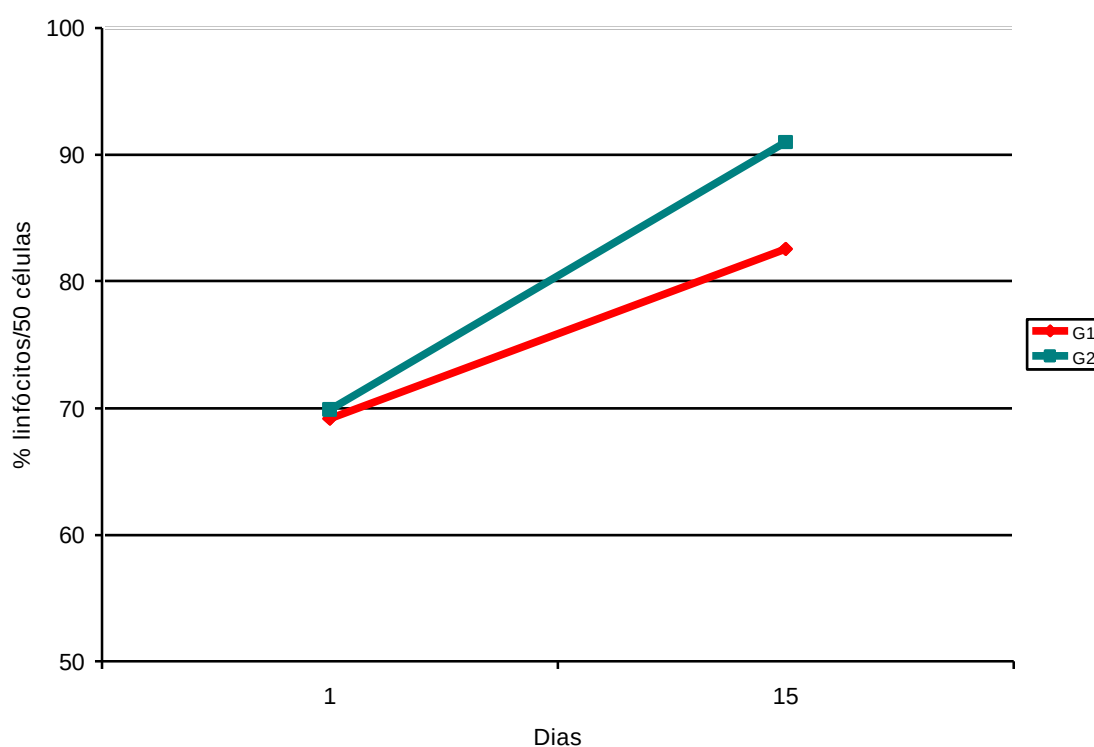
Amostra 1: antes do tratamento

Amostra 2: após 15 dias de tratamento

G1: grupo 1

G2: grupo 2

FIGURA 07 – Representação gráfica da porcentagem de linfócitos no líquido nos dois grupos.



*Média da porcentagem de linfócitos em 50 células

G1: grupo 1

G2: grupo 2

Ao contrário do que observamos com as células nucleadas, a porcentagem de linfócitos aumentou após o tratamento com a ribavirina em associação com o DMSO. Apesar de não apresentar resultado estatístico significativo, a contagem de linfócitos

nos revelou que o processo imunológico desencadeado pelo vírus da cinomose não cessou com a utilização das drogas, como podemos verificar na Tabela 23.

TABELA 23 – Mediana e nível de significância da contagem diferencial de linfócitos no líquido dos animais dos dois grupos, nos diferentes momentos.

	Amostra 1	Amostra 2	Valor de p
G1 Mediana*	31,42	28,57	0,0313
G2 Mediana*	22,54	8,65	0,3125

Estatística: teste t de Student, sendo que valores de $p < 0,05$ indicam diferença significativa entre os grupos.

*Mediana da contagem diferencial de linfócitos em 50 células

Amostra 1: antes do tratamento

Amostra 2: após 15 dias de tratamento

G1: grupo 1

G2: grupo 2

Quando calculamos os valores absolutos dos linfócitos no líquido observamos que os dois grupos apresentaram uma queda nesta contagem. Apesar de encontrarmos uma diferença significativa no G1 ($p=0,0313$) entre as medianas desta contagem, observando os valores do G2 verificamos que esta queda foi mais acentuada.

Da mesma forma que a contagem total de células nucleadas, as células mononucleares acompanharam essa queda após o tratamento. Não houve diferença significativa entre os grupos nos dois momentos de colheita.

6 Efeitos Colaterais

A partir das avaliações clínicas diárias e os exames complementares verificamos algumas alterações que sugerem efeitos colaterais do uso da ribavirina. No início do tratamento observamos que os animais começaram a apresentar hiporexia ou anorexia durante o período de administração da droga e alguns animais apresentaram vômitos esporádicos. Estes sinais associados à sensibilidade abdominal demonstraram que alguns animais desenvolveram uma gastrite com a administração oral da ribavirina.

No entanto, após as nossas primeiras observações frente a esses sinais, todos os animais que iniciavam o tratamento recebiam protetores de mucosa, como a ranitidina, diariamente até cessar a administração da droga. Verificamos, desta forma, uma suavização destes sinais de irritação gástrica.

Como foi relatado anteriormente, observamos uma queda de leucócitos acentuada próximo do 15º dia de administração da droga. Essa imunossupressão foi comparada entre os grupos e não apresentou um nível de significância ($p=0,5436$).

Com relação aos efeitos na medula óssea, utilizamos os dados dos hemogramas e foram analisados todos os tipos celulares, hemácias, plaquetas e leucócitos. Foi sugerido a partir da queda simultânea destas células que poderia haver comprometimento de medula óssea em um grau que não exerceu efeitos colaterais sobre a mesma e não comprometeu a sobrevida dos animais, mostrando ser uma ação transitória.

Discussão

Para compor os grupos experimentais, não houve distinção de sexo e raça entre os animais selecionados. Os resultados de Headley & Graça (2000) demonstraram que não há diferença de susceptibilidade à infecção pelo vírus da cinomose entre machos e fêmeas. Da mesma forma, Corrêa & Corrêa (1992) afirma que a enfermidade não tem predileção por sexo ou raça. No entanto, alguns autores afirmam que raças braquiocefálicas apresentam menor prevalência da doença, de mortalidade e de seqüelas comparadas com as raças dolicocefálicas (HEADLEY & GRAÇA, 2000; GREENE, 2006).

Com relação à idade dos animais, alguns autores afirmam que a maior incidência da cinomose coincide com a época da diminuição da taxa de anticorpos maternos, entre 60 e 90 dias de idade (CORRÊA & CORRÊA, 1992). No entanto, Greene (2006) relata que animais com três a seis meses de idade são mais susceptíveis e Headley & Graça (2000) afirmam que a susceptibilidade é maior em animais neonatos e jovens, porém todos os autores concordam com a maior incidência quando há uma queda nos títulos de anticorpos maternos. Por isso, somente incluímos no estudo animais com mais de dois meses de idade.

Headley e Graça (2000) encontraram nos seus resultados 63% dos casos de encefalite pela cinomose em animais com menos de um ano e meio, sugerindo que os maiores índices de mortalidade nesta forma acontece ao redor de um ano de idade. Concordando com esses dados, Silva et al. (2007) encontraram uma taxa de 49,5% dos casos com alterações neurológicas em animais com menos de um ano de idade, sendo que 48% dos animais com estes sinais estavam na faixa etária de um a nove anos de idade e 2,5% possuíam mais de 10 anos. Em nossos resultados registrados na Tabela 01, os animais selecionados se encontravam dentro da faixa etária de maior incidência da fase neurológica citada pelos autores.

Contudo, Corrêa & Corrêa (1992) quando descrevem as apresentações clínicas da cinomose, afirmam que a encefalite do cão velho é comumente observada em animais com mais de seis anos de idade. No entanto, Greene (2006) relata que é uma enfermidade rara, crônica, resultante da persistência viral no SNC, acometendo apenas animais imunocompetentes. Por isso, não foram incluídos animais com mais de seis anos de idade no estudo.

Através do estudo da patogenia da doença, verificamos que a infecção do tecido epitelial e SNC ocorrem no período de oito a nove dias pós-infecção e que no período de nove a 14 dias após a disseminação nestes tecidos há produção de anticorpos contra o

vírus (GREENE, 2006). No entanto, Vandeveld & Zurbriggen (2005) afirmam que quando uma efetiva resposta imune antiviral neutralizante é ausente na fase aguda da cinomose, anticorpos IgM anti-vírus aparecem nas duas primeiras semanas da infecção. Além disso, alguns autores relatam que os anticorpos contra o vírus interagem com macrófagos infectados em lesões no SNC, causando sua ativação com liberação de ROS. Esta atividade por sua vez pode levar à destruição de oligodendrócitos e bainha de mielina (TIPOLD et al., 1992; SUMMERS et al., 1995; GEBARA et al., 2004; GREENE, 2006; STEIN et al., 2006). Portanto, não utilizamos animais com evolução clínica neurológica muito avançada com objetivo de minimizar esta influência do sistema imune na progressão da enfermidade. Assim os animais foram selecionados no máximo com 10 dias de evolução dos sinais nervosos, sendo que as médias nos grupos foram de seis dias, sugerindo que os animais estavam na fase aguda da enfermidade.

Para o diagnóstico da cinomose podem ser empregadas as técnicas de ELISA (LATHA et al., 2007), imunofluorescência (MEGID et al., 2000) e RT-PCR (SAITO et al., 2000; GEBARA et al., 2004). Em virtude do custo, essas técnicas são pouco utilizadas e chega-se na suspeita clínica baseando-se na história, sintomatologia e achado hematológico (SLVA et al., 2005; GREENE, 2006). Do mesmo modo descrito na literatura, os animais do experimento foram selecionados a partir de suspeitas clínicas. Todos os animais apresentavam histórico de contato com outros animais doentes, ou que tinham acesso à rua, ou enfermidades com caráter imunossupressor anteriormente. A maior parte dos animais, antes de chegar ao Hospital Veterinário com sintomatologia neurológica, apresentou sinais sistêmicos da enfermidade. Além da verificação do histórico clínico, foram avaliados com relação ao histórico vacinal, pois animais com vacinação correta não foram incluídos. Após análise dos sinais clínicos, somente foram incluídos os animais com sintomatologia nervosa, pois encontramos na literatura, que em regiões endêmicas, a principal suspeita para estes sinais deve ser cinomose (SAITO et al., 2005; MORETTI, et al., 2006; SILVA et al., 2007).

Além disso, utilizamos a reação de imunofluorescência direta de esfregaço sangüíneo como diagnóstico final. Segundo Tipold et al. (1992), para um diagnóstico conclusivo de cinomose, a imunofluorescência direta de esfregaços e fluídos corporais é rotineiramente utilizada. Infelizmente, este método só confirma cinomose até três semanas após a infecção, porque depois desse tempo o vírus desaparece dos tecidos epiteliais (JÓZWIK & FRYMUS, 2005). No entanto, Greene (2006) descreve que a técnica requer equipamentos especiais e segundo o autor, o antígeno é primeiramente

encontrado no sangue no período de dois a cinco dias após a infecção e a técnica de imunofluorescência direta utilizando as amostras de esfregaço conjuntival, líquido, ou sangue é útil no diagnóstico na fase aguda da doença.

Em nossos resultados pudemos observar que animais com tempo maior que cinco dias após a infecção apresentaram resultados positivos na imunofluorescência direta de esfregaço sangüíneo. Verificamos que 70% dos animais do G1 e 80% dos animais do G2 apresentaram positividade neste método, demonstrando que estavam na fase aguda da enfermidade e, provavelmente os animais negativos haviam ultrapassado esta fase, já que os sinais clínicos da doença eram patentes. Segundo alguns autores, a fase aguda da cinomose é caracterizada por replicação viral intensa, causando os danos no SNC e no sistema imune (SUMMERS et al., 1995; MORO & VASCONCELOS, 1998; KUMAGAI et al., 2004; GREENE, 2006).

No entanto, a imunofluorescência direta de esfregaço sangüíneo não deve ser considerada um método de diagnóstico ideal para este estudo, já que todos os animais apresentavam a fase neurológica da cinomose e a amostra utilizada na reação foi o sangue. Todos os animais que mostraram negatividade no exame foram incluídos no experimento, já que apresentavam um histórico clínico e alterações neurológicas compatíveis com cinomose.

Segundo Elia et al. (2007) a ribavirina causa mutações no vírus da cinomose que levam a um erro catastrófico na formação do genoma viral. Pode ser especulado que a ribavirina interfere com a RNA polimerase pela competição com nucleosídeos naturais e produz erro na terminação da cadeia de RNA do vírus. Além disso, a ribavirina afeta o vírus ainda no meio extracelular, de maneira precoce no seu ciclo de replicação. Por isso, tentamos fazer com que a maior parte dos animais fosse incluída nos grupos experimentais no momento ideal para a ação da droga.

Quando correlacionamos os dados de animais que apresentam viremia, identificados pela imunofluorescência direta (Tabela 03), e os dados de melhora clínica frente aos grupos experimentais (Tabela 04) observamos uma semelhança nos resultados, já que 70% dos animais do G1 e 80% dos animais do G2 alcançaram uma melhora clínica. Podemos sugerir que a ribavirina foi capaz de impedir a replicação viral não somente no SNC, mas também nas partículas virais encontradas ainda na circulação sangüínea, impedindo a progressão da doença.

No estudo de Elia et al. (2007) foi observado que a relação entre o efeito da droga e o tempo de exposição mostrou que a atividade antiviral em altas concentrações

ocorre no período de 24 horas. Entretanto, em baixas concentrações a eficácia da droga foi obtida após 48 horas de exposição. Porém, este estudo refere-se à eficácia da ribavirina frente ao vírus da cinomose “in vitro”. Quando analisamos a eficácia da ribavirina em animais naturalmente infectados com o vírus da cinomose, observamos uma melhora dos sinais na maior parte dos mesmos a partir do sétimo dia de administração da droga.

Em nosso estudo foi realizada uma avaliação clínica diária permitindo identificar uma variação do estado clínico destes animais a partir do décimo dia de administração. Através destes dados podemos sugerir que o sistema imune pode influenciar no quadro geral do animal, com relação à produção de ROS, citocinas e anticorpos anti-mielina conseqüente à ação viral, que tem início ao redor de três semanas pós-infecção (BÜRGE et al., 1989; TIPOLD et al., 1992; SUMMERS et al., 1995; WÜNSCHMANN et al., 1999; GRÖNE et al., 2000; MARKUS et al., 2002; STEIN et al., 2004; GREENE, 2006; STEIN et al., 2006).

Todos os vírus isolados pertencem a um mesmo sorotipo e as várias amostras isoladas produzem enfermidades com duração e sinais clínicos distintos; algumas causam enfermidade de mediana patogenicidade, enquanto outras causam enfermidade aguda, altamente letal, com ou sem encefalite aguda, e outras, ainda, levam a encefalite tardia, após uma enfermidade branda, ou mesmo após a recuperação da fase aguda (CORRÊA & CORRÊA, 1992).

Como em nosso estudo não foram identificadas as cepas virais e conhecendo as suas diferenças de patogenicidade, podemos sugerir que alguns animais não sobreviveram à infecção, não por uma falha da ribavirina e sua associação com o DMSO, mas pela gravidade da enfermidade.

Segundo Biazzone et al. (2001) vários fatores interferem na qualidade e duração da resposta imune à vacinação, como a amostra viral utilizada, a massa antigênica ou o título vacinal e o grau de atenuação do antígeno viral. Existem também os fatores relacionados ao próprio hospedeiro, como a variação individual na capacidade de resposta a uma mesma vacina, o estado nutricional, parasitismo, os estados de imunodeficiência de causa genética ou não e fatores relacionados às condições ambientais. Concordando com os dados descritos pelos autores animais que receberam a vacina de forma correta não foram incluídos no nosso estudo, pois segundo eles as vacinas atuais são eficientes em induzir o estado de imunidade dos animais, protegendo-os contra a infecção natural.

Contudo, em nosso estudo verificamos que não houve diferença entre os grupos tratados e o grupo controle com relação ao histórico vacinal e, no entanto, animais que não foram vacinados apresentaram índices melhores de recuperação no tratamento experimental.

Segundo Corrêa & Corrêa (1992), a cinomose na fase neurológica é progressiva, raramente estacionando, levando à morte em curso agudo ou crônico, e sempre deixando seqüelas que podem ser inabilitantes, quando eventualmente o animal sobreviva. Observamos em nosso estudo que a eficácia da ribavirina não foi influenciada pelo período de evolução apresentado pelos animais ao início do tratamento. Podemos sugerir que a ribavirina como forma de tratamento na fase neurológica da cinomose, torna o prognóstico da enfermidade mais favorável. Também verificamos que nenhum dos animais tratados, cuja melhora do estado clínico foi evidente, apresentou seqüelas incompatíveis com a vida normal.

No estudo de Silva et al. (2007) com 620 casos, a forma neurológica da cinomose foi caracterizada por uma grande variedade de sinais, nas quais os cães apresentavam um único sinal clínico ou uma combinação deles, sendo que este levantamento também foi realizado no atual estudo, concordando com estes dados. No entanto, os autores relataram que a mioclonia foi o achado mais comum em 38,4% dos animais, já em nosso experimento verificamos que no GC este sinal foi observado em 60% dos animais e em 70% dos animais do G2, porém em apenas 40% dos animais do G1. Com relação ao estudo de Silva et al. (2007) foram encontrados 2,1% dos casos com opistótono e 1,9% com tremores, entretanto, em nosso estudo verificamos que apenas um animal (10%) apresentava opistótono no G2 e que os tremores apresentaram maior relevância, ocorrendo em 20% dos animais no GC, 40% no G1 e 80% no G2. Esta discrepância de valores percentuais nos dois trabalhos pode ser explicada pelo tamanho amostral dos dois grupos experimentais.

As disfunções motoras e posturais observadas por Silva et al. (2007) foram ataxia em 25%, paresias em 20,5% e desvio lateral da cabeça em 1,9% dos animais. No nosso estudo, verificamos que 40% dos animais do GC apresentavam ataxia e 30% apresentaram paresias de membros. Já nos grupos tratados observamos que 30% dos animais do G1 e 80% dos animais do G2 apresentaram ataxia, as paresias foram encontradas em 40% no G1 e 30% no G2, sendo que estes resultados não mostram discrepância com relação ao estudo anterior. No caso de animais com desvio lateral de cabeça, verificamos que no GC não foram incluídos animais com este sinal e no G1 e no

G2 encontramos 40% e 30%, respectivamente. Da mesma forma, sugerimos que as alterações nos valores percentuais se dão pela diferença no tamanho da amostra.

Nos relatos de Silva et al. (2007) foram listadas outras manifestações clínicas encontradas como ambulação ou andar em círculos, sonolência, vocalização, agressividade, inquietação, incapacidade de reconhecer os proprietários, automutilação, sialorréia, trismo mandibular, retenção ou incontinência urinária, rigidez e atrofia musculares, pressão da cabeça contra objetos e disfagia. Em nossos resultados encontramos alguns sinais semelhantes aos citados pelos autores como andar em círculos, choro noturno, hiperexcitabilidade, sialorréia, espasticidade e atrofia muscular. Outros sinais que não foram citados pelo referidos autores foram encontrados em nossos animais como alterações em nervos cranianos, apatia, balanço ou tremores de cabeça, déficits de locomoção, estrabismo, fraqueza muscular, giro ortotônico do pescoço, hipermetria e nistagmo, sendo que estes sinais também foram relatados por outros autores (CORRÊA & CORRÊA, 1992; TIPOLD et al., 1992; GREENE, 2006).

Apesar da literatura descrever alterações oculares e no trato óptico, observamos em nosso estudo uma baixa incidência destas lesões e sinais clínicos destas alterações. Apenas dois animais dos grupos tratados apresentaram sinais de cegueira ou alterações pupilares, como midríase, porém nestes casos observamos uma melhora no quadro clínico independente da associação com o DMSO, sendo que estes sinais estacionaram com o tratamento e os animais apresentaram seqüelas.

No que se refere às alterações hematológicas, a anemia pode ser atribuída ao aumento da destruição dos eritrócitos ou pela diminuição de sua produção. A destruição é determinada pela presença do vírus no eritrócito ou pela deposição de imunocomplexos na membrana desta célula. A queda da produção pode ser atribuída à falência da medula óssea devido ao estresse desencadeado pela doença. Na maioria dos casos, os eritrócitos apresentam-se normocíticos e normocrômicos e não há sinais de regeneração medular, como hemácias nucleadas, policromasia, anisocitose ou corpúsculos de Howell-Jolly (SILVA et al., 2005).

Silva et al. (2005) encontraram um índice de 61% de casos com anemia. No entanto, Amude et al. (2007) observaram que apenas 12,5% dos animais com cinomose tinham anemia. Nos 20 animais incluídos em nossos estudos, 17 (85%) apresentavam um quadro de anemia. Concordando com os achados de Silva et al. (2005), os eritrócitos apresentaram-se normocíticos e normocrômicos e não houve sinais de regeneração

medular, concluímos que nossos animais apresentavam uma alteração na medula óssea devido ao estresse desencadeado pela doença.

Entretanto, verificamos que houve uma resposta ao início do tratamento nos dois grupos no quarto dia de administração da droga, porém os animais do G1 mantiveram uma média baixa da contagem de hemácias, demonstrando um quadro de anemia durante todo o período de tratamento. No G2 esta média mostrou-se melhor do quarto ao décimo dia de tratamento, o que nos permite sugerir que o DMSO potencializou a ação da ribavirina ou minimizou possíveis danos na medula óssea destes animais e nas membranas das hemácias.

Segundo os autores, Hayden & Douglas (1990), a ribavirina sistêmica causa uma anemia relacionada com a dose, por hemólise extravascular e, em altas doses, causa supressão de medula óssea com diminuição de elementos eritróides. Podemos sugerir a partir de nossos resultados que a ribavirina na dose de 30 mg/Kg, a cada 24 horas no período de 15 dias foi levemente tóxica à medula de cães, porém sabemos que estes efeitos são reversíveis quando cessa a administração da droga.

No entanto, Papich et al. (2003) afirmam não ter encontrado efeitos colaterais da ribavirina em cães, na dose de 60 mg/Kg durante duas semanas.

Nestes achados hematológicos podemos evidenciar duas características do DMSO. O composto potencializou a ação da ribavirina pela observação da suavização do estresse da medula óssea no quarto dia de tratamento por uma diminuição do antígeno viral no organismo. O DMSO tem efeito sobre as membranas de hemácias como foi descrito por Santos et al. (2002), pois uma grande quantidade da droga é dissolvida na membrana, direcionando as alterações nas suas propriedades. Podemos afirmar também que este composto pode ter preservado os precursores eritróides amenizando os efeitos da ribavirina na medula óssea e levando os índices menores de anemia no G2.

Os resultados da dosagem de hemoglobina são compatíveis com os achados de outros autores, quando afirmam que as hemácias de cães são mais resistentes a hemólise causada pela ribavirina. No nosso estudo a dosagem no decorrer do tratamento foi compatível com os achados encontrados na contagem de hemácias, demonstrando que a anemia não é causada por hemólise.

A concentração celular de ribavirina alcança níveis estáveis em duas a três semanas após o início do tratamento, quando ocorre a diminuição de hemoglobina. De forma interessante, as mudanças na concentração de ribavirina celular são inversamente

proporcionais às alterações nos níveis de hemoglobina (INOUE et al., 2004). Da mesma forma que observamos em nossos resultados, no 15º dia de administração foi encontrada uma diferença significativa entre os dois grupos, a qual foi resultante de uma queda acentuada na concentração globular de hemoglobina no G1.

No entanto, podemos sugerir que o DMSO pode ter ajudado a diminuir essa alteração causada pela ribavirina no G2. É possível que este composto diminua a degradação da ribavirina pela adenosina-quinase dentro dos eritrócitos, impedindo o seu acúmulo e posterior perda da hemoglobina. Esta sugestão pode ser feita a partir do estudo de Yoon et al. (2006), que mostrou que o DMSO possui efeitos variados na atividade de isoenzimas, sua presença nas reações enzimáticas produz efeitos inibitórios diretos no metabolismo mediado por estas. A afinidade relativa do DMSO com o substrato das enzimas pode ter um papel importante como consequência dessa interação.

A média da contagem de plaquetas revelou uma leve trombocitopenia no primeiro dia, quando os animais ainda não haviam recebido o tratamento. Tipold et al. (1992) afirmam que a trombocitopenia é um achado raro na cinomose e no estudo de Amude et al. (2007) não foram encontrados animais com esta alteração e, no entanto, Silva et al. (2005) afirmam que a trombocitopenia é um achado freqüente. Sabe-se, apenas, que para o gênero *Morbillivirus* já se observou aumento de anticorpos anti-plaquetas. A trombocitopenia é provavelmente do tipo imunomediada com remoção das plaquetas pelo sistema reticulo endotelial. Esta explicação também é citada nos estudos de Rima & Duprex (2006) e concluíram que é um achado transitório que desaparece com três a quatro semanas após a infecção por *Morbillivirus*.

Durante o período de tratamento não houve alterações significativas na contagem de plaquetas, porém no último dia de tratamento, o G2 revelou uma média mais baixa em relação ao G1, sendo que os dois grupos apresentaram uma leve trombocitopenia de significado irrelevante.

O leucograma é a característica mais variável com as contagens abrangendo leucopenia a leucocitose. Infecções bacterianas oportunistas no trato digestivo e respiratório podem ser observadas e isso justifica a leucocitose por neutrofilia e o desvio a esquerda e neste mesmo estudo, os autores encontraram 46% de leucopenia, 8% de leucocitose por neutrofilia 54% de desvio a esquerda (SILVA et al., 2005).

Em nossos resultados observamos que a média da contagem de leucócitos estavam dentro dos padrões normais. Dos 20 animais incluídos no experimento, apenas

cinco (25%) deles apresentavam leucopenia, um (5%) apresentou leucocitose e 70% dos animais apresentavam valores normais na contagem de leucócitos. Desta forma, verificamos que os nossos resultados não eram concordes com os autores citados.

Segundo Moro & Vasconcellos (1998) a infecção resulta em leucopenia devido à linfopenia que se inicia uma semana após a infecção e que pode persistir até a convalescência. O animal com infecção persistente permanece com baixa contagem de leucócitos. A replicação do vírus nas células linfóides é seguida por um extenso período de imunossupressão e segundo Schobesberger et al. (2005) a queda significativa de linfócitos foi observada no período de três dias após a infecção, antes da viremia.

Esta imunossupressão e função imune anormal aumentam a susceptibilidade às infecções secundárias, que podem influenciar na letalidade da doença (HASS & BARRETT, 1996; KAJITA et al., 2006).

No entanto, os resultados da média da contagem de leucócitos se mantiveram dentro dos valores normais durante o período de tratamento, contudo com uma queda no último dia. Porém, no quarto dia de administração da ribavirina verificamos uma diferença significativa entre os resultados do G1 e G2, mostrando que o grupo que recebeu a ribavirina associada com o DMSO obteve uma resposta imunológica melhor do que os animais do G1, demonstrando potencialização da ação da ribavirina sobre o vírus.

No estudo de Silva et al. (2005), em 85% dos casos de cinomose foi encontrada linfopenia. Já no experimento de Amude et al. (2007) a alteração na contagem de linfócitos foi de 37,5% dos casos. Em nossos animais encontramos um índice de 75% de linfopenia, concordando com os valores dos primeiros autores.

Outros autores afirmam que a ribavirina tem efeito supressor de linfócitos e sugerem uma possível toxicidade nestas células, principalmente em altas doses por via oral (HEAGY et al., 1991; BEAN, 1992).

Em nosso estudo verificamos que a contagem total de leucócitos teve uma queda, que foi acompanhada de uma linfopenia acentuada no último dia de administração, concordando com Heagy et al. (1991) e Bean (1992), desta forma, podemos concluir que a dose da ribavirina foi alta o suficiente para causar uma possível toxicidade nos linfócitos.

Contudo, sabemos que os efeitos colaterais da droga são reversíveis e mesmo não tendo acompanhado os animais após este período, com base nos trabalhos existentes, após cessar a administração espera-se que a contagem destas células retorne

aos valores normais. Desta forma, sugerimos novos estudos que acompanhem os animais que receberam a ribavirina e apresentaram leucopenia com linfopenia por um período mais longo, após cessar a administração da droga.

No entanto, podemos observar que a linfopenia no G1 foi persistente em todos os momentos, ao contrário da encontrada no G2. Segundo Moro & Vasconcellos (1998) a linfopenia encontrada na cinomose é causada por uma destruição de linfócitos devido à replicação vírica no tecido linfóide, o que também pode prejudicar a função dos linfócitos ou de subpopulações dos mesmos. Sendo este quadro importante na infecção pelo vírus da cinomose, é observado linfopenia prolongada e depleção linfóide sistêmica.

Desta forma, podemos concluir que a ribavirina quando associada ao DMSO apresentou melhor ação sobre o vírus, fazendo com que o organismo do animal responda na produção de resposta imune. Podemos sugerir que o DMSO seja responsável por difundir a droga nos órgãos linfóides, impedindo a replicação viral e a depleção dos mesmos (Tabela 14).

Nos estudos de Silva et al. (2005) foram encontrados 8% de animais que apresentavam leucocitose por neutrofilia. E Amude et al. (2007) verificou o índice de 12,5% de neutrofilia. Em nosso estudo observamos uma frequência de 10% de neutrofilia nos 20 animais, concordando com os dados dos dois autores. Quando observamos os dados de Amude et al. (2007) com relação ao índice de neutropenia (12,5%), verificamos que a nossa incidência foi maior com 20% dos casos.

A análise feita com as médias de neutrófilos não mostrou nível de significância entre os grupos e a partir destas não foi observado neutrofilia ou neutropenia com base na estatística. Porém, o que indica que a ribavirina não causou alterações em neutrófilos. Da mesma forma, não observamos alterações significativas no número de eosinófilos nos dois grupos.

No entanto, encontramos valores médios da contagem de monócitos aumentados com relação aos valores de referência apenas no grupo que recebeu a ribavirina associada ao DMSO. Este aumento pode ser observado no quarto dia após a administração das drogas e se manteve até o décimo dia. Sugere-se que esta monocitose pode ser considerada uma resposta da medula óssea, quando comparamos com as informações anteriores, já que não há relatos de literatura sobre alterações nestas células referente à cinomose, ribavirina e DMSO.

No exame bioquímico de função hepática e renal, os achados não são específicos para a infecção (TIPOLD et al., 1992; GREENE, 2006). E no nosso estudo não foram encontrados resultados com diferença estatística entre os grupos experimentais.

Os dados referentes aos valores médios da dosagem de uréia no soro sangüíneo foram levemente aumentados, podendo identificar um grau de desidratação no início do tratamento. Porém, no 15º dia todos os animais apresentaram estes valores normalizados, demonstrando uma melhora clínica compatível com o que foi verificado nas avaliações diárias. As dosagens de creatinina mantiveram suas médias dentro dos valores de referência normais.

Quando associamos estes dados bioquímicos com os dados da urinálise, em que observamos a presença de cilindros granulosos no sedimento urinário e um aumento na dosagem de proteína na urina, principalmente em animais do G2 e no 15º dia de tratamento, podemos afirmar que houve uma leve alteração renal sem maior importância.

Da mesma forma, as dosagens bioquímicas de função hepática (ALT, FA e GGT) não apresentaram diferença estatística entre os grupos, mantendo suas médias dentro dos padrões de referência para cães, o que demonstra que a ribavirina e o DMSO não exerceram efeitos hepatotóxicos, apesar de sabermos que a metabolização destas ocorre no fígado, como descrito por Hayden & Douglas (1990) e Paes (1999), respectivamente.

Apesar de encontrarmos valores alterados na dosagem de gama-glutamilttransferase (GGT) a partir do quinto dia de administração das drogas no G2, podemos identificar fatores responsáveis por este aumento, como a utilização de anitmicrobianos. Neste grupo o medicamento mais utilizado foi o cloranfenicol que também possui metabolização hepática. No entanto, estas alterações na função hepática não mostraram significância na clínica dos animais.

Segundo Greene (2006), a elevação plasmática das globulinas é freqüente em várias reações inflamatórias e, em particular, o componente alfa 2 aumenta significativamente nas infecções bacterianas e víricas, notadamente na cinomose.

Os nossos resultados concordam com as informações citadas pelo autor. Foi observado que houve uma queda nos valores de globulina no decorrer do tratamento, principalmente a partir do décimo dia de administração das drogas. Esta queda pode estar relacionada à resposta do sistema imune por uma diminuição do antígeno viral,

identificando novamente a eficácia da ribavirina sobre a replicação do vírus da cinomose.

A ribavirina administrada sistemicamente, em altas doses, pode causar efeitos indesejáveis, como anemia por hemólise extravascular e aumento de bilirrubina no soro, os quais são reversíveis quando cessada a administração da droga (BEAN, 1992; TAKAHASHI et al., 1998; HOSOYA et al., 2001).

Verificamos, em nosso estudo, que a bilirrubina total sérica e suas frações não apresentaram médias alteradas com relação aos padrões estabelecidos para cães, sendo este um achado importante que discorda da literatura existente, que se refere, principalmente, a utilização da droga em humanos.

Quando avaliamos os dados da urinálise associados às dosagens bioquímicas de bilirrubina, podemos afirmar que a ribavirina não causou hemólise extravascular em hemácias caninas, mesmo quando usamos a dose de 30 mg/Kg, a cada 24 horas durante um período de 15 dias. Contudo, as hemácias caninas demonstraram maior resistência à ação da ribavirina.

Em relação aos dados de exames de líquido, a turbidez do mesmo ocorre geralmente devido a um aumento na celularidade da amostra, com presença de 500 ou mais células/ μ L (FEITOSA et al., 1997b). Porém, segundo Cook & Denicola (1988), a mesma já pode ser observada em amostras contendo mais de 200 leucócitos/ μ L.

No estudo de Feitosa et al., (1997b) foram observadas duas amostras do grupo de animais com cinomose que possuíam líquido discretamente turvo, sendo que um deles apresentava 400 leucócitos/ μ L. Apesar de haver uma pleocitose no líquido dos dois animais, a turbidez não pode ser creditada exclusivamente a esse número de células, já que outros cães do mesmo grupo apresentavam amostras de líquido límpido, com até 380 leucócitos/ μ L.

No nosso estudo observamos que apenas um animal do G1 apresentou turbidez da amostra e apresentava acima de 200 células/ μ L. E na segunda colheita, quatro animais apresentaram o líquido discretamente turvo, sendo que apenas um animal compõe o G2. Porém estes quatro animais não apresentaram celularidade acima de 100 leucócitos/ μ L, concordando com os achados referentes a celularidade nos estudos de Feitosa et al. (1997b). Sendo que esta turbidez pode estar associada com a presença de hemácias, como foi encontrado em nosso estudo. Os quatro animais que apresentaram turbidez na segunda colheita, encontramos contagem de hemácias acima de 2.000 células/ μ L.

De acordo com os resultados de Gama et al. (2005), não encontramos alterações significativas em coloração, aspecto, densidade, pH e glicose. Entretanto, Feitosa et al. (1997b) afirmam que houve elevação da densidade do líquido em casos de pleocitose e de aumento dos níveis protéicos, porém a avaliação da mesma é insuficiente por si só para estabelecer o diagnóstico de uma anormalidade.

Segundo Greene (2006) a encefalomielite desmielinizante aguda e não inflamatória não causa alterações no líquido de animais com cinomose. O aumento da proteína e na celularidade são características das fases subagudas e crônicas.

No entanto, o componente protéico e a celularidade líquórica mostraram alterações importantes na presença de sinais neurológicos no estudo realizado por Gama et al. (2005).

Feitosa et al. (1997b) concluíram em seus estudos que os altos níveis de proteína (acima de 200 mg/dL) são encontrados em animais com uma porcentagem maior de plasmócitos no líquido, uma vez que todos os estudados se encontravam com alterações neurológicas há mais de 10 dias e sugerem que, além da produção de anticorpos contra o vírus, a desmielinização já estivesse ocorrendo por uma resposta imune e não por uma ação viral direta, levando também à produção de anticorpos contra a bainha de mielina. Em função dos resultados encontrados por eles, um líquido normal pode apresentar até 65 mg/dL de proteínas.

Entretanto, no nosso estudo foram incluídos animais com no máximo 10 dias de alterações neurológicas, discordando dos dados dos autores acima. No estudo observou-se que poucos animais apresentaram taxas de proteína acima de 65 mg/dL, fazendo com que as médias destas dosagens ficassem abaixo deste valor.

Contudo, alguns autores afirmam que no estágio crônico, com a inflamação ocorre aumento de proteína (acima de 25 mg/dL), principalmente representado por IgG antivírus da cinomose (CORRÊA & CORRÊA, 1992; TIPOLD et al., 1992; SUMMERS et al., 1995; GREENE, 2006).

No estudo de Feitosa et al. (1997) também foi realizado o teste de Pandy, com objetivo de identificar a quantidade de globulinas, sendo que todos os animais portadores de cinomose apresentaram positividade neste teste, sendo possível constatar que aqueles animais com níveis protéicos totais elevados apresentavam também maior turbidez no teste e uma maior porcentagem de plasmócitos, sugerindo que o aumento dos níveis protéicos ocorreu por uma produção local de anticorpos e não por uma lesão na barreira hemato-encefálica.

Em nossos resultados podemos observar que houve um aumento da proteína no líquido dos animais, porém apenas quatro animais apresentaram positividade neste teste, demonstrando que este aumento de proteína acima de 25 mg/dL pode ter sido causado pela produção local de anticorpos conforme a literatura. Porém 10 animais apresentavam o aumento na dosagem de proteína total, apresentando negatividade no teste de Pandy, demonstrando que pode haver um aumento sem que haja produção de anticorpos locais. Esta diferença encontrada no teste de Pandy pode estar relacionada com o tempo de evolução, já que nossos animais apresentavam o tempo máximo de 10 dias de evolução da doença, sendo a fase aguda da enfermidade, que ainda não há produção de anticorpos locais.

No entanto, dos três animais do G1, apenas um manteve a positividade na segunda colheita, sendo que houve diminuição da turbidez da reação, nos permitindo afirmar que houve diminuição da produção de anticorpos após o início do tratamento, com intervalo de 15 dias entre as colheitas. No G2 observamos que o animal que apresentava positividade na primeira amostra passou a não apresentar mais na segunda. E verificamos ainda que outro animal, mesmo recebendo a ribavirina associada com o DMSO, apresentou positividade na segunda colheita, desta forma, podemos afirmar que houve produção de anticorpos, nesse caso.

A contagem de células nucleadas é de extremo valor para nosso estudo. Os resultados não apresentaram diferenças significativas entre os dois grupos, porém observamos uma diminuição dessa contagem em todos os animais e nos dois momentos da análise. Estes valores médios da contagem de leucócitos foram comparados com os achados de Feitosa et al. (1997b), que afirmam a ocorrência de pleocitose em amostras com mais de oito células/ μ L. Estes autores encontraram no grupo de cães com cinomose uma pleocitose variando de 19 a 400 células/ μ L. Em nosso estudo encontramos uma variação de duas a 265 células/ μ L na primeira colheita, porém na segunda amostra verificamos uma variação de duas a 100 células/ μ L.

Nos relatos de Gama et al. (2005) foi observado que 50% dos animais infectados e com sintomatologia neurológica apresentavam pleocitose, com mais de oito células/ μ L. A ausência de células no líquido, em cães com cinomose e sinais nervosos, está associada a estágios iniciais e agudos desta fase da referida enfermidade.

Em nosso estudo encontramos 30% dos animais com valores normais desta contagem, porém verificando-se as médias encontradas em cada grupo, podemos afirmar que os animais apresentavam pleocitose.

No entanto, quando avaliamos as amostras dos dois grupos, percebemos que houve uma queda nos valores médios da contagem de células nucleadas entre a primeira e a segunda colheita, confirmando a diminuição da resposta imune no local, concordando com os dados do teste de Pandy com relação à eficácia da ribavirina frente ao vírus da cinomose. Portanto, podemos afirmar também que o DMSO potencializou a penetração do antiviral no SNC através dos resultados obtidos na análise da contagem de células nucleadas, já que a diminuição desta foi claramente evidente quando analisamos graficamente (Figura 06).

Em casos de cinomose a pleocitose ocorre predominantemente por um aumento de linfócitos, havendo também a presença de monócitos, macrófagos e raros neutrófilos (FEITOSA et al., 1997b). Concordando com os dados obtidos por estes autores, verificamos que todos os animais apresentavam pleocitose linfocítica, sendo que em nosso estudo comparamos os outros tipos celulares de forma agrupada.

Ao contrário do que encontramos nas células nucleadas, o percentual de linfócitos aumentou e, podemos afirmar que o índice percentual das outras células mononucleares, conforme citadas na literatura, diminuiu. Segundo Feitosa et al. (1997b), no líquido de animais com cinomose foi possível observar uma relação direta entre o número de plasmócitos e os níveis protéicos. Esta relação também foi encontrada em nossos estudos quando comparamos a queda nos valores de células mononucleares, o componente protéico e o teste de Pandy, sugerindo, desta forma que a produção local de anticorpos diminuiu após o tratamento, sendo que a associação da ribavirina com o DMSO foi mais eficaz em impedir a replicação viral no SNC.

Apesar da ausência de manguitos perivascularares, numerosas células CD8⁺ são encontradas nas lesões agudas desmielinizantes e também distribuídas difusamente no parênquima cerebral, correlacionado de forma desigual com áreas de infecção viral. No líquido destes animais altos títulos de IL-8 foram encontrados, isto sugere que a ativação inicial das células da micróglia serve como uma alavanca para a invasão de células T no SNC (VANDEVELDE & ZURBRIGGEN, 2005).

A partir destes relatos podemos afirmar que a presença de linfócitos no líquido, mesmo após o tratamento, pode significar uma resposta a essa produção de citocinas, desencadeada na presença do antígeno viral, que induzem a migração de mais células e podem manter a inflamação no SNC, resultando em resposta imuno-mediada, conforme descrito por Wünschmann et al. (1999) e Markus et al. (2002). Estas complicações

imunológicas podem ser responsáveis pelo óbito de alguns animais que não chegaram ao final do tratamento.

No entanto, quando analisamos os valores absolutos de linfócitos, verificamos que houve uma diminuição desta contagem, porém não houve normalidade nestes valores. Estatisticamente, o G1 apresentou significância entre as medianas, contudo o G2 demonstrou uma queda mais acentuada destes valores. O fato de não encontrarmos resultados estatísticos no grupo que recebeu a ribavirina associada ao DMSO pode ser referente a variabilidade de resultados encontrados neste grupo, já que utilizamos testes não paramétricos nesta análise.

Desta forma, podemos afirmar que a eficácia da ribavirina pode ter sido prejudicada pela ação do sistema imune e sugerimos novos estudos que utilizem a associação do antiviral com imunomoduladores, com objetivo de minimizar os efeitos deletérios do sistema imune no SNC.

Além dos efeitos colaterais encontrados nos exames hematológicos, observamos através das avaliações clínicas diárias que os animais começaram a apresentar hiporexia ou anorexia durante o período de administração da droga e alguns animais apresentaram vômitos esporádicos. Estes sinais demonstraram que a administração oral da ribavirina pode levar a um quadro de irritação gástrica, podendo evoluir para gastrite.

Segundo Hayden & Douglas (1990) outros efeitos colaterais podem ser encontrados, como pruridos, erupção cutânea aguda, náuseas, depressão, tosse e sintomas respiratórios em humanos. No entanto, em nosso estudo experimental, não observamos nenhum destes efeitos indesejáveis relatados.

Conclusões

Os resultados do presente estudo permitem concluir que:

1. A ribavirina demonstrou atividade efetiva contra o vírus da cinomose em animais na fase neurológica, com melhora sensível do quadro clínico.
2. O DMSO mostrou-se capaz de potencializar a ação antiviral da ribavirina, aumentando o seu poder de difusão tecidual, tornando sua ação mais eficaz frente ao vírus da cinomose.
3. Os efeitos colaterais encontrados pela utilização da ribavirina foram: leve alteração em medula óssea observada pela anemia, imunossupressão expressa por linfopenia, branda lesão renal e gastrite.
4. A ribavirina foi capaz de diminuir a expressão do antígeno viral com conseqüente diminuição da produção de anticorpos no SNC, porém manteve uma pleocitose linfocítica no líquido.
5. A dose de 30 mg/Kg por via oral, a cada 24 horas, durante 15 dias foi eficaz contra a infecção viral. O monitoramento através de exames complementares deve ser realizado rotineiramente com intuito de acompanhar o surgimento de efeitos colaterais, mesmo que estes sejam reversíveis com a suspensão do tratamento.

Referências Bibliográficas

AITA, K.; IRIE, H.; TANUMA, Y.; TOIDA, S.; OKUMA, Y.; MORI, S.; SHIGA, J. Apoptosis in murine lymphoid organs following intraperitoneal administration of dimethyl sulfoxide (DMSO). *Experimental and Molecular Pathology*, v. 79, p. 265-271, set. 2005.

ALI, B. H. Dimethyl Sulfoxide: Recent pharmacological and toxicological research. *Veterinary and Human Toxicology*, v. 43, n. 4, p. 228-231, ago. 2001.

ALVES, C. M.; VASCONCELOS, A. C.; MARTINS, A. S.; PUERTO, H. L.; SANTOS, F. G. A.; NUNES, J. E. S.; CAMPOS, P. P.; MORO, L. Morphometric analysis of the thymus of puppies infected with the Snyder Hill strain of canine distemper virus. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*, v. 58, n. 4, p. 472-479, 2006.

AMEMORI, S.; IWAKIRI, R.; ENDO, H.; OOTANI, A.; OGATA, S.; NODA, T.; TSUNADA, S.; SAKATA, H.; MATSUNAGA, H.; MIZUGUCHI, M.; IKEDA, Y. Oral dimethyl sulfoxide for systemic amyloidosis complication in chronic inflammatory disease: a retrospective patient chart review. *Journal of Gastroenterology*, v. 41, p. 444-449, 2006.

AMUDE, A. M.; ALFIERI, A. A.; ALFIERI, A. F. Clinicopathological findings in dogs with distemper encephalomyelitis presented without characteristic signs of the disease. *Research in Veterinary Science*, v. 82, p. 416-422, 2007.

APPEL, M. J. G.; SUMMERS, B. A. Pathogenicity of Morbilliviruses for terrestrial carnivores. *Veterinary Microbiology*, v. 44, p. 187-191, 1995.

APPEL, M. J. G.; SUMMERS, B. A. Canine Distemper: Current Status. Disponível em: www.ivis.org. 23/11/1999.

BARRETT, T. Morbillivirus infections, with special emphasis on Morbillivirus of carnivores. *Veterinary Microbiology*, v. 69, p. 3-13, 1999.

BAUMGÄRTNER, W.; BOYCE, R. W.; ALLDINGER, S.; AXTHELM, M. K.; WEISBRODE, S. E.; KRAKOWKA, S.; GAEDKE, K. Metaphyseal bone lesions in young dogs with systemic canine distemper virus infection. *Veterinary Microbiology*, v. 44, p. 201-209, 1995.

BEAN, B. Antiviral therapy: current concepts and practices. *Clinical Microbiology Reviews*, v. 5, n. 2, p. 146-182, abr. 1992.

BELLINI, W. J.; ENGLUND, G.; RICHARDSON, C. D.; ROZENBLATT, S.; LAZZARINI, R. A. Matrix genes of measles virus and canine distemper virus: cloning,

nucleotide sequences, and deduced amino acid sequences. *Journal of Virology*, v. 58, n. 2, p. 408-416, mai. 1986.

BENGSTON, J. L.; BOVENG, P.; FRANZEN, U.; HAVE, P.; HEIDE JORGENSEN, M. P.; HÄRKÖNEN, T. J. Antibodies to canine distemper virus in Antarctic seals. *Marine mammal science*, v. 71, p. 85-87, 1991.

BERNARD, D. Viramidine (Ribapharm). *Current Opinion in Investigational Drugs*, v. 3, p. 1585-1589, 2002.

BIAZZONO, L.; HAGIWARA, M. K.; CORRÊA, A. R. Avaliação da resposta imune humoral em cães jovens imunizados contra a cinomose com vacina de vírus atenuado. *Brazilian journal of veterinary research and animal science*, v. 38, n. 5, p. 245-250, 2001.

BEAN, B. Antiviral therapy: current concepts and practices. *Clinical Microbiology Reviews*, v. 5, n. 2, p. 146-182, abr. 1992.

BÖHM, M. et al. Serum antibody titers to canine parvovirus, adenovirus and distemper virus in dog in the UK which had not been vaccinated for at least three years. *Veterinary Record*, v. 154, p. 457-463, 2004.

BRAYTON, C. F. Dimethyl Sulfoxide (DMSO): A Review. *Cornell veterinarian*, v. 76, p. 61-90, 1986.

BINK, L. E. S.; TRAMPER, J.; LUYBEN, K. Ch. A. M.; VAN'T RIET, K. Biocatalysis in organic media. *Enzyme and Microbial Technology*, v. 10, n. 12, p. 736-743, 1988.

BROWNE, M. J. Mechanism and specificity of action of ribavirin. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, v. 15, n. 6, p. 747-753, jun. 1978.

BÜRGE, T.; GRIOT, C.; VANDEVELDE, M.; PETERHANS, E. Antiviral antibodies stimulate production of reactive oxygen species in cultured canine brain cells infected with canine distemper virus. *Journal of Virology*, v. 63, n. 6, p. 2790-2797, jun. 1989.

CASTILHO, J. G.; BRANDÃO, P. E.; CARNIELI JR., P.; OLIVEIRA, R. N.; MACEDO, C. I.; PEIXOTO, Z. M. P.; CARRIERI, M. L.; KOTAIT, I. Molecular analysis of the N gene of canine distemper virus in dogs in Brazil. *Arquivo brasileiro de medicina veterinária e zootecnia*, v. 59, n. 3, p. 654-659, 2007.

CAMICI, G. G.; STEFFEL, J.; AKHMEDOV, A.; SCHAFER, N.; BALDINGER, J.; SCHULZ, U.; SHOJAATI, K.; MATTER, C. M.; YANG, Z.; LÜSCHER, T. F.; TANNER, F. C. Dimethyl Sulfoxide Inhibits Tissue Factor Expression, thrombus formation, and vascular smooth muscle cell activation: a potential treatment strategy for drug-eluting stents. *Circulation*, v. 114, p. 1512-1521, 2006.

- CAVALETTI, G.; OGGIONI, N.; SALA, F.; PEZZONI, G.; CAVALETTI, E.; MARMIROLI, P.; PETRUCCIOLI, M. G.; FRATTOLA, L.; TREDICI, G. Effect on the peripheral nervous system of systemically administered dimethylsulfoxide in the rat: a neurophysiological and pathological study. *Toxicology Letters*, v. 118, p. 103-107, 2000.
- CHANG, T.; HEEL, R. C. Ribavirin and Inosiplex: A review of their present status in viral diseases. *Drug*, v. 22, p. 111-128, 1981.
- CHAPPUIS, G. Control of canine distemper. *Veterinary Microbiology*, v. 44, p. 351-358, 1995.
- CHERPILLOD, P.; TIPOLD, A.; GRIOT-WENK, M.; CARDOZO, C.; SCHMID, I.; FATZER, R.; SCHOBESBERGER, M.; ZURBRIGGEN, R.; BRUKNER, L.; ROCH, F.; VANDEVELDE, M.; WITTEK, R.; ZURBRIGGEN, A. DNA vaccine encoding nucleocapsid and surface proteins of wild type canine distemper virus protects its natural host against distemper. *Vaccine*, v. 18, n. 26, p. 2927-2936, jul. 2000.
- CHO, H. S.; PARK, N. Y. Detection of canine distemper virus in blood samples by reverse transcription loop-mediated isothermal amplification. *Journal of veterinary medicine*, v. 52, p. 410-413, 2005.
- COCHRAN, T.; STEFANKO, J.; MOORE, C. et al. Dimethyl Sulfoxide protection against gastric stress ulceration. *Current Surgery*, v. 40, p. 435-437, 1983.
- COOK, J. R.; DENICOLA, D. B. Cerebrospinal fluid. *Veterinary Clinics of North América Small Animal Practice*, v. 18, n. 3, p. 475-499, 1988.
- CORRÊA, C. N. M. Cinomose. In: CORRÊA, W. M.; CORRÊA, C. N. M. (Eds). *Enfermidades Infecciosas dos Mamíferos Domésticos*. Rio de Janeiro: Medsi, 1992. p. 655-670.
- CROTTY, S.; CAMERON, C. E.; ANDINO, R. RNA virus error catastrophe: direct molecular test by using ribavirin. *PNAS*, v. 98, n. 12, p. 6895-6900, jun. 2001.
- DAHL, L.; JENSEN, T. H.; GOTTSCHALCK, E.; KARLSKOV-MORTENSEN, P.; JENSEN, T. D.; NIELSEN L.; ANDERSEN, M. K.; BUCKLAND, R.; WILD, T. F.; BLIXENKRONE-MOLLER, M. Immunization with plasmid DNA encoding the hemagglutinin and the nucleoprotein confers robust protection against a lethal canine distemper virus challenge. *Vaccine*, v. 22, p. 3642-3648, 2004.
- DAMIÁN, M.; MORALES, E.; SALAS, G.; TRIGO, F. J. Immunohistochemical detection of antigens of distemper, adenovirus and parainfluenza viruses in domestic dogs with pneumonia. *Journal of comparative pathology*, v. 133, p. 289-293, 2005.

DAVIS, J.; ROWLEY, S. D.; SANTOS, G. M. Toxicity of autologus bone marrow graft infusion. *Progress in Clinical and Biological Research*, v. 333, p. 531-540, 1991.

ELIA, G.; BELLOLI, C.; CIRONE, F.; LUCENTE, M. S.; CARUSO, M.; MARTELLA, V.; DECARO, N.; BUONAVOGLIA, C.; ORMAS, P. In vitro efficacy of ribavirin against canine distemper virus. *Antiviral Research*, 2007. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com.html> >. Acesso em: dezembro, 2007.

FEITOSA, M. M.; FEITOSA, F. L. F.; KOHAYAGAWA, A.; CURI, P. R.; MOGAMI, S. R. K. Avaliação física, citológica, conteúdo de proteínas e determinação qualitativa de globulinas do líquido de cães normais e de cães com encefalite por cinomose. *Brazilian journal of veterinary research and animal science*, v. 34, n. 3, p. 147-151, 1997b.

FEITOSA, M. M.; KOHAYAGAWA, A.; FEITOSA, F. L. F.; CURI, P. R.; MOGAMI, S. R. K. Avaliação bioquímica do líquido cefalorraquidiano de cães normais e de cães jovens portadores de encefalite por cinomose. *Brazilian journal of veterinary research and animal science*, v. 34, n. 2, p. 99-102, 1997a.

FARKAS, E.; INSTITÓRIS, A.; DOMOKI, F.; MIHÁLY, A.; LUITEN, P. G. M.; BARI, F. Diazoxide and dimethyl sulphoxide prevent cerebral hypoperfusion-related learning dysfunction and brain damage after carotid artery occlusion. *Brain Research*, v. 1008, p. 252-260, 2004.

FERRARA, E. A.; OISHI, J. S.; WANNEMACHER, R. W.; STEPHEN, E. L. Plasma disappearance, urine excretion, and tissue distribution of ribavirin in rats and rhesus monkeys. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, v. 19, n. 6, p. 1042-1049, jun. 1981.

FORSYTH, M.; KENNEDY, S.; WILSON, S.; EYBATOV, T.; BARRETT, T. Canine distemper in Caspian seal. *Veterinary Record*, 1998.

FRISK, A. L.; KÖNIG, M.; MORITZ, A.; BAUMGÄRTNER, W. Detection of canine distemper virus nucleoprotein RNA by reverse transcription-PCR using serum, whole blood, and cerebrospinal fluid from dogs with distemper. *Journal of Clinical Microbiology*, v. 37, n. 11, p. 3634-3643, nov. 1999.

GAMA, F. G. V.; NISHIMORI, C. T.; SOBREIRA, M. R.; SANTANA, A. E. Caracteres físico-químicos e citológicos do líquido de cães em diferentes fases da cinomose. *Ciência Rural*, v. 35, n. 3, p. 596-601, mai./jun. 2005.

GEBARA, C. M. S.; WOSIACKI, S. R.; NEGRÃO, F. J.; ALFIERI, A. A.; ALFIERI, A. F. Lesões histológicas no sistema nervoso central de cães com encefalite e

diagnóstico molecular da infecção pelo vírus da cinomose canina. *Arquivo brasileiro de medicina veterinária e zootecnia*, v. 56, n. 2, p. 168-174, 2004.

GILBERT, B. E.; KNIGHT, V. Biochemistry and clinical applications of ribavirin. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, v. 30, n. 2, p. 201-205, ago. 1986.

GILBERT, B. E.; WYDE, P. R. Pharmacokinetics of ribavirina aerosol in mice. *Antimicrobial Agents and Chemoterapy*, v. 32, n. 2, p. 117-121, 1988.

GRACHEV, M. A.; KUMAREV, V. P.; MAMEV, L. V.; ZORIN, V. L.; BARANOVA, L. V.; DENIKINA, N. N.; BELIKOV, S. I.; PETROV, S. I.; PETROV, E. A.; KOLESNIK, V. S.; KOLESNIK, R. S.; DOREFUV, V. M.; BEIM, A. M.; KUDELIN, V. N.; MAGIEVA, F. G.; SIDOROV, V. N. Distemper vírus in Baikal seals. *Nature*, v. 338, p. 209, 1989.

GRANCHER, N.; VERNARD, V.; KEDZIEREWICZ, F.; AMMERLAAN, W.; FINANCE, C.; MULLER, C. P.; FAOU, A. Le. Improved antiviral activity in vitro of ribavirin against measles virus after complexation with cyclodexins. *Antiviral Research*, v. 62, p. 135-137, 2004.

GREENE, C. E.; APPEL, M. J. Canine Distemper. In: GREENE, C. E. (Eds.) *Infectious Disease of the Dog and Cat*. Philadelphia: Saunders, 2006. p. 25-41.

GRÖNE, A.; ALLDINGER, S.; BAUMGÄRTNER, W. Interleukin-1 α , -6, -12 and tumor necrosis factor- α expression in brains of dogs with canine distemper virus infection. *Journal of Neuroimmunology*, v. 110, p. 20-30, 2000.

HAAS, L.; BARRETT, T. Rinderpest and other animal morbillivirus infections: comparative aspects and recent developments. *Journal of veterinary medicine*, v. 43, p. 411-420, 1996.

HEAGY, W.; CRUMPACKER, C.; LOPEZ, P. A.; FINBERG, R. W. Inhibition of immune functions by antiviral drugs. *Journal of clinical investigation*, v. 87, p. 1916-1924, jun. 1991.

HAYDEN, F. G.; DOUGLAS, R. G. JR. Antiviral Agents. In: MANDELL, G. L.; DOUGLAS, R. G. JR.; BENNETT, J. E. (Eds). *Principles and Praticce of Infectious Disease*. New York: Churchill Livingestone, 1990. p. 370-393.

HEADLEY, S. A.; GRAÇA, D. L. Canine distemper: epidemiological findings of 250 cases. *Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science*, v. 37, n. 2, 2000.

HIRAMA, K.; TOGASHI, K.; WAKASA, C.; YONEDA, M.; NISHI, T.; ENDO, Y.; MIURA, R.; TSUKIYAMA-KOHARA, K.; KAI, C. Cytotoxic T-lymphocyte activity

specif for hemagglutinin (H) protein of canine distemper virus in dogs. *The Journal of veterinary medical science*, v. 65, n. 1, p. 109-112, 2003.

HOMMA, M.; JAYEWARDENE, A. L.; GAMBERTOGLIO, J.; AWEEKKA, F. High-performance liquid chromatographic determination of ribavirin in whole blood to assess disposition in erythrocytes. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, v. 43, n. 11, p. 2716-2719, nov. 1999.

HOSOYA, M.; SHIGETA, S.; NAKAMURA, K.; CLERCQ, E. De. Inhibitory effect of selected antiviral compounds on measles (SSPE) virus replication in vitro. *Antiviral Research*, v. 12, p. 87-97, 1989.

HOSOYA, M.; SHIGETA, S.; MORI, S.; TOMODA, A.; SHIRAISHI, S.; MIIKE, T.; SUZUKI, H. High-dose intravenous ribavirin therapy for subacute sclerosing panencephalitis. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, v. 45, n. 3, p. 943-945, mar. 2001.

IMAGAWA, D. T.; GORET, P.; ADAMS, J. M. Immunological relationships of measles, distemper, and rinderpest viruses. *Pathology*, v. 46, p. 1119-1123, jun. 1960.

IMHOFF, H.; VON MESSLING, V.; HERRLER, G.; HAAS, L. Canine distemper virus infection requires cholesterol in the viral envelope. *Journal of Virology*, v. 81, n. 8, p. 4158-4165, abr. 2007.

INOUE, Y.; HOMMA, M.; MATSUZAKI, Y.; SHIBATA, M.; MATSUMURA, T.; ITO, T.; MITAMURA, K.; TANAKA, N.; KOHDA, Y. Liquid Chromatography assay for routine monitoring of cellular ribavirin levels in blood. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, v. 48, n. 10, p. 3813-3816, out. 2004.

IWATSUKI, K.; MIYASHITA, N.; YOSHIDA, E.; GEMMA, T.; SHIN, Y. S.; HIRAYAMA, N.; KAI, C.; MIKAMI, T. Molecular and phylogenetic analyses of the haemagglutinin (H) proteins of field isolates of canine distemper virus from naturally infected dogs. *Journal of general virology*, v. 78, p. 373-380, fev. 1997.

IWATSUKI, K.; TOKIYOSHI, S.; HIRAYAMA, N.; NAKAMURA, K.; OHASHI, K.; WAKASA, C.; MIKAMI, T.; KAI, C. Antigenic differences in the H proteins of canine distemper virus. *Veterinary Microbiology*, v. 71, p. 281-286, 2000.

JEULIN, H.; GRANCHER, N.; KEDZIEREWICZ, F.; FAOU, A. E.; VENARD, V. Evaluation by Q-RT-PCR of the efficacy of ribavirin complexed with beta-cyclodextrin against measles virus in a mouse encephalitis model. *Pathologie Biologie*, v. 54, p. 541-544, 2006.

- JONES, T. C., HUNT, R. D., KING, N. W. *Patologia Veterinária*. São Paulo: Manole, 2000. p. 1415.
- JÓZWIK, A.; FRYMUS, T. Comparison of the immunofluorescence assay with RT-PCR and Nested PCR in the diagnosis of canine distemper. *Veterinary Research Communications*, v. 29, p. 347-359, 2005.
- LAN, N. T.; YAMAGUCHI, R.; INOMATA, A.; FURUYA, Y.; UCHIDA, K.; SUGANO, S.; TATEYAMA, S. Comparative analyses of canine distemper viral isolates from clinical cases of canine distemper in vaccinated dogs. *Veterinary Microbiology*, v. 115, p. 32-42, 2006.
- LARSSON, A.; STENBERG, K.; ÖBERG, B. Reversible Inhibition of cellular metabolism by ribavirin. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, v. 13, n. 2, p. 154-158, fev. 1978.
- LATHA, D.; GEETHA, M.; RAMADASS, P.; NARAYANAN, R. B. Development of recombinant nucleocapsid protein based IgM-ELISA for the early detection of distemper infections in dogs. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, v. 119, p. 278-286, 2007.
- LEEKUMJORN, S.; SUM, A. K. Molecular study of the diffusional process of DMSO in double lipid bilayers. *Biochimica et Biophysica Acta*, v. 1758, p. 1751-1758, 2006.
- LEYSEN, P.; BALZARINI, J.; CLERCQ, E.; NEYTS, J. The predominant mechanism by which ribavirin exerts its antiviral activity in vitro against flavivirus and paramyxovirus is mediated by inhibition of IMP dehydrogenase. *Journal of Virology*, v. 79, n. 3, p. 1943-1947, fev. 2005.
- LIANG, C. T.; CHUEH, L. L.; PANG, V. F.; ZHUO, Y. X.; LIANG, S. C.; YU, C. K.; CHIANG, H.; LEE, C. C.; LIU, C. H. A non-biotin polymerized Horseradish-peroxidase method for the immunohistochemical diagnosis of canine distemper. *Journal of comparative pathology*, v. 136, p. 57-64, 2007.
- LIN, C.; YEH, L.; LUU, T.; LOURENCO, D.; LAU, J. Y. N. Pharmacokinetics and metabolism of [14 C] ribavirin in rats and Cynomolgus monkeys. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, v. 47, n. 4, p. 1395-1398, abr. 2003.
- LIND, R. C.; BEGAY, C. K.; GANDOLFI, J. Hepatoprotection by Dimethyl Sulfoxide. *Toxicology and Applied Pharmacology*, v. 166, p. 145-150, 2000.
- LU, D.; MATTSON, M. P. Dimethyl sulfoxide suppresses NMDA- and AMPA-induced ion currents and calcium influx and protects against excitotoxic death in hippocampal neurons. *Experimental neurology*, v. 170, p. 180-185, 2001.

LYONS, C.; WELSH, M. J.; THORSEN, J.; RONAL, K.; RIMA, B. K. Canine distemper virus isolated from a captive seal. *Veterinary record*, v. 132, p. 487-488, 1993.

KAJITA, M.; KATAYAMA, H.; MURATA, T.; KAI, C.; HORI, M.; OZAKI, H. Canine distemper virus induce apoptosis through caspase-3 and -8 activation in vero cells. *Journal of veterinary medicine*, v. 53, p. 273-277, 2006.

KIM, D.; JEOUNG, S. Y.; AHN, S. J.; LEE, J. H.; PAK, S.; KWON, H. M. Comparison of tissue and fluid samples for the early detection of canine distemper virus in experimentally infected dogs. *The Journal of veterinary medical science*, v. 68, n. 8, p. 877-879, 2006.

KISHIOKA, T.; IIDA, C.; FUJII, K.; NAGAE, R.; ONISHI, Y.; ICHI, I.; KOJO, S. Effect of dimethyl sulphoxide on oxidative stress, activation of mitogen activated protein kinase and necrosis caused by thioacetamide in the rat liver. *European Journal of Pharmacology*, v. 564, p. 190-195, 2007.

KRAKOWAKA, S.; McCULLOUGH, B.; KOESTNER, A.; OLSEN, R. Myelin-specific autoantibodies associated with central nervous system demyelination in canine distemper virus infection. *Infection and immunity*, v. 8, n. 5, p. 819-827, nov. 1973.

KUMAGAI, K.; YAMAGUCHI, R.; UCHIDA, K.; TATEYAMA, S. Lymphoid apoptosis in acute canine distemper. *The Journal of veterinary medical science*, v. 66, n. 2, p. 175-181, 2004.

KHUTH, S.; AKAOKA, H.; PAGENSTECHER, A.; VERLAETEN, O.; BELIN, M., GIRAUDON, P.; BERNARD, A. Morbillivirus infections of the mouse central nervous system induces region-specific upregulation of MMPs and TIMPs correlated to inflammatory cytokine expression. *Journal of Virology*, v. 75, n. 17, p. 8268-8282, set. 2001.

MARKUS, S.; FAILING, K.; BAUMGÄRTNER, W. Increase expression of pro-inflammatory cytokines and lack of up-regulation of anti-inflammatory cytokines in early distemper CNS lesions. *Journal of Neuroimmunology*, v. 125, p. 30-41, 2002.

MARTELLA, V.; ELIA, G.; LUCENTE, M. S.; DECARO, N.; LORUSSO, E.; BANYAI, K.; MOLLER, M. B.; LAN, N. T.; YAMAGUCHI, R.; CIRONE, F.; CARMICHAEL, L. E.; BUONAVOGLIA, C. Genotyping canine distemper virus (CDV) by a hemi-nested multiplex PCR provides a rapid approach for investigation of CDV outbreaks. *Veterinary Microbiology*, v. 122, p. 32-42, 2007.

MEERTENS, N.; STOFFEL, M. H.; CHERPILLOD, P.; WITTEK, R.; VANDEVELDE, M.; ZURBRIGGEN, A. Mechanism of reduction of virus release and cell-cell fusion in persistent canine distemper virus infection. *Acta Neuropathologica*, v. 106, p. 303-310, 2003.

MEGID, J.; NOZAKI, C. N.; FILHO, O. A.; et al. Positividade a imunofluorescência direta (IFD) em diferentes tecidos de cães clinicamente suspeitos de cinomose. *Revista Brasileira de Ciência Veterinária*, v. 7, p. 114, 2000.

MIAO, Q.; BAUMGÄRTNER, W.; FAILING, K.; ALLDINGER, S. Phase-dependent expression of matrix metalloproteinases and their inhibitors in demyelinating canine distemper encephalitis. *Acta Neuropathologica*, v. 106, p. 486-494, 2003.

MOCHIZUKI, M.; MOTOYOSHI, M.; MAEDA, K.; KAI, K. Complement-mediated neutralization of canine distemper virus in vitro: cross-reaction between vaccine Onderstepoort and field KDK-1 strains with different hemagglutinin gene characteristics. *Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology*, v. 9, n. 4, p. 921-924, jul. 2002.

MORETTI, L. A.; DA SILVA, A. V.; RIBEIRO, M. G.; PAES, A. C.; LANGONI, H. *Toxoplasma gondii* genotyping in a dog co-infected with distemper virus and ehrlichiosis rickettsia. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo*, v. 48, n. 6, p. 359-363, nov./dez. 2006.

MORO, L.; MARTINS, A. S.; ALVES, C. M.; SANTOS, F. G. A.; DEL PUERTO, H. L.; VASCONCELOS, A. C. Apoptosis in the *Cerebellum* of dogs with distemper. *Journal of veterinary medicine*, v. 50, p. 221-225, 2003.

MORO, L.; VASCONCELOS, A. C. Patogenia da imunossupressão na cinomose canina. *A Hora Veterinária*, v. 17 n. 102, p. 53-57, mar./abr. 1998.

MUELLER, L. P.; THEURICH, S.; CHRISTOPEIT, M.; GROTHE, W.; MUETHERIG, A.; WEBER, T.; GUENTHER, S.; BEHRE, G. Neurotoxicity upon infusion of dimethylsulfoxide-cryopreserved peripheral blood stem cells in patients with and without pre-existing cerebral disease. *Journal Compilation*, v. 78, p. 527-531, 2007.

MYERS, D. L.; ZURBRIGGEN, A.; LUTZ, H.; POSPISHIL, A. Distemper: not a new disease in lions and tigers. *Clinical and diagnostic laboratory immunology*, v. 4, p. 180-184, 1997.

NAGEL, S.; GENIUS, J.; HEILAND, S.; HORSTMANN, S.; GARDNER, H.; WAGNER, S. Diphenyleneiodonium and dimethylsulfoxide for treatment of

reperfusion injury in cerebral ischemia of the rat. *Brain Research*, v. 1132, p. 210-217, 2007.

NEGRÃO, F. J.; WOSIACKI, S. H.; ALFIERI, A. A.; ALFIERI, A. F. Perfil de restrição de um fragmento do gene da hemagglutina amplificado pela RT-PCR a partir de estripes vacinais e selvagens do vírus da cinomose canina. *Arquivo brasileiro de medicina veterinária e zootecnia*, v. 58, n. 6, p. 1099-1106, 2006.

NEUWLT, E. A.; BARNETT, P.; BARRANGER, J.; McCORMICK, C.; PAGEL, M.; FRENKEL, E. Inability of dimethyl sulfoxide and 5-fluorouracil to open the blood-brain barrier. *Neurosurgery*, v. 12, p. 29-34, 1983.

PAES, A. C. *Estudo da Potencialização da Ação Terapêutica da Isoniazida pelo Dimetil-Sulfóxido (DMSO) no Tratamento de Hamsters (Mesocricetus auratus) Experimentalmente Infectados com Mycobacterium bovis (Cepa AN5)*. 1999. Dissertação (Doutorado) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo.

PAPICH, M. G., HEIT, M. C., RIVIERE, J. E. Fármacos Antifúngicos e Antivirais. In: ADAMS, H. R. (8ª Eds). *Farmacologia e Terapêutica em Veterinária*. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan S.A., 2003. p. 767-790.

PARDRIDGE, W. M. Blood-brain barrier drug targeting: the future of brain drug development. *Molecular Interventions*, v. 3, n. 2, p. 90-105, 2003.

PASTÉN, R. P.; GALERO, E. M.; SICILIANO, L. G.; LARA, I. C.; CEVALLOS, G. C. Effects of dimethylsulphoxide on mice arsenite-induced dysmorphogenesis in embryo culture and cytotoxicity in embryo cells. *Toxicology Letters*, v. 161, p. 167-173, 2006.

PELLEGRINO, F. C.; SURANITI, A.; GARIBALDI, L. *Síndromes Neurológicas em cães e gatos*. São Caetano do Sul: Interbooks, 2003. p. 376.

PLATTET, P.; RIVALS, J. P.; ZUBER, B.; BRUNNER, J. M.; ZURBRIGGEN, A.; WITTEK, R. The fusion protein of wild-type canine distemper virus is a major determinant of persistent infection. *Virology*, v. 337, p. 312-326, mai. 2005.

PRESTON, S. L.; DRUSANO, G. L.; GLUE, P.; NASH, J.; GUPTA, S. K.; McNAMARA, P. Pharmacokinetics and absolute bioavailability of ribavirin in healthy volunteers as determined by stable-isotope methodology. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, v. 43, n. 10, p. 2451-2456, out. 1999.

RANDHAWA, M. A. The effects of dimethyl sulfoxide (DMSO) on the growth of dermatophytes. *Japanese Journal of Medical Mycology*, v. 47, p. 313-318, 2006.

REHAN, M.; YOUNUS, H. Effects of organic solvents on the conformation and interaction of catalase and anticatalase antibodies. *International Journal of Biological Macromolecules*, v. 38, p. 289-295, 2006.

RIMA, B. K.; DUPREX, W. P. Morbillivirus and human disease. *Journal of Pathology*, v. 208, p. 199-214, 2006.

ROSENBERG, G. A.; ESTRADA, E. Y.; MOBASHERY, S. Effect of synthetic matrix metalloproteinase inhibitors on lipopolysaccharide-induced blood-brain barrier opening in rodents: differences in response based on strains and solvents. *Brain Research*, v. 1133, p. 186-192, 2007.

RUDD, P. A.; CATTANEO, R.; VON MESSLING, V. Canine distemper virus uses both the anterograde and the hematogenous pathway for neuroinvasion. *Journal of Virology*, v. 80, n. 19, p. 9361-9370, out. 2006.

SAITO, H.; MASUDA, M.; MIURA, R.; YONEDA, M.; KAI, C. Morbillivirus nucleoprotein possesses a novel nuclear localization signal and a CRM1-independent nuclear export signal. *Virology*, v. 352, p. 121-130, 2006.

SAITO, T. B.; ALFIERI, A. A.; WOSIACKI, S. R.; NEGRÃO, F. J.; MORAIS, H. S. A.; ALFIERI, A. F. Detection of canine distemper virus by reverse transcriptase-polymerase chain reaction in the urine of dogs with clinical signs of distemper encephalitis. *Research in Veterinary Science*, 2005. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com.html>>. Acesso em: dezembro 2007.

SANTOS, N. C.; FIGUEIRA-COELHO, J.; SALDANHA, C.; MARTINS-SILVA, J. Biochemical, biophysical and haemorheological effects of dimethylsulphoxide on human erythrocyte calcium loading. *Cell Calcium*, v. 31, n. 4, p. 183-188, 2002.

SCHOBESBERGER, M.; SUMMERFIELD, A.; DOHERR, M. G.; ZURBRIGGEN, A.; GRIOT, C. Canine distemper virus-induced depletion of uninfected lymphocytes is associated with apoptosis. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, v. 104, p. 33-44, 2005.

SHIN, Y. J.; CHO, K. O.; CHO, H. S.; KANG, S. K.; KIM, H. J.; KIM, Y. H.; PARK, H. S.; PARK, N. Y. Comparison of one-step RT-PCR and nested PCR for the detection of canine distemper virus in clinical samples. *Australian Veterinary Journal*, v. 82, n. 1-2, p. 83-86, jan./fev. 2004.

SILVA, I. N. G.; GUEDES, M. I. F.; ROCHA, M. F. G.; MEDEIROS, C. M. O.; OLIVEIRA, L. C.; MOREIRA, O. C.; TEIXEIRA, M. F. S. Perfil hematológico e

avaliação eletroforética das proteínas séricas de cães com cinomose. *Arquivo brasileiro de medicina veterinária e zootecnia*, v. 57, n. 1, p. 136-139, 2005.

SILVA, L. H.Q.; MORINISHI, C. K.; NUNES, C. M. Diagnóstico diferencial entre raiva e a cinomose em amostras de cérebro de cães examinadas no período de 1998 a 2001 na região de Araçatuba, SP, Brasil. *Arquivos do Instituto Biológico*, v. 71, n. 3, p. 317-321, jul./set. 2004.

SILVA, M. C.; FIGHERA, R. A.; BRUM, J. S.; GRAÇA, D. L.; KOMMERS, G. D.; IRIGOYEN, L. F.; BARROS, C. S. L. Aspectos clinicopatológicos de 620 casos neurológicos de cinomose em cães. *Pesquisa veterinária brasileira*, v. 27, n. 5, p. 215-220, mai. 2007.

SIXT, N.; CARDOSO, A.; VALLIER, A.; FAYOLLE, J.; BUCKLAND, R.; WILD, T. F. Canine distemper virus DNA vaccination induces humoral and cellular immunity and protects against a lethal intracerebral challenge. *Journal of Virology*, v. 72, n. 11, p. 8472-8476, nov. 1998.

SOLOMON, T.; HART, C. A.; VINJAMURI, S.; BEECHING, N. J.; MALUCCI, C.; HUMPHREY, P. Treatment of subacute sclerosing panencephalitis with interferon- α , ribavirin, and inosiplex. *Journal of child neurology*, v. 17, p. 703-705, 2002.

STEPHENSON, J. R.; MEULEN, V. TER. Antigenic relationships between measles and canine distemper viruses: comparison of immune response in animals and humans to individual virus-specific polypeptides. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, v. 76, n. 12, p. 6601-6605, dez. 1979.

STEIN, V. M.; BAUMGÄRTNER, W.; KREIENBROCK, L.; ZURBRIGGEN, A.; VANDEVELDE, M.; TIPOLD, A. Canine microglial cells: stereotypy in immunophenotype and specificity in function? *Veterinary Immunology and Immunopathology*, v. 113, p. 277-287, 2006.

STEIN, V. M.; CZUB, M.; SCHREINER, N.; MOORE, P. F.; VANDEVELDE, M.; ZURBRIGGEN, A.; TIPOLD, A. Microglial cell activation in demyelinating canine distemper lesions. *Journal of Neuroimmunology*, v. 153, p. 122-131, 2004.

STERN, L. B.; GREENBERG, M.; GERSHONI, J. M.; ROZENBLATT, S. The hemagglutinin envelope protein of canine distemper virus (CDV) confers cell tropism as illustrated by CDV and measles virus complementation analysis. *Journal of Virology*, v. 69, n. 3, p. 1661-1668, mar. 1995.

STRONCEK, D. J.; FAUTSH, S. K.; LASKY, L. C.; HURD, D. D.; RAMSAY, N. K.; MCCOLLOUGH, J. Adverse reactions in patients transfused with cryopreserved marrow. *Transfusion*, v. 31, p. 521-526, 1991.

SUMMERS, B. A.; CUMMINGS, J. F.; LAHUNTA, A. *Veterinary Neuropathology*. Mosby, 1995, p. 102-110.

TAKAHASHI, T.; HOSOYA, M.; KIMURA, K.; OHNO, K.; MORI, S.; TAKAHASHI, K.; SHIGETA, S. The cooperative effect of interferon- α and ribavirin on subacute sclerosing panencephalitis (SSPE) virus infections, in vitro and in vivo. *Antiviral Research*, v. 37, p. 29-35, 1998.

TAM, R. C.; PAI, B.; BARD, J.; LIM, C.; AVERETT, D. R.; PHAM, U. T.; MILOVANOVIC, T. Ribavirin polarizes human T cell responses towards a type I cytokine profiles. *Journal of hepatology*, v. 30, p. 376-382, 1999.

TEKGÜL, H.; TUTUNCUOĞLU, S.; KUTUKÇULER, N.; DIZDARER, G.; HUSEYİNOV, A. Lymphocyte subsets and inflammatory mediators in patients with subacute sclerosing panencephalitis. *Journal of child neurology*, v. 14, p. 418-421, 1999.

TIPOLD, A.; VANDEVELDE, M.; JAGGY, A. Neurological manifestations of canine distemper virus infection. *Journal of Small Animal Practice*, v. 33, p. 466-470, 1992.

TOPACOĞLU, A.; KARCIOĞLU, O.; OZSAR, M.; ORAY, D.; NIYAZI, A.; OZUCELIK, D.; TUNCOK, Y. Massive intracranial hemorrhage associated with the ingestion of dimethyl sulfoxide. *Veterinary and human toxicology*, v. 46, p. 138-140, 2004.

TRIOLA, M.F. *Introdução à estatística*. São Paulo: LTC. 2005.

VANDEVELDE, M. The pathogenesis of nervous distemper. In: WORLD CONGRESS OF THE WORLD SMALL ANIMAL VETERINARY ASSOCIATION, 29, 2004, Rhodes. *Proceedings...* Greece: Rhodes, 2004.

VANDEVELDE, M.; ZURBRIGGEN, A. The neurobiology of canine distemper virus infection. *Veterinary Microbiology*, v. 44, p. 271-280, 1995.

VANDEVELDE, M.; ZURBRIGGEN, A. Demyelination in canine distemper virus infection: a review. *Acta Neuropathologica*, v. 109, p. 56-68, 2005.

VAN MOLL, P.; ALLDINGER, S.; BAUMGÄRTNER, W.; ADAMI, M. Distemper in wild carnivores: an epidemiological, histological and immunocytochemical study. *Veterinary Microbiology*, v. 44, p. 193-199, 1995.

VENKATESH, G.; RAMANATHAN, S.; NAIR, N. K.; MANSOR, S. M.; SATTAR, M. A.; KHAN, A. H.; NAVARATNAM, V. Permeability of atenolol and propranolol in the presence of dimethyl sulfoxide in rat single-pass intestinal perfusion assay with liquid chromatography/UV detection. *Biomedical Chromatography*, v. 21, p. 484-490, fev. 2007.

VITE, C. H. Inflammatory Disease of the Central Nervous System. In: VITE, C. H. *Braund's Clinical Neurology in Small Animals: Localization, Diagnosis and Treatment* (Eds.) New York: International Veterinary Information Service (www.ivis.org), fev. 2005.

VOLLMER, J.; RANKIN, R.; HARTMANN, H.; JURK, M.; SAMULOWITZ, U.; WADER, T.; JANOSCH, A.; SCHETTER, C.; KRIEG A. M. Immunopharmacology of CpG oligodeoxynucleotides and ribavirin. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, v. 48, n. 6, p. 2314-2317, jun. 2004.

WEI, E. P.; KONTOS, A. A.; NECKMAN, J. S. Antioxidants inhibit ATP sensitive potassium channels in cerebral arterioles. *Stroke : journal of cerebral circulation*, v. 29, p. 817-822, 1998.

VON MESSLING, V. ZIMMER, G.; HERRLER, G.; HAAS, L.; CATTANEO, R. The hemagglutinin of canine distemper virus determines tropism and cytopathogenicity. *Journal of Virology*, v. 75, n. 14, p. 6418-6427, jul. 2001.

VON MESSLING, V.; CATTANEO, R. Amino-terminal precursor sequence modulates canine distemper virus fusion protein function. *Journal of Virology*, v. 76, n. 9, p. 4172-4180, mai. 2002.

VON MESSLING, V.; MILOSEVIC, D.; CATTANEO, R. Tropism illuminated: Lymphocyte-based pathways blazed by lethal morbillivirus through the host immune system. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, v. 101, n. 39, p. 14216-14221, set. 2004b.

VON MESSLING, V.; OEZGUEN, N.; ZHENG, Q.; VONGPUNSAWAD, S.; BRAUN, W.; CATTANEO, R. Nearby clusters of hemagglutinin residues sustain SLAM-Dependent canine distemper virus entry in peripheral blood mononuclear cells. *Journal of Virology*, v. 79, n. 9, p. 5857-5862, mai. 2005.

VON MESSLING, V.; SVITEK, N.; CATTANEO, R. Receptor (SLAM [CD150]) recognition and the V protein sustain swift lymphocyte-based invasion of mucosal tissue and lymphatic organs by a Morbillivirus. *Journal of Virology*, v. 80, n. 12, p. 6084-6092, jun. 2006.

YOON, M. Y.; KIM, S. J.; LEE, B. H.; CHUNG, J. H.; KIM, Y. C. Effects of dimethylsulfoxide on metabolism and toxicity of acetaminophen in mice. *Biological and pharmaceutical bulletin*, v. 29, n. 8, p. 1618-1624, 2006.

WEST, R. T.; GARZA, L. A.; WINCHESTER, W. R.; WALMSLEY, J. A. Conformation, hydrogen bonding and aggregate formation of guanosine 5'-monophosphate and guanosine in dimethylsulfoxide. *Nucleic Acids Research*, v. 22, n. 23, p. 5128-5134, 1994.

WILD, T. F.; NANICHE D.; RABOURDIN-COMBE, C.; GERLIER, D.; MALVOSIN, E.; LECOUTURIER, V.; BUCKLAND, R. Mode of entry of morbillivirus. *Veterinary Microbiology*, v. 44, p. 267-270, 1995.

WU, J. Z.; LARSON, G.; HONG, Z. Dual-action mechanism of viramidine functioning as a prodrug and as a catabolic inhibitor for ribavirin. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, v. 48, n. 10, p. 4006-4008, out. 2004.

WU, J. Z.; LARSON, G.; WALKER, H.; SHIM, J. H.; HONG, Z. Phosphorylation of ribavirin and viramidine by adenosine kinase and cytosolic 5'-Nucleotidase II: implications for ribavirin metabolism in erythrocytes. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, v. 49, n. 6, p. 2164-2171, jun. 2005.

WU, J. Z.; WALKER, H.; LAU, J. Y. N.; HONG, Z. Activation and deactivation of a broad-spectrum antiviral drug by a single enzyme: adenosine deaminase catalyzes two consecutive deamination reactions. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, v. 47, n. 1, p. 426-431, jan. 2003.

WÜNCHEMANN, A.; ALLDINGER, S.; KREMMER, E.; BAUMGÄRTNER, W. Identification of CD4⁺ and CD8⁺ T cell subsets and B cells in the brain of dogs with spontaneous acute, subacute-, and chronic-demyelinating distemper encephalitis. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, v. 67, p. 101-116, 1999.

ZURBRIGGEN, A.; GRABER, H. U.; VANDEVELDE, M. Selective spread and reduced virus release leads to canine distemper virus persistence in the nervous system. *Veterinary Microbiology*, v. 44, p. 281-288, 1995a.

ZURBRIGGEN, A.; GRABER, H. U.; WAGNER, A.; VANDEVELDE, M. Canine distemper virus persistence in the nervous system is associated with noncytolytic selective virus spread. *Journal of Virology*, v. 69, n. 3, p. 1678-1686, mar. 1995b.

YANAGI, Y.; TAKEDA, M.; OHNO, S.; SEKI, F. Measles virus receptors and tropism. *Japanese journal of infectious diseases*, v. 59, p. 1-5, 2006.

Trabalho enviado e aceito na Revista Veterinária e Zootecnia:

Neuropatologia da Cinomose
Canine Distemper Neuropathology
Neuropatología del moquillo canino

Simone Henriques Mangia¹, Antonio Carlos Paes²

Endereço para correspondência:

Nome: Prof. Ass. Dr. Antonio Carlos Paes

Endereço: Distrito de Rubião Júnior, s/n – Botucatu – SP

CEP: 18600-000

Departamento de Higiene Veterinária e Saúde Pública

Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia

Universidade Estadual Paulista – Campus Botucatu

Telefone: (14) 3811-6270 ramal 31

Fax: (14) 3811-6075

E-mail: simangia@hotmail.com

paesacmi@unesp.br

Neuropatologia da Cinomose

Resumo

A cinomose é uma enfermidade infecto-contagiosa, que afeta naturalmente os cães, causada um *Paramyxovirus*, do gênero *Morbilivirus*, de apresentação clínica aguda, subaguda e crônica. De ocorrência mundial, sem sazonalidade, sem predileção de sexo ou raça, apresenta maior incidência em animais jovens, podendo acometer todas as idades. A transmissão ocorre principalmente por aerossóis e gotículas contaminados. Após o contato do vírus com o epitélio do hospedeiro ocorre replicação viral nos macrófagos e disseminação. Entre quatro e seis dias ocorre nova replicação causando aumento inicial na temperatura corporal e leucopenia. No período de 8 a 10 dias, ocorre disseminação viral nos epitélios e no sistema nervoso central. A encefalite aguda acomete animais jovens ou imunossuprimidos e é caracterizada por lesão viral direta. A encefalite multifocal em adultos acomete frequentemente animais entre quatro a seis anos, apresentando curso crônico. A encefalite do cão velho, comum em cães com mais de seis anos, caracteriza-se por panencefalite e é uma forma rara, resultante da persistência viral nos neurônios. As lesões desmielinizantes clássicas iniciam três semanas pós-infecção e durante período de intensa imunossupressão, sendo consequência da replicação viral no interior de oligodendrócitos. A desmielinização na fase crônica coincide com a recuperação do sistema imune, caracterizada pela redução ou perda das proteínas virais, com aumento da regulação do complexo de histocompatibilidade maior e infiltração de células inflamatórias. O curso clínico e o padrão neurológico da encefalomielite variam de acordo com a cepa viral e a idade que o animal foi infectado. O líquido pode indicar anormalidades na fase crônica com aumento de proteínas, principalmente por IgG antivírus e aumento do número de células, com predomínio de linfócitos. Em cortes histológicos é possível confirmar a infecção com a observação de lesões caracterizadas por áreas de necrose bem delimitadas, desmielinização e corpúsculos de inclusão. O isolamento viral em cultivo celular é específica, demorado e pode resultar em falso-negativo, exceto na fase aguda. A técnica da reação em cadeia pela polimerase, precedida de transcrição reversa vem sendo empregada com sucesso na detecção viral. O diagnóstico pode ser confirmado pela técnica de imunofluorescência direta em fluidos corporais, porém o aumento dos títulos de IgM e IgG no soro é ambíguo e pode indicar infecções passadas e presentes com ou sem vacinação. Cães infectados podem apresentar imunossupressão, permitindo

a infecção por agentes oportunistas, como o *Toxoplasma gondii*. Vacinas produzidas com as amostras virais adequadamente atenuadas são eficientes em proteger os animais contra a infecção natural.

PALAVRAS-CHAVE: Cinomose, *Morbilivirus*, neuropatologia, encefalite, desmielinização.

Canine Distemper Neuropathology

Abstract

Canine Distemper, is an infectious disease of acute, subacute, and chronic clinical appearance, caused by a *Morbilivirus*, family *Paramyxoviridae*. Of worldwide distribution, no seasonal occurrence, susceptibility between males and females, or racial preference has been described. Young dogs are generally more susceptible to infection, demonstrating a relationship between susceptibility and age. Canine Distemper virus is generally transmitted as an aerosol infection to the upper respiratory tract. After entering of the virus and invasion of epithelial tissues, viral replication into macrophages and spreading occur. Four to six days after initial infection, a new replication starts, causing a rise in body temperature and leucopenia. Eight to ten days after inoculation the virus invades various epithelial tissues and the central nervous system. Acute encephalitis, which occurs early in the course of infection in young or immunosuppressed animals, is characterized by direct viral injury. Multifocal encephalitis of chronic evolution often occurs in adult dogs between four to six years old. The old-dog encephalitis is a rare form of the disease characterized by panencephalitis that may be a persistent infection with a defective virus, usually present in animals older than six years. Characteristic demyelinating lesions are observed around three weeks post infection, during a period of massive virus-induced immunosuppression, as a consequence of viral replication inside oligodendrocytes. The chronic demyelination coincides with the recovery of the immune system, characterized by reduction or loss of viral proteins, followed by upregulation of the major histocompatibility complex and inflammatory cells infiltration. The clinical course and neurological pattern of the encephalomyelitis varies depending on the virulence of the virus strain, and host age. Abnormalities like increases in protein, because elevated IgG levels, and cell count, with a predominance of lymphocytes, are detectable in cerebrospinal fluid in dogs suffering the chronic stage of the disease. It is possible to confirm infection on histologic examination by the observation of well delimited necrotic areas, demyelination and inclusion bodies. Isolation technique of virulent canine distemper virus in cell cultures is very specific and false-negative results will occur if the animal is not entered the acute phase. The reverse transcription polymerase chain reaction has shown to be useful for viral detection. A final diagnosis is based on the demonstration of viral antigens in scrapings and body fluids by immunofluorescence

test. Augment in titles of IgM and IgG in serum is ambiguous because it just indicates previous and/or present infections, even in vaccinated animals. Immunosuppression induced by canine distemper virus probably collaborates with varieties of opportunistic agents, i.e. *Toxoplasma gondii*. Live attenuated vaccines have been used successfully for many years to control wild-type morbillivirus infection.

KEY WORDS: Canine Distemper, *Morbilivirus*, neuropathology, encephalitis, demyelinating.

Neuropatología del moquillo canino

Resumen

El moquillo canino es una enfermedad infecto-contagiosa, de curso clínico agudo, causada por un *Morbilivirus* de la familia *Paramyxoviridae*. Tiene presentación mundial, sin estacionalidad, sin predilección por sexo o raza, se presenta con mayor incidencia en animales jóvenes, pero puede atacar animales de cualquier edad. La transmisión ocurre principalmente por aerosoles y gotas contaminadas. Una vez que el virus entra en contacto con el epitelio del huésped, ocurre replicación dentro de los macrófagos y ulterior diseminación. Después de cuatro a seis días se presenta una nueva replicación que causa aumento inicial en la temperatura corporal y leucopenia. Dentro de un período de 8 a 10 días, ocurre diseminación viral en los epitelios y en el sistema nervioso central. La encefalitis aguda se manifiesta en animales jóvenes o inmunosuprimidos y se caracteriza por lesión viral directa. La encefalitis multifocal en los adultos ataca frecuentemente animales entre los cuatro y los seis años, y tiene un carácter crónico. La encefalitis del perro viejo, común en animales mayores de 6 años, se caracteriza por la presencia de panencefalitis, la cual es una forma rara que resulta de la persistencia viral en las neuronas. Las lesiones desmielinizantes clásicas comienzan tres semanas después de la infección durante periodos de inmunosupresión intensa, como consecuencia de la replicación viral dentro de los oligodendrocitos. La desmielinización en la fase crónica coincide con la recuperación del sistema inmune, caracterizada por la reducción o pérdida de las proteínas virales, con aumento de la regulación del complejo mayor de histocompatibilidad e infiltración de células inflamatorias. El curso clínico y el patrón neurológico de la encefalomielitis son variables dependiendo de la cepa viral y de la edad en la cual el animal fue infectado. El líquido cefalorraquídeo indica anormalidades en la fase crónica con aumento de proteínas, principalmente de IgG antiviral y aumento del número de células, con predominio de linfocitos. En los cortes histológicos es posible confirmar la infección con la observación de lesiones caracterizadas por áreas de necrosis bien delimitadas, desmielinización y cuerpos de inclusión. La técnica de aislamiento viral en cultivo celular es específica, lenta y puede resultar en falso-negativo si el animal no se encuentra en la fase aguda. La técnica de reacción en cadena de la polimerasa por transcripción reversa ha sido empleada con éxito en la detección viral. El diagnóstico puede ser realizado por medio de la técnica de inmunofluorescencia directa en fluidos

corporales. El aumento de los títulos de IgM e IgG en el suero es ambiguo y puede indicar infecciones anteriores y actuales con o sin vacuna. Los perros infectados pueden presentar inmunosupresión, lo que permite la infección por agentes oportunistas, como *Toxoplasma gondii*. Las vacunas producidas con muestras virales atenuadas adecuadamente, son eficientes para proteger a los animales contra la infección natural.

PALABRAS-CLAVE: Moquillo canino, *Morbilivirus*, neuropatología, encefalitis, desmielinización.

1. Introdução

1.1 Aspectos etio-epidemiológicos

A cinomose é uma doença infecto-contagiosa, causada por um RNA-vírus da família *Paramyxoviridae*, gênero *Morbilivirus*. Enfermidade que possui três formas de apresentação clínica: aguda, subaguda e crônica, com manifestações gastroentéricas, respiratórias e neurológicas. Foram descritas três formas de encefalite causada pelo vírus da cinomose: encefalite dos cães jovens, encefalite em cães adultos e encefalite do cão velho (CORRÊA & CORRÊA, 1992).

O vírus possui simetria helicoidal, pleomorfismo e muitos são aproximadamente esféricos medindo ao redor de 100-250 nm de diâmetro (GREENE, 2006). A sua estrutura é formada por um nucleocapsídeo contendo o genoma viral, que consiste na nucleoproteína (NP) e no complexo polimerase incluindo proteínas P e L. Exibe duas glicoproteínas no envelope viral: a maior, hemaglutinina (HA), possui atividade de hemoaglutinação, fixação do vírus na célula hospedeira e é responsável pelo tropismo celular; a proteína de fusão (F) proporciona a ligação entre a membrana celular e o envelope viral e a formação sincicial (STERN et al., 1995; VANDEVELDE & ZURBRIGGEN, 2005).

Enfermidade de ocorrência mundial afeta animais das famílias Canidae, Mustelidae, Procyonidae, Viverridae, Felidae, Ursidae e mamíferos aquáticos. Porém, é o mais importante agente infeccioso que acomete a população canina (CORRÊA & CORRÊA, 1992; TIPOLD et al., 1992; SUMMERS et al., 1995; HEADLEY & GRAÇA, 2000; GEBARA et al., 2004).

O vírus da cinomose é pantrópico, apresenta diversas cepas, sendo algumas mais neurotrópicas e mais virulentas. Esta enfermidade pode ocorrer em qualquer época do

ano, mas acomete os cães principalmente no inverno, sem predileção de sexo ou raça (CORRÊA & CORRÊA, 1992).

A taxa de infecção é maior do que o número dos animais que manifestam a enfermidade, estimando-se em até 75% de cães suscetíveis que eliminam o vírus, sem qualquer sinal clínico da doença (CORRÊA & CORRÊA, 1992; GEBARA et al., 2004).

A transmissão ocorre principalmente por aerossóis e gotículas contaminadas, de secreções respiratórias, fezes e urina (CORRÊA & CORRÊA, 1992).

2. Desenvolvimento

2.1 Patologia

A quebra e a ativação das glicoproteínas, em alguns *Paramyxovirus* e *Ortomyxovirus*, dependem de proteases tissulares específicas, que determinam o tropismo, restringindo a fusão para tecidos selecionados. O processo de fusão inicia com o contato do receptor celular com a proteína HA, que muda sua conformação, transmitindo lateralmente um sinal para a proteína F, que sofre quebra e ativação (Von MESSLING et al., 2001; Von MESSLING et al., 2004).

Durante a exposição natural, o vírus da cinomose se propaga por gotas de aerossóis e entra em contato com o epitélio do trato respiratório superior. Em 24 horas, as partículas virais se replicam nos macrófagos e se disseminam pela via linfática local, para tonsilas e linfonodos brônquicos (VANDEVELDE & ZURBRIGGEN, 1995; VANDEVELDE & ZURBRIGGEN, 2005; GREENE, 2006).

Após dois a quatro dias pós-infecção, o número de partículas virais nas tonsilas, linfonodos retrofaríngeos e bronquiais aumenta, porém uma quantidade pequena de células mononucleares infectadas é encontrada em outros órgãos linfóides. No período

de quatro a seis dias ocorre a replicação viral no sistema linfóide, medula óssea, timo, baço, linfonodos mesentéricos, placas de Payer, células estomacais, células de Küpffer e células mononucleares ao redor dos vasos pulmonares e bronquiais. A ampla proliferação viral nos órgãos linfóides induz um aumento inicial na temperatura corporal, entre o segundo e o sexto dia, ocorrendo leucopenia, causada por danos virais nas células linfóides (CORRÊA & CORRÊA, 1992; TIPOLD et al., 1992; GREENE, 2006).

Ocorre disseminação do vírus no epitélio e nos tecidos do sistema nervoso central (SNC) no período de 8 a 10 dias pós-infecção, por via hematogena ou pelo líquido, após viremia (JONES et al., 2000; VANDEVELDE & ZURBRIGGEN, 2005; GREENE, 2006).

No cão com níveis intermediários de resposta imune mediada por células e com títulos de anticorpos que aparecem tardiamente, após 9 a 14 dias, o vírus se dissemina pelos tecidos. Os sinais clínicos podem desaparecer com o aumento da titulação de anticorpos e o vírus é eliminado da maioria dos tecidos assim que este título aumentar, podendo persistir por longos períodos em tecidos uveais, neurônios e tegumentos, como nos coxins plantares. A recuperação da infecção está associada com a imunidade a longo prazo e interrupção da replicação viral. A proteção pode ser comprometida se o cão for exposto a uma cepa altamente virulenta, a dose infectante elevada ou sofrer imunossupressão (CORRÊA & CORRÊA, 1992; GREENE, 2006).

2.2 Patologia do Sistema Nervoso Central

Alguns estudos sugerem que a infecção do sistema nervoso central (SNC) ocorre precocemente, na fase sistêmica da doença. Neste caso, a cinomose progride da forma sistêmica para a neurológica, aparentemente por falha do sistema imune.

Além da resposta imune sistêmica do hospedeiro, a presença de anticorpos antivirais e deposição de imunocomplexos podem facilitar a sua difusão no endotélio vascular do SNC. O vírus livre ou associado às plaquetas ou linfócitos penetra nas células endoteliais vasculares das meninges, nas células do plexo coróide do quarto ventrículo e nas células ependimárias lineares do sistema ventricular (GREENE, 2006). A freqüente ocorrência de lesões periventriculares e subpiais, e o fato do vírus ser encontrado facilmente nas células do plexo coróide e do epêndima, sugerem que penetre nos tecidos cerebrais através do líquido, onde o agente pode ser encontrado em células mononucleares fundidas com células ependimárias (VANDEVELDE & ZURBRIGGEN, 1995).

A infecção do epitélio do plexo coróide é produtiva através de todo o curso de infecção com o vírus continuamente sendo produzido. A propagação do vírus através das vias do SNC explica a distribuição de lesões em córtex cerebral, trato óptico e nervos, véu medular rostral, pedúnculos cerebelares e medula espinhal (GREENE, 2006).

Apesar da ausência de manguitos perivasculares, numerosas células CD8⁺ são encontradas nas lesões agudas desmielinizantes e também distribuídas difusamente no parênquima cerebral, correlacionado de forma desigual com áreas de infecção viral. No líquido destes animais altos títulos de interleucina 8 (IL-8) foram encontrados, sugerindo que a ativação inicial das células da micróglia serve como uma alavanca para a invasão de células T no SNC (VANDEVELDE & ZURBRIGGEN, 2005).

A IL-1 é importante na patogênese de todos os tipos de lesões causadas pelo vírus da cinomose e é responsável por estimular a proliferação de astrócitos, que pode significar o início das lesões, como as encontradas na cinomose não inflamatória subaguda, que evidenciam frequentemente astrogliose reativa. Encontrada

principalmente nos espaços perivasculares da inflamação subaguda e nas lesões crônicas, a IL-1 age de forma importante na propagação da doença (GRÖNE et al., 2000).

A encefalite aguda, que ocorre inicialmente no curso da infecção em animais jovens ou imunossuprimidos, é caracterizada por lesão viral direta (SUMMERS et al., 1995; GEBARA et al., 2004; GREENE, 2006). O vírus causa lesão multifocal nas substâncias cinzenta e branca. As lesões na substância cinzenta são resultados de infecção neuronal e necrose, e podem levar a uma poliencefalomalácia. Lesões na substância branca são caracterizadas por danos mielínicos e estão associadas com replicação viral nas células da glia. Mudanças inflamatórias são mínimas devido à imunodeficiência resultante de imaturidade fisiológica do sistema imune e/ou decorrente da imunossupressão viral induzida (VANDEVELDE & ZURBRIGGEN, 1995; GEBARA et al., 2004; GREENE, 2006).

No aspecto microscópico é possível observar inclusões intranucleares no interior de astrócitos multinucleados e de certas micróglias. No entanto, raramente podem ser detectados nos neurônios corpúsculos de inclusão citoplasmáticos ou nucleares (SUMMERS et al., 1995; JONES et al., 2000).

Durante a fase inicial da encefalite a expressão do RNA mensageiro (mRNA) e da proteína viral é alta nas áreas afetadas e uma possível consequência é o aumento da produção do Fator de Necrose Tumoral (TNF) pelas células, como astrócitos. A sua importância na progressão das lesões cerebrais é também sustentada pela abundância do vírus na forma imunorreativa presente nas lesões não inflamatórias, que se caracterizam pela desmielinização. O TNF tem sido evidenciado como causa da destruição de oligodendrócitos e perda de mielina (GRÖNE et al., 2000).

A encefalite multifocal em cães adultos acomete freqüentemente animais entre os quatro e seis anos, com curso crônico. Esta enfermidade não é precedida nem coincidente com os sinais sistêmicos (CORRÊA & CORRÊA, 1992). O antígeno do vírus fica restrito a poucos astrócitos e a expressão do Complexo de Histocompatibilidade Maior (MHC) é proeminente em todas as células da micróglia, sendo responsável pela desmielinização contínua e disseminada infiltração mononuclear perivascular. As alterações tem início com hiperplasia dos astrócitos e proliferação microglial em estruturas subpiais e subependimárias na substância branca. Esta forma também está associada com a alta concentração de anticorpos antimielínicos, podendo ser uma reação secundária ao processo inflamatório. Anticorpos contra o vírus interagem com macrófagos infectados em lesões no SNC, causando sua ativação com liberação de radicais livres de oxigênio. Esta atividade por sua vez pode levar à destruição de oligodendrócitos e bainha de mielina (TIPOLD et al., 1992; SUMMERS et al., 1995; GEBARA et al., 2004; GREENE, 2006). Corpúsculos de inclusão viral intranucleares e intracitoplasmáticos estão presentes em astrócitos e células da superfície ependimal (SUMMERS et al., 1995; GEBARA et al., 2004).

Na retina ocorre congestão e edema. Também pode estar presente uma inflamação do nervo óptico acompanhada de alterações microscópicas como a formação de manguitos perivasculares com linfócitos, degeneração de células ganglionares, desmielinização e gliose. As inclusões intranucleares podem ser encontradas na glia da retina e do nervo óptico (JONES, et al., 2000).

Os estudos de Bürge et al. (1989) demonstraram que os anticorpos antivirais estimulam a produção de radicais livres de oxigênio (ROS) em culturas cerebrais de cães infectadas com o vírus da cinomose. Os ROS fazem degradação de fosfolipídios na

parte cortical do cérebro, destruindo proteínas da bainha de mielina e interferindo na produção da mielina.

Nesta fase da doença, nos infiltrados perivasculares encontram-se CD8+, CD4+ e linfócitos B, e citocinas pro-inflamatórias, IL-1, IL-6 e IL-12, indicando uma resposta imune-mediada (WÜNSCHMANN et al., 1999; MARKUS et al., 2002).

A produção de TNF e também de IL-1 e IL-6 pelas células locais é importante na indução de moléculas de adesão endotelial como pré-requisito para a migração de células inflamatórias para o SNC e a progressão das lesões no estágio crônico, caracterizadas por inflamação severa. Além disso, a produção de TNF por células inflamatórias não é responsável apenas pelo processo de desmielinização pela destruição direta de oligodendrócitos, mas pode levar a mobilização de mais leucócitos (GRÖNE et al., 2000).

Os estudos realizados por Vandeveld & Zurbriggen (1995) mostraram que o vírus persiste em áreas na substância branca que não apresentam lesões inflamatórias desmielinizantes, ou perifericamente a estas. Isto acontece no desenvolvimento progressivo da doença crônica se a resposta imune for mais lenta do que a replicação viral. A persistência viral é a chave para a patogênese das lesões crônicas (ZURBRIGGEN et al., 1995a; ZURBRIGGEN et al., 1995b; VANDEVELDE & ZURBRIGGEN, 2005).

É possível que o vírus reduza sua expressão nestas áreas do SNC, em analogia a panencefalite subaguda esclerosante em humanos. A persistência está associada com a diminuição da regulação dos genes que codificam proteínas de membrana e superfície. Estas células persistentemente infectadas podem continuar a sobreviver, pois a infecção é restrita e a difusão viral não provoca lise celular.

Sugere-se que a infecção de astrócitos pelo vírus da cinomose não inicie uma reação inflamatória, por uma ação viral em limitar o seu desenvolvimento com a diminuição da destruição celular, impedindo a exposição de proteínas virais e debris celulares no meio extracelular. A persistência do vírus é favorecida pela estratégia do mesmo, que se dissemina sem ser detectado pelo sistema imune (ZURBRIGGEN et al., 1995a; ZURBRIGGEN et al., 1995b; VANDEVELDE & ZURBRIGGEN, 2005).

A encefalite do cão velho é comumente observada em cães com mais de seis anos, porém já foi encontrada em animais mais novos. Caracteriza-se por ser principalmente uma panencefalite e é uma forma rara, crônica, de caráter inflamatório progressivo na camada cinzenta dos hemisférios cerebrais e do tronco encefálico, resultante da persistência viral nos neurônios após infecção aguda pelo vírus da cinomose. Esta enfermidade acomete animais que são imunocompetentes e que apresentam a persistência viral no SNC, com lesões caracterizadas por infiltração perivascular disseminada com linfócitos (células T) e plasmócitos, proliferação difusa da micróglia, astrogliose, degeneração neuronal, neuronofagia e a resposta imune é caracterizada por um aumento da expressão do MHC. Estas lesões estão em todo córtex cerebral e também no núcleo basal, tálamo e hipotálamo (SUMMERS et al., 1995; GREENE, 2006). Geralmente o cerebelo não é acometido nesta forma (CORRÊA & CORRÊA, 1992). Podem ser encontrados corpúsculos de inclusão intranucleares nas células gliais e nos neurônios (JONES, et al., 2000).

2.3 Desmielinização

O início das lesões desmielinizantes ocorre aproximadamente três semanas pós-infecção e durante o período de intensa imunossupressão e ausência de inflamação. Coincide com a replicação viral nas células da glia, com predileção por algumas regiões

como cerebelo, sistema óptico e medula espinhal (TIPOLD et al., 1992; SUMMERS et al., 1995; VANDEVELDE, 2004; VANDEVELDE & ZURBRIGGEN, 2005).

O sistema matrix metaloproteases (MMP) está envolvido na patogênese da desmielinização, por abrir a barreira hemato-encefálica pela quebra de componentes da membrana basal, favorecendo a migração de células inflamatórias para o interior do SNC, desencadeando a liberação de TNF- α , que desintegra a bainha de mielina (MIAO et al., 2003; VANDEVELDE, 2004).

No estudo realizado por Khuth et al. (2001) foi possível observar o aumento da expressão de MMP e seus inibidores tissulares (TIMP) em locais específicos, principalmente na região rostral do cérebro, córtex, hipocampo e hipotálamo. Concomitantemente há um aumento da regulação ou indução de citocinas pro-inflamatórias, havendo uma relação entre a replicação viral no SNC, a produção citocinas inflamatórias e esse aumento da quantidade de MMP e TIMP. Sugere-se que a indução de citocinas inflamatórias é causada pela replicação viral, sendo estas responsáveis em parte pela regulação de MMP e TIMP.

- Desmielinização aguda - lesão induzida pelo vírus

O exato mecanismo do início das lesões da mielina no estágio agudo imunossupressor da cinomose ainda é incerto (STEIN et al., 2004; VANDEVELDE, 2004; VANDEVELDE & ZURBRIGGEN, 2005). Segundo Gröne et al. (2000), as áreas com desmielinização aguda e sem inflamação são consideradas uma consequência da replicação viral no interior de oligodentrócitos levando a destruição celular e a perda de habilidade para manter a bainha de mielina (MIAO et al., 2003; VANDEVELDE & ZURBRIGGEN, 2005).

A explicação segundo Vandeveld & Zurbruggen (1995) para o fenômeno de desmielinização é similar, porém o estudo em microscopia óptica mostra que a maioria

das células infectadas são astrócitos. A microscopia eletrônica revela que a infecção de oligodentrócitos é rara na cinomose, e concluem em seus estudos que o vírus causa uma infecção restrita nos oligodentrócitos, que mesmo assim pode ser responsável pelo fenômeno de desmielinização.

Em estudo ultraestrutural foi constatado microvacuolização e perda de organelas por degeneração de oligodentrócitos. As mudanças morfológicas são precedidas por disfunções metabólicas nestas células, com a diminuição drástica da atividade da cerebrosídeo sulfo-transferase (enzima específica de oligodentrócitos) após infecção viral. É possível que a transcrição do vírus interfira nas funções especializadas destas células, que são necessárias para manutenção das membranas mielínicas (VANDEVELDE, 2004; VANDEVELDE & ZURBRIGGEN, 2005).

Nos achados de Stein et al. (2004), o vírus induziu a ativação das células da micróglia, que podem ter um importante impacto na patogênese de desmielinização aguda da cinomose, devido a um difuso aumento da regulação do MHC na camada branca. A ativação de tais células libera fatores tóxicos que podem induzir a destruição da mielina (MIAO et al., 2003; VANDEVELDE & ZURBRIGGEN, 2005).

- Desmielinização crônica - complicações imunológicas

Coincidente com a recuperação do sistema imune seis a sete semanas pós-infecção, manguitos perivasculares com linfócitos, células plasmáticas e monócitos ocorrem inicialmente nas lesões induzidas pelo vírus no cérebro. A reação inflamatória nas lesões desmielinizantes pode levar a progressão da destruição do tecido e é possível que astrócitos, o primeiro alvo do vírus, participem da amplificação desta resposta imune (VANDEVELDE & ZURBRIGGEN, 2005).

Lesões crônicas desmielinizantes são caracterizadas pela redução ou possível perda das proteínas virais, com aumento da regulação do MCH e infiltração massiva de CD8+, CD4+ e células B (MIAO et al., 2003; VANDEVELDE, 2004).

A inflamação está associada com a síntese de anticorpos citotóxicos-dependentes, que podem induzir a desmielinização por ação dos anticorpos anti-mielina. Vandeveld & Zurbriggen (1995) concluíram que as reações auto-imunes na cinomose são provavelmente um epifenômeno e que não são primárias no processo crônico de desmielinização (TIPOLD et al., 1992; VANDEVELDE, 2004).

O experimento realizado por Krakowka et al. (1973) descreve a presença de anticorpos anti-mielina no soro de cães infectados apresentando encefalomielite desmielinizante. A demonstração de imunoglobulinas nas lesões desmielinizantes no SNC de cães infectados é uma tentativa de provar que estas possuem um papel ativo na progressão da doença. Os autores concluíram que estes anticorpos são fatores que contribuem na patogênese da desmielinização e funcionam amplificando as lesões básicas não inflamatórias induzidas pelo vírus no cérebro.

Anticorpos anti-mielina são produzidos no local das lesões cerebrais inflamatórias e podem ser encontrados no líquido de cães infectados. Resposta mediada por células contra a proteína básica da mielina foi encontrada em cães experimentalmente infectados. Entretanto, nem anticorpos anti-mielina ou reações mediadas por células estão relacionados com o curso da doença (VANDEVELDE & ZURBRIGGEN, 2005).

No entanto, Summers et al. (1995), descreve que fragmentos de mielina são fagocitados, principalmente por células da micróglia, menos por astrócitos e raramente por oligodendrócitos, induzindo a retirada pelos macrófagos.

Macrófagos, que estão em grande número nas lesões de cinomose, possuem um papel importante. A interação dos anticorpos antivirais e dos macrófagos resulta na produção de radicais livres de oxigênio que podem ser responsáveis pela destruição de oligodentrócitos e compartimentos de mielina. Quimicamente a produção de radicais livres de oxigênio no sistema xantina/xantina-oxidase, seletivamente destrói culturas de oligodentrócitos, que são ricos em compostos ferrosos (VANDEVELDE, 2004; VANDEVELDE & ZURBRIGGEN, 2005).

Existem algumas evidências experimentais que o vírus induz alterações nas funções de macrófagos. A produção de IL-1 por macrófagos *in vitro* pode diminuir e de prostaglandina E aumentar como resultado da infecção viral. A fagocitose, dependente ou independente de receptores Fc, assim como a habilidade de liberar radicais livres de oxigênio e a atividade procoagulante dos macrófagos também é alterada após a infecção. Considerando a relação entre o sistema de coagulação e funções inflamatórias, essas observações mostram que a infecção pelo vírus da cinomose pode desencadear uma atividade destrutiva dos macrófagos e é possível sugerir a hipótese que a desmielinização “espectadora” ocorra na cinomose crônica (VANDEVELDE & ZURBRIGGEN, 1995).

2.4 Sinais clínicos da doença neurológica

O vírus da cinomose causa doença multissistêmica freqüentemente com sinais neurológicos. Estes sinais podem apresentar-se tardiamente, semanas, meses ou anos após a recuperação de infecções inaparentes, ou após a recuperação da fase sistêmica da cinomose aguda (TIPOLD et al., 1992; GREENE, 2006).

Os sinais neurológicos são múltiplos e refletem a distribuição do vírus e as lesões no SNC. Experimentalmente, o curso clínico e o padrão neurológico da

encefalomielite podem mostrar-se variáveis com a cepa viral e com a idade que o animal foi infectado.

Hiperestesia, rigidez cervical e para-espinhal podem ser encontrados em cães como resultado de inflamação das meninges, entretanto, sinais de lesões no parênquima são predominantes em relação aos sinais meningeais (GREENE, 2006). Quando há acometimento da medula espinhal sinais, como paresia e incordenação de membros são os únicos achados neurológicos.

A doença vestibular pode levar a presença de sinais como movimento de cabeça, nistagmo, déficits em outros nervos cranianos e da propriocepção, e a doença cerebelar se manifesta por ataxia, hipermetria e balançar de cabeça. Cegueira uni ou bilateral, às vezes com midríase, ocorrem devido o freqüente envolvimento do trato e nervo óptico. Atrofia muscular generalizada é rara como apresentação clínica de lesão focal no córtex (CORRÊA & CORRÊA, 1992; TIPOLD et al., 1992; GREENE, 2006).

Podem ocorrer convulsões parciais ou generalizadas. Porém, a convulsão do tipo “goma de mascar” frequentemente ocorre em cães que desenvolvem poliencefalomalácea nos lobos temporais (GREENE, 2006).

As mioclonias são os sinais mais comuns da cinomose e podem estar presentes na ausência de outros sinais neurológicos. Acometem um único músculo ou um grupo de músculos, como auriculares, temporais, reto abdominal e flexores dos membros (CORRÊA & CORRÊA, 1992; SUMMERS et al., 1995; GREENE, 2006). O mecanismo neural para as mioclonias origina-se com irritação local pela presença do vírus em neurônios motores inferiores da medula espinhal ou do núcleo do nervo craniano (TIPOLD et al., 1992; GREENE, 2006).

Na encefalite do cão velho, o sinal neurológico mais comum é a diminuição visual. A enfermidade é progressiva e acompanhada pelo desenvolvimento de depressão

mental, andar compulsivo em círculos, mioclonias, hipercinesia e pressão de cabeça contra paredes ou objetos. Sinais de envolvimento do tronco cerebral são raros (CORRÊA & CORRÊA, 1992; SUMMERS et al., 1995; VITE, 2005).

2.5 Patologia clínica

- Exame do líquido

Segundo Gama et al. (2005), as características físico-químicas do líquido tais como, coloração, aspecto, densidade, pH e níveis de glicose, não são capazes de contribuir para indicar qualquer anormalidade, nas diferentes fases da cinomose. Por outro lado, o componente protéico e a celularidade mostraram alterações importantes na presença de sinais neurológicos. Durante o estágio de desmielinização aguda, não ocorrem reações inflamatórias e as proteínas e as células do líquido podem estar normais (TIPOLD et al., 1992; GREENE, 2006).

No estágio crônico, com a inflamação pode ocorrer aumento de proteína (acima de 25 mg/dl), principalmente representado por IgG antivírus e aumento do número de células (mais que 10/ μ l) com predomínio de linfócitos (CORRÊA & CORRÊA, 1992; TIPOLD et al., 1992; SUMMERS et al., 1995; GREENE, 2006).

O aumento dos anticorpos anti-vírus no líquido oferece uma evidência definitiva da encefalite pela cinomose, porque estes anticorpos são produzidos no local, e este aumento não é encontrado em animais vacinados ou na cinomose sistêmica sem alterações neurológicas (GREENE, 2006).

2.6 Prognóstico

O prognóstico é reservado na fase sistêmica da enfermidade, pois pode progredir para a fase neurológica. Torna-se desfavorável nesta fase, pois a mesma comumente é progressiva, raramente estacionando, ou levando à morte de forma aguda ou crônica. Caso isso não ocorra, o animal pode ficar com seqüelas que sejam incapacitantes ou incompatíveis com a vida (CORRÊA & CORRÊA, 1992).

2.7 Diagnóstico

No sistema nervoso central o vírus causa lesões caracterizadas por áreas de necrose bem delimitadas, desmielinização e inclusões intranucleares principalmente em astrócitos. A observação dessas lesões em cortes histológicos confirma o diagnóstico da infecção pelo vírus (SUMMERS et al., 1995; JONES et al., 2000; GEBARA et al., 2004; GREENE, 2006).

A técnica de isolamento viral em cultivo celular é específica, porém demorada e difícil, podendo resultar em falso-negativo se o animal não estiver na fase aguda da doença. A formação de células gigantes é a característica citopática efetiva do vírus da cinomose em várias culturas de tecido e pode ser detectada dois a cinco dias após a infecção.

Atualmente, a técnica da reação em cadeia pela polimerase precedida de transcrição reversa (RT-PCR) vem sendo empregada com sucesso na detecção do vírus em diferentes tipos de amostras biológicas provenientes de cães com sinais clínicos sistêmicos e neurológicos. Segundo Gebara et al. (2004), é possível detectar o ácido nucléico do vírus em urina de cães tanto com encefalite aguda quanto crônica, evidenciando a virúria. Estes resultados demonstram que a técnica de RT-PCR é um

método eficiente para realização do diagnóstico rápido, precoce e *in vivo* (GEBARA et al., 2004; SATIO et al., 2005).

O diagnóstico final, na fase aguda, é baseado na demonstração de antígenos virais em esfregaços sangüíneos e fluído corporais como raspado de conjuntiva, lavado traqueal, sedimento urinário, células do líquido e medula óssea. O antígeno viral pode ser difícil de achar em outros tecidos em casos de cinomose neurológica sem sinais sistêmicos. O mesmo pode ser detectado nas células do líquido com o teste de anticorpos fluorescentes indiretos usando anticorpos anti-vírus (TIPOLD et al., 1992; GREENE, 2006). Na pele, tecido uveal, coxins plantares e sistema nervoso central o vírus pode ser encontrado através de fluorescência direta em um período de 60 dias após a infecção (GREENE, 2006).

O aumento de títulos de anticorpos neutralizantes no soro pode ser mensurado em cães que sobreviveram à fase aguda de infecção, no entanto, a presença de IgM é específica para infecções recentes ou após vacinação. O aumento dos títulos de IgM e de IgG no soro é ambíguo e podem ambos indicar infecções passadas e presentes com ou sem vacinação para cinomose. A análise dos níveis de IgG específica no líquido pode ser usada para mensurar anticorpos na fase crônica da infecção do SNC (GREENE, 2006).

2.8 Co-infecção com Toxoplasmose

Cães enfermos podem apresentar imunossupressão, permitindo a infecção por agentes oportunistas, como o *Toxoplasma gondii*. No Brasil, a cinomose é considerada enzoótica em algumas regiões e pode estar associada com co-infecção por toxoplasmose (MORETTI et al., 2006).

A toxoplasmose é considerada uma enfermidade oportunista, caracterizada por sinais neuromusculares, respiratórios e gastroentéricos, ou por infecções generalizadas associada com sintomatologia neurológica (CORRÊA & CORRÊA, 1992; MORETTI et al., 2006).

A sorologia de toxoplasmose é rotineiramente requisitada em animais com sintomatologia neurológica e a obtenção de título igual a 1024 sugere que *Toxoplasma gondii* é um importante agente no processo da doença neurológica (MORETTI et al., 2006).

Segundo Brito et al. (2002), não é possível ter certeza que todos os casos de doença neurológica sejam toxoplasmose clínica, quando há sintomatologia neurológica a suspeita é direcionada para outras infecções, como a cinomose, podendo, desta forma, a toxoplasmose se tornar um risco para saúde pública.

A infecção por *Neospora caninum* é descrita em animais com toxoplasmose. Tipold et al. (1992) relatam a infecção combinada de cinomose com *Toxoplasma gondii* e *Neospora caninum* (MORETTI et al., 2006).

2.9 Tratamento e prevenção

A falta de um tratamento antiviral para a infecção do vírus da cinomose requer um tratamento suporte e sintomático (TIPOLD et al., 1992; CORRÊA & CORRÊA, 1992).

Na encefalite multifocal progressiva causadora de tetraplegia, semicoma e incapacitação a eutanásia é recomendada. Nos casos de animais com convulsão os anticonvulsionantes podem ser utilizados, como o fenobarbital na dose de 2 mg/Kg pelas vias intravenosa, intramuscular e oral, a cada 12 horas. Corticosteróides, como a

dexametasona na dose de 2,2 mg/Kg, por via intravenosa, podem ser utilizados por causa da imunopatologia das lesões neuronais e para reduzir o edema cerebral, mantendo a terapia com doses antiinflamatórias e posteriormente reduzindo a dose até o final do tratamento. A imunossupressão causada pelos esteróides é a principal desvantagem, porque a resposta inflamatória é responsável pela retirada do vírus do organismo. A terapia com glicocorticóides com dosagens antiinflamatórias pode ter algum sucesso no controle na dilatação pupilar causada pela neurite óptica ou de alguns sinais associados à inflamação crônica da encefalite. A prednisolona é comumente escolhida entre os glicocorticóides na dose de 2 – 4 mg/Kg, a cada 24 horas, por via oral. A mioclonia é normalmente intratável e irreversível (TIPOLD, 1992; GREENE, 2006).

Como os macrófagos e seus produtos são importantes na indução da destruição do tecido nervoso, antioxidantes como vitamina E e vitamina C podem ser utilizados terapeuticamente (TIPOLD, 1992).

Segundo Vandeveld (2004), o desenvolvimento de estratégias terapêuticas deve estar relacionado com a modulação imunológica. Terapias antivirais específicas contra *Morbilivirus* não foram avaliadas ainda. Por isso a mais importante intervenção veterinária é a prevenção.

Vacinas produzidas com as amostras do vírus da cinomose isoladas de cães naturalmente infectados, adequadamente atenuadas em culturas de células, são eficientes em induzir o estado de imunidade dos animais protegendo-os contra a infecção natural.

O cão deve ser vacinado quando se tornar soronegativo dos anticorpos maternos, assegurando-se a máxima resposta sorológica pós-vacinal. Recomendam-se várias aplicações de vacinas, administradas a intervalos de três a quatro semanas, devido as

dificuldades de mensurar os títulos de anticorpos do filhote de forma rotineira. Após a administração da primeira dose de vacina, os cães já apresentam títulos de anticorpos em níveis protetores e, após a revacinação anual, os títulos perduram por mais de 12 meses (BIAZZONO et al., 2001).

3 Considerações finais

Embora, a cinomose seja uma enfermidade muito estudada, não existem pesquisas sobre tratamento antiviral específico. Atualmente, o tratamento é basicamente de suporte e sintomático, dependendo diretamente da imunidade do animal. A utilização de soro hiperimune está restrita à fase virêmica da doença, onde ainda existem vírus livres e é uma conduta bastante discutível.

Muitos estudos priorizam a prevenção da doença, considerando que as vacinas podem reduzir bastante a incidência da mesma. Recentemente, a pesquisa de vacinas com sequência de DNA está sendo desenvolvida com objetivo de minimizar os problemas pós-vacinais, como a encefalite causada pelo vírus vacinal pouco atenuado.

O uso das vacinas está diretamente relacionada com a conscientização e condição econômica da população. A produção de novas vacinas mais seguras e eficientes, as tornam cada vez menos acessíveis à população de baixa renda, sendo observado um aumento da incidência da enfermidade nos animais por ela mantidos.

Os objetivos dos estudos sobre cinomose realizados no Brasil deveriam priorizar o estabelecimento de protocolos terapêuticos, para evitar a alta taxa de mortalidade; ao mesmo tempo cuidar da conscientização da população e na busca de vacinas ainda mais efetivas.

4. Bibliografia

BIAZZONO, L.; HAGIWARA, M. K.; CORRÊA, A. R. Avaliação da resposta imune humoral em cães jovens imunizados contra a cinomose com vacina de vírus atenuado. *Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science*, v. 38, n. 5, p. 245-250, 2001.

BRITO, A. F. et al. Epidemiological and serological aspects in canine toxoplasmosis in animals with nervous symptoms. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, v. 97, n. 1, p. 31-5, jan. 2002.

BÜRGE, T. et al. Antiviral Antibodies Stimulate Production of Reactive Oxygen Species in Cultured Canine Brain Cells Infected with Canine Distemper Virus. *Journal of Virology*, v. 63, n. 6, p 2790-2797, jun. 1989.

CORRÊA, C. N. M. Cinomose. In: CORRÊA, W. M.; CORRÊA, C. N. M. (Eds). *Enfermidades Infecciosas dos Mamíferos Domésticos*. Rio de Janeiro: Medsi, 1992. p. 655-670.

GAMA, F. G. V. et al. Caracteres físico-químicos e citológicos do líquido de cães em diferentes fases da cinomose. *Ciência Rural*, v.35, n. 3, p. 596-601, mai./jun. 2005.

GEBARA, C. M. S., et al. Lesões histológicas no sistema nervoso central de cães com encefalite e diagnóstico molecular da infecção pelo vírus da cinomose canina. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*, v. 56, n. 2, p 168-174, abr. 2004.

GREENE, C. E.; APPEL, M. J. Canine Distemper In: GREENE, C. E. (Eds). *Infectious Diseases of the Dog and Cat*. Philadelphia: Elsevier, 2006. p 25-41.

GRÖNE, A.; ALLDINGER, S.; BAUMGÄRTNER, W. Interleukin-1 α , -6, -12 and tumor necrosis factor- α expression in brains of dogs with canine distemper virus infection. *Journal of Neuroimmunology*, v. 110, p 20-30, 2000.

- HEADLEY, S. A., GRAÇA, D. L. Canine distemper: epidemiological findings of 250 cases. *Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science*, v. 37, p. 136-140, 2000.
- JONES, T. C., HUNT, R. D., KING, N. W. *Patologia Veterinária*. São Paulo: Manole, 2000. p. 1415.
- KHUTH, S. T., et al. Morbillivirus Infection of the Mouse Central Nervous System Induces Region-Specific Upregulation of MMPs and TIMPs Correlated to Inflammatory Cytokine Expression. *Journal of Virology*, v. 75, n. 17, p. 8268-8282, set. 2001.
- KRAKOWKA, S. et al. Myelin-Specific Autoantibodies Associated with Central Nervous System Demyelination in Canine Distemper Virus Infection. *Infection and Immunity*, v. 8, n. 5, p 819-827, nov. 1973.
- MARKUS, S., FAILING, K., BAUMGÄRTNER, W. Increased expression of pro-inflammatory cytokines and lack of up-regulation of anti-inflammatory cytokines in early distemper CNS lesions. *Journal of Neuroimmunology*, v. 125, p 30-41, 2002.
- MIAO, Q. et al. Phase-dependent expression of matrix metalloproteinases and their inhibitors in demyelinating canine distemper encephalitis. *Acta Neuropathologica*, v. 106, p 486-494, ago. 2003.
- MORETTI, L. D. et al. *Toxoplasma gondii* genotyping in a dog co-infected with distemper virus and ehrlichiosis Rickettsia. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo*, v. 48, n. 6, p. 359-363, nov/dez. 2006.
- MORO, L.; VASCONCELOS, A. C. Patogenia da imunossupressão na cinomose canina. *A Hora Veterinária*, v. 17, n. 102, p. 53-7, mar/abr. 1998.

SATIO, T. B. et al. Detection of canine distemper virus by reverse transcriptase-polymerase chain reaction in the urine of dogs with clinical signs of distemper encephalitis. Disponível em: www.sciencedirect.com – mar. 2005.

STEIN, V. M. et al. A. Microglial cell activation in demyelinating canine distemper lesions. *Journal of Neuroimmunology*, v. 153, p. 122-131, mai. 2004.

STERN, L. B. L. et al. The Hemagglutinin Envelope Protein of Canine Distemper Virus (CDV) Confers Cell Tropism as Illustrated by CDV and Measles Virus Complementation Analysis. *Journal of Virology*, v. 69, n. 3, p 1661-1668, mar. 1995.

SUMMERS, B. A., CUMMINGS, J. F., LAHUNTA, A. *Veterinary Neuropathology*. Mosby, 1995, p. 102-110.

TIPOLD, A., VANDEVELDE, M., JAGGY, A. Neurological manifestations of canine distemper virus infection. *Journal of Small Animal Practice*, v. 33, n. 10, p. 466-470, 1992.

VANDEVELDE, M. The Pathogenesis of Nervous Distemper. Disponível em: www.vin.com/proceedings/proceedings.plx?CID=WSAVA&PID out, 2004, acesso em 15/01/2007.

VANDEVELDE, M., ZURBRIGGEN, A. The neurobiology of canine distemper virus infection. *Veterinary Microbiology*, v. 44, n. 2-4, p 271-280, jan. 1995.

VANDEVELDE, M.; ZURBRIGGEN, A. Demyelination in canine distemper virus infection: a review. *Acta Neuropathologica*, v. 109, p 56-68, jan. 2005.

VITE, C. H. Inflammatory Disease of the Central Nervous System. In: VITE, C. H. *Braund's Clinical Neurology in Small Animals: Localization, Diagnosis and Treatment* (Eds.) New York: International Veterinary Information Service (www.ivis.org), fev. 2005.

Von MESSLING, V. et al. The hemagglutinin of Canine Distemper Virus Determines Tropism and Cytopathogenicity. *Journal of Virology*, v. 75, n. 14, p 6418-6427, jul. 2001.

Von MESSLING, V. et al. Canine Distemper Virus and Measles Virus Fusion Glycoprotein Trimers: Partial Membrane-Proximal Ectodomain Cleavage Enhances Function. *Journal of Virology*, v. 78, n. 15, ago. 2004.

WÜNSCHMANN, A. et al. Identification of CD4⁺ and CD8⁺ T cell subsets and B cell in the brain of dogs with spontaneous acute, subacute-, and chronic-demyelinating distemper encephalitis. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, v. 67, p 101-116, 1999.

ZURBRIGGEN, A. et al. Canine Distemper Virus Persistence in the Nervous System Is Associated with Noncytolytic Selective Virus Spread. *Journal of Virology*, v. 69, n. 3, p. 1678-1686, mar. 1995a.

ZURBRIGGEN, A. et al. Selective spread and reduced virus release leads to canine distemper virus persistence in the nervous system. *Veterinary Microbiology*, v. 44, p 281-288, 1995b.

INSTRUÇÕES AOS AUTORES

Devem ser estruturados de acordo com os seguintes itens:

1. Página de rosto, com:

- Título do trabalho em português, em inglês e em espanhol, fonte Times New Roman, tamanho 12, com espaçamento simples, em negrito e centralizado, no qual somente a primeira letra de cada palavra deve ser maiúscula. Quando necessário, indicar a entidade financiadora da pesquisa, como primeira chamada de rodapé;
- Nomes completos dos autores, em que somente a primeira letra de cada nome deve ser maiúscula, centralizado e em negrito. Digitá-los, separados por vírgulas, com chamadas de rodapé numeradas e em sobrescrito, que indicarão o cargo e o endereço profissional dos autores (inclusive endereço eletrônico), seguidos da instituição onde o trabalho foi desenvolvido ou às quais estão vinculados;
- Nome, endereço, telefone, fax e correio eletrônico, para correspondência;
- Em caso de envolvimento de seres humanos ou animais de experimentação, encaminhar o parecer da Comissão de Ética ou equivalente, assinalando, no trabalho, antes das referências, a data de aprovação.

2. Página com resumo, abstract e resumen

- Tanto o resumo, como o abstract e o resumen devem ser seguidos do título do trabalho, no respectivo idioma, e conter no máximo 400 palavras cada um, com informações referentes à introdução, metodologia, resultados e conclusões. O texto deve ser justificado e digitado em parágrafo único e espaço 1,5, começando por RESUMO. O abstract, e o resumen, devem ser tradução fiel do resumo. Se for apresentado em inglês, deve conter também, resumos em português e espanhol; se for em espanhol, resumos em português e inglês.
- Devem conter, no máximo, cinco palavras-chave, key words, e palabras-clave que identifiquem o conteúdo do texto.

3. A estrutura do artigo deverá conter:

Introdução: Deve ser clara, objetiva e relacionada ao problema investigado e à literatura pertinente, bem como aos objetivos da pesquisa. A introdução estabelece os objetivos do trabalho.

Material e Métodos: Deve oferecer informações de reprodutibilidade da pesquisa, de forma clara e concisa, como variáveis, população, amostra, equipamentos e métodos utilizados, inclusive os estatísticos.

Resultados: Apresentação dos resultados obtidos, que devem ser descritos sem interpretações e comparações. Poderá ser sob a forma de tabelas, em folha à parte, no máximo de cinco, ordenadas em algarismos arábicos e encabeçadas pelo título, de acordo com as normas de apresentação tabular da ABNT/NBR 6023/2000 da Associação Brasileira de Normas Técnicas, identificadas no texto como Tabela; sob a forma de figuras, nos casos de gráficos, fotografias, desenhos, mapas, etc., ordenadas em algarismos arábicos, até no máximo de seis, e citadas no texto como Figura. Devem ser identificadas em folha à parte, onde deve constar o título do artigo. Fotografias podem ser em preto e branco ou coloridas, identificadas com o(s) nome(s) do(s) autor(es) no verso. No caso de desenhos originais, a impressão deve ser em papel adequado, de qualidade. Se o trabalho for apresentado na língua portuguesa ou espanhola, os enunciados das tabelas e figuras bem como das variáveis apresentadas deverão estar também escritos em inglês.

Discussão: Deve ser entendida como a interpretação dos resultados, confrontando com a literatura pertinente, apresentada na introdução. Se julgar conveniente, os resultados e a discussão poderão ser apresentados conjuntamente.

Conclusões: É a síntese final, fundamentada nos resultados e na discussão.

Referências: Devem ser apresentadas de acordo com as normas da ABNT, e o arranjo deve ser em ordem alfabética por sobrenome do autor.

Deverão ser editorados em Microsoft Word for Windows, para edição de textos, Excel (qualquer versão) para gráficos, formato JPEG ou GIF (imagem) para fotografias, desenhos e mapas, em três vias (uma original e duas cópias) impressas, formato A4 (21,0 x 29,7 cm), em espaço duplo, mantendo margens de 2,5 cm, nas laterais, no topo e pé de cada página, fonte Times New Roman, tamanho 12 e numeração consecutiva das páginas em algarismos arábicos, a partir da folha de identificação.

Ilustrações e legendas devem ser apresentadas em folhas separadas. Encaminhar cópia em disquete 3 ½” de alta densidade ou CD, identificado com título do artigo e nome dos autores. Nas duas cópias deve(m) ser omitido(s) o(s) nome(s) do(s) autor(es), o local onde se realizou o trabalho, bem como o rodapé.

Não serão fornecidas separatas. Os artigos estarão disponíveis no formato PDF no endereço eletrônico da revista. Para as demais seções da revista são válidas as normas

anteriores. Não devem exceder a 15 páginas. Abreviaturas não usuais devem ser empregadas após escritas por extenso na primeira utilização.

ARTIGOS DE REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Os artigos de revisão bibliográfica serão publicados nas línguas portuguesa, inglesa e espanhola, quando o autor apresentar contribuição científica, relevante na área específica do assunto abordado, a convite dos editores.

Deverão conter: Título (português, inglês e espanhol), resumo, palavras-chave, abstract, key words, resumen, palabras-clave, introdução, desenvolvimento do assunto, conclusão e referências. Deverão conter no máximo 20 páginas com 60 referências.