

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA

**AVALIAÇÃO DO TRATAMENTO EXPERIMENTAL DE CÃES
NATURALMENTE INFECTADOS COM O VÍRUS DA CINOMOSE NA FASE
NEUROLÓGICA COM RIBAVIRINA, PREDNISONA E DMSO ATRAVÉS DA
RT-PCR**

SIMONE HENRIQUES MANGIA

BOTUCATU – SP
2011

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA

AVALIAÇÃO DO TRATAMENTO EXPERIMENTAL DE CÃES
NATURALMENTE INFECTADOS COM O VÍRUS DA CINOMOSE NA FASE
NEUROLÓGICA COM RIBAVIRINA, PREDNISONA E DMSO ATRAVÉS DA
RT-PCR

SIMONE HENRIQUES MANGIA

Tese apresentada junto ao Programa de
Pós-Graduação em Medicina Veterinária
para obtenção de título de Doutor.

Orientador: Prof. Dr. Antonio Carlos Paes

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO DE AQUIS. E TRAT. DA INFORMAÇÃO
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CAMPUS DE BOTUCATU - UNESP
BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: **ROSEMEIRE APARECIDA VICENTE**

Mangia, Simone Henriques.

Avaliação do tratamento experimental de cães naturalmente infectados com vírus da cinomose com ribavirina, DMSO e prednisona através da RT-PCR / Simone Henriques Mangia. – Botucatu : [s.n.], 2011

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia

Orientador: Antonio Carlos Paes

Capes: 50502034

1. Cão – Doenças. 2. Encefalite - Tratamento. 3. Virologia veterinária.

Palavras-chave: Antiviral; Corticóide; Encefalite; hn-PCR; Morbillivirus; Terapêutica.

Nome do Autor: Simone Henriques Mangia

Título: AVALIAÇÃO DO TRATAMENTO EXPERIMENTAL DE CÃES NATURALMENTE INFECTADOS COM O VÍRUS DA CINOMOSE NA FASE NEUROLÓGICA COM RIBAVIRINA, PREDNISONA E DMSO ATRAVÉS DA RT-PCR.

COMISSÃO EXAMINADORA

Prof. Dr. Antonio Carlos Paes

Presidente e Orientador

Departamento de Higiene Veterinária e Saúde Pública

FMVZ – UNESP – Botucatu

Prof.Dr. Márcio Garcia Ribeiro

Membro

Departamento de Higiene Veterinária e Saúde Pública

FMVZ – UNESP – Botucatu

Profa. Titular Dr. Hélio Langoni

Membro

Departamento de Higiene Veterinária e Saúde Pública

FMVZ – UNESP – Botucatu

Prof. Dr. Christian Hirsch

Membro

Departamento de Medicina Veterinária

Universidade Federal de Lavras - UFLA

Prof. Dr. Osimar de Carvalho Sanches

Membro

Departamento de Patologia Animal

Faculdade de Ciências Agrárias da Universidade do Oeste Paulista -

UNOESTE

Data da Defesa: 16 de dezembro de 2011.

Dedicatória

Dedico esta pesquisa a todos os cães que participaram e a todos os outros que sofrem com a cinomose.

Dedico a todos os proprietários que perderam ou que lutaram contra a cinomose, que por algum motivo cruzaram com a minha vida e me fizeram ter forças para seguir em frente no trabalho. Esta dedicatória serve como agradecimento por todo o carinho que venho recebendo.

Dedico esta pesquisa ao meu orientador, Prof. Dr. Antonio Carlos Paes que foi o grande idealizador do estudo e que sonhou ao meu lado em fazer um trabalho como este, me apoiando e guiando frente as dificuldades.

Agradecimentos

Agradeço a Deus pela oportunidade de enriquecer meus conhecimentos nesta inestimável universidade.

Agradeço a minha mãe Sandra da Cunha Henriques pelo apoio que recebi desde o início quando cheguei em Botucatu, pelos valores que me ensinou, pelo amor e dedicação, além de toda compreensão pela minha ausência. Obrigada por toda ajuda que me deu nesse período, permitindo terminar mais uma fase da minha vida.

Agradeço ao Prof. Dr. Antonio Carlos Paes não só pela orientação profissional, mas também por se tornar um grande amigo, que me apoiou em todos os momentos que precisei aqui em Botucatu.

Agradeço ao meu namorado Leonardo Simões Pinho pelo apoio, carinho e compreensão pelos momentos de ausência. Obrigada por estar do meu lado neste momento tão importante para mim, pela sua dedicação no término da tese e por me trazer momentos de alegria e paz, quando parecia ser tão difícil, e que foram fundamentais na reta final.

Agradeço aos “Pretos”, “Loiro” e “Marrom”, Nina, Holly, Lut, Skol e Johnnie a companhia para escrever a tese e por serem a minha inspiração do dia-a-dia.

Agradeço a todos os cães e proprietários que colaboraram com a pesquisa e foram de fundamental importância para a conclusão de mais uma fase da minha vida.

Agradeço a todas as pessoas que desejaram que o trabalho não atingisse os seus objetivos e que dificultaram sua realização, pois estas dificuldades me fizeram uma pessoa mais forte para as tormentas da vida.

Agradeço a toda minha família por estarem sempre por perto nos momentos mais importantes da minha vida, pelos ensinamentos e amor que sempre recebi. Obrigada pela compreensão pela minha ausência nos momentos que também são importantes para vocês.

Agradeço às minhas amigas eternas, Danielle, Mírian e Cheryl pelo apoio que recebi durante todo esse período, pelos maravilhosos e inesquecíveis momentos de diversão e pelo apoio nas horas tristes. Obrigada

pela compreensão pela minha ausência nos momentos que foram importantes e eu não pude estar lá.

Agradeço às minhas amigas Leila e Marília por estarem sempre presentes na minha vida de forma tão agradável, pelos momentos de diversão e desabafo.

Agradeço às residentes e amigas, Anna Paula e Isabella por transformarem os momentos de tensão e trabalho em momentos tão alegres e divertidos; foi maravilhoso conhecer e trabalhar com vocês. Espero que nossa amizade continue por muito tempo.

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

Agradeço à Profa. Jane Megid por disponibilizar o Laboratório de Biologia Molecular da Disciplina de Enfermidades Infecciosas dos Animais da UNESP – Botucatu para a realização das reações de PCR. Agradeço ao Clóvis pelo auxílio e dedicação para a realização destas técnicas que foram fundamentais na execução da pesquisa.

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

Agradeço a todos os pós-graduandos do Departamento pela colaboração e auxílio na realização da pesquisa.

Agradeço a todos os residentes da Disciplina de Enfermidades Infecciosas dos Animais que colaboraram com o desenvolvimento da pesquisa.

Agradeço aos funcionários Adilson e Roberto por toda ajuda que ofereceram para melhor execução da pesquisa; sem vocês não teria conseguido concluir o experimento.

Aos residentes da Disciplina de Zoonoses e ao Prof. Dr. Hélio Langoni, obrigada pela ajuda e orientação no diagnóstico de toxoplasmose.

Aos funcionários do Departamento de Higiene Veterinária e Saúde Pública e da FMVZ – UNESP – Botucatu, obrigada pela inestimável ajuda.

Agradeço ao Prof. Dr. Aristeu Vieira da Silva a contribuição para a realização e interpretação das análises estatísticas desta pesquisa.

Agradeço a Blausigel Farmacêutica por fornecer o medicamento antiviral no preço acessível para a realização da pesquisa.

Agradeço a CAPES pelo apoio financeiro e fundamental para a estadia na cidade de Botucatu.

Agradeço ao CNPq pelo auxílio financeiro para a realização da pesquisa.

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

Epígrafe

Nosso Mundo – Barão Vermelho

Compositor: Maurício Barros e Guto Goffi

*Se eu ainda soubesse
Como mudar o mundo
Se eu ainda pudesse
Saber um pouco de tudo
Eu voltaria atrás do tempo
Eu não te deixaria
Presa no passado
E arrumaria um jeito
Pra você estar ao meu lado de novo
Eu voltaria no tempo*

*Pra voltar pra ontem
Sem temer o futuro
E olhar pra hoje
Cheio de orgulho
Eu voltaria atrás do tempo
Eu voltaria atrás
Atrás do tempo
Os nossos erros
Seriam apagados
Nossos primeiros desejos
Ressuscitados
E de novo eu voltaria no tempo
Eu não te deixaria desistir tão fácil
E não te negaria nenhum abraço
De novo
Eu voltaria no tempo*

...Eu andarei vestido e armado, com as armas de São Jorge. Para que meus inimigos tendo pés não me alcancem, tendo mãos não me peguem, tendo olhos não me enxerguem e nem pensamentos eles possam ter, para me fazerem mal...

(Oração de São Jorge)

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Descrição da sequência de nucleotídeos iniciadores utilizados na reação de RT-PCR e hn-PCR no diagnóstico da cinomose em cães. Botucatu, SP, 2011.....	77
Tabela 2 - Frequência de cães machos e fêmeas com cinomose incluídos nos respectivos grupos experimentais. Botucatu, SP, 2011.....	79
Tabela 3 - Média, desvio padrão, mediana das idades em meses dos cães com cinomose incluídos na pesquisa, divididos nos diferentes grupos. Botucatu, SP, 2011.....	80
Tabela 4 - Média, desvio padrão e mediana dos dias de evolução dos sinais clínicos neurológicos dos cães com cinomose nos diferentes grupos. Botucatu, SP, 2011.....	81
Tabela 5 - Frequência dos sinais oculares em cães com cinomose nos diferentes grupos experimentais. Botucatu, SP, 2011..	82
Tabela 6 - Frequência dos sinais respiratórios em cães com cinomose nos diferentes grupos experimentais. Botucatu, SP, 2011.....	83
Tabela 7 - Frequência dos sinais gastroentéricos em cães com cinomose nos diferentes grupos experimentais. Botucatu, SP, 2011.....	84
Tabela 8 - Frequência dos sinais neurológicos nos cães com cinomose incluídos na pesquisa nos diferentes grupos experimentais. Botucatu, SP, 2011.....	85
Tabela 9 - Frequência da vacinação dos cães com cinomose incluídos na pesquisa, segundo o grupo experimental. Botucatu, SP, 2011.....	88
Tabela 10 - Média, desvio padrão, mediana do tempo de tratamento dos cães com cinomose para cada grupo experimental. Botucatu, SP, 2011.....	90
Tabela 11 - Avaliação do tratamento experimental segundo a sobrevida dos cães com cinomose nos diferentes grupos. Botucatu, SP, 2011.....	91
Tabela 12 - Avaliação do tratamento experimental através da sobrevida dos cães com cinomose incluídos nos grupos 1, 2 e 3. Botucatu, SP, 2011.....	92

Tabela 13 - Avaliação do tratamento experimental através da sobrevida dos cães com cinomose incluídos nos grupos 3, 4, 5 e 6. Botucatu, SP, 2011.....	93
Tabela 14 - Avaliação da sobrevida dos cães com cinomose frente ao histórico de vacinação independente do grupo experimental. Botucatu, SP, 2011.....	94
Tabela 15 - Avaliação da sobrevida dos cães com cinomose em cada grupo experimental frente ao histórico de vacinação. Botucatu, SP, 2011.....	98
Tabela 16 - Média, desvio padrão e mediana da idade dos cães com cinomose em relação à sobrevida, independente do grupo experimental. Botucatu, SP, 2011.....	99
Tabela 17 - Média, desvio padrão e mediana da idade dos cães com cinomose nos grupos experimentais frente à evolução clínica. Botucatu, SP, 2011.....	100
Tabela 18 - Frequência de acometimento ocular dos cães com cinomose em relação à sobrevida. Botucatu, SP, 2011.....	101
Tabela 19 - Frequência dos sinais oculares em relação à sobrevida dos cães com cinomose em cada grupo experimental. Botucatu, SP, 2011.....	102
Tabela 20 - Frequência dos sinais gastroentéricos em relação à sobrevida dos cães com cinomose. Botucatu, SP, 2011.....	103
Tabela 21 - Frequência dos sinais gastroentéricos em relação à sobrevida dos cães com cinomose nos grupos experimentais. Botucatu, SP, 2011.....	104
Tabela 22 - Frequência dos sinais respiratórios em relação à sobrevida dos cães com cinomose. Botucatu, SP, 2011.....	105
Tabela 23 - Frequência dos sinais respiratórios em relação à sobrevida dos cães com cinomose nos grupos experimentais. Botucatu, SP, 2011.....	106
Tabela 24 - Média, desvio padrão, mediana e percentis da quantidade de sinais neurológicos nos cães com cinomose incluídos na pesquisa em relação à sobrevida. Botucatu, SP, 2011..	107
Tabela 25 - Média, desvio padrão, mediana e percentis da soma dos sinais neurológicos nos cães com cinomose em cada grupo experimental em relação à evolução clínica. Botucatu, SP, 2011.....	108

Tabela 26 - Frequência da soma de sinais neurológicos em relação à evolução clínica dos cães com cinomose independente do grupo experimental. Botucatu, SP, 2011.....	111
Tabela 27 - Frequência da soma de sinais neurológicos nos cães com cinomose em relação à evolução clínica nos diferentes grupos experimentais. Botucatu, SP, 2011.....	112
Tabela 28 - Frequência dos sinais neurológicos nos cães com cinomose em relação à evolução clínica, independente dos grupos experimentais. Botucatu, SP, 2011.....	115
Tabela 29 - Valor absoluto de linfócitos do hemograma dos cães com cinomose em média, desvio padrão, mediana e percentis no décimo quinto dia nos diferentes grupos. Botucatu, SP, 2011.....	123
Tabela 30 - Mediana e percentis em escores da dosagem de bilirrubina na urina dos cães com cinomose nos diferentes grupos experimentais, no décimo dia de tratamento. Botucatu, SP, 2011.....	142
Tabela 31 - Mediana e percentis em escores da dosagem de bilirrubina na urina dos cães com cinomose nos diferentes grupos experimentais, no décimo quinto dia de tratamento. Botucatu, SP, 2011.....	142
Tabela 32 - Mediana e percentis da dosagem de proteína no líquido dos cães com cinomose nos diferentes grupos experimentais no primeiro momento. Botucatu, SP, 2011..	150
Tabela 33 - Mediana e percentis da dosagem de proteína no líquido dos cães com cinomose nos diferentes grupos experimentais após o tratamento. Botucatu, SP, 2011.....	151
Tabela 34 - Mediana e percentis em escore do teste de Pandy no líquido dos cães com cinomose nos diferentes grupos experimentais após o tratamento. Botucatu, SP, 2011.....	154
Tabela 35 - Mediana e percentis da contagem de células nucleadas do líquido dos cães com cinomose nos diferentes grupos experimentais no primeiro momento de colheita de material. Botucatu, SP, 2011.....	156
Tabela 36 - Mediana e percentis da contagem de células nucleadas no líquido dos cães com cinomose nos diferentes grupos experimentais após o tratamento. Botucatu, SP, 2011.....	157

Tabela 37 - Mediana e percentis da porcentagem e do valor absoluto de linfócitos na citologia líquórica dos cães com cinomose nos diferentes grupos experimentais antes do tratamento. Botucatu, SP, 2011.....	159
Tabela 38 - Mediana e percentis da porcentagem e do valor absoluto de linfócitos na citologia líquórica dos cães com cinomose nos diferentes grupos experimentais após o tratamento. Botucatu, SP, 2011.....	160
Tabela 39 - Mediana e percentis da porcentagem e do valor absoluto de células mononucleares na citologia líquórica dos cães com cinomose nos diferentes grupos experimentais no primeiro momento de colheita de material. Botucatu, SP, 2011.....	162
Tabela 40 - Mediana e percentis da porcentagem e do valor absoluto de células mononucleares na citologia líquórica dos cães com cinomose nos diferentes grupos após o tratamento experimental. Botucatu, SP, 2011.....	163
Tabela 41 - Relação das amostras positivas e negativas na PCR no diagnóstico da cinomose em cães antes do tratamento experimental, independente do grupo. Botucatu, SP, 2011.....	164
Tabela 42 - Relação das amostras positivas e negativas de cães na RT-PCR após o tratamento experimental, independente do grupo. Botucatu, SP, 2011.....	165
Tabela 43 - Resultados positivos e negativos da RT-PCR para detecção do vírus da cinomose do líquido dos cães nos diferentes grupos, após o tratamento experimental. Botucatu, SP, 2011.....	166
Tabela 44 - Resultados positivos e negativos da hn-PCR para detecção do vírus da cinomose de amostras de cães nos diferentes grupos experimentais independente do momento de colheita do material. Botucatu, SP, 2011.....	169
Tabela 45 - Relação dos resultados positivos e negativos da hn-PCR para detecção do vírus da cinomose em relação ao tipo de amostra de cães, independente do grupo experimental. Botucatu, SP, 2011.....	170
Tabela 46 - Relação dos resultados da hn-PCR para detecção do vírus da cinomose em cada tipo de amostra de cães nos diferentes grupos experimentais. Botucatu, SP, 2011.....	172

Tabela 47 - Relação dos resultados positivos e negativos da hn-PCR para detecção do vírus da cinomose de amostras de cães, realizadas antes e após o tratamento experimental independente do grupo. Botucatu, SP, 2011.....	173
Tabela 48 - Resultados da hn-PCR para detecção do vírus da cinomose de amostras de cães, antes e após o tratamento nos diferentes grupos experimentais. Botucatu, SP, 2011.....	174

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Representação gráfica da avaliação do tratamento experimental segundo a sobrevida dos cães com cinomose nos diferentes grupos. Botucatu, SP, 2011.....	92
Figura 2 - Representação gráfica dos valores de mediana da soma de sinais neurológicos dos cães com cinomose em relação à evolução clínica em cada grupo experimental. Botucatu, SP, 2011.....	110
Figura 3 - Representação gráfica das medianas da contagem de hemácias dos cães com cinomose em cada momento de colheita de material nos grupos experimentais. Botucatu, SP, 2011.....	118
Figura 4 - Representação gráfica das medianas da dosagem de hemoglobina dos cães com cinomose em cada momento de colheita de material nos grupos experimentais. Botucatu, SP, 2011.....	119
Figura 5 - Representação gráfica das medianas do volume globular das hemácias de cães com cinomose em cada momento de colheita de material nos grupos experimentais. Botucatu, SP, 2011.....	120
Figura 6 - Representação gráfica das medianas da contagem total de leucócitos dos cães com cinomose nos momentos de colheita de material. Botucatu, SP, 2011.....	122
Figura 7 - Representação gráfica da mediana dos valores absolutos de linfócitos no hemograma dos cães com cinomose de cada grupo nos momentos de colheita de material. Botucatu, SP, 2011.....	124
Figura 8 - Representação gráfica do número de cães com cinomose que apresentaram monócitos ativados no hemograma nos diferentes momentos de colheita de material. Botucatu, SP, 2011.....	127
Figura 9 - Representação gráfica das medianas das dosagens de uréia sérica dos cães com cinomose nos diferentes grupos experimentais nos momentos de colheita de material. Botucatu, SP, 2011.....	130

Figura 10 - Representação gráfica das medianas da dosagem de creatinina dos cães com cinomose nos grupos experimentais e nos momentos de colheita de material. Botucatu, SP, 2011.....	131
Figura 11 - Representação gráfica das medianas da dosagem de fosfatase alcalina (FA) dos cães com cinomose nos grupos e nos diferentes momentos de colheita de material. Botucatu, SP, 2011.....	133
Figura 12 - Representação gráfica das medianas da dosagem de gama-glutamilttransferase (GGT) dos cães com cinomose nos grupos e nos diferentes momentos de colheita de material. Botucatu, SP, 2011.....	134
Figura 13 - Representação gráfica das medianas da dosagem de proteínas totais séricas dos cães com cinomose nos grupos experimentais e nos momentos de colheita de material. Botucatu, SP, 2011.....	135
Figura 14 - Representação gráfica das medianas da dosagem de albumina sérica dos cães com cinomose nos grupos experimentais nos diferentes momentos de colheita de material. Botucatu, SP, 2011.....	137
Figura 15 - Representação gráfica das medianas da dosagem de globulina sérica dos cães com cinomose nos grupos experimentais nos diferentes momentos de colheita de material. Botucatu, SP, 2011.....	138
Figura 16 - Representação gráfica das medianas da dosagem de proteínas no líquido dos cães com cinomose incluídos na pesquisa, antes e após o tratamento experimental. Botucatu, SP, 2011.....	152
Figura 17 - Representação gráfica dos valores de medianas da contagem de células nucleadas do líquido dos cães com cinomose, antes e após o tratamento experimental. Botucatu, SP, 2011.....	158
Figura 18 - Representação gráfica das medianas de valores absolutos de linfócitos no líquido dos cães com cinomose, nos diferentes grupos, antes e após o tratamento experimental. Botucatu, SP, 2011.....	161

Figura 19 - Representação gráfica dos resultados positivos para o vírus da cinomose nas diferentes amostras de cães, antes e após o tratamento, independente do grupo experimental. Botucatu, SP, 2011.....	167
Figura 20 - Eletroforese após RT-PCR para detecção do vírus da cinomose de amostras de sangue, medula óssea e líquido de cães. Botucatu, SP, 2011.....	168
Figura 21 - Eletroforese após hn-PCR para detecção do vírus da cinomose de amostras de sangue e medula óssea de cães. Botucatu, SP, 2011.....	169
Figura 22 - Representação gráfica dos valores percentuais dos resultados positivos da hn-PCR para detecção do vírus da cinomose em amostras de cães, antes e após o tratamento nos diferentes grupos experimentais. Botucatu, SP, 2011.....	175

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

% - porcentagem

°C – graus Celsius

< - menor que

> - maior que

μL – microlitro

mg – miligramas

mL - mililitros

dL - decilitro

® - marca registrada

α – alfa

β - beta

A+ - amostra positiva

A- - amostra negativa

ALT – alanina-aminotransferase

ATP – adenosina trifosfato

C+ - controle positivo

C- - controle negativo

CPK – creatinina fosfo-quinase

CDV – vírus da cinomose (Canine Distemper Virus)

COX – ciclooxigenase

CSD – depressão cortical difusa

cDNA – cópias de DNA

DDT – Dicloro-Difenil-Tricloroetano

DL 50 – dose letal 50

DMSO – Dimetil Sulfóxido

DMSO₂ – dimetil sulfone

DMS – dimetil sulfide

dNTP – desoxirribonucleotídeos fosfatados

DUSP – fosfatase de especificidade dupla

EDTA – ácido etilenodiaminotetracético

ELISA – “Enzyme-linked immunosorbent assay”

et al. - colaboradores

EUA – Estados Unidos da América

F – proteína de fusão

FA – fosfatase alcalina

Fc – receptor de anticorpos de alta afinidade de macrófagos

FDA – “Food and Drug Administration”

GABA – ácido gama-aminobutírico

γ – gama

G1 – grupo 1

G2 – grupo 2

G3 – grupo 3

G4 – grupo 4

G5 – grupo 5

G6 – grupo 6

GGT – gama-glutamyltransferase

GTP – guanosina tri-fosfato

g/dL – gramas por decilitro

g/Kg – gramas por quilo

g/dia – gramas por dia

H - hemaglutinina

HIV – vírus da imunodeficiência humana

hn-PCR – Hemi-nested PCR

HSV – Herpes Simplex Vírus

IFN – interferon

IgG – imunoglobulina G

IgG1 – imunoglobulina G1

IgG2 – imunoglobulina G2

IgM – imunoglobulina M

IL – interleucina

IMP – inosina mono-fosfato

IMPDH – inosina-monofosfato desidrogenase

IND – “Investigated new drugs”

ITPA – inosina trifosfato

JNK – c-Jun N-terminal quinase

L – polimerase ou grande

LCR – líquido cefalorraquidiano

MAPK – proteína quinase ativada por mitógeno (mitogen-activated protein kinase)

mg/dL – miligrama por decilitro

mg/Kg – miligramas por quilo

μL – microlitros

mL – mililitros

mM - milimolar

μg/mL – microgramas por mililitro

MgCl₂ – cloreto de magnésio

M – proteína de matrix ou marcador (“loading” – foto do gel de eletroforese)

MHC – Complexo de histocompatibilidade principal

M-MLV – Moloney Murine Leukemia Virus

mRNA – RNA mensageiro

n – número de animais

N ou NP – nucleoproteína

ng/μL – nanograma por microlitro

P – fosfoproteína

pb – pares de bases

P25 – percentil 25

P75 – percentil 75

PCR – reação em cadeia pela polimerase

PGE₂ – prostaglandina E₂

PLA - fosfolipase

pH – pressão de hidrogênio

recCDV ou rD – vacina recombinante contra a cinomose

ROS – radicais livres de oxigênio

RT-PCR – reação em cadeia pela polimerase precedida de transcrição reversa

rpm – rotação por minuto

SHV – sem histórico vacinal

SNC – Sistema nervoso central

spp. – espécie

SRD – sem raça definida

SSPE – paencefalite subaguda esclerosante

SV – sem vacinação

U.S. – “United States”

Th1 – célula T *helper* 1

Th2 – célula T *helper* 2

TNF – fator de necrose tumoral

UI/L – unidades internacionais por litro

VI – Vacinação incompleta

VSO – vacinação sem orientação veterinária

WHO – Organização Mundial da Saúde (World Health Organization)

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

SUMÁRIO

RESUMO.....	1
ABSTRACT.....	2
INTRODUÇÃO.....	3
REVISÃO DE LITERATURA.....	6
1 CINOMOSE.....	7
2 RT-PCR.....	25
3 TRATAMENTO DE CÃES COM CINOMOSE E PROFILAXIA.....	27
4 RIBAVIRINA.....	31
5 APLICAÇÕES DA RIBAVIRINA NA MEDICINA VETERINÁRIA.....	43
6 PREDNISONA.....	44
7 DIMETIL-SULFÓXIDO (DMSO).....	54
OBJETIVOS.....	62
MATERIAIS E MÉTODOS.....	64
1 ANIMAIS.....	65
1.1 Critérios de inclusão.....	65
1.2 Critérios de exclusão.....	66
2 GRUPOS EXPERIMENTAIS.....	66
3 FÁRMACOS EXPERIMENTAIS.....	67
4 AMBIENTE E ALIMENTAÇÃO DOS CÃES.....	68
5 COLHEITA DE MATERIAL E EXAMES COMPLEMENTARES.....	69
5.1 Colheita de Líquor.....	69
5.2 Exame do Líquor.....	70
5.3 Colheita de sangue e urina.....	71
5.4 Hemograma.....	72
5.5 Análises bioquímicas.....	73
5.6 Exame de urina tipo I.....	73
5.7 Colheita de medula óssea.....	74
6 TÉCNICA DE BIOLOGIA MOLECULAR.....	74

6.1	Extração do RNA.....	74
6.2	Conversão para cDNA.....	75
6.3	RT-PCR.....	76
6.4	Hemi-Nested RT-PCR.....	76
7	ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	77
	RESULTADOS.....	78
1	ANIMAIS E DADOS EPIDEMIOLÓGICOS.....	79
2	DADOS RELACIONADOS COM A EVOLUÇÃO CLÍNICA.....	89
3	EXAMES COMPLEMENTARES.....	117
3.1	Hemograma.....	117
3.2	Outras alterações hematológicas.....	126
3.3	Dosagens bioquímicas.....	129
3.4	Exame de urina tipo I.....	139
3.5	Exame do líquido.....	148
4	BIOLOGIA MOLECULAR.....	164
	DISCUSSÃO.....	178
	CONCLUSÕES.....	211
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	214
	ARTIGO PARA PUBLICAÇÃO 1.....	241
	ARTIGO PARA PUBLICAÇÃO 2.....	260
	ANEXO 1.....	280

MANGIA, S. H. **Avaliação do tratamento experimental de cães naturalmente infectados com o vírus da cinomose com ribavirina, DMSO e prednisona através da RT-PCR.** Botucatu, 2011. 282 p. Tese (Doutorado) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Campus Botucatu, Universidade Estadual Paulista, SP.

RESUMO

O estudo objetivou identificar efeitos do tratamento com ribavirina, prednisona e DMSO na cinomose; identificar a presença viral no sangue, medula óssea e líquido antes e após o tratamento, os efeitos colaterais dos fármacos experimentais e associações. Foram utilizados 60 cães apresentando sinais neurológicos da cinomose com evolução de dez dias. Animais foram internados para tratamento de suporte; avaliados diariamente e submetidos ao hemograma e dosagens bioquímicas. Os grupos 1 e 2 foram tratados com ribavirina associada ao DMSO; os grupos 3 e 4 foram tratados com DMSO e prednisona e os grupos 5 e 6 foram tratados com ribavirina e prednisona, ribavirina, prednisona e DMSO. Os animais foram anestesiados e colhidos líquido, medula óssea e sangue, antes e após o tratamento e realizada a RT-PCR das amostras; as negativas foram analisadas pela técnica de hn-PCR. O vírus foi encontrado em 95% das amostras de sangue, 90% de medula óssea e 53,3% de líquido pré-tratamento. O efeito adverso da ribavirina quando associada com a prednisona foi anemia. A prednisona na dose imunossupressora causou aumento da dosagem de proteína e diminuição da celularidade líquórica, leucocitose. Já a dose antiinflamatória causou diminuição de proteína no líquido. Baseado nos índices de sobrevida e melhora clínica, o tratamento mais efetivo foi o G2 (80%); seguido do G1, G5 e G3 (70%); o G6 (60%); o G4 com o pior índice (30%). Pós-tratamento, a frequência viral foi 97,7% no sangue, 86,4% na medula óssea e 27,3% no líquido.

PALAVRAS-CHAVE: encefalite, Morbillivirus, antiviral, hn-PCR, terapêutica, corticóide.

MANGIA, S. H. **The RT-PCR based assessment of experimental treatment of dogs naturally infected with canine distemper virus by the use of ribavirin, DMSO and prednisone.** Botucatu, 2011. 282 p. Thesis (Doctorate) – College of Veterinary Medicine and Animal Science, Campus of Botucatu, São Paulo State University, SP.

ABSTRACT

The present study aims at the identification of ribavirin, prednisone and DMSO's treatment effects in dogs with canine distemper, at the identification of the viral presence in the blood, bone marrow and cerebrospinal fluid (CSF) before and after the treatment and also at the identification of side effects of the experimental drugs and its combinations. Sixty dogs presenting canine distemper with neurological signs about ten days evolution were observed. The animals were hospitalized for the support treatment, assessed on daily basis and subjected to blood cells count and biochemical analysis. Groups 1 and 2 were treated with ribavirin and its combination with DMSO; Groups 3 and 4 treated with prednisone and DMSO, Group 5 treated with ribavirin and prednisone, while Group 6 with ribavirin, prednisone and DMSO. The animals were anesthetized for the cerebrospinal fluid, bone marrow and blood samples collection before and after the treatment, then the RT-PCR of the samples was proceeded. The negative were analysed according to the hn-PCR technique. The canine distemper virus were found in 95% of blood samples, 90% of bone marrow and 53,3% of CSF before the treatment. The adverse effect of ribavirin and its association with prednisone was anemia. Prednisone, at its immunosuppressive dose, led to the increase of protein and decrease of cellularity in CSF, and increase of leukocytes blood count. The anti-inflammatory dose led to the CSF protein concentration's decrease. Considering the survival and clinical improvement rates, the most successful treatment was the one applied to the G2 (80%); followed by G1 (70%); G5 (70%) and G3 (70%); G6 (60%); and the lowest rate G4 (30%). After the treatment, the virus frequency was 97,7% in the blood, 86,4% in the bone marrow and 27,3% in the CSF.

KEY-WORDS: Encephalitis, Morbillivirus, antiviral, hn-PCR, therapeutic, corticosteroids.

Introdução

A cinomose é uma doença viral antiga que afeta cães e outros carnívoros em todo o mundo. Mesmo com uso de estratégias vacinais, ela ainda é uma doença importante na população canina, apresentando a maior taxa de mortalidade depois da raiva (SUMMERS & APPEL, 1994).

É uma enfermidade infectocontagiosa, causada por RNA vírus da ordem *Mononegavirales*, família *Paramyxovirus*, subfamília *Paramyxovirinae*, gênero *Morbillivirus*. Possui três formas de apresentação clínica: aguda, subaguda e crônica, com manifestações gastroentéricas, respiratórias e neurológicas. São descritas basicamente 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).

Embora a vacinação contra a cinomose venha sendo utilizada amplamente por várias décadas, a doença ainda é prevalente 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 ocorrência da infecção na população canina (HEADLEY & GRAÇA, 2000; SILVA et al., 2004). Alguns fatores como a contaminação do 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 enfermidade com ocorrência ocasional de surtos (BÖHM et al., 2004).

A ribavirina vem sendo considerada como fármaco no tratamento da cinomose, após o referido trabalho de Elia et al. (2008), que testou a mesma frente o vírus da cinomose “in vitro”. Segundo os autores a ribavirina causa mutações no vírus da cinomose e estas levam a um erro catastrófico no RNA do genoma viral.

Os corticoesteróides são utilizados na cinomose por causa da imunopatologia das lesões neuronais e para reduzir o edema cerebral causados pelo vírus, mantendo a terapia com doses antiinflamatórias (TIPOLD et al., 1992; GREENE, 2006).

Os glicocorticóides ainda são considerados como um dos mais potentes antiinflamatórios, podendo ser utilizados no tratamento de doenças nas quais estejam envolvidos mecanismos imunes e inflamatórios (CROXTALL et al., 2002; LONGUI, 2007).

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 substância lipofílicas, indicando que este pode servir como veículo de transporte de drogas nucleotídeas por membranas celulares.

O presente estudo tem como objetivo criar novos protocolos de tratamento para a referida enfermidade utilizando-se dos fármacos supracitados. Com a característica de doença re-emergente o tratamento da cinomose deve ser considerado em novas pesquisas e o atual estudo refere-se ao tratamento de cães com encefalite, a forma mais agressiva da enfermidade, naturalmente infectados com o vírus da cinomose.

Revisão de Literatura

1. Cinomose

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

Enfermidade que afeta animais das famílias *Canidae*, *Mustelidae*, *Hyaenidae*, *Procyonidae*, *Ailuridae*, *Viverridae*, *Felidae*, *Ursidae*, *Phocidae*, *Tayassuidae* e *Cercopithecidae*. A patogenia da infecção pelo vírus da cinomose varia de acordo com a espécie e pode resultar em infecções inaparentes ou causar alta mortalidade (TIPOLD et al., 1992; SUMMERS et al., 1995; van MOLL et al., 1995; HEADLEY & GRAÇA, 2000; GEBARA et al., 2004; CHO & PARK, 2005).

A ocorrência da enfermidade em cães vacinados corretamente é bastante citada na literatura, conforme mostram os estudos a seguir.

Amude (2005) encontrou quatro cães positivos, dentre 20 selecionados, que foram corretamente vacinados com vacina de vírus vivo modificado. O autor utilizou das técnicas de RT-PCR e histologia do encéfalo para confirmação dos casos de cinomose.

Em 2002, numerosos casos de cinomose foram relatados em Windhoek, capital da Namíbia, onde cerca de 100 cães foram eutanasiados. Em abril do mesmo ano, veterinários da costa de Swakopmund, no mesmo país, reportaram o surto de cinomose com 50 ou mais animais tratados, acima de 100 cães eutanasiados e estima-se cerca de 200 casos não confirmados. Neste mesmo mês um chagal apresentou sinais clínicos, bem como vários outros animais selvagens. Em algumas localizações a prevalência em cães domésticos foi de 72%, e destes 91% eram cães sintomáticos. A sequência encontrada da cepa viral na Namíbia foi similar à encontrada nos leões africanos (GOWTAGE-SEQUEIRA et al., 2009).

O vírus da cinomose foi responsável pela infecção e mortalidade de cães domésticos e chacais na costa da Namíbia entre 2001 e 2003. Este estudo foi a primeira descrição do surto de cinomose em *Canis mesomelas* (Black-backed Jackals) e a primeira descrição da clínica e achados histopatológicos nestas espécies (GOWTAGE-SEQUEIRA et al., 2009).

Em um surto ocorrido na Finlândia, amostras de células epiteliais de 3649 cães foram testadas e 865 casos foram confirmados por testes indiretos de anticorpos fluorescentes. Os sinais clínicos variaram de conjuntivite, febre e anorexia aos sinais respiratórios e gastrintestinais, com estimativa de letalidade de 30% dos cães acometidos. Dos casos confirmados, 631 (73%) tinham entre três e 24 meses de idade. Destes, 487 tinham sido vacinados pelo menos uma vez e 351 (41%) tinham uma história completa de vacinação (EK-KOMMONEN et al., 1997).

Foi relatado neurite óptica pelo vírus da cinomose em cão vacinado, com nove anos de idade, fêmea, da raça Jack Russell terrier, onde a apresentação clínica foi o surgimento de sinais neurológicos de características agudas e progressivas, apresentando positividade na marcação pela imunoistoquímica do encéfalo. Este relato ocorreu em novembro de 2007, em Ontário, Canadá e

pode estar relacionado com os surtos de cinomose em guaxinim que ocorre periodicamente na região (RICHARDS et al., 2011).

Outro caso relatado foi de um bulldog francês, macho, de oito anos de idade, somente com apresentação neurológica, animal vacinado (cepa Rockborn), no Texas, EUA. Os pesquisadores realizaram PCR e sequenciamento para identificação do vírus da cinomose e comprovaram seu resultado pela imunoistoquímica pela marcação do vírus em neurônios no encéfalo do animal. Foi descartada a doença pós-vacinal porque o animal apresentou sinais clínicos após três meses da vacinação e os achados histopatológicos não foram compatíveis com a encefalite pós-vacinal. Sugere-se que o animal não desenvolveu resposta imune adequada à vacinação, já que no sequenciamento foi detectada cepa selvagem do vírus da cinomose, embora os autores não excluíssem possível mutação na cepa vacinal (SCHATZBERG et al., 2009).

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

O vírus também afetar mamíferos marinhos da ordem Pinnipedia e Família *Phocidae* (focas), bem como animais da ordem Artiodactyla (Família *Tayasssuidae*) como o caititu e primatas da Família *Cercopithecidae* (van MOLL et al., 1995; HARDER & OSTERHAUS, 1997; FORSYTH et al., 1998). Gatos domésticos e suínos são suscetíveis ao vírus, porém nestas espécies não há o desenvolvimento da doença clínica (GASKIN, 1974).

Para o vírus da cinomose foi demonstrado que a adaptação molecular ao receptor celular ocorre por alteração no gene H (hemaglutinina) levando a disseminação do vírus para novos hospedeiros não canídeos no ambiente selvagem (McCARTHY et al., 2007).

Surto de doença respiratória foi descrito em macacos rhesus (*Macaca mulatta*) causado pelo vírus da cinomose. Em 2006, doença respiratória em macacos rhesus ocorreu em uma fazenda no sudeste da China. Aproximadamente 10.000 macacos contraíram a doença e 4.250 morreram. A morbidade em macacos jovens chegou a 60%, com taxa de letalidade de 30%. Em adultos, a taxa de morbidade foi de 25% e letalidade de 5%. No ano de 2007, os macacos foram vacinados com cepa inativada de pulmões e fígados de macacos mortos. Após esta vacinação, entre 2007 e 2008 o número de casos diminuiu para aproximadamente 100 a 200 casos por ano (QIU et al., 2011).

A cinomose se espalhou pela China, particularmente em animais experimentais em Wuhan, Kunming e Beijing (SUN et al., 2010). A doença também foi introduzida em pequenos zoológicos na China. A doença foi descoberta pela sorologia de macacos adultos que sobreviveram à doença. Após esta descoberta, os macacos passaram a ser vacinados com vacina viva atenuada para o vírus da cinomose em 2009. O número de casos chegou a aproximadamente 130 em 2009 e reduziu para 20 a 30 em 2010 (QIU et al., 2011).

A doença clínica foi parecida com sarampo em humanos, incluindo sinais respiratórios, anorexia, febre, erupção de pele por todo o corpo, vermelhidão e inchaço dos coxins, conjuntivite e descarga nasal mucóide espessa, com coma precedendo a morte. Após a identificação com o sarampo foi realizada reação em cadeia pela polimerase precedida da transcrição reversa (RT-PCR) para o vírus do sarampo e para o vírus da cinomose. Amostras de pulmão foram utilizadas para o diagnóstico, sendo que foram negativas para o vírus do sarampo e positivas para o vírus da cinomose. O genoma encontrado foi sequenciado e os resultados mostraram grande similaridade com isolados de ferret e racoons nos EUA (QIU et al., 2011).

Os autores não conseguiram achar explicações para a epidemia na China, pode ter sido pelo contato com guaxinim, ou pelo contato com macacos selvagens, sendo outra possibilidade o contato com grande massa antigênica de vírus de cães que sofreram adaptação para novos hospedeiros. Concluíram que, embora a vacinação seja amplamente utilizada e a cinomose encontre-se controlada pela vacina viva atenuada. Casos esporádicos ainda ocorrem e grande número de mutações são encontradas no vírus tornando futuras transmissões imprevisíveis. Portanto, a vigilância para cinomose deve ser considerada na população de macacos e nos humanos que entram em contato direto com cães (QIU et al., 2011).

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

Todos os vírus isolados pertencem a um mesmo sorotipo. As várias cepas isoladas produzem afecções com duração e sinais clínicos distintos: algumas causam enfermidade de mediana patogenicidade, enquanto outras causam enfermidade aguda, altamente mortal, com ou sem encefalite aguda. Outras, ainda, causam encefalite tardia, após doença branda, ou mesmo após a recuperação da forma aguda. Há ainda cepas 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). Devido ao grande potencial neurotrópico, a cepa Snyder Hill é a mais utilizada em experimentos de inoculação intraencefálica, tanto em estudos da patogênese viral quanto em desafios pós-vacinais (NEGRÃO et al., 2006 apud SLATER, 1970).

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 transmitidos passivamente pelo colostro, entre 60 e 90 dias de idade, demonstrando a relação entre susceptibilidade e a idade. No entanto, o vírus pode acometer animais de todas

as idades (CORRÊA & CORRÊA, 1992; BIAZZONO et al., 2001; GEBARA et al., 2004). Sonne (2008) encontrou 78,5% dos cães acometidos pelo vírus da cinomose em animais cuja idade variava de dois a seis meses.

No Rio Grande do Sul, de 3.659 necropsias de caninos realizadas, em 582 (16%) o diagnóstico foi de doenças virais e, entre estas, a cinomose foi responsável por 39% (227/582) dos diagnósticos (SONNE, 2008).

Mais de 50% das infecções nos cães 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 possuem evidências de infecção no sistema nervoso central (SNC) (RUDD et al., 2006).

A transmissão ocorre principalmente por aerossóis e gotículas contaminadas com partículas virais em secreções respiratórias, e também pelas fezes e urina (CORRÊA & CORRÊA, 1992).

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 bronquiais (TIPOLD et al., 1992; VANDEVELDE & ZURBRIGGEN, 1995; MORO & VASCONCELOS, 1998; VANDEVELDE & ZURBRIGGEN, 2005; GREENE, 2006).

Entre 2 a 4 dias pós-infecção, o número de partículas virais aumenta nas tonsilas, linfonodos retrofaríngeos e bronquiais, mas 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 bronquiais. A ampla proliferação viral nos órgãos linfóides induz um aumento inicial na temperatura corporal, entre o segundo e o sexto dia, determinando 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 no tecido nervoso ocorre entre 8 a 10 dias pós-infecção, por via hematogênica e/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).

Títulos intermediários de anticorpos podem proteger o animal da doença sistêmica, mas não são suficientes para bloquear a infecção do SNC (TIPOLD et al., 1992).

Nos cães 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 os títulos de anticorpos aumentam, mas podem persistir por

longos períodos em tecidos uveais, e em 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 à cepa altamente virulenta, dose infectante elevada e/ou sofrer imunossupressão (CORRÊA & CORRÊA, 1992; GREENE, 2006).

Sugere-se 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 em conter a invasão viral no cérebro e na medula espinhal (TIPOLD et al., 1992; SUMMERS et al., 1995; VANDEVELDE & ZURBRIGGEN, 1995).

Os sinais neurológicos 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).

Silva et al. (2007) afirmaram 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 os mesmos também desenvolvem lesões mais crônicas, assim como cães adultos podem desenvolver lesões 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 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 ocorrência frequente 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 pelo líquido. Neste, o agente pode ser encontrado em células mononucleares fundidas com células endimárias (VANDEVELDE & ZURBRIGGEN, 1995). Em contraste, Rudd et al. (2006) encontraram evidências de que o vírus invade o SNC pelo bulbo olfatório nos casos de infecção por via aerógena.

Quando resposta imune antiviral neutralizante está ausente na fase aguda da cinomose, imunoglobulinas da classe IgM anti-vírus aparecem nas duas primeiras semanas da infecção. Apesar da ausência de manguitos perivascularres, numerosas células CD8⁺ são encontradas nas lesões agudas desmielinizantes e também distribuídas difusamente no parênquima cerebral, sendo que estas células não estão correlacionadas com áreas de infecção viral. No líquido destes animais altos títulos de IL-8 foram encontrados, sugerindo que a ativação inicial das células da micróglia serve como precursora da invasão de células T no SNC (VANDEVELDE & ZURBRIGGEN, 2005).

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 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 da imunossupressão viral induzida (VANDEVELDE & ZURBRIGGEN, 1995; GEBARA et al., 2004; GREENE, 2006).

Durante a fase inicial da encefalite a expressão de RNAs mensageiros (mRNAs) e das proteínas virais são elevadas nas áreas afetadas e uma possível consequência é o aumento da produção do Fator de Necrose Tumoral (TNF) pelos astrócitos. A progressão das lesões cerebrais também é sustentada pela abundância do vírus na forma imunorreativa presente nas lesões não inflamatórias, que se caracterizam pela desmielinização. O TNF tem sido evidenciado como causador da destruição de oligodendrócitos e perda de mielina em cães com cinomose (GRÖNE et al., 2000).

Vandeveld & Zurbruggen (1995) sugerem que o fenômeno de desmielinização decorre da infecção de oligodendrócitos, que são células produtoras de mielina. Porém, outros autores observaram que a maioria das células infectadas são astrócitos. Estudos de microscopia eletrônica por estes autores revelaram que a infecção de oligodendrócitos é rara na cinomose, propondo que o vírus causa infecção discreta nos oligodendrócitos, mas que mesmo assim pode ser responsável pelo fenômeno de desmielinização.

Estudo ultra-estrutural revelou microvacuolização e perda de organelas e 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 a 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 relevância na patogênese da desmielinização aguda na cinomose, devido ao aumento difuso da regulação do MHC na substância 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 encefalite multifocal em cães adultos acomete frequentemente animais entre 4 e 6 anos, com curso crônico. A doença não é precedida nem coincide com os sinais sistêmicos que são observados nos cães jovens (CORRÊA & CORRÊA, 1992). O antígeno viral fica restrito a poucos astrócitos. A expressão do MHC classe II é proeminente em todas as células da micróglia, sendo responsável pela desmielinização contínua e disseminada infiltração mononuclear perivascular. As alterações se iniciam com hiperplasia dos astrócitos e proliferação microglial em estruturas subpiais e subependimárias na substância branca. Esta forma também está associada com a concentração elevada de anticorpos antimielínicos, uma provável 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 da bainha de mielina (TIPOLD et al., 1992; SUMMERS et al., 1995; GEBARA et al., 2004; GREENE, 2006; STEIN et al., 2006).

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 podem iniciar as 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 evolução da doença (GRÖNE et al., 2000).

Bürge et al. (1989) demonstrou que os anticorpos antivirais estimulam a produção de radicais livres de oxigênio (ROS) em culturas de células 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, interferindo na produção da mesma.

Nesta fase da doença, nos infiltrados perivasculares do SNC são encontradas células CD8+, CD4+ e linfócitos B, e citocinas pro-inflamatórias, IL-1, IL-6 e IL-12, indicando 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 resulta 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 intensa. 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, também, ao recrutamento de mais leucócitos (GRÖNE et al., 2000).

A desmielinização crônica coincide com a recuperação do sistema imune, entre 6 a 7 semanas pós-infecção, que se apresentam inicialmente nas lesões induzidas pelo vírus no cérebro como manguitos perivasculares linfocitários, plasmócitos e monócitos. A resposta inflamatória nas lesões desmielinizantes pode levar a progressão da destruição tecidual. Citocinas pró-inflamatórias estão aumentadas, mas as citocinas anti-inflamatórias permanecem em níveis normais. É possível que astrócitos, o primeiro alvo do vírus, participem da amplificação da resposta imune (VANDEVELDE & ZURBRIGGEN, 2005).

Lesões crônicas desmielinizantes são caracterizadas pela redução ou possível perda das proteínas virais no tecido nervoso, com aumento da regulação do MHC e infiltração massiva de células CD8+, CD4+ e células B (MIAO et al., 2003; VANDEVELDE, 2004).

O estágio crônico da doença é 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 no processo de desmielinização (TIPOLD et al., 1992; VANDEVELDE, 2004).

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, destrói seletivamente culturas de oligodendrócitos (VANDEVELDE, 2004; VANDEVELDE & ZURBRIGGEN, 2005).

Evidências experimentais apontam que o vírus induz alterações nas funções de macrófagos, que estão em grande número nas lesões de cinomose e possuem papel importante na patogenia da enfermidade. A fagocitose, dependente ou independente de receptores Fc, assim como a habilidade de liberar ROS e a atividade procoagulante dos macrófagos também são alteradas 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, além disso, suportar a hipótese de que a desmielinização “espectadora” ocorra na cinomose crônica (VANDEVELDE & ZURBRIGGEN, 1995).

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

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, culminando com hipertermia até 41°C, anorexia, congestão conjuntival discreta e corrimento seroso ocular e nasal, sendo que geralmente esta fase passa despercebida ao proprietário. Após 2 a 3 dias, se houver progressão do vírus por falta de anticorpos, haverá disseminação viral para as células epiteliais e o segundo pico febril, com sinais característicos (CORRÊA & CORRÊA, 1992).

Poderão ocorrer sinais clínicos digestórios, respiratórios ou neurológicos isoladamente, conjuntamente ou alternadamente. Ocasionalmente surgem sinais neurológicos após 1 a 2 semanas do início dos sinais sistêmicos (CORRÊA & CORRÊA, 1992; GREENE, 2006; AMUDE et al., 2007). As alterações neurológicas podem ter início após 3 a 4 meses, ao final dos sinais sistêmicos (AMUDE, 2008). De acordo com Tipold et al. (1992) o envolvimento sistêmico acontece em um terço dos casos com alterações neurológicas, e a mioclonia é encontrada em apenas metade desses. Ao contrário, Amude (2005) encontrou 40% dos cães com apresentação neurológica sem mioclonias e sem apresentação sistêmica, no momento do atendimento hospitalar, em encefalites causadas pelo vírus da cinomose.

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

No sistema gastrointestinal há ocorrência de vômitos intermitentes, anorexia, diarréia pastosa a líquida, escura, com ou sem presença de sangue, podendo levar a sinais de desidratação nos animais (CORRÊA & CORRÊA, 1992; GREENE, 2006).

Podem ser observadas pústulas na pele do abdomen e, em alguns casos, hiperqueratose dos coxins digitais (GREENE, 2006).

Os sinais neurológicos são múltiplos, decorrentes da replicação viral em neurônios e células gliais, refletindo, desta forma, a distribuição do vírus e das lesões no SNC (TIPOLD et al., 1992; GREENE, 2006).

Animais com apresentação clínica neurológica focal, no diagnóstico *pos mortem* tiveram uma avaliação neuropatológica com lesões multifocais difusas em vários sítios neuroanatômicos. Em contraste, cães com sinais multifocais tinham lesões focais em apenas um sítio neuroanatômico (AMUDE, 2008).

Independente da ocorrência de lesões neuropatológicas, a infecção do sistema nervoso pelo vírus da cinomose pode levar a uma variedade de sinais neurológicos. A infecção pelo vírus determina disfunção molecular dos neurotransmissores nas células nervosas, que pode ser responsável por alguns sinais neurológicos em cães com cinomose, mesmo que as lesões correspondentes em sítios neuroanatômicos estejam ausentes (D'INTINO et al., 2006; AMUDE et al., 2010a).

A cinomose em cães jovens é a forma de apresentação mais comum e é caracterizada por convulsões, sem mioclonias (THOMAS et al., 1993). Em cães adultos com cinomose a convulsão é menos frequente que outros sinais clínicos (THOMAS et al., 1993; AMUDE et al., 2007).

Convulsões e mioclonias são sinais típicos de lesões da substância cinzenta do SNC, ao passo que déficits visuais e dificuldades motoras, são sinais de lesões na substância branca (GREENE, 2006).

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

O vírus da cinomose tem predileção pelo ângulo pontinocerebelo e são observados déficits cerebelares e vestibulares. Esses sinais são observados isoladamente ou associados no mesmo animal. No entanto, a combinação dos sinais é mais frequente (AMUDE et al., 2006; AMUDE et al., 2007; AMUDE, 2008). Os sinais cerebelares e vestibulares podem representar disfunção na camada cinzenta ou na substância branca. As regiões nódulo e flóculo do cerebelo possuem relação com o vestibulo, e os sinais vestibulares podem ocorrer por lesões na substância branca dos pedúnculos cerebelares, que fazem a conexão entre essas duas áreas (AMUDE, 2008; DEWEY, 2006).

Quando há acometimento da medula espinhal, a paresia e incordenação de membros são os únicos sinais neurológicos. As manifestações comuns incluem a doença vestibular com movimento de cabeça, nistagmo, déficits em outros nervos cranianos e da propriocepção. Na doença cerebelar aparecem ataxia com hipermetria e cabeça pendente. Cegueira uni ou bilateral e midríase ocorrem também devido ao 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, ocorre frequentemente em cães que desenvolvem poliencefalomalácia dos 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 na cinomose e podem estar presentes quando não há outros sinais neurológicos. Acometem um músculo ou grupo de músculos, como auriculares, temporais, retro-abdominal e flexores dos membros (CORRÊA & CORRÊA, 1992; TIPOLD et al., 1992; SUMMERS et al., 1995; GREENE, 2006). O mecanismo neural para as mioclonias se origina pela irritação local de neurônios motores da medula espinhal ou de núcleos de nervos cranianos. É considerado um sinal característico da cinomose. Porém, também pode ser observada em outras doenças inflamatórias do sistema nervoso dos cães (TIPOLD et al., 1992; GREENE, 2006).

A resposta hematológica na cinomose varia entre os cães, de acordo com 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 em eritrócitos 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 frequentes na cinomose em cães são linfopenia, em combinação com leucopenia ou leucocitose, anemia, monocitose e raramente trombocitopenia (TIPOLD et al., 1992). O leucograma é mais variável e as infecções bacterianas oportunistas no trato digestório e respiratório determinam 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. Silva et al. (2005) observaram que cães jovens infectados experimentalmente com o vírus da cinomose desenvolveram marcada linfopenia.

Segundo Corrêa & Corrêa (1992) a linfopenia absoluta é causada pela depleção dos tecidos linfóides e depende da característica imunossupressora da cepa viral.

Silva et al. (2005) referiram que a trombocitopenia é achado frequente na doença em cães. Sugerem que na infecção pelo *Morbillivirus* ocorre aumento de anticorpos antiplaquetas e a trombocitopenia é imunomediada com remoção das plaquetas pelo sistema reticuloendotelial.

As inclusões citoplasmáticas denominadas corpúsculo de Lentz ou de 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 na cinomose, 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).

A análise do líquido cefalorraquidiano (LCR) é um dos melhores métodos de diagnóstico das afecções do encéfalo e da medula espinhal. O exame do LCR é indicado em todo animal com doença neurológica na qual não há diagnóstico conclusivo, 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 indicam qualquer anormalidade líquórica nas diferentes fases da cinomose. Por outro lado, o componente protéico e a celularidade líquórica mostraram alterações significativas na presença de sinais neurológicos. Porém, na ausência destas alterações, não adicionam informações suficientes para a detecção precoce de lesões do SNC.

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

No estágio crônico da cinomose, a inflamação determina aumento de proteína (> 25 mg/dL), principalmente representado por IgG-antivírus e aumento da celularidade ($> 10/\mu\text{l}$), com predomínio de linfócitos (CORRÊA & CORRÊA, 1992; TIPOLD et al., 1992; SUMMERS et al., 1995; GREENE, 2006).

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

O prognóstico da doença é reservado na fase sistêmica, pois pode progredir para a fase neurológica. Nesta fase torna-se desfavorável, pois comumente é progressiva, raramente estacionando, levando à morte em curso agudo ou crônico. Os animais que se recuperam podem ficar com sequelas inabilitantes (CORRÊA & CORRÊA, 1992).

Segundo Kim et al. (2006), a combinação de alguns sinais como inflamação conjuntival, secreção respiratória, diarreia e sinais nervosos e curso da doença com três semanas ou mais sugerem diagnóstico presuntivo da cinomose. Em regiões endêmicas para cinomose, a mesma deve sempre ser considerada no diagnóstico de cães com alterações neurológicas, independente do tipo, curso, extensão e natureza da doença (AMUDE et al., 2010a).

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 indicados 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 anteriores e recentes em cães com ou sem vacinação para cinomose. Já 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 oferecer novas técnicas de diagnóstico, Latha et al. (2007) identificaram uma nucleoproteína que 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

se mostrou superior a outros métodos sorológicos, oferecendo alta reprodutibilidade, ausência de reações cruzadas, facilidade de realização em relação à detecção de anticorpos pela imunofluorescência indireta, além disso, esse método não requer o cultivo viral. Pode ser utilizado para detectar o aumento do título de IgG ou níveis de IgM específicos visando monitorar a eficácia do programa de vacinação.

No SNC 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 imunoistoquímica é mais sensível que a histopatologia de corpúsculos de inclusão, considerada complemento do diagnóstico histopatológico.

Sonne (2008) analisou o encéfalo de 54 cães e observou que 29 deles apresentavam alguma lesão microscópica. Na marcação imunoistoquímica dos 54 animais utilizados, 51 cães apresentaram marcação positiva em pelo menos um órgão, demonstrando que 94,4% dos animais com diagnóstico macroscópico e microscópico de cinomose tiveram marcação positiva na imunoistoquímica. É importante ressaltar que, no mesmo estudo, foram encontrados dois animais que não apresentaram alterações microscópicas no cérebro, porém o antígeno viral foi visualizado por teste imunoistoquímico.

No diagnóstico *post-mortem* a imunoistoquímica tem sido utilizada para detectar o gene da proteína do nucleocapsídeo, que é uma proteína interna e mais transcrita em células infectadas, considerado bom indicador de infecção (SHIN et al., 1995). Os astrócitos são as principais células marcadas pela imunoistoquímica para detectar o vírus da cinomose, chegando a 95% de células infectadas (MUTINELLI et al., 1998).

Haines et al. (1999) detectaram o antígeno no epitélio da mucosa nasal, dos coxins digitais e da pele, sugerindo a utilização da técnica de imunoistoquímica para o diagnóstico *ante-mortem* da cinomose.

Na cinomose aguda, com lesões não inflamatórias, encontra-se grande quantidade de antígeno viral no centro das lesões. A medida que a resposta imune começa a agir nas lesões crônicas é mais difícil de encontrar o antígeno viral, podendo resultar em marcação negativa na imunoistoquímica (VANDEVELDE et al., 1985; BOLLO et al., 1986; BAUMGÄRTNER et al., 1989; MULLER et al., 1995).

A técnica de isolamento viral em cultivo celular é altamente específica, porém é demorada e pode resultar em falso-negativo se o animal não estiver na fase aguda da doença. O sucesso da replicação viral ocorre durante o cultivo direto de tecidos infectados do hospedeiro. Culturas de macrófagos detectam o vírus entre 24 a 48 horas, porém foram substituídas pela cultura de linfócitos caninos para o isolamento do vírus. A formação de células gigantes, considerada citopática do vírus da cinomose em várias culturas de tecido, é detectada com dois a cinco dias (BARRETT, 1999; GEBARA et al., 2004).

O diagnóstico de rotina do vírus da cinomose pela imunofluorescência é aplicado em várias amostras, conjuntival, nasal e vaginal, usando anticorpos policlonais ou monoclonais. Este teste é pouco sensível e detecta o antígeno viral somente em infecções com três semanas, quando o vírus está presente em células epiteliais (ELIA et al., 2008 apud APPEL, 1987).

O uso do imunoensaio cromatográfico para pesquisa de antígenos da cinomose foi descrito por Santos (2008). Neste estudo foram utilizados 38 animais saudáveis, sendo que apenas um apresentou positividade no teste rápido.

O diagnóstico da cinomose pode ser realizado de forma rápida e específica utilizando kit comercial de imunoensaio cromatográfico para pesquisa do antígeno do vírus da cinomose na mucosa nasal, saliva, conjuntiva, urina, soro e plasma. Afirma-se que este teste atinja 98,8% de sensibilidade e 97,7% de especificidade, não causando reação cruzada com outras infecções (Antigen Rapid CDV Ag Test Kit®, Bioessay).

A maior desvantagem deste teste é a possibilidade de falso negativo, já que a amostra selecionada pode não conter o antígeno, sendo esta evidência encontrada quando relacionada com a fase da enfermidade, ocorrendo comumente na fase neurológica. Este método não detecta o vírus vacinal, pela baixa titulação nas vacinas, do 1º ao 14º dia após a vacinação (Antigen Rapid CDV Ag Test Kit®, Bioessay).

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 líquido com o teste de imunofluorescência indireta usando anticorpos antivírus (TIPOLD et al., 1992; GREENE, 2006).

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. 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., 2006; SATO et al., 2006; ELIA et al., 2008).

2. RT-PCR

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 detectado o RNA viral pelo RT-PCR em 86% das amostras de soro sanguíneo e 88% de sangue circulante e líquido de cães com cinomose confirmado pela imunoistoquímica. O RNA viral não foi encontrado na imunoistoquímica 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, Sato et al. (2006) afirmam que o soro e o sangue periférico não são boas amostras para a detecção do vírus da cinomose pela 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 inadequado isolamento do RNA viral.

A sensibilidade da técnica da PCR pode variar com a seleção dos “primers”, método de extração do RNA e amostra clínica analisada (AMUDE, 2005). A sequência de genes do vírus da cinomose no sentido 3’ a 5’ é pela proteína do nucleocapsídeo (N), fosfoproteína (P), proteína de matrix (M),

proteína de fusão (F), hemaglutinina (H) e proteína grande (L) (AMUDE et al., 2010b).

A escolha do iniciador (“primer”) gene-específico requer cuidado e conhecimento sobre a replicação dos Paramyxovirus. Genes distais (L, H e F) são os últimos a serem transcritos durante a replicação e genes das proteínas do núcleo (N e P) possuem maior frequência na transcrição. O gene-alvo para a amplificação na RT-PCR deve ser preferencialmente do núcleo para evitar ou minimizar os resultados falso-negativos (AMUDE et al., 2010b).

O sequenciamento dos genes amplificados pela RT-PCR pode levar a classificação das cepas virais do vírus da cinomose e na diferenciação das cepas selvagens ou vacinais (HEADLEY et al., 2009; SCHATZBERG et al., 2009).

A maior vantagem da PCR em tempo real é a habilidade de quantificar partículas virais em amostras clínicas, ao contrário da RT-PCR convencional que é uma análise qualitativa. Alta carga viral foi demonstrada em tecidos linfóides, como tonsilas, baço, linfonodos mesentéricos; vísceras e urina. No SNC, no lobo frontal foi encontrada alta concentração viral, sugerindo ser a área mais sensível para diagnóstico (ELIA et al., 2008).

As amostras de sangue periférico, swab conjuntival, secreção nasal, urina, líquido, e swab vaginal, tecido pulmonar, estomacal, intestinal e urinário, podem ser utilizadas para o diagnóstico de cinomose pela técnica RT-PCR. Entretanto, o swab conjuntival é o mais apropriado para o diagnóstico “in vivo” da cinomose (KIM et al., 2006).

Shin et al. (2004) levantaram a hipótese de utilização do nested PCR para diagnóstico da cinomose. A efetividade da técnica foi demonstrada em amostras de 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 à RT-PCR, mostrou positividade 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 ao 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 o 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 epitélios e a reação de imunofluorescência foi negativa.

3. Tratamento de cães com cinomose e Profilaxia

Ainda não existe tratamento efetivo para a cinomose, o que explica a importância dessa enfermidade em medicina veterinária (TIPOLD et al., 1992; CORRÊA & CORRÊA, 1992; KAJITA et al., 2006).

Apesar de não existirem muitos estudos atuais sobre o assunto, Corrêa & Corrêa (1992) recomendavam a administração de soro hiperimune (gama globulinas específicas) distribuindo-o em vários locais por via subcutânea, em

dose única. A ação do soro hiperimune é, fundamentalmente, de soroneutralização de todos os vírus livres, e que se libertam eventualmente dos tecidos. O soro homólogo permanece ativo no animal por 15 a 30 dias, baixando seu título gradualmente, formando complexos antígeno-anticorpo com o vírus, por metabolização e eliminação progressiva. 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, 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 frequentemente é causada por complicações bacterianas secundárias, devem ser tratados com antimicrobianos de amplo espectro, ativos principalmente contra *Bordetella bronchiseptica*, *Staphylococcus* spp. e *Streptococcus* spp. Os fármacos mais utilizados são amoxicilina, cloranfenicol, florfenicol, cefalosporinas, 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. Podem ser utilizados também expectorantes ou nebulização (CORRÊA & CORRÊA, 1992; GREENE, 2006).

A hidratação dos animais com solução de Ringer, para hidratar e ao mesmo tempo manter o equilíbrio eletrolítico. Pode-se adicionar 2,5 a 5% de glicose ao Ringer e administrar glicose como fonte energética para animais anoréxicos (CORRÊA & CORRÊA, 1992; GREENE, 2006).

Anticonvulsivantes devem ser utilizados, como o fenobarbital na dose de 2 mg/Kg pelas vias intravenosa, intramuscular ou oral, a cada 12 horas. Corticosteróides, como a dexametasona na dose de 2,2 mg/Kg, por via intravenosa, podem ser utilizados devido a base imunopatológica das lesões neuronais e para reduzir o edema cerebral, mantendo a terapia com doses anti-inflamatórias, 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. Na encefalite multifocal progressiva causadora de tetraplegia, semicoma e incapacitação a eutanásia é recomendada (TIPOLD et al., 1992; GREENE, 2006). A mioclonia é 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 terapêuticamente (TIPOLD et al., 1992).

O ácido ascórbico não é só considerado um simples anti-oxidante, mas também neuromodulador do sistema nervoso central (GRÜNEWALD, 1993; REBEC & PIERCE, 1994). Matsumoto et al. (2010) comprovaram que a quantidade de ácido ascórbico no cérebro aumenta em resposta ao excesso de glutamato, que é encontrado em diversos modelos de destruição tecidual, incluindo convulsões induzidas.

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 antialgia e mielopoiese e estimulante de apetite (CORRÊA & CORRÊA, 1992; GREENE, 2006).

No início do século XX as vacinas inativadas eram amplamente utilizadas, porém a cinomose ainda ocorria em cães e animais de zoológico (APPEL & SUMMERS, 1995). A partir dos anos 60, com as vacinas atenuadas houve diminuição considerável na incidência da cinomose em todo mundo (LAN et al., 2006; RIKULA et al., 2007). Vacinas preparadas a partir de passagens em cultura de células de aves e embrião de galinha, ou em células de cães, foram amplamente utilizadas. As vacinas preparadas em cultivo de células de cães induzem imunidade em quase 100% dos cães vacinados (APPEL & SUMMERS, 1995; PARDO et al., 2007). A utilização de vacinas recombinantes (recCDV ou rD) tem sido realizada nos Estados Unidos da América desde 1997, tendo como benefício a não ocorrência de encefalite pós-vacinal (PARDO et al., 2007).

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, 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 a 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 à aplicação subcutânea que tem uma resposta após cinco dias. Porém, a vacinação intravenosa pode ser necessária nos casos emergenciais, como a infecção de um filhote antes da primeira dose de vacina.

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

A variação genética e antigênica na proteína H entre as cepas “novas” e “velhas”, causa dúvidas 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 passa permitir falha na resposta de anticorpos maternos em filhotes não vacinados (MARTELLA et al., 2007).

Negrão et al. (2006) referiu que as falhas vacinais podem ocorrer 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.

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 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 o gene da proteína H quando aplicado no músculo pode induzir a produção de 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 pequena duração da sua imunidade quando comparada com a vacina de vírus vivo atenuado convencional.

4. Ribavirina

O interesse na quimioterapia antiviral iniciou em 1950, quando a pesquisa de agentes antitumorais gerou interesse em inibidores da síntese de DNA e foram produzidos vários compostos capazes de inibir a síntese de DNA viral. Agentes antivirais foram utilizados pela primeira vez com sucesso nos anos 1960, quando Bauer administrando thiosemicarbazone (methisazone) impediu doenças em pacientes expostos à varíola, enquanto 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 busca por novos agentes antivirais. No primeiro momento, foi desenvolvido para ser um análogo a nucleotídeo de pirimidina. Porém, estruturalmente e funcionalmente é mais parecida a guanossina (BEAN, 1992).

Outros autores afirmaram que somente em 1972, Joseph Witkowski e Roland Robins sintetizaram a ribavirina pela primeira vez, pela combinação química dos derivados carboxamida e ribofuranosídeo mostrando que poderia ser um promissor agente antiviral de amplo espectro. A atividade antiviral da ribavirina é especificamente associada a sua estrutura, o que faz com que alterações na ribose ou na base resultam em perda significativa da atividade antiviral (GILBERT & KNIGHT, 1986; LIN et al., 2003).

Atualmente, a forma industrial da produção da ribavirina ocorre pela utilização do genoma da bactéria *Bacillus amyloliquefaciens* cepa TA208 para produção de guanossina, também utilizada para a produção do fármaco pela assimilação da formamida pela fermentação (ZHANG et al., 2011).

Nestas pesquisas iniciais envolvendo agentes antivirais de reduzida eficácia, os fármacos apresentavam apenas efetividade “in vitro”. Entretanto, a ribavirina (1-β-D-ribofuranosyl-1H-1,2,4-triazole-3-carboxamida) foi um agente antiviral que mostrou atividade “in vivo” contra grande variedade de vírus DNA e RNA (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 tem sido avaliados para o tratamento de síndrome respiratória severa aguda e infecção do vírus da varíola, em casos de bioterrorismo (WU et al., 2005).

A ribavirina é usada rotineiramente no tratamento de hepatite C crônica associada com o interferon-alfa (IFN- α). O mecanismo pelo qual a ribavirina contribui junto com o IFN- α na terapia da hepatite C crônica não é muito bem entendido. No entanto, sugere-se que a ação como antiviral, decorra de mutações no RNA, por mecanismos indiretos como aumentar a imunidade mediada por células T frente aos agentes virais, ou por inibição da enzima iósina monofosfato desidrogenase - IMPDH (VOLLMER et al., 2004).

Atualmente a terapia antiviral em pacientes com hepatite C tem sobrevida de aproximadamente de 55% (SUNG, et al., 2011).

A ribavirina é fármaco antiviral, análogo à guanosina, inibidor da replicação *in vitro* de alguns RNA e DNA-vírus, incluindo *Herpesvirus*, *Poxvirus*, Influenza vírus, Parainfluenza vírus, *Reovirus*, *Togavirus*, *Paramyxovirus* e Tumor RNA-vírus. “In vivo”, o espectro antiviral é restrito, com ação contra *Herpesvirus*, *Influenza virus*, *Parainfluenza*, *Paramyxovirus* do Sarampo e *Adenovirus* (HAYDEN & DOUGLAS, 1990).

Até o momento, a ribavirina é o único antiviral aprovado e comercializado disponível para *Arenavirus*. Demonstrou reduzir o número de óbitos quando administrada no início da infecção pelo Vírus da Febre de Lassa (CHARREL et al., 2011). Enria et al. (1987) demonstraram a ação da ribavirina frente a Febre Hemorrágica da Argentina, provando a sua eficácia em casos com poucos dias de sinais clínicos.

No estudo realizado por Cashman et al. (2011), a dose de 25 mg/Kg de ribavirina por via intraperitoneal em cobaias demonstrou atividade antiviral pela redução da viremia e por prolongar a sobrevida frente ao Vírus da Febre de Lassa.

Nenhum antiviral está disponível em dias atuais para o tratamento específico de doenças causadas por Hantavírus. O único antiviral que mostrou alguma atividade “in vitro” e com possibilidade para o uso “in vivo” foi a ribavirina. A eficácia do fármaco depende da fase da infecção e a severidade da doença ao se iniciar o tratamento (CHARREL et al., 2011).

A Organização Mundial da Saúde (WHO) recomenda atualmente o uso da ribavirina como terapêutico para a Febre Hemorrágica da Crimeia-Congo, também descrita como efetiva contra este vírus “in vitro”, embora esta eficácia seja controversa. Bodur et al. (2011) administrou a ribavirina por via oral na dose de 4 g/dia, durante 4 dias, seguido de 2,4 g/dia por mais 6 dias, não havendo eficácia no tratamento desta doença.

A WHO recomenda a dose de 30 mg/Kg como dose inicial, a seguir 15 mg/Kg, a cada 6 horas por 4 dias, e após 7,5 mg/Kg a cada 8 horas por 6 dias para tratamento da Febre Hemorrágica da Crimeia-Congo (ELALDI et al., 2009).

Elaldi et al. (2009) verificaram que a ribavirina não foi capaz de melhorar os quadros de Febre Hemorrágica da Crimeia-Congo. Encontraram neste estudo toxicidade da ribavirina em pessoas que tinham comprometimento renal e

hepático, além de hemorragias. Sugeriram que a ribavirina em altas doses por via oral pode levar a falência múltipla de órgãos em casos severos da doença.

Wright et al. (2005) comprovaram a eficácia da ribavirina em humanos infectados pelo vírus Hendra, também da família *Paramyxoviridae*.

Foi comprovada a eficácia frente à doença de Borna, em gerbis, com a diminuição da replicação viral com doses baixas como 1 mg/Kg, com tratamento de 10 dias após a infecção. Neste mesmo estudo, comprovaram a ação da ribavirina em células da micróglia e a baixa produção de citocinas no cérebro (LEE et al., 2008).

A ribavirina foi testada frente ao Metapneumovírus Humano em infecção de ratos. Neste estudo, o antiviral foi associado a glicocorticóide, demonstrando melhor resultado já que houve diminuição da inflamação nos pulmões. A dose utilizada foi de 40 mg/Kg e a ribavirina demonstrou ação frente ao Metapneumovírus Humano (HAMELIN et al., 2006).

Segundo Gilbert & Knight (1986) existem três possíveis mecanismos de ação da ribavirina: a diminuição na concentração intracelular de guanossina trifosfato (GTP) por uma inibição competitiva da inosina-monofosfato desidrogenase (IMPDH) e duas ações específicas no 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 enzima da célula hospedeira (adenosina-quinase). A ribavirina monofosfato compete inibindo a IMPDH e interfere com a síntese da GTP. Consequentemente, a composição do local do nucleotídeo é marcadamente alterado, impedindo a síntese de ácido nucléico e do RNA viral. A queda da concentração do competidor da guanossina pode potencializar outros efeitos antivirais (HAYDEN & DOUGLAS, 1990; BEAN, 1992; CROTTY et al., 2002; WU et al., 2005). No entanto, quando aumenta a fosforilação ocorre leve diminuição na sua ação antiviral (CHANG & HEEL, 1981).

A ribavirina pode produzir vírus mutantes por imitar os pares de bases adenosina e guanossina, que interagem com a timidina e citosina, no genoma viral. Por isso, a incorporação da ribavirina trifosfato no genoma viral pode induzir uma mutação e levar a um erro catastrófico no vírus. Como um análogo do nucleotídeo de guanossina, a ribavirina trifosfato é incorporada no lugar da guanossina monofosfato produzindo alteração na estrutura para transcrição do RNA viral, contribuindo para a diminuição da translação do genoma viral, chamada de mutagênese letal (CROTTY, et al., 2001; WU et al., 2005). 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 do acúmulo da ribavirina e da ribavirina trifosfato em alguns tecidos.

Segundo Bean (1992) a ribavirina inibe a formação do mRNA, como um passo importante na replicação de muitos vírus. É capaz de inibir diretamente vírus que são dependentes de RNA polimerase, como o Vírus da Influenza. Foi demonstrado que a ribavirina trifosfato pode ser incorporada na polimerase de Poliovírus como um análogo de nucleotídeo. Atua como uma cadeia terminal ("capping") que impede a replicação viral pela formação de mutações. Este mecanismo de ação explicaria seu amplo espectro frente aos RNA vírus (CROTTY et al., 2002).

Entretanto, todos ou nenhum dos mecanismos de ação descritos podem estar acontecendo a qualquer momento, contudo dependem do vírus

infectante. Essa é a principal característica para a melhor inibição e para explicar a falha na detecção de resistência viral (GILBERT & KNIGHT, 1986).

O tratamento do Poliovírus em humanos com ribavirina, em altas doses, resultou em extinção da população pela ação mutagênica letal não gerando vírus resistentes. Quando foi aumentada ainda mais a concentração da droga, foram observadas cepas virais resistentes. A mutação que torna os vírus resistentes ocorre na polimerase, devido a sua baixa taxa de mutações, por isso alguns autores sugerem a combinação de terapias (VIGNUZZI et al., 2005).

No grupo dos *Paramyxovirus* todos os componentes são sensíveis a ribavirina, e o vírus do sarampo o mais sensível (CHANG & HEEL, 1981).

Pacientes com sarampo podem apresentar complicações clínicas como 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 hematoencefálica (PARDRIDGE, 2003). Apenas um estudo revelou a passagem da ribavirina pela barreira hematoencefálica, 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 por via oral é efetiva no tratamento da infecção aguda pelo vírus da hepatite A, sarampo e febre de Lassa (GILBERT & KNIGHT, 1986).

A sua utilização na encefalite subaguda esclerosante (SSPE) causada pelo vírus do sarampo é preconizada por alguns pesquisadores. No estudo de Hara et al. (2003), a ribavirina em associação com o interferon, foi administrada por via intratecal e sua eficácia testada pela PCR em tempo real no líquido. Apesar de não terem observado melhora clínica dos pacientes, não foi encontrado mais o vírus livre no líquido. Assim, os autores sugeriram que o agente poderia estar no parênquima cerebral, já que os pacientes desenvolveram títulos de anticorpos para o vírus do sarampo no líquido. Embora a ribavirina tenha sido capaz de combater o vírus livre no líquido, o micro-organismo continuou a se replicar no parênquima cerebral.

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).

Hosoya et al. (1989) descreveram a eficácia do fármaco frente ao vírus da SSPE e doses de 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. (2008) a ribavirina mostrou-se altamente efetiva na prevenção da replicação do vírus da cinomose “in vitro” em baixas concentrações (6,5-12,5 µg/mL), concordando com os valores encontrados para a inibição do vírus do sarampo.

Ainda segundo estes autores a ribavirina causa mutações no vírus da cinomose que levam a um erro catastrófico no RNA do genoma viral. Pode ser especulado que a ribavirina interfira com a RNA polimerase pela competição com nucleosídeos naturais e produza erro na terminação da cadeia do vírus.

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., 2008).

A ação antiviral "in vivo" depende de alguns fatores como a cepa e dose infectante, a via de infecção, idade e sexo dos animais, e a frequência e via de administração do fármaco (CHANG & HEEL, 1981).

A ribavirina é um antiviral composto de nucleosídeo sintético solúvel em água, com espectro de ação frente a alguns vírus responsáveis por causar encefalite, como sarampo, febre hemorrágica, West Nile, encefalites transmitidas por carrapatos e encefalite japonesa (JEULIN et al., 2009).

Na administração oral, a biodisponibilidade é de aproximadamente 33% a 45% em humanos. O pico plasmático ocorre entre 1 a 2 horas após doses únicas. Até o momento, sabe-se que no líquido é alcançada 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).

No estudo realizado por Ogle et al. (1989) foi administrada ribavirina por via oral para humanos na dose de 10 mg/Kg, três vezes ao dia, por três dias e duas vezes ao dia por seis semanas. Este estudo demonstrou que a concentração de ribavirina no líquido atingiu 48 a 75% do nível sérico após sete dias, e a concentração se manteve entre 25 a 66% do nível sérico durante todo o tratamento.

Na pesquisa realizada por Jeulin et al. (2009), a ribavirina atingiu o cérebro em duas ou três horas após a sua aplicação em ratos, na dose de 40 e 100 mg/Kg, respectivamente, e foi detectada no cérebro após um período de 24 horas.

As condições neuroinflamatórias (incluindo as encefalites) são caracterizadas pela destruição da barreira hematoencefálica e pela abertura das junções pela ação das citocinas secretadas pelos macrófagos e micróglia, permitindo a passagem de outras substâncias, assim como a ribavirina, como comprovado por Jeulin et al. (2009). Os autores relataram que o acúmulo da ribavirina no cérebro de ratos pode ser explicado pela diferença entre os perfis farmacocinéticos dos animais que receberam múltiplas doses, e concluíram que a concentração neste tecido diminuiu vários dias após o término do tratamento mesmo nos animais que receberam apenas uma dose (JEULIN et al., 2009).

Quando administrada por via oral, o tempo de absorção 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 e

o mecanismo de absorção identificado envolve transportadores de nucleotídeos dependentes de sódio (PRESTON et al., 1999).

Lin et al. (2002) afirmaram que a biodisponibilidade da ribavirina quando administrada por via oral em ratos, na dose de 30 mg/Kg, é de 27,1% e o tempo para a concentração máxima foi de uma hora. Já em macacos, na dose de 10 mg/Kg também por via oral, a biodisponibilidade foi de 59,3% com tempo para concentração máxima de duas horas. A meia vida em ratos foi de oito horas e em macacos de 179 horas, quando administrada por via oral. Este estudo demonstrou o quanto é importante trabalhar com o fármaco em cada espécie, devido as características diferentes de metabolismo e excreção.

No estudo de radioatividade, de Lin et al. (2003), foi observado que a ribavirina é excretada principalmente pela urina, com excreção mínima pela bile e 1,4% pelas fezes, da dose intravenosa em ratos e de 0,8% em macacos.

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

A meia-vida no plasma foi observada em cerca de 24 horas, mas uma pequena quantidade do fármaco persiste no plasma por mais de 16 dias (CHANG & HEEL, 1981). A meia-vida de eliminação da ribavirina é de 79 horas em doses simples e pode chegar até 274 a 298 horas quando administradas múltiplas doses, sugerindo que os parâmetros que descrevem a farmacocinética de uma única dose não podem ser aplicados na farmacocinética de várias doses (KRISHNAN & DIXIT, 2011).

Em contraste, nas células do sangue e do fígado, ocorre pequeno acúmulo da ribavirina no cérebro de ratos e macacos. Esta informação indica que a ribavirina é capaz de ultrapassar a barreira hematoencefálica (FERRARA et al., 1981).

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

Estudos que utilizaram administração de altas doses intravenosas de ribavirina em pacientes com SSPE mostraram concentrações líquóricas de 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 da 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 por dia. Estes autores observaram que ocorre melhora da atividade da ribavirina pelas ciclodextrinas, provavelmente relacionada à ação em membranas biológicas, facilitando sua passagem pela barreira hematoencefálica.

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

No estudo realizado por Elia et al. (2008), a ribavirina demonstrou baixa toxicidade na cultura de células Vero, enquanto a citotoxicidade só foi

observada em concentrações 100 vezes maiores que as necessárias para inibir a replicação do vírus da cinomose.

Browne (1978) observou que o aumento da concentração da ribavirina levou ao declínio na síntese de proteínas virais e, concomitantemente, a 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, com exceção da capacidade de inibir a IMP desidrogenase.

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 óbito entre os animais, tampouco obtiveram dose letal devido ao volume da droga a ser injetada.

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 não estimula a mitose de linfócitos humanos “in vitro”. Porém, não afeta a função de leucócitos polimorfonucleares e é capaz de inibir a secreção de mastócitos. No entanto, tem efeito imunossupressor 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, a proliferação de linfócitos e a síntese de ácido nucléico. Pode, suprimir também, 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 possível toxicidade para estas células (HEAGY et al., 1991).

Ning et al. (1998) demonstraram que a ribavirina em concentrações utilizadas “in vivo” inibe quase totalmente a produção de mediadores próinflamatórios como TNF, IL-1 e atividade procoagulante de macrófagos “in vitro” de camundongos BALB/cj. Além disso, a ribavirina diminuiu a produção de IL-4 pelas células Th1/Th2, portanto sem efeito sobre a produção de IFN- γ pelas células Th1. Contudo, os autores concluíram que a ribavirina inibe a produção de mediadores próinflamatórios induzidos pela infecção viral.

Os benefícios da ribavirina estão relacionados com a habilidade de reduzir a ativação de macrófagos e diminuir a produção de citocinas pelas células Th2, mas preservando a produção de citocinas pelas células Th1 (NING et al., 1998).

Segundo Tam et al. (1999), a ribavirina possui uma atividade imunomoduladora capaz de estimular a imunidade celular mediada por células T, favorecendo a eliminação de patógenos virais intracelulares. Por outro lado, Vollmer et al. (2004) afirmaram que a ribavirina não possui efeito sobre as células B ou na secreção de citocinas, sugerindo que este fármaco não apresenta efeito estimulante isoladamente e diminui a secreção de IL-5.

Estudos mais recentes mostram que a ribavirina em doses baixas pode ativar linfócitos B, potencializar linfócitos Th1 e suprimir resposta imune mediada por células Th2. Em altas concentrações inibe a proliferação de linfócitos T e tem efeito imunossupressor, pela inibição do gene que expressa interferon gamma. No entanto, os efeitos indesejáveis de altas doses de ribavirina podem ser solucionados com a administração de guanossina, como é

realizado na Hepatite C crônica, na qual somente em altas doses pode reduzir a replicação viral (RIGOPOULOU et al., 2007).

Thomas et al. (2011) descreveram que a ribavirina é capaz de modular os genes estimuladores de interferon. A ribavirina induz alguns genes antivirais (IRF7 e IRF9) que têm mostrado ser importante na resposta antiviral pela produção de interferon endógeno. Estimulando estes genes, a ribavirina amplificou a resposta imune pela produção de interferon. Esta ação é dose dependente e foi encontrada na concentração mais baixa de 1 a 3 µg/mL na cultura celular.

A ribavirina foi utilizada com o tiazofurin como possível imunomodulador na encefalite autoimune experimental, que simula a esclerose múltipla em humanos. O efeito de reduzir GTP pela inibição de IMPDH é mais potente em linfócitos do que em outros tipos celulares. Neste estudo a dose utilizada foi de 30 mg/Kg, por via intraperitoneal, diariamente, por 15 dias. Pela inibição da IMPDH, a ribavirina e tiazofurin demonstraram efeito antiproliferativo de linfócitos, incluído células T que são as principais causadoras da resposta inflamatória no sistema nervoso central. Os autores demonstraram também que a associação destes fármacos pode causar uma resposta na micróglia, provavelmente indireta, como resultado da supressão de células T e macrófagos. Portanto, não se pode excluir a ação dos fármacos na micróglia diretamente, já que foi comprovado que a ribavirina e o tiazofurin são capazes de ultrapassar a barreira hematoencefálica. O tratamento também preveniu o aparecimento de lesões desmielinizantes, e não foi encontrada leucopenia associada com o protocolo terapêutico (STOJKOV et al., 2008).

A aplicação clínica da ribavirina mostra restrições devido a alguns efeitos adversos, especialmente indução de anemia hemolítica. O acúmulo dos fosfatos 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, seguida em humanos, roedores e cães (LIN et al., 2003).

A anemia ocorre em 30% dos casos tratados e resulta em 9% a 22% de pacientes que necessitam a redução da dose para continuar o tratamento. A ocorrência de anemia está relacionada com a dose de ribavirina, função renal e a idade do paciente (SUNG et al., 2011).

Segundo Krishnan & Dixit (2011) 54% dos pacientes tratados com 1000 a 1200 mg/dia de ribavirina apresentam uma queda de hemoglobina abaixo de 3 g/dL. Essa queda da hemoglobina leva a redução da dose, o que compromete significativamente a resposta ao tratamento para Hepatite C. Esse efeito é relatado devido a capacidade de células vermelhas de primatas 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 metabólitos diminuem os níveis de ATP intracelular, resultando na perda da integridade dos eritrócitos por desestabilização da membrana que pode causar 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. As mudanças na concentração de ribavirina celular são inversamente proporcionais às alterações nos níveis de hemoglobina (INOUE et al., 2004; HITOMI et al., 2011).

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, e que 74% da ribavirina dos eritrócitos eram metabólitos fosforilados, os quais não foram encontrados no plasma. A partir deste estudo, os autores sugeriram que o fármaco é transportado para o interior dos eritrócitos por um transportador de nucleotídeos presente na membrana celular.

A variação genética que resulta na deficiência da enzima inosina trifosfato (ITPA) foi descoberta recentemente por proteger pacientes contra a anemia induzida pelo uso da ribavirina. A deficiência de ITPA leva ao aumento de inosina trifosfato nas hemácias, que interfere com a atividade da ribavirina trifosfato e diminui sua ação hemolítica. A partir destes resultados, novas intervenções terapêuticas foram instituídas com objetivo de suprimir ITPA, reduzir a anemia induzida pela ribavirina e a descontinuidade do tratamento por esta causa (FELLAY et al., 2010).

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

Ratas prenhes tratadas com ribavirina desenvolveram deformações embrionárias no esqueleto, podendo levar até a reabsorção fetal. Por isso, a ribavirina é contraindicada em mulheres grávidas (BEAN, 1992). De acordo com a Food and Drug Administration, a ribavirina também é contraindicada para os parceiros de mulheres grávidas. É imperativo evitar a gravidez durante o tratamento e até seis meses do término da terapia. Foi observado também que a ribavirina causa toxicidade testicular (SUNG et al., 2011).

Outros efeitos foram reportados, como prurido, erupção cutânea aguda, náuseas, depressão, tosse e sinais respiratórios em humanos (HAYDEN & DOUGLAS, 1990; SUNG et al., 2011).

Shah et al. (2010) demonstraram que a ribavirina não causou efeito citotóxico em culturas celulares diferentes. No entanto, estes autores demonstraram que o vírus da estomatite vesicular e o vírus Sendai foram resistentes a ação da ribavirina conforme a cultura celular em que foram mantidos. Os autores relacionaram essa atividade de resistência do fármaco com a baixa capacidade de acúmulo dentro da célula, dependente do tipo de metabolismo. Foi comprovado que a ribavirina tem mecanismo de ação diferente em cada tipo celular, pela capacidade de acúmulo dos fosfatos. Estes resultados sugerem que outros vírus que foram testados "in vitro" para detecção do mecanismo de ação devem ser reavaliados conforme o tipo celular usado.

5. Aplicações da Ribavirina na Medicina Veterinária

A ribavirina oral piorou as condições de gatos experimentalmente infectados com Calicivírus. Supressão da medula óssea, perda de peso, aumento de enzimas hepáticas e icterícia foram observadas. Porém, esses efeitos adversos não foram observados em cães que receberam 60 mg/Kg do fármaco durante duas semanas (PAPICH et al., 2003).

Em estudo recente foi estudada em cultivo celular a ação da ribavirina frente ao Calicivírus felino. Foi observada inibição da replicação viral em até 99,9% em altas concentrações (OKA et al., 2011).

Embora a atividade da ribavirina tenha sido relatada anteriormente frente ao vírus da cinomose (SCAGLIARINI et al., 2006; ELIA et al., 2008), o mecanismo de ação não é totalmente elucidado. Dal Pozzo et al. (2010) utilizaram um composto (EICAR), semelhante a ribavirina, frente ao vírus da cinomose, que demonstrou toxicidade nove vezes maior que a ribavirina em células Vero e melhor atividade antiviral. O mecanismo de ação é provavelmente pela mutagênese letal, causando erro catastrófico no genoma viral.

Mangia (2008) utilizou pela primeira vez testou a ribavirina em cães naturalmente infectados com o vírus da cinomose da região de Botucatu, SP. Todos os animais apresentavam a fase neurológica da doença e foram tratados com 30 mg/Kg de ribavirina por via oral, a cada 24 horas, durante 15 dias. Nenhum animal apresentou sinais de efeitos colaterais como descrito na terapia em humanos com o mesmo fármaco.

Mangia et al. (2011) relatou a eficácia do tratamento com ribavirina na dose de 30 mg/Kg, por via oral, a cada 24 horas, durante 15 dias em caso de encefalite aguda em cão pelo vírus da cinomose, quando associada ao DMSO na dose de 1 g/Kg, por via intravenosa, a cada 24 horas.

6. Prednisona

Desde 1949, os glicocorticóides têm sido utilizados no tratamento de doenças inflamatórias e apesar dos efeitos indesejáveis ainda são considerados como um dos mais potentes anti-inflamatórios (CROXTALL et al., 2002).

Na década de 50, alterações na estrutura do cortisol resultaram em novos fármacos, como a prednisona e prednisolona. Assim, as modificações estruturais dos esteróides sintéticos ampliaram a duração e a potência do efeito dos glicocorticóides, bem como propiciaram diferentes afinidades e tempo de ligação aos seus receptores (LONGUI, 2007).

Os glicocorticóides são esteróides lipofílicos, com biodisponibilidade entre 60 e 100% quando administrados por via oral. A concentração plasmática depende, em boa parte, da capacidade de ligação às proteínas séricas, como a transcortina e albumina (LONGUI, 2007). Por possuírem característica lipofílica passam de forma passiva para o citoplasma das células até chegarem ao receptor glicocorticóide (VAN DEN BRANDT et al., 2007).

Os glicocorticóides possuem amplo espectro de indicações terapêuticas, podendo ser utilizados de forma substitutiva em casos de insuficiência adrenocortical ou no diagnóstico de doenças como a síndrome de Cushing. Podem, ainda, ser empregados no tratamento agudo da hipoglicemia ou da hipercalemia. São capazes de induzir maturação celular (pneumócito tipo II), diferenciação celular (linhagens da crista neural) ou mesmo a morte celular por apoptose, o que permite seu uso no tratamento de tumores, especialmente os de linhagem hematopoiética. Porém, os glicocorticóides têm seu papel central no tratamento de doenças nas quais estejam envolvidos mecanismos imunes e inflamatórios (LONGUI, 2007).

A dexametasona, prednisona, cortisona e hidrocortisona possuem propriedades antiinflamatórias e imunossupressoras, e são usados comumente como agentes terapêuticos de afecções como asma, neurite óptica, dermatite atópica e colite ulcerativa, além de outras doenças inflamatórias (FTICH & VAN DE BEEK, 2008).

A ativação da proliferação e a morte de células do sistema imune são controladas por uma variedade de fatores: interação direta célula a célula, citocinas secretadas pelas células do sistema imune e os fatores relacionados com sistema neuroendócrino. Os glicocorticóides são os reguladores mais estudados do sistema neuroendócrino e são reconhecidos por inibir a proliferação de linfócitos T e a produção de uma variedade de citocinas, incluindo interferon- γ (IFN). A interleucina-7 (IL-7) age mantendo a população policlonal de linfócitos T imaturos e as células T de memória, e, portanto, controla o tamanho do estoque de células T (TALAYEV et al., 2005).

A dexametasona, análogo sintético do grupo dos glicocorticóides, usada por Talayev et al. (2005) foi capaz de aumentar a proliferação de células T e inibir a produção de IFN- γ . Os autores relataram que houve diminuição na concentração das células T imaturas e as células de memória não acompanharam o aumento da morte celular. Neste estudo foi comprovado que a IL-7 inibiu a apoptose causada pela dexametasona em células progenitoras de timócitos, timócitos CD4⁺, CD8⁺ e em células T periféricas e maduras (VAN DEN BRANDT et al., 2007).

A superexpressão do receptor glicocorticóide está relacionada com a linhagem de células T, visto que o nível de receptores nestas células é duas vezes maior. Esta superexpressão é acompanhada por moderado aumento na sensibilidade aos glicocorticóides, redução do timo e do estoque de células T (VAN DEN BRANDT et al., 2007).

Van Den Brandt et al. (2007) descreveram que os glicocorticóides induziram células CD8 α a formarem linfócitos T CD4⁺ e causaram apoptose de timócitos, mas mantendo as células T maduras do sangue periférico, mimetizando uma proliferação hemostática. Os autores concluíram também que os glicocorticóides não são responsáveis pela involução do timo, e sugeriram que os glicocorticóides não interferem na maturação de células T, mas atuam na polarização da resposta imune adaptativa.

Os glicocorticóides também inibem a expressão dos mediadores inflamatórios dos macrófagos e de outras células. Desta forma são usados no tratamento de várias doenças inflamatórias imunomediadas (ABRAHAM, et al., 2006).

Barnes (1999) referiu que a ação antiinflamatória de certos glicocorticóides ocorre pela interação na transcrição. Croxtall et al. (2002) afirmaram que a ação genômica ou não dos glicocorticóides não são dependentes da dose, mas sim por vias ativadas pelo receptor para glicocorticóides em diferentes tipos celulares.

O receptor de glicocorticóides é uma estrutura protéica codificada pelo gene do receptor de glicocorticóide. É característica da família de receptores nucleares, os quais são proteínas multifuncionais que traduzem o sinal determinado pelo seu hormônio ligante. Estes receptores possuem funções que ocorrem em três níveis: recrutando os fatores de transcrição, modulando a ação dos fatores de transcrição independente da ligação ao DNA e modulando

a estrutura da cromatina, permitindo a ligação de outras proteínas reguladoras ao DNA (FARIA & LONGUI, 2006).

A resposta fisiológica e a sensibilidade aos glicocorticóides variam amplamente entre as espécies, os indivíduos, os tecidos, os tipos celulares e até mesmo durante as fases do ciclo de uma mesma célula. Muitas condições patológicas também estão relacionadas aos estados de resistência ou de hipersensibilidade aos glicocorticóides, e vários fatores influenciam a cascata de eventos que leva à modulação da sensibilidade aos glicocorticóides (FARIA & LONGUI, 2006).

Considerando que a maior parte dos efeitos dos glicocorticóides é mediada pela ativação de seus receptores, um dos principais determinantes da responsividade e da sensibilidade a estes hormônios é a densidade intracelular do receptor (FARIA & LONGUI, 2006).

A resposta de uma célula exposta a um glicocorticóide advém de diversos fatores moduladores, tais como a concentração do hormônio livre, a potência relativa do hormônio e a habilidade da célula em receber e traduzir o sinal hormonal (FARIA & LONGUI, 2006).

Os glicocorticóides possuem dois tipos de mecanismos de ação, genômico e não genômico, que atuam em vários tecidos, inclusive o cérebro, que pode desencadear respostas eletrofisiológicas, metabólicas, secretórias e inflamatórias. A via não genômica é mais rápida e pode levar segundos a minutos para ser detectada (LOPES et al., 2008).

A cascata de eventos que leva à transativação ou à transrepressão gênica pelos glicocorticóides inicia-se com o hormônio lipofílico cruzando a membrana citoplasmática da célula-alvo. O complexo hormônio-receptor-elemento de resposta hormonal modula a transcrição de genes-alvo dos glicocorticóides, positiva ou negativamente, na dependência do contexto do promotor e da participação de proteínas co-ativadoras ou co-repressoras (ABRAHAM et al., 2006; FARIA & LONGUI, 2006).

Os receptores ativados são capazes de agir especialmente como homodímeros, ligando-se à dupla fita do DNA em uma sequência específica de seis nucleotídeos (hexâmeros). Os receptores também modulam a ação dos fatores de transcrição independente de ligação direta ao DNA, por meio de interações diretas proteína-proteína com outros fatores de transcrição (FARIA & LONGUI, 2006).

Os glicocorticóides são capazes de induzir resposta rápida e sustentável na expressão da fosfatase 1 de especificidade dupla (DUSP1) em vários tipos celulares, incluindo células mielóides e seus precursores. DUSP1 é uma fosfatase capaz de inativar a proteínquinase ativadora da divisão celular e também as vias c-Jun N-terminal quinase (JNK) e p38 MAPK, que contribuem para a expressão de mediadores inflamatórios no momento da transcrição e após a transcrição. DUSP1 é um importante regulador negativo da resposta inflamatória, e a indução da expressão deste gene é o mecanismo de ação dos glicocorticóides (ABRAHAM et al., 2006).

Abraham et al. (2006) afirmaram que a dexametasona foi capaz de estimular a expressão DUSP1, conseqüentemente levou a inibição do JNK e p38 MAPK. Essa regulação da expressão do gene é independente da dimerização do receptor de glicocorticóides. Os autores detectaram também que a ciclo-oxigenase 2 (COX-2), IL-1 α , IL-1 β , INF- γ e TNF foram fortemente inibidos pela dexametasona.

Existem também os efeitos não genômicos dos glicocorticóides, os quais determinam redução da ação histamínica, diminuição da síntese de prostaglandinas (diminuem a fosfolipase A2) e da ativação do plasminogênio (LONGUI, 2007). Outros efeitos não genômicos foram documentados principalmente para a vitamina D3, a progesterona e a aldosterona. Parecem envolver os sistemas de segundos-mensageiros, incluindo a proteína quinase C, os níveis intracelulares de cálcio e de óxido nítrico e tirosina quinase (FARIA & LONGUI, 2006).

A ação do glicocorticóide no sistema imune ocorre em vários pontos, culminando com o desvio da resposta para um padrão T *helper* 2 (Th2), com características antinflamatórias dependentes do aumento de citocinas como as interleucinas IL-1, IL-4, IL-5, IL-6, IL-10, IL-13 e o fator estimulador de colônias provenientes de granulócitos e macrófagos. Induz ainda a secreção do fator transformador de crescimento, capaz de reduzir a ativação de linfócito T e a proliferação celular. Os glicocorticóides são capazes de inibir citocinas pró-inflamatórias, como as interleucinas IL-2 e IL-12, o interferon gama e o fator de necrose tumoral, bem como moléculas de adesão, como a lipocortina-1, moléculas de adesão vascular e as moléculas de adesão intercelular, ou ainda enzimas, como a sintase induzida pelo óxido nítrico, a cicloxigenase (COX2) e a fosfolipase (PLA₂) (LONGUI, 2007).

Vários aspectos do processo de inflamação envolvem o excesso de produção de metabólitos eicosanóides, como as prostaglandinas. Estas são formadas pela ação das enzimas PLA₂ da membrana fosfolipídica e com subsequente conversão da liberação de ácido araquidônico pelas enzimas da COX. A atividade das enzimas PLA₂ e a expressão de COX não são os únicos pontos de controle que regulam a inflamação, mas são importantes para a intervenção terapêutica. Croxtall et al. (2002) afirmaram que os novos glicocorticóides como mometasona, fluticasona, budesonide, dipropionato de beclometasona e prednisolona não possuem efeito significativo na produção de ácido araquidônico e na atividade das enzimas PLA₂. Entretanto, inibem a atividade de expressão de COX.

A supressão de prostaglandinas inflamatórias ocorre pela inibição dos seus precursores, o ácido araquidônico, catalizado pela PLA₂, pelo mecanismo citolítico envolvendo o receptor de glicocorticóides, sem envolvimento genômico (LOPES et al., 2008).

No SNC, os glicocorticóides induzem a síntese e a liberação retrógrada de endocanabinóides, que fazem a supressão da excitação sináptica de células neuroendócrinas supraópticas e paraventriculares. Além dos neurônios, os endocanabinóides possuem os receptores canabinóides em células do sangue e células inflamatórias. Os endocanabinóides são derivados de ácidos graxos do metabolismo não oxidativo do ácido araquidônico e estão envolvidos na resposta inflamatória e são estabilizadores de membranas em processos apoptóticos (LOPES et al., 2008).

Os endocanabinóides podem ser neurotransmissores incomuns, não são armazenados em vesículas e são sintetizados a partir da membrana fosfolipídica e desta forma atravessam facilmente a membrana da célula e agem nas regiões pré e pós-sinápticas. Agem causando supressão momentânea de liberação de GABA, gerando assim supressão da despolarização da sinapse de inibição. Esta ação está relacionada com o receptor celular e pode ser diferente nas diversas áreas do cérebro. No

hipotálamo e em outras áreas cerebrais foi descrita ação similar, porém com supressão da sinapse glutamatérgica excitatória (LOPES et al., 2008).

O ácido araquidônico serve como precursor para prostaglandinas, leucotrienos, tromboxanos, endocanabioides, mediadores e reguladores da inflamação e neurotransmissores. No sistema nervoso a resposta inflamatória, pela liberação de ácido araquidônico, passa a ser pela liberação de neurotransmissores, neuromoduladores e neuropeptídeos (LOPES et al., 2008).

A prostaglandina E_2 demonstra atividade glutamatérgica na sinapse do hipocampo que é revelada pelo aumento na frequência de correntes excitatórias pós-sinápticas. Esse aumento da transmissão excitatória sináptica leva a efeitos neurotóxicos, sugerindo que o metabolismo oxidativo de endocanabioides pela COX_2 pode contribuir para neurodegeneração induzida pela inflamação. Os glicocorticóides inibem a oxidação dos endocanabioides pela COX_2 , servindo como neuroprotetores, reduzindo a neurotoxicidade durante a inflamação ou após a ativação de circuitos neuronais excitatórios (LOPES et al., 2008).

Os efeitos neuroprotetores da metilprednisolona tem sido atribuídos a captura de radicais livres quando administrados em altas doses (CROXTALL et al., 2002).

Segundo Fitch & Van De Beek (2008) a terapia com esteróides é recomendada na redução da ativação inflamatória nas doenças infecciosas do SNC.

Alguns trabalhos relatam que em enfermidades autoimunes do SNC, em modelos experimentais humanos e animais, os glicocorticóides não foram eficazes (SORRELLS & SAPOLSKY, 2007).

Os glicocorticóides sintéticos, como a dexametasona, mostraram pouca capacidade de atravessar a barreira hematoencefálica. Porém, são carregados por globulinas e demonstraram afinidade pelo receptor glicocorticóide ao contrário do receptor mineralocorticóide, como acontece com o cortisol. Desta forma é possível explicar as diferenças no mecanismo de ação entre glicocorticóides endógenos e sintéticos em processos inflamatórios do SNC (SORRELLS & SAPOLSKY, 2007).

A integridade da barreira hematoencefálica é alterada em várias desordens neurológicas. As estratégias terapêuticas de várias enfermidades incluem o tratamento com o glicocorticóide, mas a base molecular de como os glicocorticóides regulam a permeabilidade da barreira hematoencefálica ainda não é totalmente entendida (FÖRSTER et al., 2005).

No estudo de Förster et al. (2005) foi desenvolvido um sistema de cultura celular que representasse a barreira hematoencefálica "in vitro", onde o gene "occludin" (proteínas de junção intercelular) endógeno pode ser induzido pelos glicocorticóides "in vitro", sem a necessidade de cultivo em outros tipos celulares, com a formação da barreira principal. A hidrocortisona foi escolhida para induzir significativamente as propriedades da barreira e pelas alterações encontradas na morfologia. Calcula-se que 50% destes fármacos sejam capazes de atravessar a monocamada.

Os mecanismos moleculares no fechamento da barreira pelos glicocorticóides foram elucidados por Förster et al. (2005). Foi observado que os glicocorticóides podem atuar diretamente na transcrição pela interação específica na sequência de DNA do gene "occludin". Neste mesmo estudo, os

glicocorticóides de forma dose-dependente aumentaram a transcrição do RNAm do "occludin" e da proteína de células endoteliais de capilares do cérebro. Esta é a primeira descrição da ação direta de glicocorticóides na regulação da expressão de componentes juncionais.

Em revisão realizada por Sorrells & Sapolsky (2007), concluiu-se que em ambos os sistemas nervoso e imune periférico, a exposição prévia ao estresse ou ao glicocorticóide pode resultar na produção de resposta imune a uma subsequente inflamação. No sistema nervoso, a administração crônica de glicocorticóides ou o estresse não são uniformemente anitnfamatórios e, em algumas circunstâncias, agem aumentando o processo inflamatório. Assim, foi observado aumento da migração de células inflamatórias, pelo nível de mediadores inflamatórios e pela ativação do fator de transcrição. No sistema nervoso lesado, em níveis basais ou de baixo estresse possuem efeito tradicional antinflamatório. Esta resposta é oposta à encontrada no sistema imune periférico. Outra conclusão encontrada foi que os efeitos pró-inflamatórios no cérebro são diferentes conforme a região, o uso de sintéticos versus glicocorticóides endógenos e o tempo de exposição ao glicocorticóide no que diz respeito a resposta inflamatória.

Os glicocorticóides podem ter efeitos opostos simultaneamente na injúria do córtex e do hipotálamo, que podem estar relacionados com diferenças no efeito do complexo glicocorticóide e receptor, de interações com outros componentes de transcrição de genes ou de mecanismos completamente independentes do genoma. Outra hipótese para os glicocorticóides agirem de formas diferentes no cérebro pode ser a diferença na concentração de receptor glicocorticóide e receptor mineralocorticóide em neurônios, micróglia e células endoteliais vasculares (SORRELLS & SAPOLSKY, 2007).

Níveis basais e efeitos permissivos dos glicocorticóides são a prevenção da morte de neurônios, aumento da plasticidade sináptica e melhora da cognição dependente do hipocampo. Entretanto, o uso prolongado de glicocorticóides pode causar efeitos deletérios, incluindo o prejuízo da cognição e da plasticidade sináptica, inibição da neurogênese, atrofia dos prolongamentos dendríticos e redução da densidade da medula espinhal. Esta ação prejudicial piora quando há lesão prévia de neurônios, comprometendo a habilidade de sobrevivência destas células no hipocampo, córtex e núcleo estriado a uma variedade de lesões, incluindo hipóxia/isquemia, convulsões, hipoglicemia, geração de radicais livres de oxigênio, peptídeo beta-amilóide e a glicoproteína do HIV. Os efeitos deletérios são exacerbados pelo fato que estas lesões estimulam a secreção de mais glicocorticóides, elevando a concentração cerebral dos mesmos (SORRELLS & SAPOLSKY, 2007).

O uso de glicocorticóides para lesões no SNC pode ser deletério. Porém, estes efeitos são compensados com a diminuição da inflamação pela administração crônica. Os efeitos benéficos para o processo inflamatório acontecem pelo bloqueio dos receptores de TNF- α e pela inibição da proliferação de astrócitos no local da morte de neurônios. O fato é que altas concentrações de glicocorticóides aumentam a extensão da neurotoxicidade e da resposta inflamatória nos locais lesados (SORRELLS & SAPOLSKY, 2007).

A região CA3 do hipocampo é local mais estudado em pesquisas de uso prolongado de glicocorticóides por ser a primeira área que demonstra reestruturação dendrítica. Conrad et al. (2007) confirmaram a hipótese que a retração dendrítica da região CA3 pode levar a vulnerabilidade do hipocampo

às neurotoxinas e comprometimento dos neurônios com uso prolongado de glicocorticóides.

Fitch & Van De Beek (2008) recomendaram o uso dos esteróides como adjuvantes no tratamento de meningites bacterianas em todos os pacientes, crianças ou adultos, desde que não apresentem choque séptico. Em pacientes com meningite bacteriana, os esteróides devem ser administrados antes ou junto com a terapia antimicrobiana. Recomenda-se a dexametasona na dose de 0,4 a 0,6 mg/Kg por dia.

Os esteróides são recomendados também na meningite tuberculosa por reduzir o edema cerebral e a morte dos pacientes. Foi realizado estudo grande, prospectivo, controlado e randomizado com 141 crianças com meningite tuberculosa que foram tratadas com prednisona, e este tratamento proporcionou uma melhora na sobrevida e um resultado melhor na manutenção intelectual, sem contar que houve resolução na produção de exsudato basal e dos tuberculomas pela tomografia computadorizada. O uso de esteróides passou a ser recomendado na meningite tuberculosa, porém após o início do tratamento com as drogas antituberculosas (FITCH & VAN DE BEEK, 2008).

Corticosteróides podem ser utilizados devido a imunopatologia das lesões neuronais e para reduzir o edema cerebral causados pelo vírus da cinomose, mantendo a terapia com doses antiinflamatórias. A imunossupressão causada pelos esteróides é a principal desvantagem, porque a resposta inflamatória é responsável por combater o vírus. A terapia com glicocorticóides com dosagens antiinflamatórias pode ter algum sucesso no controle da 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 (TIPOLD et al., 1992; GREENE, 2006).

Certos efeitos indesejáveis sistêmicos pelo uso de glicocorticóides são relatados, como a redução da massa óssea e muscular, necrose asséptica de cabeça de fêmur e úmero, disfunção hipofisária e gonadal, hipertensão, diabetes, intolerância aos carboidratos, hipocalemia, alcalose metabólica, calculose renal, pancreatite aguda, infiltração gordurosa do fígado, hepatomegalia, erupções de pele, hiperpigmentação, leucocitose, linfopenia, eosinopenia, monocitopenia, supressão da hipersensibilidade tardia, supressão da resposta antigênica primária, catarata subcapsular posterior, glaucoma, distúrbio do sono e insônia, irritabilidade, pseudotumor cerebral, nefrocalcinose, nefrolitíase e aumento no peso corporal por deposição de gordura, que em geral estão relacionados ao tempo de tratamento e uso de glicocorticóides de ação mais prolongada (CROXTALL et al., 2002; LONGUI, 2007).

Os análogos sintéticos de corticóides podem causar distúrbios gastroduodenais com mais frequência que os hormônios naturais, como hidrocortisona e cortisona. Verifica-se que a incidência de complicações atinge a 6,4% dos pacientes na administração de hidrocortisona e 30% nos que são mantidos tratados com prednisona ou prednisolona (BOLAND & HEADLEY, 1958).

A partir de 1955 os autores começaram a prescrever preparações antiácidas junto com prednisona e prednisolona. E, nos estudos após essa mudança, os sinais digestórios apareceram em 18% dos pacientes. Concluíram que o desenvolvimento de manifestações digestórias foi influenciado pela

quantidade da dose administrada, pelo tempo de administração e pela susceptibilidade do indivíduo (BOLAND & HEADLEY, 1958).

Em 1958, foi sugerido por Boland & Headley que prednisona e prednisolona aumentam cerca de duas vezes a secreção de ácido clorídrico, quando esses fármacos são administrados em doses antiinflamatórias. Neste mesmo estudo o uso de antiácidos foi suficiente para reduzir a severidade e a frequência de sinais digestórios.

7. Dimetil Sulfóxido (DMSO)

O registro histórico do DMSO foi iniciado em 1867 quando o químico russo, Alexander Saytzeff descreveu a oxidação do dimetil sulfide, identificou o produto e descreveu propriedades solventes do produto. Houve pouco interesse nas descobertas até 1950, quando essas propriedades foram exploradas em vários processos industriais. Pesquisadores de indústrias descobriram que o fármaco servia como solvente para vários herbicidas, fungicidas, antimicrobianos 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 pela pele, sendo necessário cuidado no manuseio e conhecimento das soluções ou compostos com potencial tóxico. Também é capaz de 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 pioneiros 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).

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 FDA permitiu 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).

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 fármacos nucleotídeos por membranas celulares.

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

Classificado como solvente seguro (Classe J), o DMSO tem sido usado no tratamento clínico de várias afecções em humanos, porém é mais utilizado “in vivo” para a administração de substâncias insolúveis e como veículo de certos fármacos (SANTOS et al., 2003).

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

A partir de 1964, o DMSO passou a ser amplamente estudado e utilizado em várias pesquisas científicas. 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 antiinflamatória, 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 observado 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.

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

Nos relatos de Nagel et al. (2007) o DMSO demonstrou efeitos neuroprotetores em ratos em diferentes doses quando administrado antes e depois da isquemia de 24 horas. Estes autores mostraram também que houve atenuação na destruição da barreira hematoencefálica. A ação ocorre frente a formação de ROS em locais sem fagocitose de forma que o DMSO diminui o estresse oxidativo dos tecidos infartados e dos circunvizinhos.

As propriedades antioxidantes atribuídas ao DMSO representam um problema quando este composto tem o objetivo de ser usado como solvente no desenvolvimento de novas drogas antioxidantes e um substituto orgânico ainda não foi encontrado. A limitação passa a ser crucial na produção/captura de radicais livres de oxigênio liberados na fisiopatologia das desordens neurodegenerativas (BARNHAM et al., 2004; GELLA & DURANY, 2009; JELLINGER, 2009) e levam à eficácia atribuída aos fármacos antioxidantes no tratamento destas doenças (SUÁREZ et al., 2011).

O DMSO possui efeito antioxidante capaz de reduzir a peroxidação de lipídeos induzida pela combinação de íons de ferro e peróxido de hidrogênio em cérebros de ratos. Esse mecanismo é descrito pela habilidade de capturar radicais hidroxil (HALLIWELL et al., 1987; BEKTASOGLU et al., 2006; SUÁREZ et al., 2011).

Suárez et al. (2011) comprovaram pela primeira vez que o DMSO é capaz de reduzir a liberação de grupos carbonil de proteínas pela mistura química de íons de ferro e peróxido de hidrogênio no cérebro de ratos. Essa inibição ocorreu de forma dependente da concentração, o que favoreceu as suas propriedades antioxidantes.

Em situações clínicas, benefícios antiinflamatórios 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. Certo 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 a proliferação de fibroblastos, que pode ser importante nas condições crônicas (BRAYTON, 1986).

Koo & Kim (2009) relataram pela primeira vez o efeito inibitório da degranulação de mastócitos como nova atividade biológica para o DMSO. Estes achados sugerem que o DMSO tem atividade antialérgica em concentrações específicas, e estes resultados poderiam explicar as propriedades antiinflamatórias atribuídas ao fármaco.

No entanto, Randhawa (2006) descreve que é uma substância relativamente tóxica e sua aplicação tópica pode causar dermatite irritante e reação urticariforme de contato que não é mediada por reação imunológica e sugere a liberação da histamina pela ativação de mastócitos.

A despeito de todas as propriedades apresentadas pelo DMSO, poucos estudos tem utilizado o fármaco como carreador de drogas. Paes (1999) utilizou o DMSO visando aumentar o poder de penetração da isoniazida em lesões tuberculosas de bovinos e, provavelmente, também para melhor penetração pela espessa e complexa membrana celular do *Mycobacterium bovis*.

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 de forma rápida e eficientemente. Os pulmões e rins são os principais órgãos envolvidos e sua excreção fecal é baixa. Quando cessa a exalação do produto, 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).

Amemori et al. (2006) observaram efeitos colaterais em humanos após doses orais, como náuseas, vômito, anorexia, erupções de pele e bradiarritmia ou hipotensão. Porém, o efeito mais significativo foi o odor na respiração e o sabor na boca “semelhante ao alho”, devido à excreção pulmonar de uma

pequena porcentagem do metabólito (DAVIS et al., 1991; STRONCEK et al. 1991).

O tratamento com DMSO em hepatócitos em cultivo celular foi efetivo na resposta celular ao estresse préapoptótico. Foi observada migração da caspase-9 (responsável pelo mecanismo apoptótico) do núcleo para o citoplasma, reduzindo a apoptose. De forma interessante, após o tratamento longo o DMSO estimulou a migração de caspase-9 para o núcleo. Assim, os autores consideraram que o tratamento curto pode ser benéfico e, quando se prolonga, o DMSO passa a ser responsável pelo estresse preapoptótico (BANIC et al., 2011).

Como antiinflamatório, o DMSO foi descrito por diminuir a produção de IL-6 e IL-8 durante um tratamento de 12 horas. Este achado foi acompanhado pela manutenção da viabilidade celular do cultivo de condrócitos e não houve indução de apoptose. Os autores concluíram que o DMSO a 1% inibiu o estímulo de IL-1 β na expressão de IL-6 e IL-8 (KELLY et al., 1994; KLOESCH et al., 2011).

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, hemoglobínúria e aumento dos níveis de transaminase. 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 indicada é 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 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 reações adversas e a neurotoxicidade ocorreu com baixa frequência, em particular após a infusão das células. 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 efeito colateral raro.

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

Estudos anteriores indicavam que o DMSO podia inibir a dilatação arteriolar pial induzida por oxidantes e ativadores dos canais de potássio ATP-sensitivo em gatos e ratos (WEI et al., 1998; ROSENBLUM et al., 2001). Brennan et al. (2007) documentaram que em altas concentrações (10%) o DMSO inibe a reação arteriolar e reduz a dilatação arterial associada a depressão difusa cortical (CSD). Os resultados de Sun et al. (2010) sugerem que o DMSO cause dilatação arteriolar cerebral e aumento da velocidade do sangue. Neste mesmo estudo, o composto inibiu de forma dose-dependente (0,1 a 4%) a resposta hemodinâmica à CSD em todos os compartimentos vasculares.

O DMSO pode aumentar a permeabilidade das células musculares do endotélio vascular induzindo ao aumento da osmolaridade e ajustando a concentração intracelular de Ca²⁺ para regular o diâmetro venoso (SUN et al., 2010).

A administração de DMSO em altas doses (2 e 4%) foram testadas com objetivo de determinar a relação dose dependente. Quando administrado em doses baixas, de 1%, foi capaz de inibir a resposta hemodinâmica e a 4% aboliu a dilatação arteriolar e inibiu o aumento do fluxo sanguíneo no cérebro. O estudo indicou que o DMSO não causou danos eletrofisiológicos durante a CSD (SUN et al., 2010).

Injeções rápidas intra-arteriais pode levar a efeitos adversos, como vasoespasmos, angionecrose, desnudamento do endotélio, destruição da lâmina interna elástica, hemorragia subaracnóide, derrame e morte (CHALOUPKA et al., 1994; DUDECK et al., 2006). Chaloupka et al. (1994) demonstraram que o DMSO é angiotóxico e neurotóxico.

Bakar et al. (2010) observaram que o DMSO produziu efeitos neurotóxicos quando infundido no espaço subaracnóide de coelhos. Esses efeitos foram relacionados a distância e a concentração de infusão.

Recentemente, Bakar et al. (2011) não observaram vasoespasmos, angionecrose, ruptura da parede arterial, angíte obliterativa granulomatosa ou hiperplasia da camada íntima na histopatologia da artéria carótida, com o uso do DMSO. Nos resultados histopatológicos e bioquímicos, o DMSO não causou danos no cérebro e na parede da artéria, sugerindo que não possui efeitos angiotóxicos e neurotóxicos quando administrado lentamente na carótida. Além disso, pode ser sugerido que o produto não causou alteração na permeabilidade da barreira hematoencefálica, devido a solubilização na porção aquosa do sangue, sendo levado ao tecido nervoso pela circulação arterial.

Os resultados de Bakar et al. (2011) sugerem também que o DMSO não causa a produção de radicais livres de oxigênio pela membrana fosfolipídica do tecido nervoso. Desta forma, os efeitos tóxicos encontrados devem estar relacionados com outras doenças prévias dos animais quando usados como modelos experimentais. No entanto, Ali (2001) sugere que o DMSO possui efeitos sobre a função neurológica e pode ter como causa a veiculação de drogas neurotóxicas. Sugere-se, desta forma, que a toxicidade não foi induzida pelo DMSO, mas como consequência da capacidade de aumentar a permeabilidade de 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 choque tóxico.

Relatado em vários trabalhos com animais experimentais, o efeito indesejável do DMSO em altas doses é a toxicidade celular que leva a indução de apoptose em células de linfoma e neurodegeneração apoptótica desenvolvida no sistema nervoso central de ratos (KLOVERPRIS et al., 2010).

Kloverpris et al. (2010) encontraram aumento duas vezes superior na morte celular na concentração de zero a 0,2% de DMSO, por sete dias. Em contraste, não observaram aumento na morte celular quando a exposição foi de uma hora, sugerindo que períodos mais longos de exposição ao DMSO está relacionado a morte celular. Além disso, em concentrações acima de 2%, por mais de duas horas de exposição, houve influência marcante na funcionalidade de linfócitos T, sugerindo que a apoptose induzida próximo desta concentração,

por longo período de exposição, poderia explicar o comprometimento da funcionalidade das células T neste estudo.

Objetivos

1. Gerais

- Identificar os possíveis efeitos do tratamento experimental com ribavirina, prednisona e DMSO em cães naturalmente infectados com o vírus da cinomose.

2. Específicos

- Identificar as principais alterações hematológicas e líquóricas de cães naturalmente infectados pelo vírus da cinomose.
- Identificar possíveis efeitos adversos da ribavirina.
- Identificar possíveis efeitos adversos da prednisona.
- Identificar possíveis efeitos adversos do DMSO.
- Identificar possíveis efeitos colaterais da associação dos fármacos experimentais supracitadas.
- Identificar os possíveis efeitos antiinflamatórios dos fármacos prednisona e DMSO em cães com encefalite pela cinomose.
- Identificar o perfil dos animais que apresentaram resultado positivo no tratamento com ribavirina.
- Identificar a frequência da presença do vírus no sangue, medula óssea e líquido de cães naturalmente infectados pelo vírus da cinomose e após o tratamento com as drogas experimentais.

Material e Métodos

1. Animais

Foram utilizados 60 cães com sinais neurológicos de cinomose, diagnosticados a partir do histórico de vacinação, desenvolvimento clínico da doença e exame físico. A confirmação diagnóstica foi realizada pela técnica da transcrição reversa seguida pela reação em cadeia da polimerase (RT-PCR).

Os animais foram divididos em seis grupos de 10 animais de forma aleatória na medida em que foram atendidos no Hospital Veterinário da FMVZ, UNESP – Campus Botucatu, no Serviço de Enfermidades Infecciosas dos Animais.

1.1 Critérios de inclusão:

Para a inclusão dos animais no estudo, os sinais neurológicos deveriam ter apresentação clínica multifocal e caráter progressivo de no máximo 10 dias de evolução. Porém, animais foram incluídos com apenas um sinal neurológico.

Os animais incluídos apresentaram sinais de acometimento dos sistemas respiratório e/ou gastroentérico associados ou anteriormente à apresentação neurológica. Alguns animais apresentam também descamação de pele ou descarga ocular mucopurulenta. Esses sinais quando acompanhados de histórico de vacinação contra cinomose incorreta ou incompleta foram os principais critérios para a inclusão dos animais no grupo experimental.

Para serem considerados sinais respiratórios o animal deveria apresentar pelo menos uma das características a seguir: secreção nasal mucopurulenta, espirrro ou tosse produtiva e alterações na auscultação pulmonar.

Os sinais oculares foram caracterizados por secreção ocular, ceratoconjuntivite seca, úlcera de córnea e alopecia das pálpebras.

Os sinais gastroentéricos foram considerados quando o animal apresentava vômitos, diarreia com ou sem sangue e anorexia ou hiporexia associado a episódios de regurgitação ou vômito.

Foram incluídos animais com idade entre dois meses e seis anos, sem distinção de sexo e raça.

1.2 Critérios de exclusão:

Não foram incluídos animais com quadro avançado da doença em fase neurológica, como convulsões, estado semicomatoso ou comatoso.

2. Grupos Experimentais

Grupos 1 e 2: compostos por animais tratados com ribavirina e sua associação com o DMSO, respectivamente nas doses de 30 mg/Kg e 20mg/Kg, a cada 24 horas, durante 15 dias. Dessa forma, foram utilizados os materiais colhidos (sangue, medula óssea e líquido) para avaliação do tratamento pela RT-PCR. Estas amostras foram devidamente armazenadas em freezer a – 80°C desde 2007.

Grupo 3: foram incluídos animais que serviram de controle para o tratamento antiviral específico e para a avaliação da ação antiinflamatória do DMSO. Estes animais receberam 50 mg/Kg de DMSO, diluído na concentração de 10 a 20%, por via intravenosa, a cada 24 horas, durante 15 dias.

Grupo 4: foram incluídos animais que serviram de controle para o tratamento antiviral específico e para a avaliação da ação antiinflamatória da prednisona. Estes animais receberam 4 mg/Kg de prednisona, por via oral, a cada 24 horas, durante 7 dias, em seguida receberam a dose de 2 mg/Kg de prednisona, também por via oral a cada 24 horas até completar os 15 dias de tratamento. Após este período os animais foram encaminhados para o término do tratamento no próprio domicílio com redução gradativa da dose.

Grupo 5: os animais incluídos neste grupo receberam ribavirina na dose de 30 mg/Kg, por via oral, a cada 24 horas, durante 15 dias. Nestes foi administrado em associação a prednisona na dose de 4 mg/Kg, por via oral, a cada 24 horas, durante sete dias, com posterior redução da dose para 2 mg/Kg, por via oral, a cada 24 horas, até completar o período de 15 dias. Após este período os animais foram encaminhados para o término do tratamento no próprio domicílio com redução gradativa da dose da prednisona por mais duas semanas. Este grupo foi considerado o grupo desafio da droga antiviral, já que a dose do glicocorticoide foi imunossupressora.

Grupo 6: os animais foram tratados com ribavirina, prednisona e DMSO. Neste grupo os cães receberam 30 mg/Kg de ribavirina, por via oral, a cada 24 horas, durante 15 dias; o DMSO foi administrado na dose de 50 mg/Kg, diluído na concentração de 10 a 20%, por via intravenosa, a cada 24 horas; e a prednisona foi administrada na sua dose antiinflamatória de 0,5 mg/Kg, por via oral, a cada 12 horas, durante sete dias, sendo reduzida para 0,25 mg/Kg, a cada 24 horas até completar 15 dias de tratamento. Após este período o animal terminou o tratamento em domicílio com manutenção da dose e aumento do intervalo para 48 horas por mais sete dias.

Todos os animais receberam tratamento sintomático e de suporte básico, que inclui suplementação vitamínica, fluidoterapia nos casos de desidratação e antibioticoterapia para combater infecções secundárias. Todos os animais foram avaliados neurologicamente e clinicamente todos os dias e foram realizados exames complementares de forma rotineira.

Para padronização dos exames clínicos diários e melhor análise dos resultados foi utilizada uma ficha clínica padrão de simples preenchimento, contendo o dia de colheita e tipo de material colhido, permitindo ainda anexar todos os dados necessários para a fácil realização do experimento (Anexo 1).

3. Fármacos experimentais

A Ribavirina¹ utilizada na pesquisa possui apresentação de cápsulas de 250 mg e para facilitar o cálculo da dose o medicamento foi diluído.

A diluição foi realizada de forma asséptica onde foram utilizadas oito cápsulas de ribavirina para 50 mL de água destilada ou solução fisiológica 0,9% estéril, formando uma solução de 40 mg/mL para administração oral. Depois de diluída, a ribavirina foi armazenada em frascos âmbar e mantida em refrigeração constante em geladeira.

A prednisona foi adquirida em farmácia de manipulação (Cruz Vermelha, Botucatu, SP), na forma de solução oral, na concentração de 40 mg/mL em frascos de 50 mL para os animais do grupo 4 e 5.

Os animais do grupo 6 receberam uma dose menor e, por isso, foi solicitado uma nova formulação da droga na concentração de 10 mg/mL em frascos de 50 mL.

O DMSO² foi utilizado a sua forma comercial Dimetil Sulfóxido P. A., na concentração de 99,9%, sendo que para a administração intravenosa, a droga foi diluída em solução fisiológica 0,9% estéril na proporção de 10 a 20%. O

¹ Ribavirina: Ribavirin[®] Laboratório Blau

² DMSO: Dimetil Sulfóxido P.A.[®] Laboratório Vetec Química Fina

DMSO diluído foi administrado de forma lenta e o acesso venoso foi trocado a cada três dias.

4. 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.

5. Colheita de material e exames complementares:

5.1 Colheita de líquido:

Todos os animais do experimento foram anestesiados conforme o protocolo sugerido pelo Departamento de Anestesiologia Veterinária da FMVZ – UNESP – Botucatu, SP para a colheita de líquido, composto pela medicação pré-anestésica acepromazina e diazepam e como anestésico intravenoso o

tiopental. A acepromazina foi utilizada na dose de 0,05 mg/Kg e o diazepam na dose de 0,2 mg/Kg, por via intramuscular, cerca de 30 minutos antes da administração do anestésico. O tiopental foi administrado por via intravenosa na dose de 7,5 mg/Kg, caso houvesse necessidade de aprofundar o estado hipnótico foi utilizado mais 2,5 mg/Kg lentamente.

Foram realizadas duas colheitas em cada animal, no momento em que o mesmo chegou ao ambulatório, antes de qualquer tratamento e, após um período de 15 dias, referente ao tempo do tratamento experimental. A técnica de colheita de líquido seguiu a descrição feita por Dewey (2006). O líquido foi colhido em três tubos por gotejamento e a quantidade de líquido colhida variou de 0,5 a 3 mL, dependendo do tamanho do animal.

O líquido cerebroespinal é mais comumente obtido na cisterna cerebelomedular, local onde foi colhido o líquido de todos os animais. Os pontos de referência anatômicos úteis para a punção e colheita do líquido nesse local incluem a protuberância occipital externa, a porção cranial da região dorsal do eixo (vértebra cervical C2) e os processos transversos do atlas (vértebra cervical C1). Os pacientes foram posicionados em decúbito lateral e o pescoço foi flexionado por um assistente em aproximadamente 90 graus. O nariz do animal foi mantido paralelo à mesa. No local da punção foi realizado tricotomia e assepsia da pele, e para a realização do procedimento foram utilizadas agulhas hipodérmicas esterilizadas que foram introduzidas na linha média, direcionada para o espaço atlantoccipital (DEWEY, 2006).

Este material foi analisado pelo Laboratório Clínico Veterinário da FMVZ – UNESP – Botucatu para a realização de exame físico, químico e contagem de células.

Para a realização da RT-PCR, o líquido foi colhido diretamente em microtubos de 500 µL, livre de pirogênicos, DNase, RNase e metais pesados e armazenado em freezer a -80°C, para posterior processamento, no Laboratório de Biologia Molecular da Disciplina de Enfermidades Infecciosas dos Animais – FMVZ – UNESP – Botucatu.

5.2 Exame 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 reagentes³ e foram avaliados pH, estimativa de proteínas, glicose e sangue oculto. A quantificação de proteínas totais do líquido requer um método bioquímico⁴ com a utilização de espectrofotômetro⁵, 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 +++).

Para contagens de hemácias e células nucleadas utilizou-se o hemocitômetro padrão (Câmara de Neubauer). Para contagens de células nucleadas em líquido não-diluído, foram preenchidas ambas as câmaras do hemocitômetro. 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 por citocentrifugação, que foi realizada colocando-se a amostra em um citofunil acoplado a uma lâmina de microscopia e centrifugada 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 (CHRISMAN, 1992; MEYER, 1995).

5.3 Colheita de sangue e urina:

As amostras de sangue foram colhidas com seringas e agulhas esterilizadas e descartáveis, no volume de 10 mL, sendo então acondicionadas em tubos com EDTA a 7,5% e sem anticoagulantes, para retirada de soro. O local da punção foi a veia jugular. Após o procedimento, as amostras foram levadas diretamente ao Laboratório Clínico Veterinário para realização de hemograma e análises bioquímicas de função hepática e renal. O sistema

³ Combur Test - Roche®

⁴ Kit Bioquímico - Doles®

⁵ CELM SB 190®

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

Nos animais dos grupos 3 e 4 foi colhido apenas sangue para hemogramas de acompanhamento nos dias 1°, 7° e 15°, já que foram utilizadas drogas conhecidas. Não foram realizados exames bioquímicos pelos mesmos motivos. Além disso, este grupo foi formado com o objetivo de terem seus resultados comparados com os resultados da RT-PCR dos grupos experimentais.

Os animais dos grupos 1, 2, 5 e 6, que receberam o antiviral, as amostras de sangue foram colhidas nos dias 1°, 4°, 7°, 10°, 12° e 15°.

As dosagens bioquímicas foram realizadas nos grupos 1, 2, 5 e 6 nos dias 1°, 5°, 10° e 15° para identificação de possíveis efeitos colaterais dos fármacos experimentais.

As amostras de sangue com anticoagulante foram acondicionadas em microtubos de 500 µL, livre de pirogênios, DNase, RNase e metais pesados e armazenadas em freezer a -80°C para posterior processamento no Laboratório de Biologia Molecular da Disciplina de Enfermidades Infecciosas dos Animais – FMVZ – UNESP – Botucatu. Estas amostras foram colhidas antes e após o tratamento experimental em todos os grupos, com intervalo de 15 dias.

As amostras de urina foram colhidas com auxílio de seringas descartáveis e agulhas descartáveis esterilizadas através da punção da vesícula urinária e foram levadas diretamente ao Laboratório Clínico Veterinário da FMVZ, UNESP – Botucatu para a análise. No caso de animais muito pequenos ou que não mantinham a vesícula repleta foi utilizada a sondagem uretral para obtenção da urina. Essa técnica não foi escolhida para todos os casos por ser muito agressiva ao sistema urinário do animal podendo levar a casos de cistite ascendente.

Em alguns animais não foi possível colher a urina em todos os momentos pela dificuldade de mantê-lo com sonda uretral e de puncionar a vesícula urinária devido ao tamanho do animal, porém para a manutenção do animal no grupo experimental, a urina foi colhida pelo menos em dois momentos durante o tratamento.

O exame de urina do tipo I foi realizado nos animais dos grupos 1, 2, 5 e 6 nos dias 1°, 5°, 10° e 15° de tratamento com o antiviral com objetivo de identificar possíveis efeitos colaterais dos fármacos experimentais utilizados.

Lembrando sempre que os animais dos grupos 1 e 2 são animais que foram incluídos em pesquisa prévia, porém a metodologia foi mantida para comparação dos resultados já encontrados.

5.3 Hemograma:

Após chegada ao laboratório, foi confeccionada a lâmina de esfregaço sanguíneo 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 automático⁶. Quando foi observada na lâmina de esfregaço sanguíneo 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 hemoglominômetro⁷, um método colorimétrico.

5.5 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

⁶ CELM CC 510®

⁷ CELM HB 520®

espectrofotômetro⁵. Nestas análises foram utilizados kits comerciais para determinação por método cinético, da creatinina⁸, enzimáticos da uréia⁸, ALT⁹, FA⁹, GGT⁹, e colorimétricos da proteína total sérica⁸ e albumina⁸.

5.6 Exame de urina tipo I:

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. Foram separados 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 reagentes³ 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.

5.7 Colheita de medula óssea:

As colheitas de medula óssea foram realizadas nos mesmos momentos das colheitas de líquido, antes do início do tratamento e após 15 dias de administração das drogas. Os animais estavam anestesiados para a colheita de líquido, facilitando a colheita no úmero, que foi realizada com agulha de biópsia de medula óssea¹⁰, com mandril, e esterilizada. A colheita foi realizada com seringa esterilizada e com EDTA, o material foi depositado em microtubos de 500 µL, livre de pirogênios, DNase, RNase e metais pesados e armazenado em freezer a -80°C para posterior processamento em Laboratório de Biologia Molecular, da Disciplina de Enfermidades Infecciosas dos Animais da FMVZ, UNESP – Botucatu.

⁸ Labtest®

⁹ Bioclin®

¹⁰ Agulha de biópsia de medula óssea Modelo Komyiashiki - Japan

6. Técnica de Biologia Molecular:

6.1 Extração do RNA:

A extração do RNA foi realizada a partir das amostras de sangue, medula óssea e líquido, utilizando-se o Kit para extração de RNA Invisorb® Spin Virus RNA Mini Kit (Inviteck®).

Para realização da extração foram diluídos 100 µL da amostra em 100 µL de água livre de nucleases. E para cada cinco amostras foram adicionados um controle negativo que era composto apenas por 200 µL de água livre de nucleases. As reações foram realizadas em baterias de 10 amostras por vez. O controle positivo utilizou amostras de urina sabidamente positivas e para realização da extração foi utilizada mesma diluição em água livre de nucleases.

O procedimento da extração foi realizado conforme a instrução do fabricante. Às amostras diluídas foram adicionados 600 µL Lysis Buffer RV, 20 µL de Carrier RNA e 20 µL de Proteinase K, levados ao vórtex rápido para agitação constante em temperatura de 65°C, durante 10 minutos. Após, foram adicionados 400 µL Binding Solution e levado ao vórtex rápido. O volume do tubo foi transferido para o tubo RTA Spin Filter, onde ficou incubado por um minuto e em seguida centrifugado em 8.000 rpm por um minuto. O líquido que passou pelo filtro foi descartado e RTA Spin Filter foi transferido para RTA Receiver Tube. Neste foi adicionado 600 µL Wash Buffer R1 e centrifugado novamente em 8.000 rpm durante um minuto. O líquido que passou pelo filtro foi descartado e novamente transferido para um novo RTA Receiver Tube. Em seguida, adicionaram-se 600 µL Wash Buffer R2 e o líquido foi colocado novamente para centrifugação em 8.000 rpm durante um minuto. Este último procedimento foi realizado duas vezes. Para eliminar traços de etanol, realizou-se nova centrifugação em 14.000 rpm por quatro minutos. Após transferiu-se o RTA Spin Filter para RNase free 1,5 mL Elution tube e adicionou-se 100 µL de Elution Buffer R (aquecido a 80°C), que ficou incubado por três minutos e centrifugado em 4.000 rpm durante um minuto. Após foi descartado o filtro e o RNA foi imediatamente aliquoteado em tubos menores com volume de 7 µL da amostra e acondicionados a -80°C.

6.2 Conversão para cDNA:

As amostras (7 µL) foram retiradas do freezer -80°C e levadas diretamente ao termociclador para desnaturação do RNA, durante sete minutos em temperatura de 95°C.

Ao mesmo tempo foi preparada a mistura para formação de cDNA. A mistura era composta por 3 µL de água Mili-Q autoclavada; 1 µL de Randon Primer (250 ng/µL); 1 µL de dNTP (10 mM); 5 µL de Buffer 5x; 1 µL de DDT (0,1 M); 1 µL de inibidor de RNase (10 U/µL) e 1 µL tampão de M-MLV Reverse transcriptase. A mistura formou como volume final 13 µL.

Aliquotou-se 13 µL em cada microtubo previamente identificado com o RNA previamente aquecido, totalizando-se 20 µL. Levou-se ao termociclador no programa CINOCDNA (composto por ciclo de 25°C por 10 minutos; 37°C por 50 minutos e 70°C por 15 minutos, totalizando um período de 1 hora e 15 minutos).

6.3 RT-PCR:

Para a realização da reação de RT-PCR foi necessária a preparação de outra mistura com 17,35 µL de água Mili-Q autoclavada; 2,5 µL de Buffer 10x; 0,75 µL de Mg₂Cl₂ (50 mM); 0,5 µL de dNTP (10 mM); 1,25 µL do Primer CDV-NPS F1 (Tabela 1); 1,25 µL do Primer CDV-NPS R1 (Tabela 1); 0,15 µL de Taq DNA Platinum (5U/µL), com volume final de 23,75 µL da mistura.

Aliquotou-se 23,75 µL em cada microtubo previamente identificado, sempre mantido em gelo, na sala de aplicação foi pipetado 1,25 µL do cDNA em cada tubo, totalizando 25 µL de volume total. Após os microtubos foram levados ao termociclador no programa CINOPCR (composto por ciclo de 95°C por 10 minutos, 39 ciclos de 95°C por 30 segundos, 56°C por 30 segundos, 72°C por 30 segundos, depois 72°C por 10 minutos e 4º *for ever*) e, após, foi armazenado a -20°C.

A leitura do gel foi realizada em gel de agarose a 2% em transluminador UV, corados com brometo de etídeo, onde se esperou um produto amplificado com 440 pb.

6.4 Hemi-Nested PCR:

A reação do hemi-nested PCR (hn-PCR) foi realizada de forma semelhante a reação da PCR, utilizou-se para estas reações as amostras que foram negativas na PCR, onde aliquotou-se 23,75 µL da mistura e 1,25 µL do produto amplificado da PCR.

A mistura foi composta pelos mesmos reagentes, porém na hn-PCR utilizou-se Primer CDV-NPS R2 (tabela 1) no lugar do Primer CDV-NPS R1. E o produto esperado desta reação apresentou 331 pb na leitura do gel, assim como na reação anterior.

TABELA 1 – Descrição da sequência de nucleotídeos iniciadores utilizados na reação de RT-PCR e hn-PCR no diagnóstico da cinomose em cães. Botucatu, SP, 2011.

Primers (número de acesso aos genes)	Iniciadores
Primer ITS 1 F (10 pmol) CVD-NPS F1 5'-3'	ATCCCCAGGRAACAAGCCTACAA
Primer ITS 1 R (10 pmol) CVD-NPS R1 5'-3'	CCTTGGTGATGCCAAGCTCG
Primer ITS 2 R (10 pmol) CVD-NPS R2 5'-3'	CGAATTTTAACCCTCCATG

(AMARAL, 2007).

Os iniciadores (primers) utilizados nas duas reações amplificaram regiões específicas do gene da nucleoproteína [GenBank: X02000.1].

7. Análise estatística:

A comparação de frequências de ocorrências foi realizada pelos testes de Qui-quadrado ou G de Williams, de acordo com os resultados registrados em tabelas de contingência.

Para as variáveis ordinais as comparações entre os grupos foram realizadas pelo teste de Kruskal-Wallis, seguido de comparação de medianas pelo teste de Dunn.

As variáveis discretas e contínuas foram submetidas à verificação do tipo de distribuição pelo teste de Shapiro-Wilkins; quando de distribuição Normal, os grupos foram comparados pela Análise de Variância Um Fator seguido de teste de Tukey; quando de distribuição Livre, os grupos foram comparados pelo teste de Kruskal-Wallis, seguido de comparação de medianas pelo teste de Dunn.

Em todas as análises, valores de P menores que 0,05 foram considerados significantes. Os testes foram realizados nos programas BioEstat 5.0 (AIRES et al, 2007) e EpiInfo 6.04 (1996).

Resultados

1. Animais e dados epidemiológicos

Foram utilizados 60 cães naturalmente infectados com o vírus da cinomose, apresentando sinais neurológicos precedidos ou concomitantes com sinais sistêmicos, como alterações respiratórias, digestivas, oculares e epiteliais. Todos os animais não possuíam histórico de vacinação correto e foi estudada a quantidade de animais que apresentavam histórico de contactantes sintomático ou que possuíam acesso à rua.

Os 20 animais dos grupos 1 e 2 fizeram parte da pesquisa precedente, porém todos os dados foram novamente avaliados para serem comparados com protocolos de tratamento testados na atual pesquisa.

O estudo apresentou a frequência de 45% de fêmeas e 55% de machos que foram descritos na tabela 2.

TABELA 2 – Frequência de cães machos e fêmeas com cinomose incluídos nos respectivos grupos experimentais. Botucatu, SP, 2011.

Grupo	Fêmeas		Machos	
	n	%	n	%
G1	5	50	5	50
G2	4	40	6	60
G3	6	60	4	40
G4	3	30	7	70
G5	4	40	6	60
G6	5	50	5	50
Total	27	45	33	55

G1: grupo 1; G2: grupo 2; G3: grupo 3; G4: grupo 4; G5: grupo 5; G6: grupo 6

n: número de animais

%; porcentagem

Os animais incluídos na pesquisa apresentavam idades a partir de três meses até um de 156 meses. Apenas esse animal acima de seis anos foi incluído na pesquisa, já que apresentou imunofluorescência direta positiva no líquido, demonstrando que estava em fase aguda da doença. Os dados das idades dos animais estão na tabela 3.

TABELA 3 – Média, desvio padrão, mediana das idades em meses dos cães com cinomose incluídos na pesquisa, divididos nos diferentes grupos. Botucatu, SP, 2011.

Grupo	Média	Desvio padrão	Mínimo	P25	Mediana	P75	Máximo
G1	29,6	15,8	8,0	24,0	24,0	36,0	60
G2	47,0	44,4	4,0	12,0	42,0	60,0	156
G3	35,4	24,6	5,0	7,0	48,0	60,0	60
G4	31,0	20,9	7,0	16,0	24,0	36,0	72
G5	20,0	21,8	3,0	8,0	10,5	24,0	60
G6	15,1	17,5	5,0	8,0	7,5	12,0	60

G1: grupo 1; G2: grupo 2; G3: grupo 3; G4: grupo 4; G5: grupo 5; G6: grupo 6

P25: percentil 25

P75: percentil 75

Mesmo o estudo sendo realizado de forma aleatória a inclusão dos animais nos grupos, os componentes dos grupos 5 e 6 foram os mais jovens, no entanto os valores demonstraram que na sua maioria foram adultos, ou seja, acima de um ano de idade.

Com relação à raça dos animais incluídos na pesquisa, 75% foram cães sem raça definida; seis (10%) da raça Poodle; dois (3,3%) animais da raça Border Colie; dois (3,3%) Pinschers e um (1,7%) animais das raças Daschound, Labrador, Pit Bull, Pointer e Waimaraner.

Quando analisou-se a frequência das raças por grupo, verificou-se que a quantidade de animais sem raça definida ocorreu em 90% dos animais dos grupos 4 e 6; 70% nos grupos 1, 3 e 5, e 60% no grupo 2.

Para serem incluídos na pesquisa, os animais deveriam apresentar no máximo 10 dias de evolução dos sinais neurológicos, com objetivo de selecionar os animais que estavam na fase aguda, onde há intensa replicação viral e possível ação da droga antiviral. Estes dados do período de evolução foram registrados na tabela 4.

TABELA 4 – Média, desvio padrão e mediana dos dias de evolução dos sinais clínicos neurológicos dos cães com cinomose nos diferentes grupos. Botucatu, SP, 2011.

Grupos	Média	Desvio padrão	Mínimo	P25	Mediana	P75	Máximo
G1	5,0	3,2	1,0	3,0	4,0	9,0	10,0
G2	6,2	2,6	3,0	4,0	6,0	8,0	10,0
G3	7,0	2,6	2,0	5,0	7,0	10,0	10,0
G4	6,0	3,0	1,0	4,0	6,5	7,0	10,0
G5	5,2	1,8	3,0	4,0	5,0	7,0	8,0
G6	4,4	2,1	2,0	2,0	4,5	6,0	7,0

G1: grupo 1; G2: grupo 2; G3: grupo 3; G4: grupo 4; G5: grupo 5; G6: grupo 6

P25: percentil 25

P75: percentil 75

Dos animais incluídos no estudo 63,3% apresentavam sinais oculares. Os animais dos grupos 5 e 6 foram os que apresentaram maior índice de acometimento ocular, em relação aos outros grupos.

TABELA 5 – Frequência dos sinais oculares em cães com cinomose nos diferentes grupos experimentais. Botucatu, SP, 2011.

Grupo	Sem sinais oculares		Sinais oculares	
	n	%	n	%
G1	5	50,0	5	50,0
G2	5	50,0	5	50,0
G3	4	40,0	6	60,0
G4	4	40,0	6	60,0
G5	1	10,0	9	90,0
G6	3	30,0	7	70,0
Total	22	36,7	38	63,3

Estatística: Qui-quadrado, $p=0,4307$

G1: grupo 1; G2: grupo 2; G3: grupo 3; G4: grupo 4; G5: grupo 5; G6: grupo 6

n: número de animais.

%: porcentagem.

Com relação aos sinais respiratórios, foi encontrada uma frequência de 41,7% dos animais incluídos na pesquisa. Somente o grupo 5 que apresentou 60% dos animais com sinais respiratórios, os outros grupos mostraram uma frequência maior de animais sem sinais respiratórios. É importante ressaltar que este mesmo grupo apresentou uma frequência alta de animais com sinais oculares (Tabela 6).

TABELA 6 – Frequência dos sinais respiratórios em cães com cinomose nos diferentes grupos experimentais. Botucatu, SP, 2011.

Grupo	Sem sinais respiratórios		Sinais respiratórios	
	n	%	n	%
G1	7	70,0	3	30,0
G2	6	60,0	4	40,0
G3	6	60,0	4	40,0
G4	6	60,0	4	40,0
G5	4	40,0	6	60,0
G6	6	60,0	4	40,0
Total	35	58,3	25	41,7

Estatística: Qui-quadrado, $p=0,8507$.

G1: grupo 1; G2: grupo 2; G3: grupo 3; G4: grupo 4; G5: grupo 5; G6: grupo 6

n: número de animais.

%: porcentagem.

De todos os animais incluídos na pesquisa, 38,3% deles apresentou sinais gastroentéricos. Esta sintomatologia foi a que apresentou menor frequência nos animais estudados. Apenas o grupo 6 apresentou maior frequência de animais com sinais gastroentéricos no momento de atendimento no Hospital Veterinário ou no histórico. Estes animais também apresentaram uma frequência alta de sinais oculares associados (Tabela 7).

TABELA 7 – Frequência dos sinais gastroentéricos em cães com cinomose nos diferentes grupos experimentais. Botucatu, SP, 2011.

Grupo	Sem sinais gastroentéricos		Sinais gastroentéricos	
	n	%	n	%
G1	7	70,0	3	30,0
G2	6	60,0	4	40,0
G3	7	70,0	3	30,0
G4	7	70,0	3	30,0
G5	6	60,0	4	40,0
G6	4	40,0	6	60,0
Total	37	61,7	23	38,3

Estatística: Qui-quadrado, $p=0,7168$.

G1: grupo 1; G2: grupo 2; G3: grupo 3; G4: grupo 4; G5: grupo 5; G6: grupo 6

n: número de animais.

%; porcentagem.

Após a tabulação dos dados de sinais clínicos foi possível verificar que os animais incluídos no estudo além de apresentarem sinais neurológicos, tiveram alta frequência em sinais oculares, menor em sinais respiratórios e, por último, sinais gastroentéricos. No G5 foi possível verificar alto índice de sinais oculares e respiratórios e no G6 de sinais oculares e gastroentéricos. Os outros grupos apresentaram distribuição homogênea dos sinais sistêmicos.

Além dos sinais sistêmicos, também foi avaliada a frequência dos sinais neurológicos em todos os animais e nos diferentes grupos experimentais (Tabela 8).

TABELA 8 – Frequência dos sinais neurológicos nos cães com cinomose incluídos na pesquisa nos diferentes grupos experimentais. Botucatu, SP, 2011.

Sinais neurológicos	Frequência (%)						Total
	G1	G2	G3	G4	G5	G6	
Alteração de Nervos Cranianos	60,0	90,0	90,0	90,0	90,0	50,0	78,3
Alteração postura ou andar	80,0	80,0	80,0	70,0	50,0	50,0	68,3
Ataxia	90,0	70,0	70,0	60,0	70,0	50,0	68,3
Mioclonias	40,0	60,0	50,0	60,0	20,0	40,0	45,0
Déficits de propriocepção	30,0	30,0	60,0	50,0	60,0	30,0	43,3
Balançar a cabeça	50,0	40,0	40,0	0,0	10,0	30,0	28,3
Desvio de cabeça	20,0	30,0	50,0	10,0	20,0	10,0	23,3
Alteração no nível de consciência	40,0	20,0	30,0	20,0	0,0	20,0	21,7
Choro noturno	10,0	10,0	20,0	10,0	10,0	20,0	13,3
Alteração dos reflexos medulares	20,0	20,0	30,0	10,0	0,0	0,0	13,3
Andar compulsivo	0,0	20,0	20,0	30,0	10,0	0,0	13,3
Andar em círculos	0,0	10,0	20,0	10,0	10,0	0,0	8,3
Opistótono	0,0	10,0	10,0	30,0	0,0	0,0	8,3
Agressividade	0,0	0,0	10,0	20,0	10,0	0,0	6,7
Pressão da cabeça contra objetos	0,0	0,0	0,0	20,0	0,0	0,0	3,3

Estatística: Qui-quadrado.

G1: grupo 1; G2: grupo 2; G3: grupo 3; G4: grupo 4; G5: grupo 5; G6: grupo 6

%: porcentagem.

Os sinais neurológicos mais encontrados nos animais incluídos na pesquisa foram as alterações de nervos cranianos (78,3%), seguidos de

alterações na postura e no andar (68,3%), junto com ataxia (68,3%). Dentre as alterações de postura foram incluídos os animais que apresentavam dificuldade de ficar em estação, consequência de paresia/paralisia flácida ou espástica dos quatro membros e/ou do pescoço, não foi considerado alteração apenas na postura de cabeça, como o desvio de cabeça. Dentre os déficits de andar foram consideradas as dificuldades de iniciar o movimento, hipo ou hipermetria, paresias flácidas ou espásticas, dificuldade de realização de manobras especiais, como subir ou descer degraus e quedas espontâneas durante a locomoção. A ataxia foi considerada separadamente das alterações no andar por ser caracterizada, na maior parte das vezes, por um déficit de coordenação motora.

A mioclonia apresentou uma frequência de 45% em todos os grupos. Este sinal foi considerado em animais com acometimento de um músculo ou grupo de músculos. Alguns grupos de músculos apresentaram maior incidência como os músculos mastigatórios, abdominais e flexores dos membros.

Na pesquisa, animais que apresentavam déficits de propriocepção em um membro ou nos quatro membros foram agrupados e apresentaram uma frequência de 43,3%.

O balançar de cabeça foi considerado como mudança de comportamento e foi encontrado em 28,3% dos animais. Já o desvio lateral da cabeça (23,3%) ocorre por alteração no sistema vestibular e foi considerado quando não havia paralelismo na posição das orelhas e olhos em relação ao chão. Este sinal neurológico geralmente foi acompanhado por nistagmo e estrabismo, que foram considerados nas alterações de nervos cranianos.

A diminuição do nível de consciência (21,7%) foi caracterizada principalmente por animais que apresentavam apatia, já que não foram incluídos animais em estado semicomatoso ou comatoso. Dentre os déficits dos níveis de consciência, o choro noturno apresentou uma frequência de 13,3%.

As alterações de comportamento com menor frequência ficaram caracterizadas por agressividade (6,7%), andar compulsivo (13,3%), pressão da cabeça contra objetos (3,3%) e andar em círculos (8,3%), este último também é considerado na síndrome vestibular quando é caracterizado por círculos pequenos.

Os reflexos medulares (13,3%) foram considerados tanto na hipo quanto na hiperreflexia, que geralmente estão alterados quando há um quadro de paresia.

O opistótono foi encontrado em 8,3% dos animais incluídos na pesquisa e é considerado como uma alteração postural, portanto por uma lesão cerebral, diferente da maior parte das alterações posturais que observamos, por isso foi colocado separadamente.

Quando analisamos em cada grupo separadamente verificamos que no G1 90% dos animais apresentavam ataxia, 80% alteração de postura e andar e 60% alteração de nervos cranianos.

O G2 apresentou as mesmas características do G3 com 90% de cães com alteração de nervos cranianos, 80% de alteração de postura e andar, seguida de 70% com ataxia.

No G4, 90% dos animais incluídos apresentavam alteração dos nervos cranianos, 70% com alteração da postura e andar e 60% com ataxia ou mioclonias.

Os animais do G5 apresentaram 90% de alteração de nervos cranianos, 70% de ataxia e 60% de déficits proprioceptivos.

O grupo que apresentou maior distribuição dos sinais clínicos foi o G6, com 50% dos animais apresentando alterações de nervos cranianos, alteração de postura e andar ou ataxia. Sendo que 40% apresentavam mioclonias e 30% dos cães tinham déficits de propriocepção e balançar de cabeça.

Não foram incluídos animais com histórico de vacinação correta, ou seja, com três doses e aplicadas por um médico veterinário. Os animais foram caracterizados por: não vacinados; com vacinação incompleta, ou seja, não receberam doses de reforço; vacinação sem orientação do médico veterinário e animais sem histórico de vacinação (Tabela 9).

TABELA 9 – Frequência da vacinação dos cães com cinomose incluídos na pesquisa, segundo o grupo experimental. Botucatu, SP, 2011.

Grupo	SV		VI		VSO		SHV	
	n	%	n	%	n	%	n	%
G1	5	50	0	0	4	40	1	10
G2	6	60	2	20	2	20	0	0
G3	6	60	1	10	3	30	0	0
G4	6	60	1	10	1	10	2	20
G5	5	50	1	10	4	40	0	0
G6	5	50	1	10	4	40	0	0
Total	33	55	6	10	18	30	3	5

G1: grupo 1; G2: grupo 2; G3: grupo 3; G4: grupo 4; G5: grupo 5; G6: grupo 6

n: número de animais

%: porcentagem

SV: sem vacinação; VI: vacinação incompleta; VSO: vacinação sem orientação do médico veterinário; SHV: sem histórico de vacinação.

O número maior de animais que foram incluídos não recebeu a vacina contra o vírus da cinomose nos últimos três anos, em seguida os animais que receberam vacina em casas agropecuárias ou farmácias veterinárias sem orientação do médico veterinário e 10% dos animais receberam pelo menos uma ou duas doses da vacina contra o vírus da cinomose, independente se foi com orientação veterinária ou não. Os animais que não receberam a vacina no período dos dois últimos anos foram incluídos no grupo de animais com vacinação incompleta, contando que houve uma interrupção na revacinação anual.

Outros dados epidemiológicos também foram estudados, como a presença de contactantes sintomáticos e o acesso à rua. Com relação aos animais que conviveram com animais doentes, verificou-se que apenas 16,7% dos animais tiveram esse contato. 55% dos animais da pesquisa não tinham contactantes

na mesma residência e 28,3% tinham contato com outros animais sem sinais clínicos.

Dos 60 cães incluídos na pesquisa, 34 (56,7%) não tinham acesso à rua e 26 (43,3%) acessavam a rua com frequência, sozinhos ou acompanhados pelo proprietário.

2. Dados relacionados com a evolução clínica:

Os animais que entraram na pesquisa foram incluídos nos grupos experimentais conforme o atendimento no setor de Enfermidades Infecciosas do Hospital Veterinário da FMVZ – UNESP, Campus Botucatu, SP.

Todos os animais foram tratados com medicações e suplementações vitamínicas conforme a rotina de tratamento de cães com cinomose no setor. Estes ficaram internados para serem avaliados clínica e neurologicamente todos os dias. O internamento dos animais também serviu de garantia que eles recebessem todas as medicações prescritas no período de 15 dias, enquanto seriam avaliados.

Os animais do G1 foram tratados apenas com a ribavirina; G2 foram tratados com ribavirina e DMSO (20 mg/Kg); G3 tratamento apenas com DMSO (50 mg/Kg); G4 tratado com prednisona (4 mg/kg, a cada 24 horas); G5 receberam o tratamento com ribavirina e prednisona (4 mg/Kg, a cada 24 horas); G6 foram os animais tratados com ribavirina, prednisona (0,5 mg/Kg, a cada 12 horas) e DMSO (50 mg/Kg).

A tabela 10 relaciona o tempo de tratamento de cada grupo experimental. Para a manutenção do animal na pesquisa, utilizou-se o tempo mínimo de tratamento de 3 dias para os grupos 3 e 4 que são controle; nos grupos que receberam ribavirina, os animais deveriam ser tratados pelo menos 5 dias para serem incluídos, já que na pesquisa anterior verificou que a ribavirina começava a fazer efeito após este período de administração.

TABELA 10 – Média, desvio padrão, mediana do tempo de tratamento dos cães com cinomose para cada grupo experimental. Botucatu, SP, 2011.

Grupo	Média	Desvio padrão	Mínimo	P25	Mediana	P75	Máximo
G1	14,1	2,2	8,0	14,0	15,0	15,0	15,0
G2	13,7	2,8	8,0	15,0	15,0	15,0	15,0
G3	12,1	5,0	3,0	10,0	15,0	15,0	15,0
G4	9,3	5,2	3,0	5,0	8,0	15,0	15,0

G5	13,7	2,7	7,0	14,0	15,0	15,0	15,0
G6	14,0	1,8	10,0	13,0	15,0	15,0	15,0

G1: grupo 1; G2: grupo 2; G3: grupo 3; G4: grupo 4; G5: grupo 5; G6: grupo 6

P25: percentil 25

P75: percentil 75

Neste primeiro momento foi possível observar que os grupos que receberam tratamento com a ribavirina (grupos 1, 2, 5 e 6) tiveram uma média de dias de tratamento maior do que os grupos controle (3 e 4).

O grupo 4 foi o que apresentou pior evolução, com média chegando a menos de 10 dias de tratamento e foi o único grupo que apresentou mediana de 8 dias de tratamento.

O tratamento experimental foi avaliado segundo a melhora clínica e a sobrevida dos animais nos diferentes grupos. Os dados foram tratados da seguinte forma: os animais que vieram a óbito, que apresentaram melhora clínica e que sobreviveram aos 15 dias de tratamento. No entanto, após o período de 15 dias de tratamento, alguns animais morreram, outros apresentaram piora ou ficaram com sequelas graves e foram eutanasiados, ou mesmo apresentaram melhora e sobreviveram, assim, estes animais foram agrupados todos juntos pela dificuldade de acompanhar a resposta, já que uma parte deles terminou o tratamento em domicílio (Tabela 11).

TABELA 11 – Avaliação do tratamento experimental segundo a sobrevida dos cães com cinomose nos diferentes grupos. Botucatu, SP, 2011.

Grupo	Óbito		Sobrevida		Melhora	
	n	%	n	%	n	%
G1	3,0	30,0	1,0	10,0	6,0	60,0
G2	2,0	20,0	4,0	40,0	4,0	40,0
G3	3,0	30,0	4,0	40,0	3,0	30,0
G4	7,0	70,0	2,0	20,0	1,0	10,0
G5	3,0	30,0	2,0	20,0	5,0	50,0
G6	4,0	40,0	2,0	20,0	4,0	40,0
Total	22,0	36,7	15,0	25,0	23,0	38,3

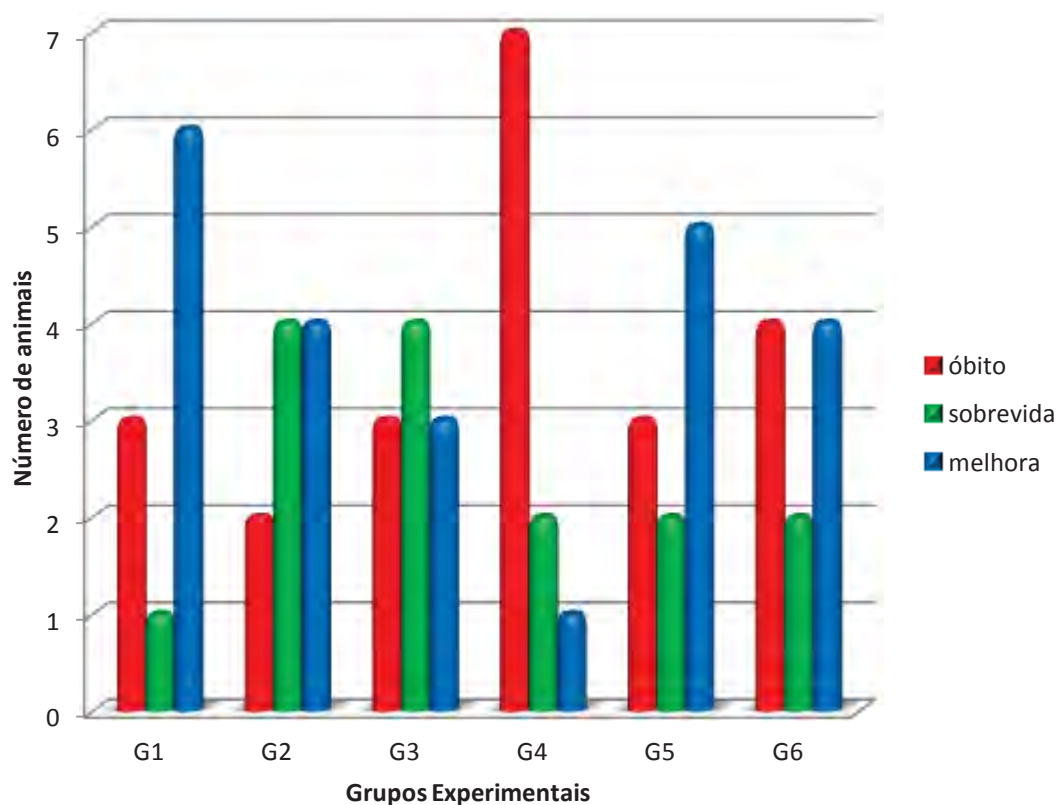
Estatística: Teste G de Willians; p=0,4034

G1: grupo 1; G2: grupo 2; G3: grupo 3; G4: grupo 4; G5: grupo 5; G6: grupo 6

n: número de animais

%; porcentagem

Como pior resultado frente à sobrevida dos animais, o grupo 4 se destacou com 70% dos animais vindo ao óbito e apenas um animal apresentou melhora clínica. Em compensação, os grupos tratados com ribavirina (1, 2, 5 e 6) tiveram os melhores resultados, quando observamos as taxas de melhora clínica (Figura 1).



Estatística: Teste G de Willians; $p=0,4034$

G1: grupo 1; G2: grupo 2; G3: grupo 3; G4: grupo 4; G5: grupo 5; G6: grupo 6

FIGURA 1 – Representação gráfica da avaliação do tratamento experimental segundo a sobrevida dos cães com cinomose nos diferentes grupos. Botucatu, SP, 2011.

Dos 60 animais incluídos no experimento, apenas 23 (38,3%) apresentaram melhora clínica, sendo um resultado semelhante ao número de óbitos (36,7%). Quando somamos os dados dos animais que receberam o antiviral, verificamos que 12 (30%) animais vieram ao óbito e 19 (47,5%) apresentaram melhora clínica evidente no período de internação.

Para melhor avaliar os tratamentos em relação aos grupos controle, foram realizadas análises estatísticas separadas de comparação dos grupos tratados sem prednisona, com e sem ribavirina (Tabela 12) e dos grupos tratados com prednisona em relação aos dois grupos controle (Tabela 13).

TABELA 12 – Avaliação do tratamento experimental através da sobrevida dos cães com cinomose incluídos nos grupos 1, 2 e 3. Botucatu, SP, 2011.

Óbito	Sobrevida	Melhora
-------	-----------	---------

Grupo	n	%	n	%	n	%
G1	3,0	30,0	1,0	10,0	6,0	60,0
G2	2,0	20,0	4,0	40,0	4,0	40,0
G3	3,0	30,0	4,0	40,0	3,0	30,0
Total	8	26,7	9,0	30,0	13,0	43,3

Estatística: Teste G de Willians; $p=0,4919$

G1: grupo 1; G2: grupo 2; G3: grupo 3; G4: grupo 4; G5: grupo 5; G6: grupo 6

n: número de animais

%; porcentagem

TABELA 13 - Avaliação do tratamento experimental através da sobrevida dos cães com cinomose incluídos nos grupos 3, 4, 5 e 6. Botucatu, SP, 2011.

Grupo	Óbito		Sobrevida		Melhora	
	n	%	n	%	n	%
G3	3,0	30,0	4,0	40,0	3,0	30,0
G4	7,0	70,0	2,0	20,0	1,0	10,0
G5	3,0	30,0	2,0	20,0	5,0	50,0
G6	4,0	40,0	2,0	20,0	4,0	40,0
Total	17,0	42,5	10,0	25,0	13,0	32,5

Estatística: Teste G de Willians; $p=0,4224$

G1: grupo 1; G2: grupo 2; G3: grupo 3; G4: grupo 4; G5: grupo 5; G6: grupo 6

n: número de animais

%; porcentagem

Não foi possível encontrar resultado estatisticamente significativo entre os dados trabalhados, porém foi possível observar que quando foi utilizado os dois grupos controle na tabela verificou-se que a porcentagem de óbitos aumenta e diminui o índice de melhora clínica, indicando, desta forma, o efeito principalmente do medicamento antiviral na sobrevida dos animais naturalmente infectados.

É importante ressaltar que os animais tratados com prednisona tiveram um resultado pior do que aqueles tratados apenas com ribavirina e DMSO. Mesmo aqueles que foram tratados com a associação da prednisona com a ribavirina apresentaram maior letalidade que os animais dos grupos 1 e 2.

Além disso, alguns dados epidemiológicos foram tratados em relação a sobrevida dos animais, permitindo verificar se houve interferência destes na avaliação do tratamento experimental. Os dados de sobrevida dos animais foram analisados frente ao histórico de vacinação independente e em relação ao grupo tratado, e frente à idade do animal, independente e em relação ao grupo tratado.

Similarmente, os dados foram avaliados como óbito, melhora clínica e sobrevida ao tempo de tratamento independente da progressão da doença. Na tabela 14 foram avaliados os dados da sobrevida frente ao histórico de vacinação, que foi tratado como: sem vacinação, vacinação incompleta, vacinação sem orientação do médico veterinário e sem histórico de vacinação.

TABELA 14 – Avaliação da sobrevida dos cães com cinomose frente ao histórico de vacinação independente do grupo experimental. Botucatu, SP, 2011.

Histórico de vacinação	Óbito		Sobrevida		Melhora	
	n	%	n	%	n	%
SV	10,0	30,3	10,0	30,3	13,0	39,4
VI	1,0	16,7	3,0	50,0	2,0	33,3
VSO	8,0	44,4	2,0	11,1	8,0	44,4
SHV	3,0	100	0,0	0,0	0,0	0,0
Total	22,0	36,7	15,0	25,0	23,0	38,3

Estatística: Teste G de Willians, $p=0,1375$

n: número de animais

%: porcentagem

SV: sem vacinação; VI: vacinação incompleta; VSO: vacinação sem orientação do médico veterinário; SHV: sem histórico de vacinação.

Os animais que apresentaram melhor resposta clinicamente foram os dos grupos de não vacinados e que receberam vacinação sem orientação do médico veterinário. A comparação dos dois grupos demonstra que a vacinação sem acompanhamento não foi capaz de aumentar os índices de melhora clínica em animais naturalmente infectados pelo vírus da cinomose.

Para confirmar a falta de efetividade da vacinação realizada sem orientação veterinária, os animais apresentaram o mesmo percentual de letalidade e melhora clínica, demonstrando que não fez diferença se o animal foi vacinado ou não. Sendo confirmado ainda pelos dados de animais não vacinados que apresentaram índices semelhantes frente à melhora e letalidade.

Quando se compara estes dados frente aos grupos experimentais, verificou-se que no G1 60% dos animais apresentaram melhora clínica, 30% sobreviveram e 10% morreram. Dos animais que apresentaram melhora clínica, 50% não eram vacinados ou apresentavam vacinação sem orientação do médico veterinário (Tabela 15).

No G1, dos animais não vacinados, 60% apresentaram melhora clínica e 20% sobreviveram ou morreram. E os animais vacinados sem orientação veterinária, apresentaram 75% de melhora clínica e 25% morreram; nenhum animal deste grupo sobreviveu (Tabela 15).

Os animais do G2 apresentaram 40% de melhora clínica, 20% morreu e 40% sobreviveu. Dos animais que apresentaram melhora clínica, 50% não eram vacinados e 25% tinham vacinação incompleta ou receberam vacina sem orientação veterinária. Da mesma forma que a melhora clínica, a maior parte deste grupo é composta por animais que não foram vacinados (75%) e 25% destes receberam vacinação sem orientação veterinária. Neste grupo não foram incluídos animais sem histórico de vacinação (Tabela 15).

No grupo dos animais tratados com ribavirina e DMSO (G2), dos animais que não receberam vacinação, 50% sobreviveram, 33,3% apresentaram melhora clínica e 16,7% morreram. Dos animais vacinados sem orientação veterinária 50% melhoraram ou sobreviveram, portanto não houve óbitos; e dos animais que receberam vacinação incompleta 50% morreram ou melhoraram (Tabela 15).

No G3, grupo controle, composto por animais que receberam apenas DMSO, 40% sobreviveram e 30% melhoraram ou morreram. Dos 30% dos animais que melhoraram 66,7% não foram vacinados e 33,3% tinham vacinação incompleta. Dos animais que sobreviveram, 75% não foram vacinados e 25% tinham vacinação sem orientação veterinária. Dos cães que faleceram 66,7% receberam vacinação sem orientação e 33,3% não eram vacinados (Tabela 15).

Assim como nos grupos descritos anteriormente, no G3 há maior quantidade de animais que não foram vacinados, como animais que receberam vacinação sem orientação. Dos animais que não foram vacinados 33,3% melhoraram, 50% sobreviveram e 16,7% morreram. Dos animais que receberam vacinação sem orientação 66,7% morreram, 33,3% sobreviveram e nenhum animal apresentou melhora clínica (Tabela 15).

No G4 70% dos animais morreram, 20% sobreviveram e 10% apresentaram melhora clínica. Dos animais que morreram, 57,1% não receberam vacinação, 28,6% não apresentavam histórico de vacinação e 14,3% tinham sido vacinados sem orientação do médico veterinário. Neste grupo, dos animais que sobreviveram 50% apresentavam vacinação incompleta ou não foram vacinados. O único animal que apresentou melhora clínica do G4 não recebeu vacinação (Tabela 15).

Com relação aos animais do G5, verificou-se que 50% apresentaram melhora clínica, 30% morreram e 20% sobreviveram. Os animais que melhoraram tinham o seguinte histórico de vacinação: 80% não foram vacinados e 20% tinham vacinação sem orientação. Neste grupo, os três animais que morreram apresentaram histórico de vacinação sem orientação do médico veterinário. E dos animais que sobreviveram 50% eram não vacinados ou tinham vacinação incompleta (Tabela 15).

No G5, apenas um animal que recebeu vacinação incompleta sobreviveu após 15 dias de tratamento. Quatro animais não foram vacinados e 80% deles apresentaram melhora clínica, os outros 20% foram animais que sobreviveram ao período de tratamento. Não ocorreu óbito de animais não vacinados neste grupo. No caso dos animais vacinados sem orientação não houve casos de animais que sobreviveram, 75% morreram e 25% apresentaram melhora clínica (Tabela 15).

No grupo dos animais tratados com todos os fármacos (G6), 40% apresentou melhora clínica e morreu, e 20% sobreviveu ao período de tratamento. Dos animais que melhoraram, 75% receberam a vacinação sem

orientação e 25% não foram vacinados. Dos animais que morreram, 75% não foram vacinados e 25% receberam a vacinação sem orientação do médico veterinário. 50% dos animais que sobreviveram, ou não receberam vacinação, ou tinham vacinação incompleta (Tabela 15).

No G6 apenas um animal recebeu vacinação incompleta. Dos animais não vacinados 60% morreram e 20% ou melhoraram ou sobreviveram. Os animais que receberam vacinação sem orientação tiveram 75% de melhora clínica e 25% de óbitos (Tabela 15).

Os resultados apresentados na tabela 15 não foram significativos estatisticamente, desta forma, não houve diferença do histórico vacinal frente à evolução clínica da doença, e não houve interferência no tratamento experimental.

TABELA 15 - Avaliação da sobrevida dos cães com cinomose em cada grupo experimental frente ao histórico de vacinação. Botucatu, SP, 2011.

Estatística: Teste G de Willians.
Row %: valor percentual na linha.

Histórico Vacinação	G1			G2			G3			G4			G5			G6		
	Ø	S	M	Ø	S	M	Ø	S	M	Ø	S	M	Ø	S	M	Ø	S	M
SV	1	1	3	1	3	2	1	3	2	4	1	1	0	1	4	3	1	1
Row %	20,0	20,0	60,0	16,7	50,0	33,3	16,7	50,0	33,3	66,7	16,7	16,7	0,0	20,0	80,0	60,0	20,0	20,0
Col %	33,3	100,0	50,0	50,0	75,0	50,0	33,3	75,0	66,7	57,1	50,0	100,0	0,0	50,0	80,0	75,0	50,0	25,0
VI	0	0	0	1	0	1	0	0	1	0	1	0	0	1	0	0	1	0
Row %	0,0	0,0	0,0	50,0	0,0	50,0	0,0	0,0	100,0	0,0	100,0	0,0	0,0	100,0	0,0	0,0	100,0	0,0
Col %	0,0	0,0	0,0	50,0	0,0	25,0	0,0	0,0	33,3	0,0	50,0	0,0	0,0	50,0	0,0	0,0	50,0	0,0
VSO	1	0	3	0	1	1	2	1	0	1	0	0	3	0	1	1	0	3
Row %	50,0	0,0	75,0	0,0	50,0	50,0	66,7	33,3	0,0	100,0	0,0	0,0	75,0	0,0	25,0	25,0	0,0	75,0
Col %	33,3	0,0	50,0	0,0	25,0	25,0	66,7	25,0	0,0	14,3	0,0	0,0	100,0	0,0	20,0	25,0	0,0	75,0
SHV	1	0	0	0	0	0	0	0	0	2	0	0	0	0	0	0	0	0
Row %	100,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	100,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
Col %	33,3	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	28,6	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
Total	3	1	6	2	4	4	3	4	3	7	2	1	3	2	5	4	2	4
Row %	30,0	10,0	60,0	20,0	40,0	40,0	30,0	40,0	30,0	70,0	20,0	10,0	30,0	20,0	50,0	40,0	20,0	40,0
Col %	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0

Col %: Valor percentual na coluna.

SV: sem vacinação; VI: vacinação incompleta; VSO: vacinação sem orientação do médico veterinário; SHV: sem histórico de vacinação.

Ø: óbito; S: sobrevida; M: melhora clínica. G1: grupo 1; G2: grupo 2; G3: grupo 3; G4: grupo 4; G5: grupo 5; G6: grupo 6.

Os dados de sobrevida também foram avaliados com relação à idade do animal, já que a idade está relacionada diretamente com o estado de maturidade do sistema imune, que pode favorecer a melhora clínica na cinomose.

TABELA 16 - Média, desvio padrão e mediana da idade dos cães com cinomose em relação à sobrevida, independente do grupo experimental. Botucatu, SP, 2011.

Evolução clínica	Média	Desvio padrão	Mínimo	P25	Mediana	P75	Máximo
Óbito	24,2	21,2	4,0	6,0	15,0	36,0	72,0
Sobrevida	35,0	21,2	5,0	12,0	36,0	60,0	60,0
Melhora	31,5	34,3	3,0	8,0	24,0	48,0	156,0

P25: percentil 25

P75: percentil 75

A análise destes resultados mostrou que os animais que morreram eram mais novos que aqueles que sobreviveram ou que apresentaram melhora clínica. Esses resultados não foram avaliados em relação ao grupo de tratamento, portanto, influenciam, de certa forma, na evolução clínica da enfermidade (Tabela 17).

Os resultados não apresentaram diferenças estatísticas, quando foi comparada a idade dos animais frente à sobrevida nos diferentes grupos. Quando esses dados foram trabalhados em grupos separados verificou-se que os animais dos grupos controle que morreram são animais mais velhos, enquanto que nos grupos tratados com a ribavirina e suas associações, os animais que morreram são mais jovens (Tabela 17).

Dos animais tratados com ribavirina que morreram, exceto o G5, a mediana da idade ficou em 12 meses ou menos, mostrando que animais mais jovens podem ter menos chances de sobreviver mesmo usando o antiviral. Os dados encontrados no grupo controle indicam que animais sem o tratamento experimental tendem a morrer com idades superiores a 24 meses, ou seja, animais com sistema imune maduro (Tabela 17).

TABELA 17 – Média, desvio padrão e mediana da idade dos cães com cinomose nos grupos experimentais frente à evolução clínica. Botucatu, SP, 2011.

Grupo	Evolução clínica	Média	Desvio padrão	Mínimo	P25	Mediana	P75	Máximo	Valor de p
G1	Óbito	18,7	15,1	8,0	8,0	12,0	36,0	36,0	0,2902
	Sobrevida	24,0	0,0	24,0	24,0	24,0	24,0	24,0	
	Melhora	36,0	15,2	24,0	24,0	30,0	48,0	60,0	
G2	Óbito	26,0	31,1	4,0	4,0	26,0	48,0	48,0	0,4917
	Sobrevida	35,5	22,6	10,0	17,0	36,0	54,0	60,0	
	Melhora	69,0	63,0	12,0	24,0	54,0	114,0	156,0	
G3	Óbito	38,0	28,4	6,0	6,0	48,0	60,0	60,0	0,1000
	Sobrevida	54,0	6,9	48,0	48,0	54,0	60,0	60,0	
	Melhora	8,0	3,6	5,0	5,0	7,0	12,0	12,0	
G4	Óbito	34,7	23,1	9,0	18,0	24,0	60,0	72,0	0,2795
	Sobrevida	30,0	8,5	24,0	24,0	30,0	36,0	36,0	
	Melhora	7,0	0,0	7,0	7,0	7,0	7,0	7,0	
G5	Óbito	14,0	9,2	6,0	6,0	12,0	24,0	24,0	0,9442
	Sobrevida	33,0	38,2	6,0	6,0	33,0	60,0	60,0	
	Melhora	18,4	23,5	3,0	8,0	9,0	12,0	60,0	
G6	Óbito	6,3	1,3	5,0	5,5	6,0	7,0	8,0	0,1170
	Sobrevida	8,5	4,9	5,0	5,0	8,5	12,0	12,0	
	Melhora	27,3	24,0	7,0	9,5	21,0	45,0	60,0	

Estatística: Kruskal-Wallis.

G1: grupo 1; G2: grupo 2; G3: grupo 3; G4: grupo 4; G5: grupo 5; G6: grupo 6.

Estes dados podem indicar o efeito da ribavirina favorecendo a resposta clínica dos animais, já que a diminuição do número de partículas virais circulantes permite melhor resposta imune do hospedeiro. Verificou-se ainda que os cães que receberam ribavirina e apresentaram melhora clínica são animais com mais de 24 meses de idade capazes que desenvolver uma resposta frente à infecção viral. Neste caso, a idade interferiu na sobrevida dos animais incluídos no experimento (Tabela 17).

Os dados de sobrevida foram trabalhados frente aos sinais clínicos que os animais apresentavam quando chegaram ao Hospital Veterinário para o atendimento. Com relação aos dados de sinais sistêmicos, como lesões oculares, alterações respiratórias e gastroentéricas, o animal pode ter apresentado sinais clínicos antes de serem atendidos.

Para a inclusão dos animais na pesquisa, o tempo de evolução dos sinais clínicos deveria ser no máximo de 10 dias, no entanto, quanto aos sinais sistêmicos poderiam ter um tempo maior de evolução.

TABELA 18 – Frequência de acometimento ocular dos cães com cinomose em relação à sobrevida. Botucatu, SP, 2011.

Sinais oculares	Óbito		Sobrevida		Melhora		Total	
	n	%	n	%	n	%	n	%
Com sinais	16,0	72,7	9,0	60,0	13,0	56,5	38,0	63,3
Sem sinais	6,0	27,3	6,0	40,0	10,0	43,5	22,0	36,7
Total	22,0	100,0	15,0	100,0	23,0	100,0	60,0	100,0

Estatística: Qui-quadrado, $p=0,5048$.

n: número de animais.

%; porcentagem.

Dos 23 animais da pesquisa que apresentaram melhora clínica no final do tratamento, 56,5% apresentavam sinais oculares. No entanto, 72,7% dos animais que morreram tinham sinais oculares. Os animais que não apresentavam sinais oculares tiveram uma frequência maior na melhora clínica em relação à sobrevida e óbito (Tabela 19).

TABELA 19 – Frequência dos sinais oculares em relação à sobrevida dos cães com cinomose em cada grupo experimental. Botucatu, SP, 2011.

Sobrevida	G1		G2		G3		G4		G5		G6	
	Sem	Com	Sem	Com	Sem	Com	Sem	Com	Sem	Com	Sem	Com
Óbito	0,0	3,0	1,0	1,0	1,0	2,0	2,0	5,0	1,0	2,0	1,0	3,0
%	0,0	100,0	50,0	50,0	33,3	66,7	28,6	71,4	33,3	66,7	25,0	75,0
Sobrevida	1,0	0,0	1,0	3,0	1,0	3,0	2,0	0,0	0,0	2,0	1,0	1,0
%	100,0	0,0	25,0	75,0	25,0	75,0	100,0	0,0	0,0	100,0	50,0	50,0
Melhora	4,0	2,0	3,0	1,0	2,0	1,0	0,0	1,0	0,0	5,0	1,0	3,0
%	66,7	33,3	75,0	25,0	66,7	33,3	0,0	100,0	0,0	100,0	25,0	75,0
Total	5,0	5,0	5,0	5,0	4,0	6,0	4,0	6,0	1,0	9,0	3,0	7,0
%	50,0	50,0	50,0	50,0	40,0	60,0	40,0	60,0	10,0	90,0	30,0	70,0

Estatística: Qui-quadrado, G1 p=0,097; G2 p=0,3679; G3 p=0,5170; G4 p=0,1322; G5 p=0,2735; G6 p=0,7881.

G1: grupo 1; G2: grupo 2; G3: grupo 3; G4: grupo 4; G5: grupo 5; G6: grupo 6.

Sem: sem sinais oculares; Com: com sinais oculares.

%; porcentagem.

É possível identificar que dos animais que apresentaram melhora clínica nos grupos 1, 2 e 3 há uma maior porcentagem nos que não apresentavam sinais oculares, entretanto nos grupos 4, 5 e 6 a maior porcentagem é de animais que tinham sinais oculares.

Dos animais que morreram, a porcentagem com sinais oculares é superior a 50%, em todos os grupos.

A frequência de sinais gastroentéricos também foi comparada com a sobrevida dos animais, independente do grupo de tratamento, nos diferentes grupos experimentais, de acordo com a tabela 20.

TABELA 20 – Frequência dos sinais gastroentéricos em relação à sobrevida dos cães com cinomose. Botucatu, SP, 2011.

Sinais gastroentéricos	Óbito		Sobrevida		Melhora		Total	
	n	%	n	%	n	%	n	%
Com sinais	6	27,3	5	33,3	12	52,2	23	38,3
Sem sinais	16	72,7	10	66,7	11	47,8	37	61,7
Total	22	100,0	15	100,0	23	100,0	60	100,0

Estatística: Qui-quadrado, $p=0,2059$.

n: número de animais.

%; porcentagem.

Pode-se verificar que independente do tratamento realizado, dos animais que morreram 72,7% não apresentavam sinais gastroentéricos e dos animais que melhoraram 52,2% tinham sinais de acometimento do sistema digestório.

Na tabela 21 pode-se verificar os resultados referentes aos sinais gastroentéricos e de sobrevida, para os diferentes grupos. Sendo que os grupos 2, 3, 5 e 6 apresentaram ocorrência acima de 50% de alterações do sistema digestório, dentre os animais que melhoraram clinicamente. Os sinais gastroentéricos podem ter ocorrido antes ou durante o atendimento no Hospital Veterinário. No G1 esta frequência não ocorreu e no G4 apenas um animal apresentou melhora clínica e não teve sinais gastroentéricos. Entre os animais que morreram a ausência de sinais gastroentéricos foi superior a 50%.

TABELA 21 - Frequência dos sinais gastroentéricos em relação à sobrevida dos cães com cinomose nos grupos experimentais. Botucatu, SP, 2011.

Sobrevida	G1		G2		G3		G4		G5		G6	
	Sem	Com	Sem	Com	Sem	Com	Sem	Com	Sem	Com	Sem	Com
Óbito	3,0	0,0	2,0	0,0	3,0	0,0	4,0	3,0	2,0	1,0	2,0	2,0
%	100,0	0,0	100,0	0,0	100,0	0,0	57,1	42,9	66,7	33,3	50,0	50,0
Sobrevida	0,0	1,0	3,0	1,0	3,0	1,0	2,0	0,0	2,0	0,0	0,0	2,0
%	0,0	100,0	75,0	25,0	75,0	25,0	100,0	0,0	66,7	0,0	0,0	50,0
Melhora	4,0	2,0	1,0	3,0	1,0	2,0	1,0	0,0	2,0	3,0	2,0	2,0
%	66,7	33,3	25,0	75,0	33,3	66,7	100,0	0,0	40,0	60,0	50,0	50,0
Total	7,0	3,0	6,0	4,0	7,0	3,0	7,0	3,0	6,0	4,0	4,0	6,0
%	70,0	30,0	60,0	40,0	70,0	30,0	70,0	30,0	60,0	40,0	40,0	60,0

Estatística: Qui-quadrado, G1 p=0,1612; G2 p=0,1534; G3 p=0,1965; G4 p=0,3992; G5 p=0,3293; G6 p=0,4346.

G1: grupo 1; G2: grupo 2; G3: grupo 3; G4: grupo 4; G5: grupo 5; G6: grupo 6.

Sem: sem sinais gastroentéricos; Com: com sinais gastroentéricos.

%; porcentagem.

TABELA 22 - Frequência dos sinais respiratórios em relação à sobrevida dos cães com cinomose. Botucatu, SP, 2011.

Sinais respiratórios	Óbito		Sobrevida		Melhora		Total	
	n	%	n	%	n	%	n	%
Com sinais	11	50,0	9	60,0	5	21,7	25	41,7
Sem sinais	11	50,0	6	40,0	18	78,3	35	58,3
Total	22	100,0	15	100,0	23	100,0	60	100,0

Estatística: teste do qui-quadrado, $p=0,0395$

n: número de animais.

%; porcentagem.

Dos animais que apresentaram melhora clínica, 78,3% apresentavam sinais respiratórios, independente do tratamento realizado. Dos 60 animais incluídos na pesquisa, 41,7% apresentavam sinais respiratórios, antes ou durante o atendimento no Hospital Veterinário.

No entanto, dos animais que morreram, a ocorrência de sinais respiratórios foi de 50%, mostrando que a presença destes sinais não foi determinante para a sobrevida dos animais, independente do tratamento que tenha recebido (Tabela 23).

O grupo 5 foi o que apresentou maior número de animais com sinais respiratórios (60%), diferente dos demais. Porém, a presença de sinais respiratórios não influenciou na sobrevida dos animais nos diferentes tipos de tratamento, já que os grupos controle apresentaram resultados similares quanto ao óbito e melhora clínica, comparando-se com os grupos submetidos aos diferentes tratamentos (Tabela 23).

TABELA 23 - Frequência dos sinais respiratórios em relação à sobrevida dos cães com cinomose nos grupos experimentais. Botucatu, SP, 2011.

Sobrevida	G1		G2		G3		G4		G5		G6	
	Sem	Com	Sem	Com	Sem	Com	Sem	Com	Sem	Com	Sem	Com
Óbito	2,0	1,0	0,0	2,0	2,0	1,0	4,0	3,0	1,0	2,0	2,0	2,0
%	66,7	33,3	0,0	100,0	66,7	33,3	57,1	42,9	33,3	66,7	50,0	50,0
Sobrevida	0,0	1,0	2,0	2,0	2,0	2,0	1,0	1,0	0,0	2,0	1,0	1,0
%	0,0	100,0	50,0	50,0	50,0	50,0	50,0	50,0	0,0	100,0	50,0	50,0
Melhora	5,0	1,0	4,0	0,0	2,0	1,0	1,0	0,0	3,0	2,0	3,0	1,0
%	83,3	16,7	100,0	0,0	66,7	33,3	100,0	0,0	60,0	40,0	75,0	25,0
Total	7,0	3,0	6,0	4,0	6,0	4,0	6,0	4,0	4,0	6,0	6,0	4,0
%	70,0	30,0	60,0	40,0	60,0	40,0	60,0	40,0	40,0	60,0	60,0	40,0

Estatística: Qui-quadrado, G1 p=2397; G2 p=0,0541; G3 p=0,8703; G4 p=0,6792; G5 p=0,3292; G6 p=0,7316.

G1: grupo 1; G2: grupo 2; G3: grupo 3; G4: grupo 4; G5: grupo 5; G6: grupo 6.

Sem: sem sinais respiratórios; Com: com sinais respiratórios.

%; porcentagem.

Devido à característica multifocal da encefalite na cinomose, os sinais neurológicos foram trabalhados conforme o local da lesão que eles refletem. Desta forma, quanto maior a quantidade de sinais neurológicos, maior a área do SNC acometida e mais difusa é a distribuição viral. Assim, analisou-se a quantidade de sinais neurológicos em relação à sobrevida dos animais (Tabela 24).

TABELA 24 – Média, desvio padrão, mediana e percentis da quantidade de sinais neurológicos nos cães com cinomose incluídos na pesquisa em relação à sobrevida. Botucatu, SP, 2011.

Sobrevida	n	Média	Desvio padrão	Mínimo	P25	Mediana	P75	Máximo
Óbito	22	5,32	2,23	1,00	4,00	5,00	7,00	10,00
Sobrevida	15	3,60	2,03	1,00	2,00	3,00	5,00	7,00
Melhora	23	4,13	1,87	2,00	3,00	3,00	5,00	10,00

Estatística: Kruskal-Wallis, $p=0,3530$

n: número de animais.

P25: percentil 25.

P75: percentil 75.

Pode-se verificar que os animais que morreram tinham mais sinais que os animais que os sobreviventes ou que apresentaram melhora clínica. É importante ressaltar que o mínimo da soma dos sinais neurológicos nos animais que morreram e que sobreviveram foi de apenas um sinal, enquanto que os animais que melhoraram apresentaram no mínimo dois sinais neurológicos. O mesmo ocorre com o máximo da soma dos sinais, onde os animais que melhoraram e que morreram apresentaram o máximo de 10 sinais neurológicos. Desta forma, verificou-se que a quantidade de sinais neurológicos não interferiu de forma determinante no desfecho da doença, independente do tratamento realizado.

TABELA 25 – Média, desvio padrão, mediana e percentis da soma dos sinais neurológicos nos cães com cinomose em cada grupo experimental em relação à evolução clínica. Botucatu, SP, 2011.

Grupo	Evolução clínica	n	Média	Desvio padrão	Mínimo	P25	Mediana	P75	Máximo	Valor de p
G1	Óbito	3	5,33	2,52	3,00	3,00	5,00	8,00	8,00	0,4563
	Sobrevida	1	5,00	0,00	5,00	5,00	5,00	5,00	5,00	
	Melhora	6	3,83	1,17	3,00	3,00	3,50	4,00	6,00	
G2	Óbito	2	5,50	3,54	3,00	3,00	5,50	8,00	8,00	0,8734
	Sobrevida	4	5,00	2,45	2,00	3,00	5,50	7,00	7,00	
	Melhora	4	4,50	1,29	3,00	3,50	4,50	5,50	6,00	
G3	Óbito	3	6,67	0,58	6,00	6,00	7,00	7,00	7,00	0,0513
	Sobrevida	4	3,75	1,71	2,00	2,50	3,50	5,00	6,00	
	Melhora	3	7,67	2,52	5,00	5,00	8,00	10,00	10,00	
G4	Óbito	7	5,43	7,62	1,00	4,00	5,00	7,00	10,00	0,6120
	Sobrevida	2	4,00	2,00	3,00	3,00	4,00	5,00	5,00	
	Melhora	1	3,00	0,00	3,00	3,00	3,00	3,00	3,00	
G5	Óbito	3	5,67	1,15	5,00	5,00	5,00	7,00	7,00	0,0167
	Sobrevida	2	1,50	0,71	1,00	1,00	1,50	2,00	2,00	
	Melhora	5	3,20	0,45	3,00	3,00	3,00	3,00	4,00	
G6	Óbito	4	3,75	2,22	1,00	2,00	4,00	5,50	6,00	0,3148
	Sobrevida	2	1,50	0,71	1,00	1,00	1,50	2,00	2,00	
	Melhora	4	3,00	0,82	2,00	2,50	3,00	3,50	4,00	

Estatística: ANOVA (Análise de variância), valores significativos $p \geq 0,05$.

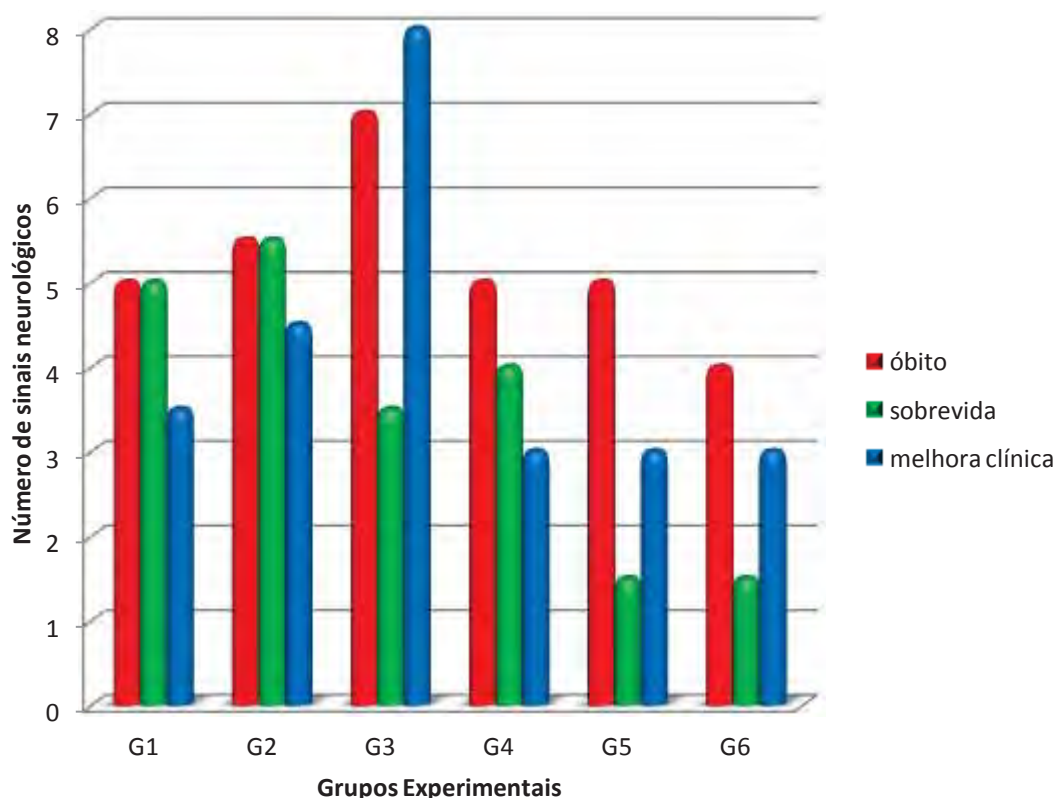
n: número de animais; G1: grupo 1; G2: grupo 2; G3: grupo 3; G4: grupo 4; G5: grupo 5; G6: grupo 6.

P25: percentil 25; P75: percentil 75.

Apenas dois grupos apresentaram resultados estatisticamente significativos, os G3 e G5. No G3, os animais que apresentaram melhora clínica foram aqueles com maior quantidade de sinais neurológicos, com mediana de oito sinais por animal, diferente do que ocorreu com os animais dos outros grupos experimentais. Neste grupo os animais foram tratados apenas com DMSO, e são considerados como controle.

Os animais do G5 foram tratados com ribavirina e prednisona e tiveram um resultado significativo em relação à soma de sinais neurológicos com a evolução clínica. Neste grupo, a maioria dos animais que melhoraram apresentava três sinais neurológicos quando chegaram para o atendimento hospitalar. Como aconteceu com todos os outros grupos não encontrou-se resultado estatisticamente significativo.

Desta forma, os animais que melhoraram apresentavam menos sinais neurológicos do que os que morreram, mesmo recebendo o antiviral. O tratamento experimental não foi capaz de desenvolver uma evolução clínica favorável em animais com muitos sinais neurológicos, provavelmente pelo quadro de lesão cerebral. Tal fato pode ser avaliado na figura 2.



Estatística: Krsukall-Wallis

G1: grupo 1; G2: grupo 2; G3: grupo 3; G4: grupo 4; G5: grupo 5; G6: grupo 6.

FIGURA 2 – Representação gráfica dos valores de mediana da soma de sinais neurológicos dos cães com cinomose em relação à evolução clínica em cada grupo experiemntal. Botucatu, SP, 2011.

Dos animais pesquisados, 34 apresentavam entre três e cinco sinais neurológicos no momento do exame clínico inicial. Houve menor frequência de animais com 10 ou mais sinais neurológicos, pois estes geralmente apresentavam um quadro avançado da doença e poderiam não sobreviver para que pudessem receber o fármaco antiviral. Porém, houve semelhança na quantidade de animais quando agrupados pelo número de sinais neurológicos (Tabela 26).

Animais com apenas um ou dois sinais também não foram selecionados devido a característica multifocal da enfermidade, optando-se para seleção de animais com mais de três sinais neurológicos, que caracterizasse melhor o quadro clínico da cinomose.

TABELA 26 – Frequência da soma de sinais neurológicos em relação à evolução clínica dos cães com cinomose independente do grupo experimental. Botucatu, SP, 2011.

Soma dos sinais neurológicos	Óbito	Sobrevida	Melhora	Total
1	2,0	2,0	0,0	4
%	50,0	50,0	0,0	
2	0,0	4,0	1,0	5
%	0,0	80,0	20,0	
3	3,0	2,0	11,0	16
%	18,8	12,5	68,8	
4	1,0	2,0	5,0	8
%	12,5	25,0	62,5	
5	6,0	2,0	2,0	10
%	60,0	20,0	20,0	
6	3,0	1,0	2,0	6
%	50,0	16,7	33,3	
7	4,0	2,0	0,0	6
%	66,7	33,3	0,0	
8	2,0	0,0	1,0	3
%	66,7	0,0	33,3	
10	1,0	0,0	1,0	2
%	50,0	0,0	50,0	
Total	22,0	15,0	23,0	60

%	36,7	25,0	38,3
----------	-------------	-------------	-------------

Estatística: ANOVA (Análise de Variância).

%; porcentagem em relação à linha.

No entanto, animais com mais de cinco sinais neurológicos apresentaram maior número de óbitos em relação aos com um até quatro sinais (Tabela 27). Esta característica é esperada na encefalite pela cinomose, pois quanto maior a área afetada, pior o prognóstico da doença.

TABELA 27 – Frequência da soma de sinais neurológicos nos cães com cinomose em relação à evolução clínica nos diferentes grupos experimentais. Botucatu, SP, 2011.

Soma dos sinais	G1			G2			G3			G4			G5			G6		
	Ø	S	M	Ø	S	M	Ø	S	M	Ø	S	M	Ø	S	M	Ø	S	M
1	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	1,0	0,0	0,0	0,0	1,0	0,0	1,0	1,0	0,0
%	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	100,0	0,0	0,0	0,0	100,0	0,0	50,0	50,0	0,0
2	0,0	0,0	0,0	0,0	1,0	0,0	0,0	1,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	1,0	0,0	0,0	1,0	1,0
%	0,0	0,0	0,0	0,0	100,0	0,0	0,0	100,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	100,0	0,0	0,0	50,0	50,0
3	1,0	0,0	3,0	1,0	0,0	1,0	0,0	1,0	0,0	0,0	1,0	1,0	0,0	0,0	4,0	1,0	0,0	2,0
%	25,0	0,0	75,0	50,0	0,0	50,0	0,0	100,0	0,0	0,0	50,0	50,0	0,0	0,0	100,0	33,3	0,0	66,7
4	0,0	0,0	2,0	0,0	1,0	1,0	0,0	1,0	0,0	1,0	0,0	0,0	0,0	0,0	1,0	0,0	0,0	1,0
%	0,0	0,0	100,0	0,0	50,0	50,0	0,0	100,0	0,0	100,0	0,0	0,0	0,0	0,0	100,0	0,0	0,0	100,0
5	1,0	1,0	0,0	0,0	0,0	1,0	0,0	0,0	1,0	2,0	1,0	0,0	2,0	0,0	0,0	1,0	0,0	0,0
%	50,0	50,0	0,0	0,0	0,0	100,0	0,0	0,0	100,0	66,7	33,3	0,0	100,0	0,0	0,0	100,0	0,0	0,0
6	0,0	0,0	1,0	0,0	0,0	1,0	1,0	1,0	0,0	1,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	1,0	0,0	0,0
%	0,0	0,0	100,0	0,0	0,0	100,0	50,0	50,0	0,0	100,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	100,0	0,0	0,0
7	0,0	0,0	0,0	0,0	2,0	0,0	2,0	0,0	0,0	1,0	0,0	0,0	1,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
%	0,0	0,0	0,0	0,0	100,0	0,0	100,0	0,0	0,0	100,0	0,0	0,0	100,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
8	1,0	0,0	0,0	1,0	0,0	0,0	0,0	0,0	1,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
%	100,0	0,0	0,0	100,0	0,0	0,0	0,0	0,0	100,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
10	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	1,0	1,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
%	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	100,0	100,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
Total	3,0	1,0	6,0	2,0	4,0	4,0	3,0	4,0	3,0	7,0	2,0	1,0	3,0	2,0	5,0	4,0	2,0	4,0
%	30,0	10,0	60,0	20,0	40,0	40,0	30,0	40,0	30,0	70,0	20,0	10,0	30,0	20,0	50,0	40,0	20,0	40,0

Estatística: Kruskal-Wallis

Ø: óbito; S: sobrevida; M: melhora clínica.

G1: grupo 1; G2: grupo 2; G3: grupo 3; G4: grupo 4; G5: grupo 5; G6: grupo 6.

No G1, 40% dos animais apresentavam três sinais neurológicos, e apenas um morreu. Os dois animais que apresentavam quatro sinais neurológicos melhoraram, enquanto que os dois com cinco sinais neurológicos não mostraram melhora clínica. Neste grupo se verificou que a mesma característica observada em todos os animais, independente do grupo experimental, demonstrando que o tratamento no G1 não alterou a característica da sobrevida dos animais.

O G2 apresentou uma distribuição mais uniforme dos animais em relação à soma de sinais neurológicos e foi possível verificar que apenas dois animais apresentaram três, quatro e sete sinais clínicos. Dentre os animais que morreram, um apresentou três sinais neurológicos e o outro sete sinais. Neste grupo não foram incluídos animais com um ou 10 sinais neurológicos. A resposta ao tratamento antiviral ficou bastante evidente neste grupo pela sobrevida e melhora clínica dos animais, mas não foi possível afirmar com relação aos sinais neurológicos.

No grupo 3 apenas dois animais apresentaram seis e sete sinais neurológicos e destes nenhum apresentou melhora clínica e três morreram. Neste grupo nenhum animal apresentou apenas um sinal neurológico. Um animal apresentou dois, outro três, outro quatro, outro cinco, outro oito e outro 10 sinais. Destes seis animais, nenhum morreu e os três com menos sinais sobreviveram. Estes resultados são diferentes aos obtidos no estudo de todos os animais incluídos na pesquisa, onde aqueles com mais sinais neurológicos foram os que apresentaram melhora clínica.

O G3, grupo controle para os tratamentos antivirais sem a prednisona, mostrou que em comparação aos grupos tratados com ribavirina houve diferença em relação ao número de sinais neurológicos, o que mostra que quando tratados com ribavirina os animais com menor número de sinais neurológicos apresentam maior chance de resposta na encefalite pela cinomose. Diferentemente no G3, em que houve maior sobrevida em relação à melhora clínica, os animais com maior quantidade de sinais neurológicos tiveram maior chance de sobreviver ao período de tratamento em relação aos animais que morreram.

No G4 a maioria dos animais apresentava cinco sinais neurológicos, sendo que dos três animais, dois morreram. Este foi o pior grupo com relação à sobrevida dos animais, demonstrando a maior letalidade (70%). Destes, um animal apresentou 10 sinais neurológicos e nenhum apresentou dois sinais. Este grupo serviu de grupo controle principalmente para os grupos 5 e 6 pelo uso da prednisona, que mostrou pouca eficácia pois mesmo animais com pouco sinais neurológicos morreram, diferente do ocorrido com os demais grupos.

O G5 mostrou o segundo melhor resultado frente a melhora clínica (50%), sendo que quatro animais apresentavam apenas três sinais neurológicos e apenas um apresentou quatro sinais neurológicos. Assim como nos outros grupos, os óbitos ocorreram em animais com mais sinais neurológicos. Nenhum animal deste grupo apresentou seis, oito e 10 sinais neurológicos.

Diferente do que ocorreu com todos os outros grupos, o G6 apresentou maior número de animais com um, dois e três sinais neurológicos, totalizando quatro óbitos, sendo em dois animais com um e três sinais apenas. Neste grupo não foram incluídos animais com sete, oito e 10 sinais neurológicos. A melhor resposta para melhora clínica aconteceu nos animais com dois, três e

quatro sinais. Apesar de tratado com antiviral este foi o segundo grupo com maior letalidade, com resultado similar aos dos outros grupos.

Os sinais neurológicos foram avaliados separadamente e são apresentados na tabela 28, relacionando-se à evolução clínica, que foi agrupada em sobrevida e melhora clínica, bem como o percentual de óbito, para cada sinal.

Dos 22 (36,7%) animais morreram, 20 (90,9%) animais apresentaram alterações de nervos cranianos, que foi o sinal neurológico relacionado ao maior número de óbitos. Estes resultados não apresentaram valor significativo na análise estatística, porém pode-se verificar que alguns sinais foram importantes para a evolução clínica (Tabela 28).

TABELA 28 – Frequência dos sinais neurológicos nos cães com cinomose em relação à evolução clínica, independente dos grupos experimentais. Botucatu, SP, 2011.

Sinais neurológicos	Óbito		Sobrevida e Melhora	
	n	%	n	%
Alteração de Nervos Cranianos	20	90,9	27	71,1
Alteração de postura e andar	16	72,7	25	65,8
Ataxia	7	31,8	6	15,6
Mioclonias	14	63,6	13	34,2
Déficits de propriocepção	13	59,1	13	34,2
Balançar de cabeça	5	22,7	12	31,6
Desvio de cabeça	6	27,3	8	21,1
Alteração do nível de consciência	7	31,8	6	15,6
Choro noturno	3	13,6	5	13,2

Reflexos Medulares	4	18,2	4	10,5
Andar compulsivo	4	18,2	4	10,5
Andar em círculos	2	9,1	3	7,9
Opistótono	3	13,6	2	5,3
Agressividade	3	13,6	1	2,6
Pressão da cabeça contra objetos	2	9,1	0	0,0
Total	22		38	

Estatística: Qui-quadrado

n: número de animais. %: porcentagem em relação ao número de óbitos.

78,3% dos animais pesquisados apresentavam alteração de nervos cranianos e apenas 42,6% morreram. Quanto à alteração de nervos cranianos, pode-se afirmar que a sobrevida e melhora clínica quando associadas foi maior. As alterações de postura e andar também foram percentualmente semelhantes, onde o maior número dos animais acometidos com essa alteração neurológica foi para sobrevida e melhora clínica (61%). Estes sinais não foram decisivos para sobrevida dos animais, de modo que pudesse intervir no tratamento.

Entre os animais incluídos na pesquisa 68,3% apresentaram ataxia, porém 63,4% destes chegaram ao final do tratamento ou melhoraram clinicamente. Este sinal também não interferiu no tratamento experimental.

A mioclonia foi encontrada em 45% dos animais, sendo que, neste caso, 51,9% deles morreram. No entanto, dos 22 animais que morreram 63,6% apresentavam mioclonias. Este sinal neurológico se revelou importante na evolução clínica dos animais tratados, pois independente do tratamento a maior parte dos animais com mioclonias morreram.

Dos 43,3% dos animais que apresentavam déficits de propriocepção, 50% morreram, e destes 59,1% apresentavam este déficit. Tal achado pode ter ocorrido porque animais que apresentam déficits de propriocepção geralmente apresentam outros sinais associados pela possível localização da lesão. Desta forma, este resultado corresponde aos achados quando considerados em relação à soma dos sinais neurológicos.

Os outros sinais neurológicos encontrados apresentaram frequências inferiores a 30%, causando menor interferência nos resultados de sobrevida em relação ao tratamento. Assim sendo, os sinais de balançar a cabeça (31,6%), desvio de cabeça (57,1%), choro noturno (62,5%), reflexos medulares (50%), andar compulsivo (50%) e andar em círculos (60%) apresentaram taxas de sobrevida e melhora maior ou igual às de óbito.

No entanto, alguns sinais mesmo com baixa frequência demonstraram certa influência na sobrevida dos animais, com taxas de óbito superiores em relação à sobrevida e melhora clínica quando os animais apresentavam estes

sinais, como alteração do nível de consciência (53,8%), opistótono (60%), agressividade (75%) e pressão da cabeça contra objetos (100%).

3. Exames complementares:

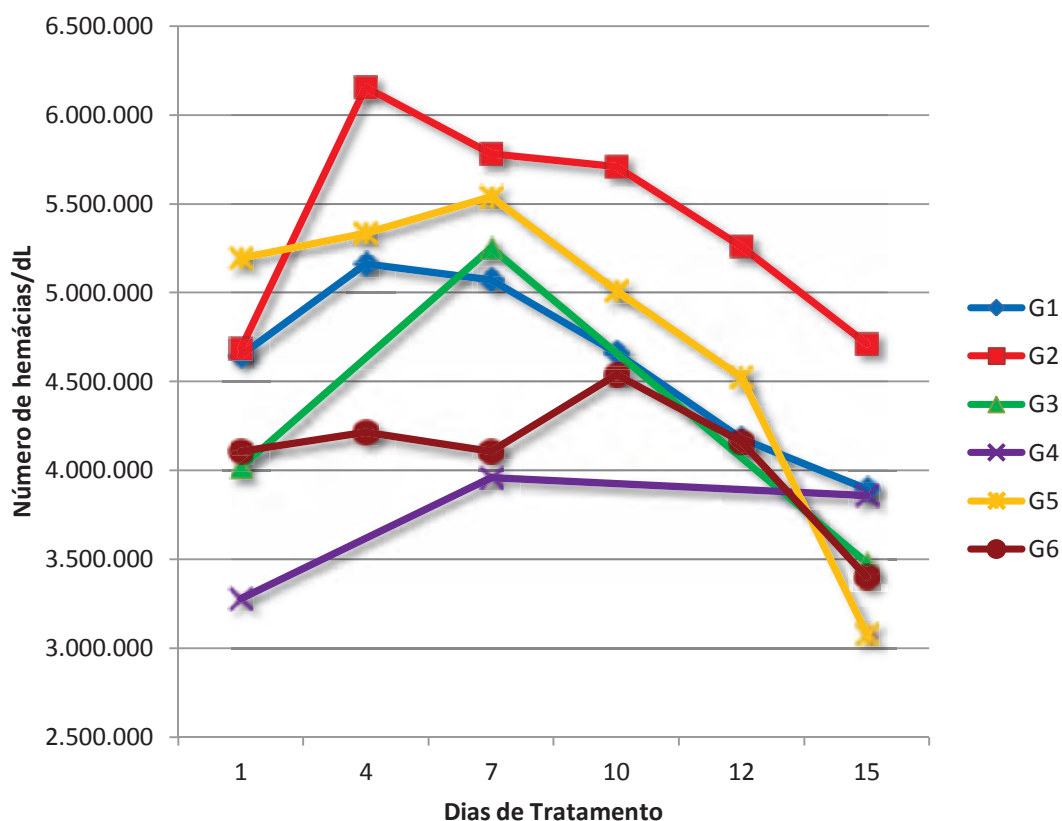
3.1 Hemograma:

Os dados de hemograma foram comparados em todos os momentos nos grupos tratados com ribavirina (1, 2, 5 e 6), e nos dias 1, 7 e 15 de tratamento em todos os grupos, inclusive nos dois grupos controle. Para cada parâmetro do hemograma foram calculados: média, desvio padrão, mediana e percentis em cada momento de colheita.

Os resultados da contagem de hemácias demonstraram que os animais do grupo 4 apresentavam valores inferiores aos outros grupos. Os cães do G5 apresentaram mediana próxima do valor de normalidade (5.500.000-8.500.000 hemácias/ μ L). A maior parte dos animais apresentava anemia, no momento do exame inicial, já que todos os grupos tiveram medianas com valores abaixo da normalidade para cães.

Todos os grupos apresentaram queda na mediana da contagem de hemácias, evidenciando anemia após o período de tratamento. Os animais dos grupos 3, 5 e 6 apresentaram valores inferiores à 3.500.000 células/ μ L (Figura 3).

Diferente dos outros grupos, dois animais do G5 e um animal do G6 apresentaram valores inferiores a 2.000.000 células/ μ L no 15º dia de tratamento, o que pode ser classificado como anemia grave. Apenas um animal do G6 recebeu transfusão sanguínea durante o período de tratamento, sendo este dado desconsiderado no cálculo da mediana para este parâmetro (Figura 3).



Estatística: Teste de Kruskal-Wallis

G1: grupo 1; G2: grupo 2; G3: grupo 3; G4: grupo 4; G5: grupo 5; G6: grupo 6.

FIGURA 3 – Representação gráfica das medianas da contagem de hemácias dos cães com cinomose em cada momento de colheita de material nos grupos experimentais. Botucatu, SP, 2011.

Em relação à dosagem de hemoglobina, encontrou-se resultado significativo estatisticamente em dois momentos, no 1º e 15º dias de tratamento. O primeiro dia é o momento quando os animais chegam ao Hospital Veterinário e ainda não receberam nenhum tratamento. Esta diferença dos valores seguiu a mesma relação dos valores da contagem de hemácias.

Conforme ocorreu na contagem de hemácias, na dosagem de hemoglobina os animais do G4 foram os que apresentaram menor mediana. No entanto, o único grupo que apresentou mediana da dosagem de hemoglobina dentro dos valores de referências para cães foi o G5 (valores de referência: 12-18 g/dL).

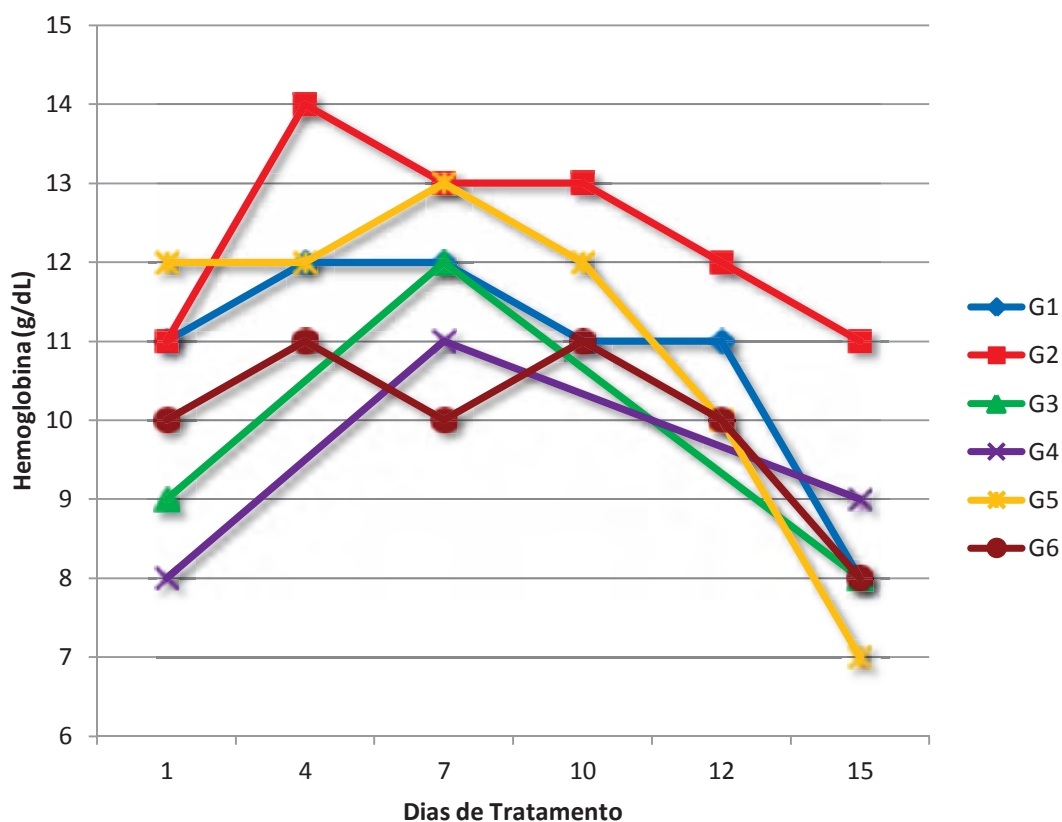
No primeiro momento pode-se afirmar somente que a maioria dos animais apresentava contagem de hemácias e dosagem de hemoglobina baixas quando chegaram ao Hospital Veterinário.

Após o tratamento experimental, o G2 foi o que apresentou mediana para a dosagem de hemoglobina, ao contrário dos grupos 5 e 6. Pode-se observar que a ribavirina em associação com a prednisona induziram uma queda nos níveis de hemoglobina nos animais destes dois grupos, diferente dos animais do grupo controle e daqueles que não receberam a associação destes dois fármacos.

Além disso, os grupos 2 e 6 que receberam DMSO em associação aos medicamentos experimentais mantiveram a dosagem de hemoglobina mais

alta, do que nos grupos 1 e 5, onde foram utilizados os mesmos fármacos sem a associação do DMSO.

Os dados da mediana da dosagem de hemoglobina em todos os momentos podem ser observados na figura 4.



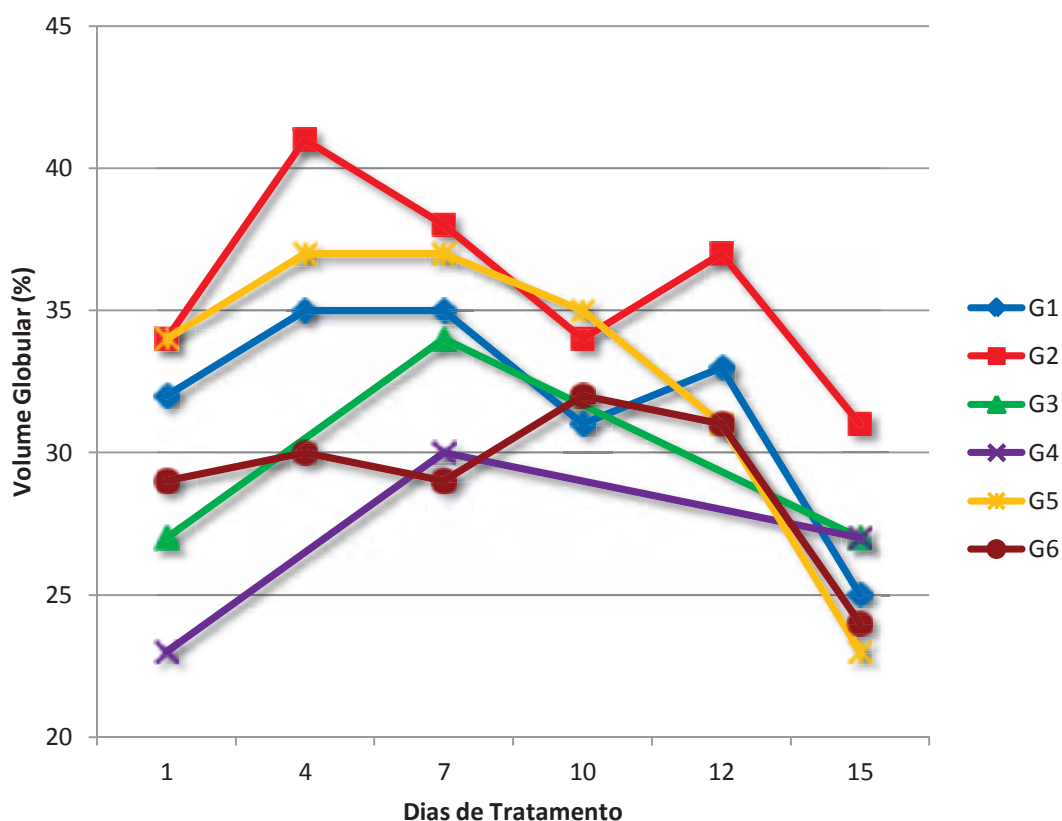
Estatística: Teste de Kruskal-Wallis

G1: grupo 1; G2: grupo 2; G3: grupo 3; G4: grupo 4; G5: grupo 5; G6: grupo 6.

FIGURA 4 – Representação gráfica das medianas da dosagem de hemoglobina dos cães com cinomose em cada momento de colheita de material nos grupos experimentais. Botucatu, SP, 2011.

Através do gráfico foi possível verificar que a queda da dosagem de hemoglobina ocorre aproximadamente no 10º dia de tratamento. Pelo traçado das curvas é possível verificar também que tanto no grupo tratado com o antiviral, como nos grupos controle, ocorre uma queda na dosagem de hemoglobina, demonstrando que não é em função do tratamento antiviral. No entanto, nos animais do G5 a mediana foi mais baixa, em relação aos outros grupos.

O volume globular das hemácias também foi analisado entre os grupos e estes dados apresentaram diferença estatística ($p=0,0021$) somente no primeiro dia de tratamento, da mesma forma que a contagem de hemácias e a dosagem de hemoglobina. Os dados de volume globular são apresentados na Figura 5.



Estatística: Teste de Kruskal-Wallis

G1: grupo 1; G2: grupo 2; G3: grupo 3; G4: grupo 4; G5: grupo 5; G6: grupo 6.

FIGURA 5 – Representação gráfica das medianas do volume globular das hemácias de cães com cinomose em cada momento de colheita de material nos grupos experimentais. Botucatu, SP, 2011.

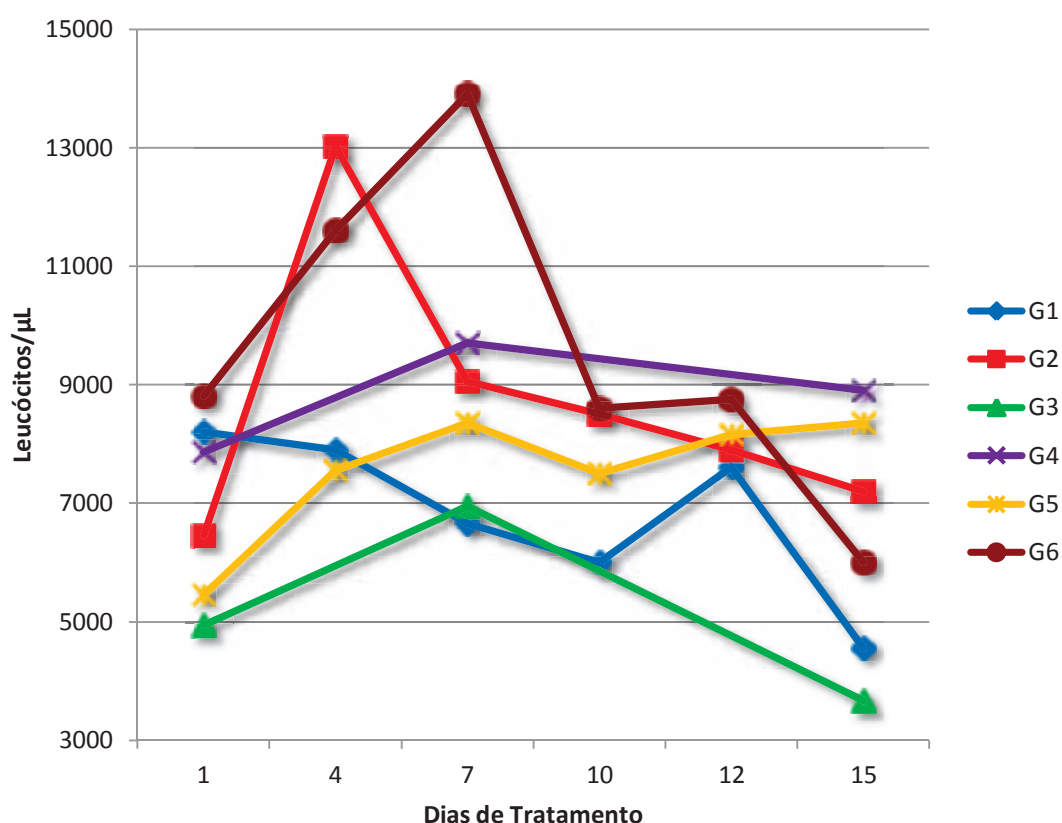
Apesar dos grupos controle apresentarem quase 10 pontos percentuais abaixo dos valores de referência (37-55%) no 15º dia de tratamento, nos grupos que receberam ribavirina, exceto o G2, os valores de volume globular chegaram a extremos, abaixo de 25%. Assim como os outros resultados apresentados, todos os animais mostraram anemia no último dia de tratamento, sendo que os grupos 1, 5 e 6 apresentaram os piores resultados tanto de volume globular, quanto de contagem de hemácias e dosagem de hemoglobina.

Ficou evidenciado que o tratamento com ribavirina, sem o DMSO, pode levar a anemia mais grave que a própria evolução da doença. O antiviral quando associado à prednisona pode levar a quadros de anemia grave, principalmente quando a prednisona é administrada na dose de 4 mg/Kg, a cada 24 horas, como aconteceu no G5.

Com relação ao número de plaquetas não encontrou-se resultado com significância estatística e em nenhum dos grupos foi encontrada uma alteração destes valores que fosse significativa clinicamente. O G6 foi o único grupo que apresentou mediana relativamente baixa no último dia de tratamento (86.000 plaquetas/ μ L). No entanto, após o 12º dia de tratamento todos os grupos demonstraram queda no número de plaquetas. O valor de normalidade para cães considerado foi de 200.000-400.000 plaquetas/ μ L.

Na série branca, a contagem total de leucócitos não apresentou resultados estatisticamente significativos. Nos dados da contagem de leucócitos foi possível identificar que a mediana do G3 foi menor em relação aos outros grupos no último dia de tratamento, chegando a 3.663 leucócitos/ μL , sendo os valores de referência para cães de 6.000-17.000 leucócitos/ μL . O G1 também apresentou mediana abaixo dos valores de referência com 4.550 leucócitos/ μL , no 15º dia de tratamento. Enquanto que todos os outros grupos apresentaram medianas dentro dos limites de normalidade para cães (Figura 6).

Os valores iniciais do leucograma mostraram uma distribuição muito ampla, com as medianas variando bastante entre si, sendo esta uma característica da própria enfermidade. A Figura 6 evidencia ainda que as medianas dos grupos 4 e 5, que receberam doses imunossupressoras de prednisona, mostraram uma contagem de leucócitos mais alta em relação aos outros grupos, sendo esta uma resposta esperada pelo uso de glicocorticóides.



Estatística: Teste de Kruskal-Wallis

G1: grupo 1; G2: grupo 2; G3: grupo 3; G4: grupo 4; G5: grupo 5; G6: grupo 6.

FIGURA 6 – Representação gráfica das medianas da contagem total de leucócitos dos cães com cinomose nos momentos de colheita de material. Botucatu, SP, 2011.

Os grupos 1, 2 e 3, que não receberam prednisona, demonstraram uma queda nesta contagem a partir do 12º dia de tratamento, demonstrando assim que esta alteração pode ser uma consequência natural da doença, já que os animais do G3 não receberam ribavirina. A mediana do G6 demonstrou a mesma característica, evidenciando que a dose de 0,5 mg/Kg, a cada 12 horas, não foi capaz de aumentar a quantidade de leucócitos circulantes tanto quanto a dose imunossupressora.

Com relação ao diferencial de células brancas, os neutrófilos apresentaram resultado estatisticamente significativo entre os grupos 1 e 6 ($p=0,0177$) no sétimo dia de tratamento. Os valores das medianas do número de neutrófilos indicou um aumento considerável nos dias 4 e 7 do tratamento no G6, enquanto que o G1 mostrou o menor número destas células no dia 7, justificando assim a diferença significativa destes valores. O valor de referência considerado para cães é de 3.000-11.500 células/ μL , portanto nenhum grupo apresentou mediana abaixo ou acima dos valores de referência, demonstrando a pouca relevância clínica frente aos achados estatísticos. Desta forma, os tratamentos experimentais não intervieram nos valores de neutrófilos, nos diferentes grupos.

A contagem de linfócitos é extremamente importante na patogenia da cinomose e é o tipo celular que mais sofre interferência dos fármacos experimentais. Nesta contagem foi encontrada uma diferença estatística no último dia do tratamento entre os grupos 4 e 6 como pode ser observado na tabela 29.

TABELA 29 – Valor absoluto de linfócitos do hemograma dos cães com cinomose em média, desvio padrão, mediana e percentis no décimo quinto dia nos diferentes grupos. Botucatu, SP, 2011.

Grupo	Média	Desvio padrão	Mediana	P25	P75
G1	188	166	136 ^{ab}	104	251
G2	688	998	324 ^{ab}	246	590
G3	952	969	748 ^{ab}	292	1284
G4	676	349	564 ^a	463	777
G5	233	231	136 ^{ab}	80	281
G6	159	140	120 ^b	74	177

Estatística: valores de mediana seguidos de letras diferentes indicam diferenças significativas entre os grupos pelo teste de Kruskal-Wallis (Valor de $P=0,0234$).

P25: percentil 25

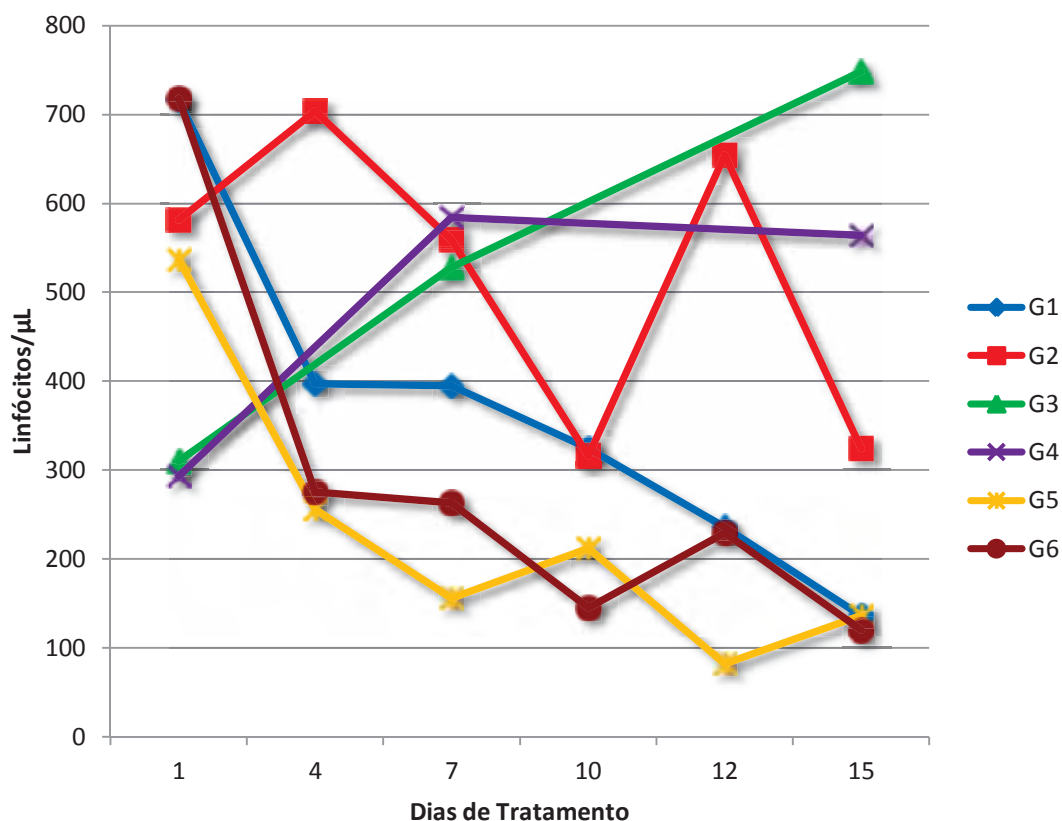
P75: percentil 75

G1: grupo 1; G2: grupo 2; G3: grupo 3; G4: grupo 4; G5: grupo 5; G6: grupo 6.

Verificou-se que o G3 apresentou melhor resposta linfocitária ao final do tratamento. No entanto, foi o único grupo que não recebeu ribavirina e prednisona. Nos grupos que receberam ribavirina e/ou prednisona os valores de linfócitos foram menores. Os valores de referência para o número absoluto de linfócitos para espécie canina é de 1.000-4.800 células/ μL . Os valores das medianas nos grupos 1, 5 e 6 foram as menores encontradas no último dia de tratamento, chegando próximo de 100 células/ μL , considerada uma linfopenia relativamente acentuada.

Os valores das medianas de todos os grupos são apresentados graficamente, conforme o momento da colheita de material, com objetivo de

avaliar a quantidade de linfócitos de acordo com os dias de tratamento, nos diferentes grupos experimentais (Figura 7).



Estatística: Teste de Kruskal-Wallis

G1: grupo 1; G2: grupo 2; G3: grupo 3; G4: grupo 4; G5: grupo 5; G6: grupo 6.

FIGURA 7 – Representação gráfica da mediana dos valores absolutos de linfócitos no hemograma dos cães com cinomose de cada grupo nos momentos de colheita de material. Botucatu, SP, 2011.

No 4º dia de tratamento dos animais dos grupos 1, 5 e 6 foi possível identificar uma queda nos valores de linfócitos, que foi constante nos três grupos, chegando a valores próximos de 100 células/ μ L no décimo quinto dia.

Novamente foi possível detectar que todos os grupos que receberam o tratamento antiviral apresentaram uma queda nos valores de linfócitos principalmente no último dia de internamento. Os grupos 3 e 4, que não receberam ribavirina, apresentaram aumento do número de linfócitos circulantes após o sétimo dia de tratamento, com a mediana chegando próximo ao valor de referência no décimo quinto dia. Os valores de medianas de todos os grupos não atingiram os padrões de referência em nenhum momento do tratamento, caracterizando uma linfopenia persistente.

As medianas dos valores absolutos de eosinófilos mostraram um resultado significativo estatisticamente no sétimo dia de tratamento entre os grupos 2 e 5, já que a mediana do grupo 5 neste momento foi zero. Os grupos tratados com DMSO (G2 e G3) apresentaram os maiores valores de medianas no sétimo dia de tratamento. No entanto, os grupos tratados com prednisona apresentaram valores de mediana igual à zero (G4, G5 e G6).

Os dados dos valores das medianas dos eosinófilos em todos os grupos foram avaliados em cada momento de colheita de sangue e não houve

significância estatística. Foi identificado um aumento de eosinófilos nos grupos 2 e 4, onde terminam o tratamento com valores de medianas altas, porém não ultrapassam os valores de referência para cães (100-1.200 células/ μ L) e, desta forma, não caracterizam uma eosinofilia.

Os monócitos não apresentaram resultado estatístico significativo. A maior parte das medianas dos grupos experimentais apresentou valor dentro daqueles de normalidade para cães (100-1.300 monócitos/ μ L). Só foi encontrada monocitose no quarto dia de tratamento dos cães do G2, sem apresentar relevância clínica à pesquisa. Os dados apresentaram uma semelhança nos diferentes grupos, demonstrando que não houve alteração dos monócitos com a utilização de ribavirina, prednisona e DMSO nas doses administradas.

3.2 Outras alterações hematológicas:

Na realização do hemograma é feita uma lâmina para a contagem diferencial e observação das células. Na cinomose há alterações celulares comumente encontradas no hemograma, como linfócitos reativos, inclusão de Lentz e monócitos ativados. No presente trabalho, esses dados foram estudados em todos os momentos, no entanto, em alguns momentos não foram encontradas as alterações descritas. Além disso, os grupos 3 e 4 tiveram menos colheitas de sangue para hemograma que os grupos experimentais, assim em algumas análises esses grupos não foram incluídos.

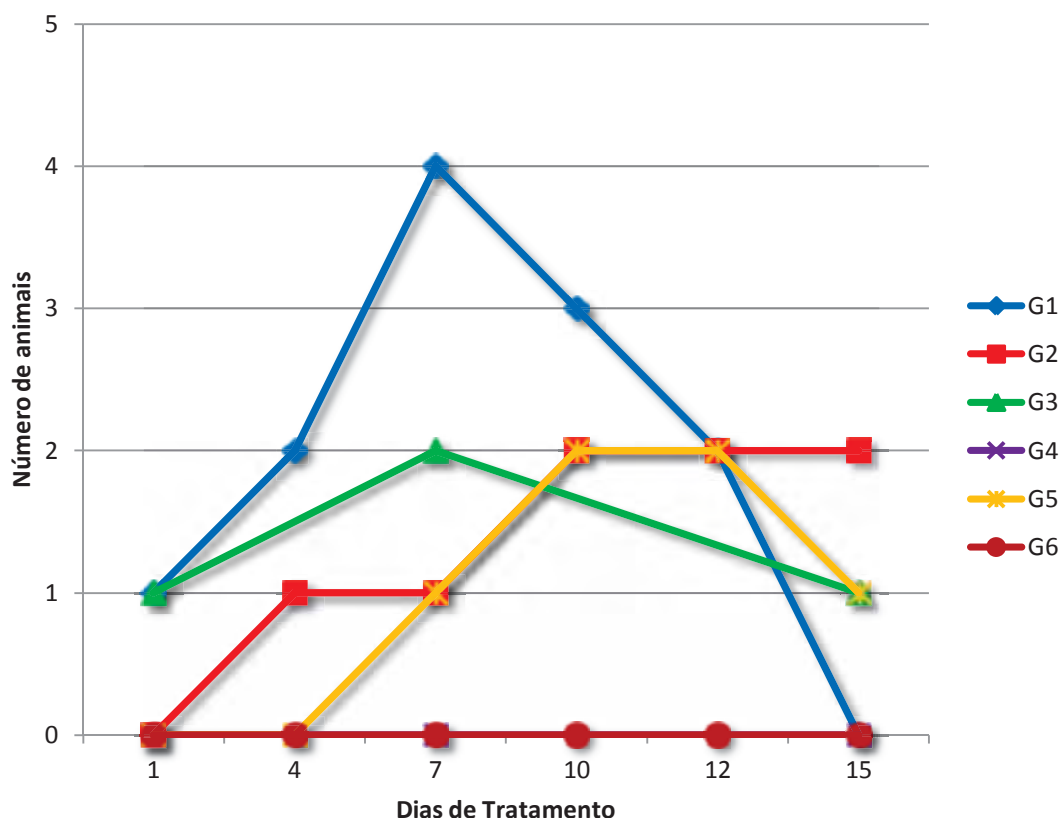
Por causa da baixa incidência desses achados, não encontrou-se resultado significativo estatisticamente em nenhum momento de colheita. Apenas dois animais apresentaram monócitos ativados no primeiro dia, antes do tratamento, com uma frequência de 3,3% de todos os animais incluídos na pesquisa. Somente um animal no G1 e no G3, com taxas de 10% em cada grupo respectivamente. No quarto dia de tratamento também foram encontrados monócitos ativados, porém neste dia não houve colheita de sangue para os animais dos grupos 3 e 4. Ainda foi possível encontrar monócitos ativados, com uma taxa de 7,5% entre os 40 animais tratados com ribavirina e suas associações. Dos animais que apresentaram essa alteração no hemograma, dois foram do grupo 1 e um do G2.

No sétimo dia de tratamento, os monócitos ativados foram encontrados em um número maior de cães. Neste momento, os seis grupos experimentais perfazem apenas 54 animais, sendo que os seis animais que morreram pertenciam aos G3 e G4. O G1 apresentou um número maior de animais com monócitos ativados circulantes (50%), seguido dos animais do G3 (25%) e estas células não foram encontradas nos animais dos grupos 4 e 6. Os monócitos ativados também foram encontrados nos hemogramas colhidos no décimo dia de tratamento, porém nestes dias não houve colheita de sangue nos G3 e G4. Os resultados demonstram que proporcionalmente o aparecimento desta célula no hemograma aumenta com relação ao tempo de tratamento. No décimo dia de tratamento, a taxa aumentou para 18,9%, observando-se que no G6 não houve detecção deste tipo de célula e que no G1 a taxa chegou a 42,9%. Até o décimo dia de tratamento três animais

havia morrido, um em cada grupo, 1, 2 e 5, por isso a soma total de animais foi para 37.

No décimo segundo dia de tratamento, os monócitos ativados caíram para 17,6%. Nenhum animal do grupo 6 tinha monócitos ativados, entretanto todos os outros grupos permaneceram com esta célula e neste momento apresentavam uma taxa de 33,3%.

No décimo quinto dia de tratamento, o total de animais sobreviventes foi de 41, sendo que 9,8% apresentavam monócitos ativados no sangue circulante. Os grupos 4 e 6 não apresentaram estas células nos hemogramas, assim como ocorreu com o G6 em todos os momentos do tratamento (Figura 8).



G1: grupo 1; G2: grupo 2; G3: grupo 3; G4: grupo 4; G5: grupo 5; G6: grupo 6.

FIGURA 8 – Representação gráfica do número de cães com cinomose que apresentaram monócitos ativados no hemograma nos diferentes momentos de colheita de material. Botucatu, SP, 2011.

Foi possível identificar que o G1 foi o grupo que apresentou o maior número de animais com monócitos ativados durante quase todo o período de tratamento, exceto no décimo quinto dia. O grupo 2 chegou a dois animais no último dia, com maior número de animais neste momento. Nos grupos 4 e 6 não foram encontrados animais com monócitos ativados no sangue periférico, em nenhum momento do tratamento.

Apesar dos animais apresentarem sinais neurológicos e com tempo de evolução de no máximo 10 dias, não se esperava encontrar corpúsculos de inclusão. No entanto, estes foram observados em dois momentos: no primeiro dia de atendimento, onde dos 60 animais incluídos apenas um (1,7%) animal

do G3 apresentou inclusões de Lentz no sangue periférico; no décimo quinto dia de tratamento também foi observado um (2,4%) animal dos 41 que sobreviveram que apresentava a inclusão no hemograma, sendo que este animal estava incluído no G5.

Com relação aos achados hematológicos, os linfócitos na sua forma reativa apresentam um significado importante na cinomose. Estes dados foram trabalhados da mesma forma que os monócitos ativados. Os dados foram avaliados para cada momento de colheita de sangue para realização dos hemogramas, nos dias 1, 4, 7, 10, 12 e 15 para os grupos 1, 2, 5 e 6. Nos dias 4, 10 e 12 não foi realizada colheita de sangue para hemograma nos grupos 3 e 4.

Portanto, no primeiro dia de atendimento no Hospital Veterinário, antes do tratamento, os linfócitos reativos foram encontrados em 8,3% dos animais incluídos na pesquisa. Apenas os G2 e G4 não apresentaram animais com linfócitos reativos no hemograma. O grupo que apresentou maior número foi o G6 com dois animais neste momento.

No quarto dia de tratamento, apenas um (2,5%) animal do grupo 2 apresentou linfócitos reativos no sangue periférico, sendo que neste momento a frequência foi calculada para 40 animais, já que os animais dos grupos 3 e 4 não foram incluídos.

No décimo dia de tratamento, apenas os grupos 5 e 6 apresentaram animais com linfócitos reativos circulantes, encontrando-se a taxa de 5,4% dos 37 animais que sobreviveram a este período de tratamento, nos quatro grupos experimentais.

Com 12 dias de tratamento não foram encontrados linfócitos reativos e no décimo quinto dia de tratamento foram encontrados linfócitos reativos em um (2,4%) animal, dos 41 que sobreviveram ao tratamento experimental, sendo que este pertencia ao grupo 6.

3.3 Dosagens bioquímicas:

As dosagens bioquímicas foram realizadas nos animais dos grupos 1, 2, 5 e 6, considerados grupos experimentais, nos dias 1, 5, 10 e 15 de tratamento. Nos animais dos grupos controle não foram realizadas as dosagens bioquímicas, pois os animais receberam medicamentos conhecidos em sua farmacologia em trabalhos anteriores. O presente estudo objetivou identificar efeitos indesejáveis causados principalmente pela ribavirina e suas associações.

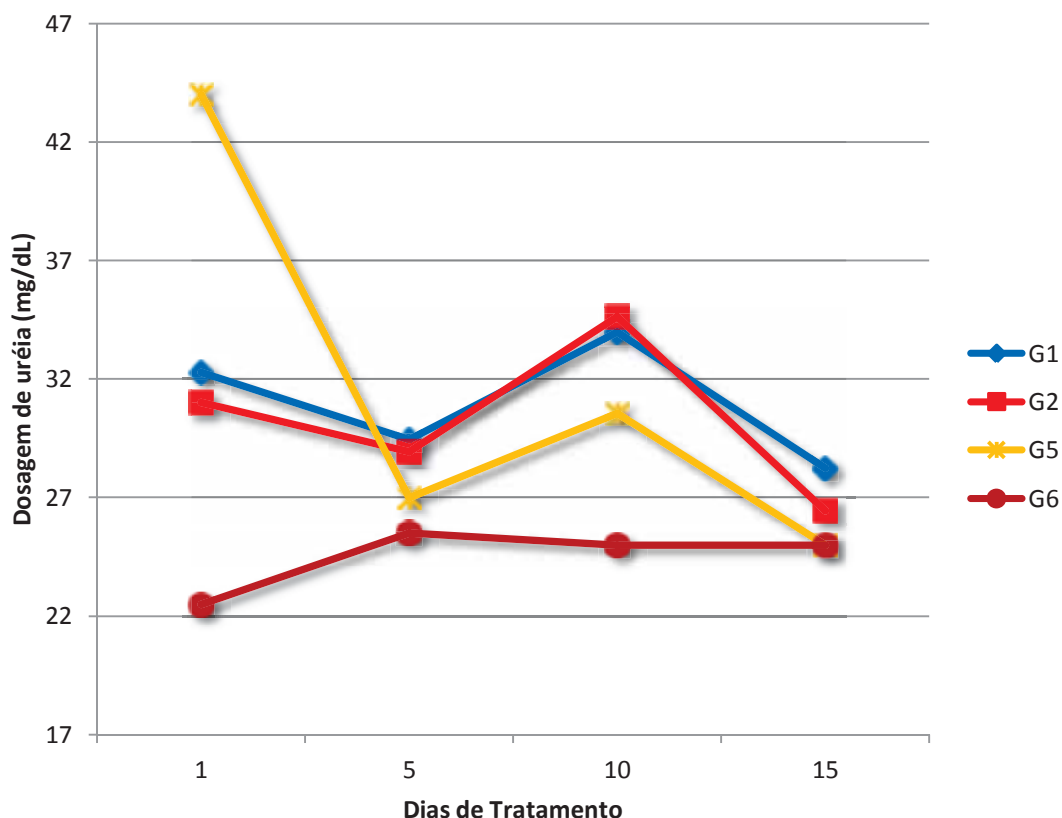
Estas medidas foram utilizadas para identificar lesões hepáticas e renais frente à administração do fármaco antiviral. Para todos os grupos foram calculados média, desvio padrão, mediana e percentis em cada momento de colheita, e foram analisados pelo teste de Kruskal-Wallis.

As dosagens de uréia e creatinina séricas foram utilizadas para avaliar a função renal dos cães tratados com ribavirina. As dosagens de uréia não mostraram diferença significativa estatisticamente entre os grupos nos diferentes momentos (Figura 9).

Os valores de normalidade da dosagem de uréia sérica em cães são de 17-32 mg/dL e foi possível identificar que a mediana do G5 no primeiro momento apresentou uma elevação de 44 mg/dL, com percentil 25 de 22

mg/dL e percentil de 75 de 48,5 mg/dL, demonstrando uma grande variedade de valores (Figura 9).

No primeiro momento, a dosagem de uréia no soro está relacionada diretamente com o estado geral dos animais quando chegaram para o tratamento e não demonstra uma ação dos fármacos experimentais. No entanto, no décimo dia de tratamento, os grupos 1, 2 e 5 apresentaram uma elevação dos valores das medianas, porém só os grupos 1 e 2 ultrapassaram os valores de referência com 34 mg/dL e 34,64 mg/dL, respectivamente. Estes valores podem estar relacionados com a desidratação dos animais, já que neste período a maior parte dos animais apresentou sinais de irritação gástrica, como diminuição do apetite e vômitos (Figura 9).



Estatística: Teste de Kruskal-Wallis

G1: grupo 1; G2: grupo 2; G5: grupo 5; G6: grupo 6.

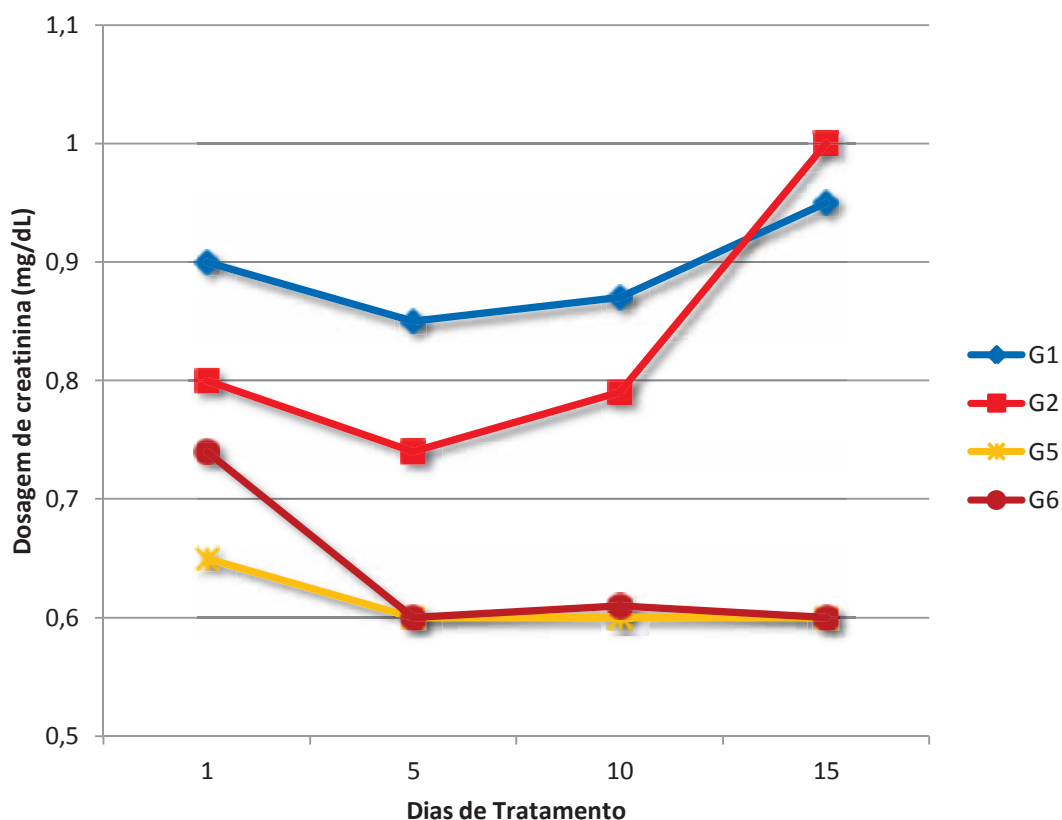
FIGURA 9 – Representação gráfica das medianas das dosagens de uréia sérica dos cães com cinomose nos diferentes grupos experimentais nos momentos de colheita de material. Botucatu, SP, 2011.

Ainda avaliando a função renal, os valores de creatinina apresentaram significância estatística nos dia 5, 10 e 15 de tratamento. Porém nenhum dos dados ultrapassou os valores de referência para cães (0,9-1,7 mg/dL), demonstrando que não houve lesão renal.

Os dados referentes às dosagens de creatinina no soro mostraram que não houve aumento destes no quinto dia de tratamento, mesmo havendo diferença significativa estatisticamente. Estes são valores abaixo da referência para cães saudáveis e não significam uma alteração na função renal, como descrito pelos valores de uréia no soro sanguíneo.

Os valores da mediana da dosagem de creatinina apresentaram diferença frente aos grupos 5 e 6, portanto nenhum deles apresentou mediana superior aos valores de referência que caracterizassem uma lesão renal no décimo dia de tratamento. Estes valores de mediana apresentam pouco valor clínico no presente trabalho, apesar de apresentarem significância estatística.

Da mesma forma que ocorreram nos outros momentos, as dosagens de creatinina não apresentaram significado clínico relevante no presente estudo, no décimo quinto dia de tratamento. Contudo, os dados foram esquematizados graficamente para melhor avaliação da função renal em todo o período de tratamento nos diferentes grupos experimentais (Figura 10).



Estatística: Teste de Kruskal-Wallis

G1: grupo 1; G2: grupo 2; G5: grupo 5; G6: grupo 6

FIGURA 10 – Representação gráfica das medianas da dosagem de creatinina dos cães com cinomose nos grupos experimentais e nos momentos de colheita de material. Botucatu, SP, 2011.

Além da função renal, também foi avaliada a função hepática pelas enzimas alanina-aminotransferase, gama-glutamilttransferase, fosfatase alcalina e albumina. Estas dosagens também foram comparadas entre os grupos nos diferentes momentos de colheita de material (1º, 5º, 10º e 15º dias de tratamento).

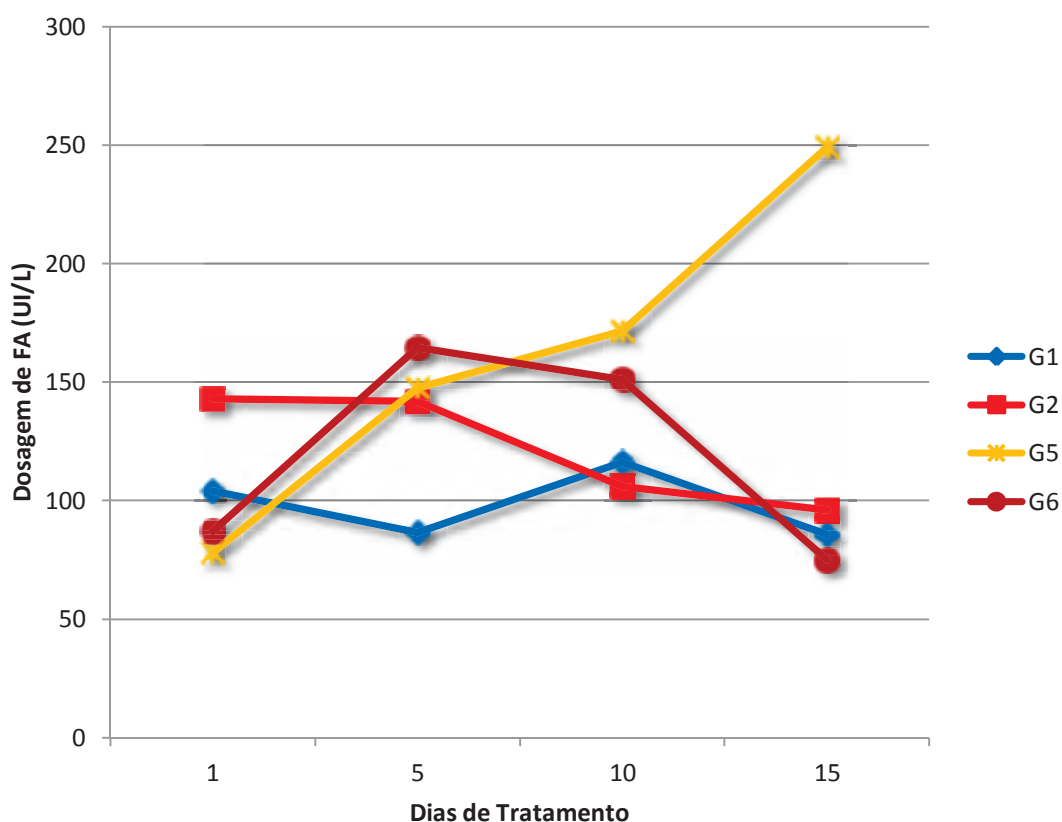
A dosagem de ALT não mostrou medianas que levassem a um resultado estatístico significativo. Os valores de referência da dosagem de ALT sérico para cães são de 10-120 UI/L. Em nenhum dos grupos foi encontrada mediana fora destes valores. O G5 apresentou uma elevação no último dia, diferente dos outros grupos, porém sem importância clínica. Assim, é possível afirmar

que o tratamento experimental não causou danos hepáticos detectáveis por meio destas dosagens.

Para complementar foi realizada a dosagem sérica de fosfatase alcalina, que apesar de não ser uma enzima muito específica, pode complementar os dados quando associada às outras enzimas hepáticas. Na comparação entre os grupos foi encontrado um resultado significativo estatisticamente no décimo quinto dia de tratamento. Esta diferença encontrada foi entre o G5 com G1 e G6. O valor da mediana do grupo 5 se destaca sendo a maior entre os grupos, no entanto, os valores de referência para esta dosagem são 35-280 UI/L. Neste caso a diferença significativa estatisticamente não apresenta valor clínico.

No grupo 5 foi encontrado um animal com aumento das enzimas hepáticas, caracterizando um lesão hepática no último dia de tratamento, este animal foi capaz de aumentar a média do grupo porque apresentou a dosagem de FA no valor de 2694 UI/L. Este mesmo animal apresentou valores de ALT e GGT altas, com 3317 UI/L e 329 UI/L respectivamente, todas no último dia de tratamento. Mesmo com as enzimas hepáticas altas, o animal ainda assim apresentava função hepática por manter normal o valor de albumina sérica.

A figura 11 presente melhor analisa dos dados das medianas da dosagem de FA entre os grupos nos diferentes momentos. A única discrepância de valores ocorre somente no último momento do G5, no entanto a mediana não ultrapassa o valor de referência desta enzima nos cães.



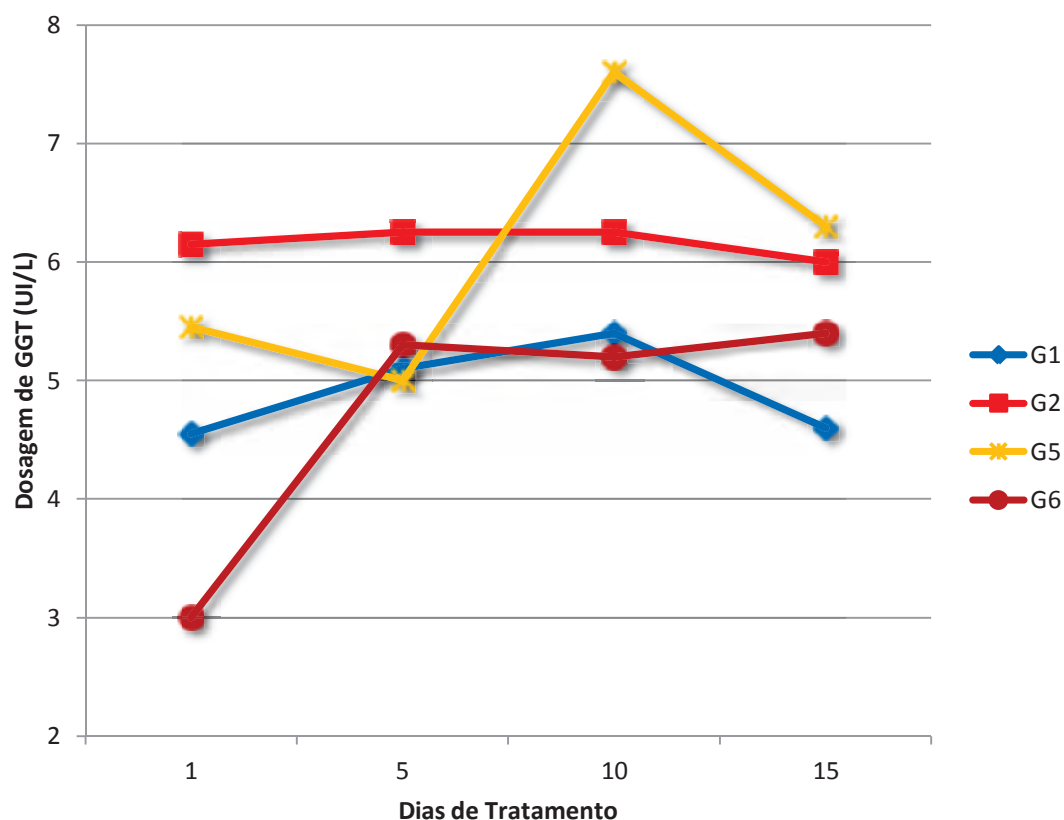
Estatística: Teste de Kruskal-Wallis

G1: grupo 1; G2: grupo 2; G5: grupo 5; G6: grupo 6.

FIGURA 11 – Representação gráfica das medianas da dosagem de fosfatase alcalina (FA) dos cães com cinomose nos grupos e nos diferentes momentos de colheita de material. Botucatu, SP, 2011.

Foi dosada também a concentração de GGT no soro dos cães tratados com ribavirina. Estes dados apresentaram resultado significativo antes do tratamento entre os grupos 2 e 6; no entanto, não apresentam importância para o referido estudo.

A dosagem de GGT sérica tem como valores de referência para cães de 0-6 UI/L, e, no entanto, a diferença estatística encontrada não representa importância clínica ao estudo, já que o valor da mediana do G2 está aumentado antes dos animais receberem os fármacos experimentais. E ao mesmo tempo, este aumento isolado não representa uma lesão hepática grave que impossibilitasse os animais de participarem do estudo (Figura 12).



Estatística: Teste de Kruskal-Wallis

G1: grupo 1; G2: grupo 2; G5: grupo 5; G6: grupo 6.

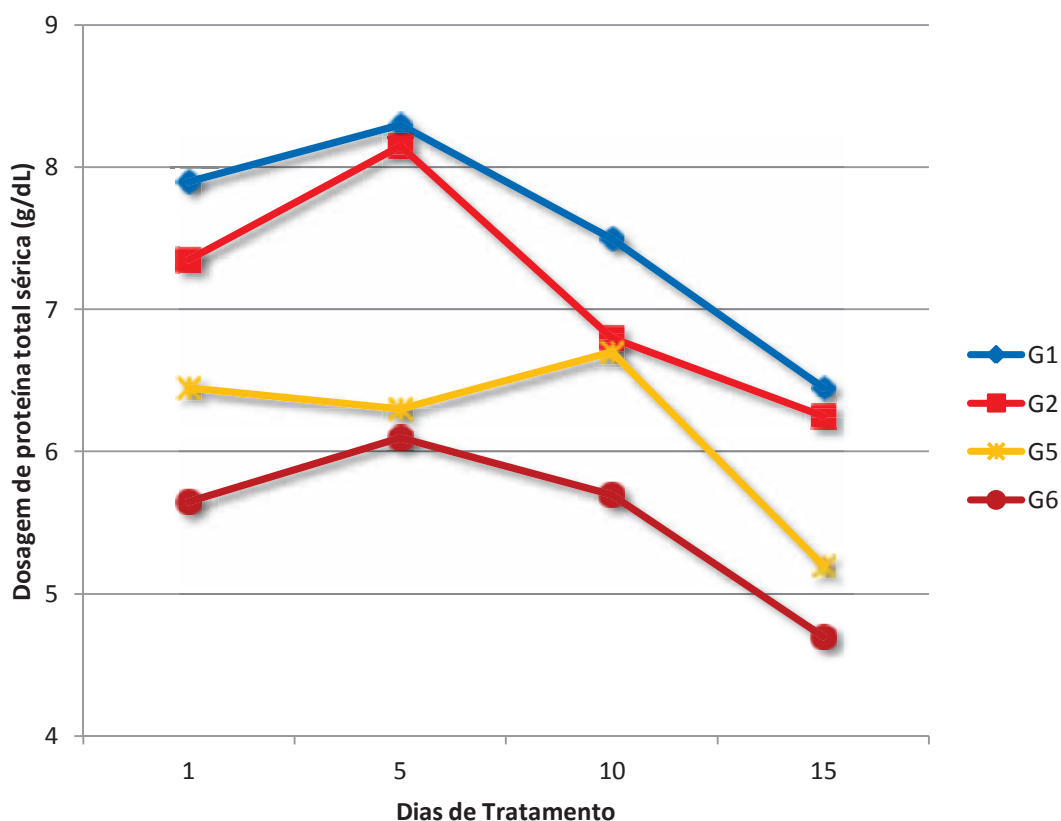
FIGURA 12 – Representação gráfica das medianas da dosagem de gama-glutamiltransferase (GGT) dos cães com cinomose nos grupos e nos diferentes momentos de colheita de material. Botucatu, SP, 2011.

Apenas os G2 e G5 apresentaram medianas acima do valor de referência. No grupo 2 as medianas ficaram acima de 6 UI/L em todos os momentos do período de tratamento. Já no grupo 5 a mediana ficou acima do valor de referência a partir do 10º dia de tratamento. No entanto, a partir destes dados não foi possível identificar se houve ou não lesão hepática por ação da ribavirina.

Os dados relacionados com a dosagem de proteínas, mais especificamente de albumina podem indicar a diminuição da função hepática quando estes valores estiverem abaixo dos valores de normalidade. Nas frações de proteína também foi analisada a globulina; esta pode estar relacionada diretamente com a produção de imunoglobulinas na doença viral.

Nesta análise é necessário avaliar todos os componentes juntos para diferenciar a diminuição da albumina por uma alteração hepática ou por uma compensação à concentração de globulinas.

Os valores de normalidade da proteína sérica total são 5,4-7,4 g/dL, e verificou-se que no primeiro momento os G1 e G2 apresentavam valores mais altos de proteína sérica. Neste momento, não foi possível avaliar as diferenças entre grupos, pois que ainda não tinham sido administrados os fármacos experimentais (Figura 13).



Estatística: Teste de Kruskal-Wallis

G1: grupo 1; G2: grupo 2; G5: grupo 5; G6: grupo 6.

FIGURA 13 – Representação gráfica das medianas da dosagem de proteínas totais séricas dos cães com cinomose nos grupos experimentais e nos momentos de colheita de material. Botucatu, SP, 2011.

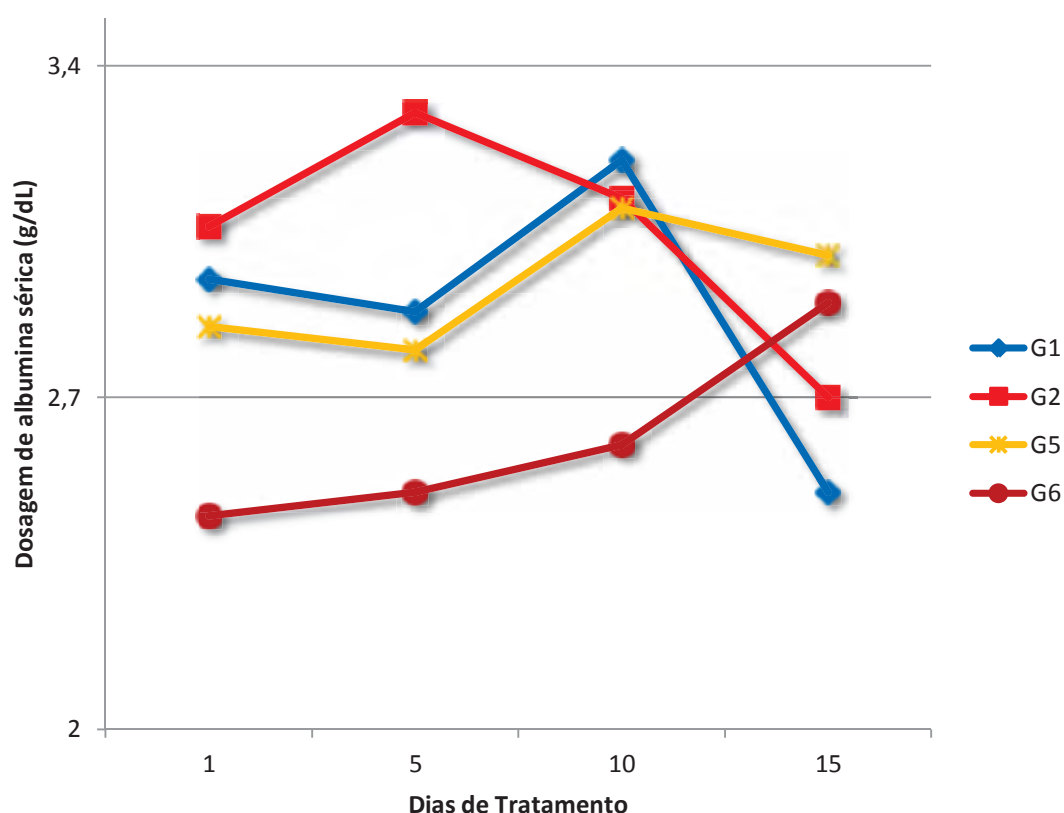
Houve uma queda em todos os grupos experimentais na dosagem de proteína sérica a partir do 10º dia de tratamento. Para apresentar algum significado clínico, a proteína sérica deve ser analisada pelas suas frações: albumina e globulina. Na fração albumina encontrou-se resultado significativo no primeiro momento do estudo, assim como aconteceu com a proteína sérica. Nenhuma das medianas apresentou valores acima dos padrões de normalidade (2,7-4,5 g/dL); desta forma pode-se afirmar que neste momento, nenhum dos grupos apresentou quadro grave de desidratação que revelasse o aumento da albumina sérica. Foi possível verificar que as medianas estão mais próximas dos valores mais baixos de referência. Apenas o G6 apresentou mediana abaixo de 2,7 g/dL, portanto a maioria dos animais deste grupo não

mostrou lesão hepática nas outras análises, indicando que a hipoalbuminemia encontrada pode estar relacionada com a pressão oncótica do sangue, havendo uma diminuição na produção de albumina para compensar a hiperglobulinemia. Outro fator que pode causar hipoalbuminemia é a anorexia ou hiporexia que pode ser um sintoma clínico da cinomose.

Para poder afirmar sobre tal achado, a análise da dosagem de globulinas no soro é fundamental. A dosagem de globulinas não apresentou diferença estatística nos momentos de colheita de material.

As medianas da dosagem de albumina e de globulinas foram trabalhadas entre os grupos e em cada momento esta análise foi representada graficamente (Figuras 14 e 15).

A mediana do G6 esteve abaixo do valor de referência para cães e a hipoalbuminemia terminou no 15º dia de tratamento. No entanto, os grupos 1 e 2 apresentaram hipoalbuminemia no mesmo momento (Figura 14).



Estatística: Teste de Kruskal-Wallis

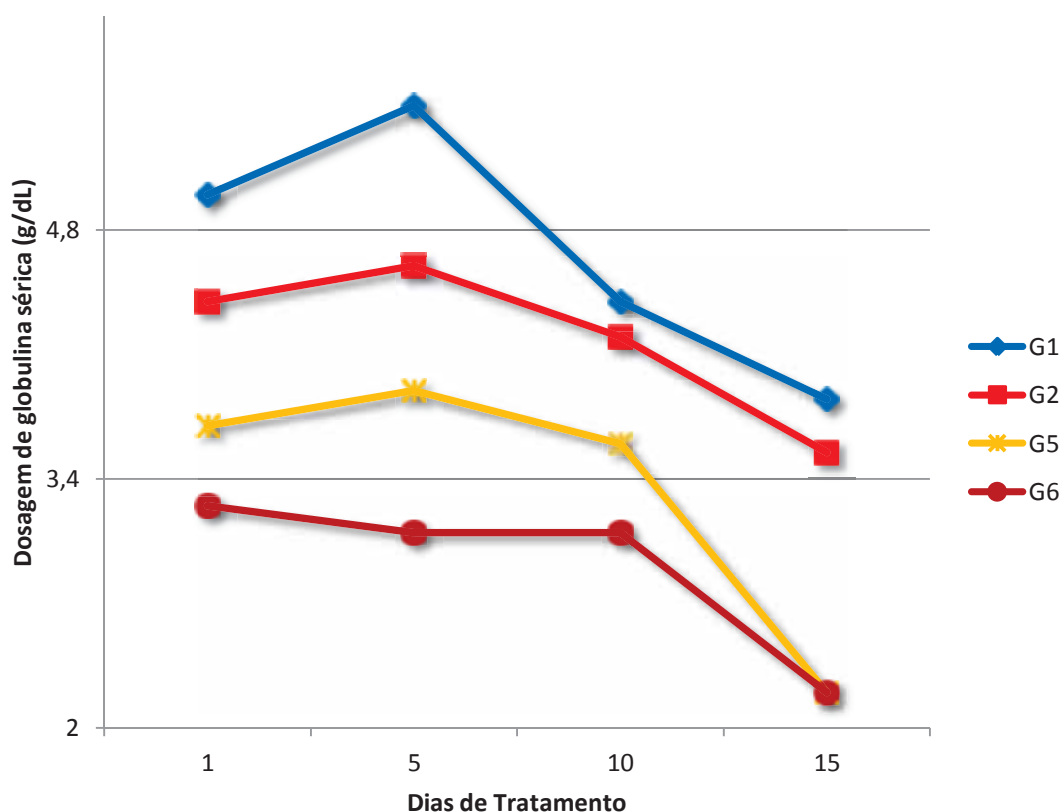
G1: grupo 1; G2: grupo 2; G5: grupo 5; G6: grupo 6.

FIGURA 14 – Representação gráfica das medianas da dosagem de albumina sérica dos cães com cinomose nos grupos experimentais nos diferentes momentos de colheita de material. Botucatu, SP, 2011.

Os valores de referência para cães na dosagem de globulina sérica são de 1,9-3,4 g/dL, desta forma verificou-se que o G6 foi o único que apresentou mediana dentro dos valores de normalidade. Os outros grupos experimentais apresentaram valores acima de 3,4 g/dL, demonstrando hiperglobulinemia até o décimo dia de tratamento (Figura 15).

No décimo quinto dia apenas os grupos 1 e 2 continuaram a apresentar hiperglobulinemia. Os valores das medianas dos grupos 5 e 6 mostraram a

eficácia da prednisona como anti-inflamatório sistêmico, já que a presença da hiperglobulinemia em cães com cinomose representa o aumento de imunoglobulinas produzidas frente a presença do vírus (Figura 15).



Estatística: Teste de Kruskal-Wallis

G1: grupo 1; G2: grupo 2; G5: grupo 5; G6: grupo 6.

FIGURA 15 – Representação gráfica das medianas da dosagem de globulina sérica dos cães com cinomose nos grupos experimentais nos diferentes momentos de colheita de material. Botucatu, SP, 2011.

A diminuição das globulinas também ocorreu nos G1 e G2, porém as suas medianas não atingiram os valores de normalidade, demonstrando que houve resposta frente ao vírus com diminuição do processo inflamatório (Figura 15).

Quando se compara as curvas do gráfico de globulina e albumina sérica, pode-se afirmar que houve uma compensação das suas dosagens, demonstrando que a diminuição da fração albumina está relacionada com a pressão oncótica dentro dos vasos sanguíneos por causa da hiperglobulinemia produzida a partir da infecção viral.

3.4 Exame de urina tipo I:

Os resultados do exame de urina tipo I foram avaliados em cada grupo experimental e cada critério analisado durante o exame. Inicialmente, o volume

da amostra foi avaliado para saber se houve padronização, apesar da dificuldade de conseguir a mesma quantidade de amostra de animais de tamanhos diferentes. Em alguns momentos de colheita houve grande dificuldade de conseguir as amostras por características próprias de cada animal.

As amostras de urina foram colhidas nos momentos 1, 5, 10 e 15 dias de tratamento e analisadas pelo Laboratório Clínico Veterinário da FMVZ – UNESP/Botucatu, SP. A análise estatística utilizada foi o teste de Kruskal-Wallis para cada perfil avaliado no exame de urina tipo I.

O volume das amostras apresentaram medianas que variaram em relação aos grupos e os dias de colheita de material entre 5 e 10mL, não havendo relevância clínica.

Com relação ao aspecto das amostras, podiam variar de límpido, discretamente turvo a turvo. Assim, no primeiro momento, houve predominância do aspecto discretamente turvo nas amostras de urina dos cães do G5. Em relação aos outros momentos houve predominância do aspecto discretamente turvo em todos os grupos, possivelmente porque as punções da vesícula urinária rotineiramente podem ter levado a quadros de cistite que apresentam aspecto discretamente turvo ou turvo da urina.

Os dados de densidade foram avaliados pelas medianas nos diferentes grupos e em cada momento de colheita de material. No primeiro momento não houve resultado significativo estatisticamente e as medianas se apresentavam dentro dos valores de normalidade (1.015-1.045), exceto a mediana da densidade urinária do G5 que ficou em 1.048.

Neste primeiro momento o aumento da densidade urinária está relacionado com o grau de desidratação dos animais, encontrado no grupo 5. Todos os outros grupos apresentaram medianas dentro da normalidade.

No quinto dia de tratamento, os valores das medianas de cada grupo mantiveram-se dentro dos valores de referência para cães. Estes dados também não apresentaram valores significativos estatisticamente.

Este mesmo resultado aconteceu com as densidades urinárias do 10º e 15º dias de tratamento, mostrando que não houve lesão renal causada pelos fármacos experimentais. Portanto, não foram organizados em tabelas ou gráficos por não apresentarem valor clínico à pesquisa.

Com relação aos dados de pH urinário não houve resultado estatístico significativo e, clinicamente, as medianas não variaram dos valores de normalidade para cães, 6,0 a 7,5. Em todos os momentos de colheita e em todos os grupos não houve alterações, por isso não foram organizados em tabelas e não houve representação gráfica.

Na primeira colheita de material não foi encontrada alteração na dosagem de proteínas. Esta dosagem é medida em cruces e pode variar de zero, traços, uma a quatro cruces, desta forma, para análise estatística foi criado escore e a mediana representa a predominância. Neste momento a predominância encontrada foi de traços em todos os grupos, o que clinicamente não tem significado. Pela análise estatística, $p=0,0364$, entre os grupos 1 versus 5 e 6, porém a variação é de zero para traços de proteínas na urina, o que não tem significado clínico.

Nenhum outro momento apresentou resultados significativos estatisticamente. Após o período de 15 dias de tratamento, os grupos 2, 5, e 6 apresentaram valores altos de concentração de proteína na urina de alguns

cães, porém não mostra significância clínica, já que alguns animais que sobreviveram apresentavam condições clínicas gerais ruins e podem influenciar estes resultados por outros fatores, como sépsse associada a quadros graves de pneumonia e não por lesões renais causadas pelos fármacos experimentais.

As dosagens de glicose são facilmente alteradas pela alimentação ou administração de fluidos adicionados de glicose. Esta dosagem apresentou resultado significativo estatisticamente no primeiro dia quando o animal chegou ao Hospital Veterinário.

No primeiro dia, todos os animais foram anestesiados e para tal fez-se necessário a fluidoterapia para acompanhar o procedimento como acesso venoso, além disso, adicionava-se glicose para favorecer a diurese e eliminação dos fármacos anestésicos. Essa adição de glicose pode causar maior eliminação da mesma pela urina, interferindo nos resultados do exame de urina tipo I. Estes valores significativos das medianas em escores podem estar relacionados com essa administração intravenosa de glicose, não apresentando valor significativo clinicamente.

Nos momentos 5 e 10 de tratamento não houve resultado significativo estatística e clinicamente, pois que todas as medianas de dosagem de glicose foram zero.

No décimo quinto dia de tratamento, não houve resultado estatístico significativo, mas os animais do grupo 2 apresentaram uma mediana de duas cruzes para a dosagem de glicose na urina.

No último dia de tratamento os animais eram anestesiados novamente para colheita de líquido, portanto novamente houve interferência da adição de glicose na fluidoterapia. Essa eventual discrepância pode estar relacionada com a dificuldade de colher o material dos animais nos respectivos grupos experimentais e a anestesia permitia melhor manejo destes.

Não foi encontrado acetona nas amostras de urina dos animais incluídos na pesquisa, em nenhum momento de colheita de material.

A dosagem de urobilinogênio também foi normal em todos os animais e em todos os momentos de colheita de material.

A presença de bilirrubina também foi analisada e nos dois primeiros momentos de colheita de material (1º e 5º dias) não houve resultados significantes, tanto estatisticamente quanto clinicamente.

No entanto, no décimo dia de tratamento dos animais do G1 foi possível detectar a presença de traços de bilirrubina na urina na maior parte deles, inclusive com resultado significativo estatisticamente (Tabela 30).

TABELA 30 - Mediana e percentis em escores da dosagem de bilirrubina na urina dos cães com cinomose nos diferentes grupos experimentais, no décimo dia de tratamento. Botucatu, SP, 2011.

Grupo	Mínimo	P25	Mediana	P75	Máximo
G1	0,0	0,0	1,0 ^a	1,0	1,0

G2	0,0	0,0	0,0 ^b	0,0	0,0
G5	0,0	0,0	0,0 ^b	0,0	2,0
G6	0,0	0,0	0,0 ^b	0,0	0,0

Estatística: Kruskal-Wallis, valores significativos representados pelas letras diferentes, $p=0,0016$.

P25: percentil 25.

P75: percentil 75.

0: negativo; 1,0: traços de bilirrubina; 2,0: + de bilirrubina; 3,0: ++ de bilirrubina; 4,0: +++ de bilirrubina; 5,0: ++++ de bilirrubina.

G1: grupo 1; G2: grupo 2; G5: grupo 5; G6: grupo 6.

No décimo quinto dia de tratamento não foi encontrado resultado significativo estatisticamente, porém todos os grupos apresentaram valores altos do percentil 75, evidenciando que todos os animais que apresentavam valores mais altos tinham uma média que variou de 2,0 a 5,0 no escore, representando de uma a quatro cruzeiras para a presença de bilirrubina na urina, que pode significar um início de lesão hepática (Tabela 31).

TABELA 31 - Mediana e percentis em escores da dosagem de bilirrubina na urina dos cães com cinomose nos diferentes grupos experimentais, no décimo quinto dia de tratamento. Botucatu, SP, 2011.

Grupo	Mínimo	P25	Mediana	P75	Máximo
G1	0,0	0,0	0,0	5,0	5,0
G2	0,0	0,0	0,0	2,0	5,0
G5	0,0	0,0	2,5	5,0	5,0
G6	0,0	0,0	0,5	2,0	5,0

Estatística: Kruskal-Wallis, $p=0,4952$.

P25: percentil 25. P75: percentil 75. 0: negativo; 1,0: traços de bilirrubina; 2,0: + de bilirrubina; 3,0: ++ de bilirrubina; 4,0: +++ de bilirrubina; 5,0: ++++ de bilirrubina.

G1: grupo 1; G2: grupo 2; G5: grupo 5; G6: grupo 6.

O grupo 5 foi o que apresentou maior dosagem de bilirrubina na urina em relação ao número de animais acometidos no grupo. O escore de 2,5 seria entre uma cruz e duas cruzeiras, o que já pode significar uma lesão ou sobrecarga hepática. Esses dados mostram uma semelhança que é o aumento de bilirrubina na urina pelo menos em alguns animais de todos os grupos. O único fármaco em comum a todos os grupos é a ribavirina. Estes podem ser indícios que a partir do décimo quinto dia a ribavirina possa levar a quadros de anemia hemolítica na dose e intervalo entre doses utilizadas na pesquisa.

Não foi encontrado resultado significativo na quantificação de sangue oculto na urina por uma variação muito grande dos dados, já que este resultado é modificado por contaminação durante a punção da vesícula urinária. Este dado foi avaliado em cada momento e nos grupos experimentais e não apresentou significância estatística. Nenhuma das amostras apresentou

positividade para a presença de sais biliares na urina nos grupos experimentais e em nenhum dos momentos de colheita de material.

Após a avaliação físico-química da urina, foi realizada a análise do sedimento e neste pode-se verificar a presença de células do trato urinário, de outras células, cristais, cilindros, bactérias e outras estruturas. As células renais foram encontradas nas amostras de urina no primeiro dia de atendimento no Hospital Veterinário, principalmente nos grupos 5 e 6. A quantidade das medianas variou de raras a três células por campo, sendo que este achado não tem grande valor no diagnóstico de uma lesão renal, portanto pode ser irrelevante clinicamente.

A presença de células renais no sedimento urinário nos grupos 5 e 6 continuaram aparecendo na mesma quantidade nos dias 5 e 10 de tratamento, levando a um resultado com diferença significativa na estatística.

Da mesma forma que ocorreu no primeiro momento, no quinto dia do tratamento foi encontrado três células renais por campos no sedimento urinário, o que não deve ser considerada uma alteração grave. Como são achados encontrados desde o primeiro dia de colheita de material, não podemos assumir que há lesão renal por causa dos fármacos experimentais.

No décimo dia, somente o grupo 5 apresentou predominância da presença de células renais no sedimento urinário. Porém, novamente a quantidade dessas células não nos permite afirmar que houve lesão renal.

No décimo quinto dia de tratamento, não houve resultado significativo estatisticamente, além disso, os valores de mediana para a presença de células renais no sedimento urinário do grupo 5 foram menores do que no décimo dia. Pode-se afirmar que houve diminuição da quantidade de células renais no sedimento urinário e não houve lesão renal pela ação dos fármacos experimentais.

A presença de células de descamação do sistema urinário é comum no sedimento urinário, porém em baixas quantidades. As células uretrais foram encontradas na variação de raras a três células por campo nos dois primeiros momentos de colheita de urina. No primeiro e no quinto dia de tratamento não houve resultado significativo e não houve presença de grande quantidade destas células, portanto sem significado clínico também.

Mesmo apresentando resultado significativo estatisticamente no décimo dia de tratamento, a presença de células uretrais no sedimento urinário de raras a três células por campo não representa um processo descamativo inflamatório ou lesão uretral. Portanto, esses dados não apresentam significância clínica para a pesquisa. Até este momento os fármacos experimentais parecem não ter causado lesão no sistema urinário.

No décimo quinto dia de tratamento não houve resultado significativo estatisticamente e as medianas dos grupos não passaram do escore um, que significa presença de raras a três células por campo. Neste momento, os valores máximos permaneceram no escore um, mostrando que não houve lesão uretral pelos fármacos experimentais.

Para as células da pelve não houve resultado significativo em momento algum e sem alterações clínicas, já que em todos os momentos e em todos os grupos as medianas permaneceram no zero. Houve animais que apresentaram o escore um e dois da presença destas células, portanto não foi a maioria, provavelmente por uma condição do indivíduo.

A presença de células da pelve não mostrou resultado clínico pertinente a pesquisa realizada, demonstrando como os rins foram preservados mesmo com a administração da ribavirina durante 15 dias consecutivos.

A presença de hemácias no sedimento urinário está relacionada com processos inflamatórios ou pode ocorrer por contaminação da amostra com sangue periférico no momento da colheita. Os dados de contagem de hemácias na urina apresentaram resultado significativo estatístico apenas no segundo momento de colheita de material.

No primeiro dia que os animais chegaram ao Hospital Veterinário, as amostras apresentavam uma mediana com escore um, ou seja, a presença de hemácias estava variando de raras a três células por campo, que pode ser considerado normal para cães.

No quinto dia, alguns animais chegaram a apresentar mais de 50 células por campo no sedimento urinário, porém as medianas de escore mostram que a predominância ficou entre zero, raras a três células por campo. Provavelmente, os valores máximos encontrados estão relacionados com erros na punção da vesícula urinária e contaminação da amostra com sangue periférico, já que a maior parte dos animais teve suas colheitas por cistocentese.

Nos outros momentos essa incidência de hemácias foi mantida entre os grupos, mostrando sempre o máximo de escore 5,0, ou seja, mais de 50 células por campo. Porém, os resultados mostraram que houve uma redução gradual, chegando a zero nos grupos 1, 2 e 6 no último dia de tratamento.

A contagem de hemácias no sedimento urinário não foi capaz de indicar alterações causadas pelo uso dos fármacos experimentais, mas sim as alterações causadas pela colheita rotineira de urina.

Da mesma forma que as hemácias, os leucócitos aparecem na urina nos processos inflamatórios e infecciosos, ou mesmo por contaminação pelo sangue periférico no momento da colheita de material.

A presença de leucócitos no sedimento urinário mostrou resultado significativo no primeiro dia de colheita de material. É importante lembrar que neste momento os animais ainda não estavam em tratamento e a colheita de urina aconteceu antes da administração dos medicamentos.

No primeiro momento, encontrou-se maior número de animais com presença de raras a três leucócitos por campo no sedimento urinário nos grupos 5 e 6. Pode-se afirmar que os leucócitos presentes, junto com as hemácias encontradas na mesma quantidade, no mesmo momento e nos mesmos grupos, que está relacionado com a contaminação da amostra com sangue periférico durante a colheita de material.

No quinto dia de tratamento não houve resultado significativo estatisticamente e os animais apresentaram medianas com escore de um em todos os grupos, ou seja, raras a três leucócitos por campo no sedimento urinário. Estes resultados foram semelhantes à apresentação de hemácias no mesmo momento e nos grupos, pode-se assim explicar pela contaminação da amostra com sangue periférico no momento da colheita.

Os dados encontrados no décimo dia de tratamento apresentaram resultados significativos estatisticamente para os valores da contagem de leucócitos no sedimento urinário.

Neste momento é importante lembrar que os grupos 5 e 6 são tratados com a prednisona e mantiveram os valores de leucócitos na urina, diferente do

que aconteceu com os grupos 1 e 2. Todos os grupos mantiveram esses valores de hemácias, no entanto somente os grupos 5 e 6 apresentaram os valores de leucócitos, que pode estar relacionado com o desenvolvimento de cistite pela contaminação durante a punção, onde os animais que não recebem prednisona conseguem debelar a infecção e os animais que recebem o glicocorticóide não. Esses dados devem ser trabalhados posteriormente com os dados da presença de bactérias para melhor afirmar a cistite.

No décimo quinto dia não houve resultado significativo, porém ocorreu uma semelhança na apresentação dos dados com o momento anterior. Nos grupos 5 e 6 a presença de leucócitos foi predominante na quantidade de raros a três leucócitos por campo no sedimento urinário, diferente do que ocorreu com as hemácias, sugerindo que houve cistite, mesmo que branda, nestes grupos.

Com relação à presença de cilindros no sedimento urinário, não foi encontrado resultado significativo estatisticamente em nenhum grupo e em nenhum dos momentos. As medianas para contagem de cilindros ficaram todas no escore zero de todos os momentos e em todos os grupos.

Mesmos os valores máximos de cilindros hialinos não se apresentaram fora da normalidade. Apenas no G2, no décimo dia foi encontrado o valor de duas cruzes para a presença destes cilindros.

Os cilindros granulosos foram encontrados no valor de uma cruz apenas no décimo dia de tratamento também no grupo 2. Nos outros momentos e nos outros grupos os valores máximos não ultrapassaram raros cilindros por campo.

Os valores de bactérias encontradas no sedimento urinário apresentaram resultado significativo no primeiro momento de colheita de material, antes dos animais iniciarem os tratamentos experimentais. Assim como ocorreu com a contagem de hemácias e leucócitos, a presença de raras a três bactérias por campo nos grupos 5 e 6 levou a resultado significativo estatisticamente ($p=0,0000$).

As bactérias são avaliadas pelo número de cruzes e foi encontrado nos grupos 1, 5 e 6 raras bactérias no sedimento urinário por campo. Nesta quantidade as bactérias podem ser consideradas até por contaminação da amostra durante a colheita, quando esta é realizada por sondagem uretral. Nos grupos 5 e 6 foram encontrados valores de hemácias e leucócitos também e quando estes estão associados pode-se considerar um processo inflamatório ou infeccioso da vesícula urinária.

No entanto, no primeiro momento de colheita de material os animais ainda não estavam em tratamento, então são achados que condizem com a característica imunossupressora da enfermidade. Em todos os animais foi utilizada a terapia antimicrobiana de amplo espectro que poderia atuar nessas infecções secundárias a partir deste momento.

No quinto dia de tratamento não houve resultado estatístico significativo e apenas houve manutenção da presença de bactérias nos grupos 5 e 6. Neste momento houve também a presença de raras bactérias no sedimento urinário do G2.

No décimo dia de tratamento, somente os animais do G1 apresentaram medianas que representam raras bactérias no sedimento urinário. Os grupos 5 e 6 deixaram de apresentar bactérias no sedimento urinário, mesmo recebendo a prednisona no tratamento ($p=0,0016$).

No décimo quinto dia de tratamento, as medianas que representam raras bactérias no sedimento voltaram a aparecer nos grupos 5 e 6. O G1 manteve o mesmo valor e o G2 voltou a apresentar valores de bactérias na urina. Neste momento é provável que todos estes achados sejam de contaminação durante a colheita da urina. Em nenhum momento houve medianas com valores extremos de bactérias na urina, portanto pode-se afirmar que a terapia antimicrobiana de amplo espectro utilizada manteve os processos de cistite controlados, com baixos valores de bactérias e baixos valores de hemácias e leucócitos, mesmo nos animais que receberam doses imunossupressoras de prednisona.

A presença de cristais de bilirrubina pode indicar uma lesão mais grave ou mais crônica do fígado. Porém, não foram encontrados resultados significativos estatística e clinicamente para a presença de cristais de bilirrubina na urina de nenhum dos grupos experimentais e em nenhum momento. As medianas dessa análise mantiveram-se em zero em todos os dados.

Todos os outros cristais que podem ser formados na urina de cães foram estudados estatisticamente, porém o aparecimento destes foi aleatório. Os cristais estudados foram urato amorfo, fosfato triplo e oxalato de cálcio e não houve resultado significativo em nenhum momento e em nenhum grupo experimental, não havendo significância clínica para o estudo.

3.5 Exame do líquido:

O líquido foi colhido em dois momentos, antes e após o tratamento. O líquido foi responsável por demonstrar o processo inflamatório no SNC dos animais naturalmente infectados com o vírus da cinomose apresentando o quadro de encefalite.

Todos os animais foram anestesiados e o líquido foi colhido por gotejamento em três tubos para evitar a contaminação do sangue periférico, portanto em alguns momentos para conseguir a amostra foi necessário utilizá-lo mesmo com contaminação do sangue periférico.

O líquido foi examinado pelos seus aspectos físico-químicos e pela celularidade. Dentre as características físico-químicas foram avaliadas cor, aspecto, densidade, pH, proteína, glicose, sangue oculto e pelo Teste de Pandy.

Com relação à cor do líquido cefalorraquidiano, os dados foram trabalhados nos diferentes grupos e nos dois momentos pelo teste do qui-quadrado, porém sem resultado estatisticamente significativo. Sendo que no primeiro momento foi encontrada uma frequência de 96,7% de todos os animais incluídos na pesquisa com o líquido incolor. Dos 60 animais, apenas um do G1 e um do G5 apresentaram a coloração avermelhada do líquido no primeiro momento de colheita.

No segundo momento, após 15 dias de tratamento, apenas 82,5% (33) dos animais apresentavam o líquido incolor, sendo que 7,5% (3) foram róseos e 5% (2) avermelhados. Foi encontrado apenas um animal com líquido xantocrômico e avermelhado. Provavelmente, por um erro na punção que levou a contaminação do material com sangue periférico como relatado anteriormente.

Quando se comparou entre os grupos pelas medianas criadas a partir de escores da variação da turbidez, não houve resultado significativo

estatisticamente nos dois momentos de colheita de material, antes e após o tratamento experimental.

No primeiro momento, em todos os grupos a maior parte dos animais apresentou o líquido límpido, apenas nos grupos 1 e 5 foi encontrado líquido turvo nos animais que foram incluídos nestes grupos.

Na segunda colheita, houve a mesma apresentação do aspecto límpido do líquido nos diferentes animais, porém neste momento foi encontrado em menor quantidade animais nos grupos 1 e 2 com líquido discretamente turvo e nos grupos 3, 5 e 6 animais com líquido turvo.

A densidade do líquido, no primeiro momento, foi analisada pelo teste de Kruskal-Wallis e apresentou resultado significativo com $p=0,0079$, porque houve pouca variação entre os grupos, sendo que o mínimo encontrado foi de 1.004 que variou até 1.008. Estes valores estão dentro da normalidade para o líquido de cães, não tendo significância clínica para o atual estudo, apesar do resultado estatístico.

No entanto, no segundo momento não houve resultado significativo estatisticamente, porém os valores de densidade variaram mais, chegando a 1.016 em alguns animais do G3. Estes valores podem estar relacionados com a contaminação pelo sangue periférico, onde também foram encontrados a coloração avermelhada e o aspecto turvo. Mas a mediana, ou seja, o valor da maioria dos animais foi de 1.006, o que está dentro dos valores de normalidade.

O valor de pH do líquido deve ser de neutro a básico para cães, sendo que nos animais incluídos na pesquisa a média do pH variou de 8,5 a 8,9 no primeiro momento, e de 8,2 a 8,8 no segundo momento. Não houve resultado significativo estatístico ou clínico com relação aos valores de pH entre os grupos e nos dois momentos.

A dosagem de proteína é de extrema importância para o estudo, já que ela pode indicar o grau de inflamação no SNC. Em ambos os momentos não foi encontrada significância estatística pelo teste de Kruskal-Wallis, porém clinicamente é importante relacionar os dados, pois todos os grupos apresentaram valores maiores que 25 mg/dL, o que indica um processo inflamatório encefálico (Tabela 32).

TABELA 32 – Mediana e percentis da dosagem de proteína no líquido dos cães com cinomose nos diferentes grupos experimentais no primeiro momento. Botucatu, SP, 2011.

Grupo	Mínimo	P25	Mediana	P75	Máximo
G1	3,20	22,10	49,00	63,00	95,26
G2	9,50	19,50	37,45	58,80	94,10
G3	5,10	11,90	43,30	65,00	65,00
G4	13,40	25,00	25,95	65,00	124,70
G5	14,40	29,90	31,55	53,20	65,30

G6	13,00	24,70	30,95	42,50	62,70
-----------	-------	-------	-------	-------	-------

Estatística: Kruskal-Wallis, $p=0,9844$.

P25: percentil 25.

P75: percentil 75.

G1: grupo 1; G2: grupo 2; G3: grupo 3; G4: grupo 4; G5: grupo 5; G6: grupo 6.

No primeiro momento, os animais ainda não tinham recebido a medicação experimental, então pode-se verificar que o G4 foi o que apresentou menor mediana com 25,95 mg/dL de proteína no líquido e o G1 foi o que apresentou maior mediana com 49,00 mg/dL.

Essa dosagem apresentou grande variação de valores, onde todos os grupos apresentaram valores mínimos dentro da normalidade, com praticamente ausência de inflamação, enquanto que dentro dos valores máximos foi encontrado 124,70 mg/dL de proteína no líquido, considerado um valor elevado indicando um processo de inflamação mais severo.

Após 15 dias de tratamento os valores da dosagem de proteínas ainda continuaram com uma variação muito grande. Estes também não apresentaram resultados significativos, porém todos os grupos apresentaram medianas acima dos valores normais para cães (Tabela 33).

TABELA 33 - Mediana e percentis da dosagem de proteína no líquido dos cães com cinomose nos diferentes grupos experimentais após o tratamento. Botucatu, SP, 2011.

Grupo	Mínimo	P25	Mediana	P75	Máximo
G1	19,38	30,00	44,30	45,52	100,00
G2	17,81	21,86	27,60	56,14	82,80
G3	11,10	17,10	25,00	65,00	154,10
G4	14,70	14,70	31,60	65,00	65,00
G5	17,20	25,25	39,30	64,30	100,00
G6	22,50	25,90	27,90	37,30	54,00

Estatística: Kruskal-Wallis, $p=0,8745$.

P25: percentil 25.

P75: percentil 75.

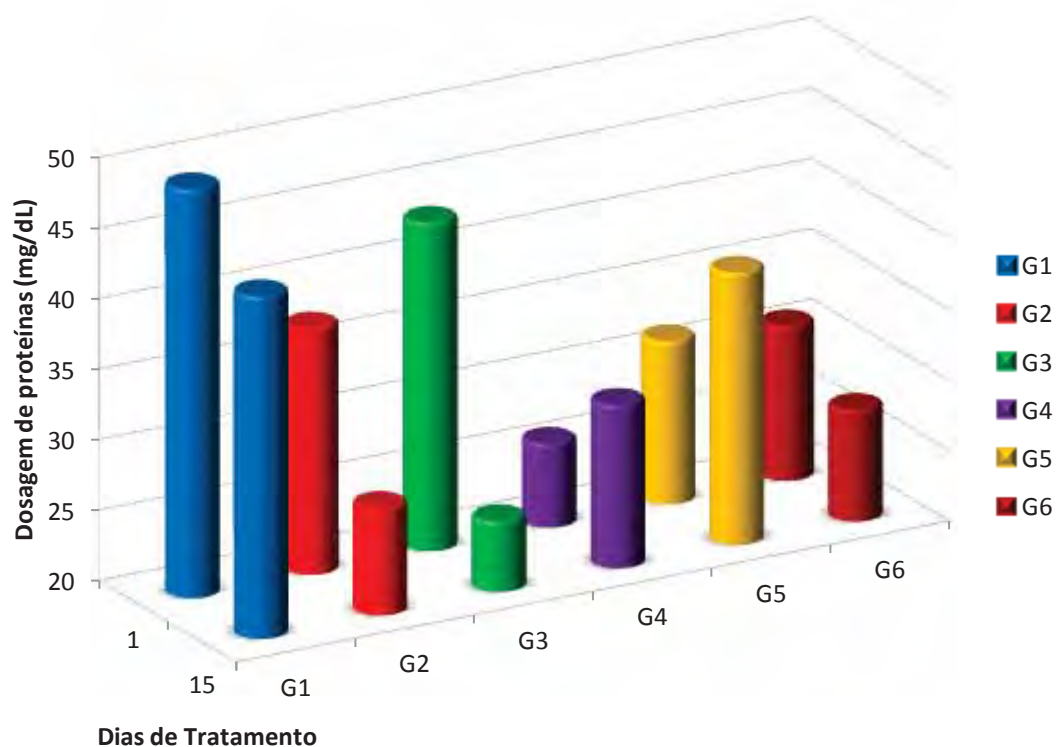
G1: grupo 1; G2: grupo 2; G3: grupo 3; G4: grupo 4; G5: grupo 5; G6: grupo 6.

Estes dados devem ser analisados conforme o grupo de tratamento, já que neste momento os animais foram tratados com os fármacos experimentais. O G3 foi o que apresentou menor valor de mediana com 25 mg/dL, podendo ser considerado dentro da normalidade, sendo que neste grupo houve grande variação dos valores de proteína no líquido, que foram de 11 mg/dL, considerado normal, a 154,1 mg/dL, considerado um processo inflamatório severo do SNC. Este grupo é considerado controle, pois estes animais apenas

receberam o DMSO e como foi encontrado no primeiro momento grande variação de valores no G3, demonstrando que não houve efeito do tratamento.

Os valores máximos encontrados nos diferentes grupos experimentais mostraram que em todos os grupos houve uma diminuição, porém no G3 e G5 houve um aumento, ou seja, mesmo os animais sendo tratados com anti-inflamatórios, DMSO ou prednisona respectivamente, foram encontrados valores mais altos.

Nos grupos 1, 2, 3 e 6 foi observado que as medianas diminuíram de um momento para outro, diferente do que aconteceu nos grupos 4 e 5 (Figura 16).



G1: grupo 1; G2: grupo 2; G3: grupo 3; G4: grupo 4; G5: grupo 5; G6: grupo 6.
Estatística: Kruskal-Wallis

FIGURA 16 – Representação gráfica das medianas da dosagem de proteínas no líquido dos cães com cinomose incluídos na pesquisa, antes e após o tratamento experimental. Botucatu, SP, 2011.

É possível verificar que apenas os grupos 4 e 5 apresentaram elevação da quantidade de proteína após o tratamento, sendo que nestes grupos foi utilizada a prednisona na sua dose imunossupressora. Desta forma, a prednisona não foi capaz de diminuir o processo inflamatório como desejado, já que houve aumento dos valores de proteína no líquido dos animais tratados.

O grupo 6 também foi tratado com prednisona, porém com doses menores e apresentou diminuição dos valores de proteína no líquido. Desta forma, pode-se afirmar que a prednisona em doses anti-inflamatórias foi capaz de reduzir a quantidade de proteína no líquido, enquanto que quando administrada em doses imunossupressoras houve aumento desses valores.

Os dados de glicose no líquido foram analisados em escores, sendo observada variação de traços a quatro cruces que quantificam a sua presença. É considerada normal a presença de até duas cruces no líquido de cães, porém essa dosagem sozinha não representa uma alteração importante, geralmente o aumento ou diminuição de glicose devem estar relacionados com outras alterações encontradas no exame. A análise estatística utilizada para avaliar esses dados foi o teste de Kruskal-Wallis e foi encontrado resultado significativo nos valores de p nos dois momentos, antes do tratamento $p=0,0006$ e após $p=0,0002$.

Os dados demonstraram que em ambos os momentos a dosagem de glicose variou de uma cruz a duas cruces. No G4 ficou evidenciado que no segundo momento houve predominância do escore 1 que representa uma cruz de glicose, sendo que neste momento sobreviveram apenas três animais, que determinaram essa dosagem diminuída da glicose. No entanto, nenhum dos animais apresentou outras alterações no líquido que caracterizassem as alterações nos níveis de glicose líquido. As alterações da glicose no líquido são apenas achados clínicos, sem valor para o estudo realizado.

Ao mesmo tempo, a quantificação de sangue oculto na amostra está relacionada diretamente com a contaminação do líquido pelo sangue periférico. Os dados em escores da dosagem de sangue oculto não deram resultados significativos estatisticamente. E a mediana desse escore ficou entre um e três, que significa traços a duas cruces de sangue oculto na amostra nos diferentes grupos experimentais e nos dois momentos de colheita de material.

Em todos os grupos e em ambos os momentos foram encontrados quatro cruces de sangue oculto que é o valor máximo dessa dosagem. Para cães consideram-se valores normais até uma cruz de sangue oculto no líquido devido a colheita de material. Na atual pesquisa, alguns animais apresentaram grande quantidade de contaminação do sangue periférico, dificultando a distinção entre sangue oculto presente na amostra ou o sangue periférico da contaminação.

O teste de Pandy é utilizado para detecção de imunoglobulinas no líquido, assim como as outras dosagens este é descrito por escala de cruces na variação da turbidez da reação e, da mesma forma que as outras dosagens, foi criado um escore e trabalhado estatisticamente.

No primeiro momento não foi encontrado resultado significativo estatisticamente, portanto a mediana permaneceu no zero em todos os grupos, o que demonstra que a maior parte dos animais não apresentou reação no teste de Pandy.

Neste primeiro momento, apenas os G1 e G4 apresentaram valores de três cruces no teste de Pandy. No segundo momento, apenas o G3 apresentou mediana com uma cruz neste teste, sendo que este grupo apenas recebeu o DMSO como tratamento, sendo considerado grupo controle (Tabela 34).

TABELA 34 – Mediana e percentis em escore do teste de Pandy no líquido dos cães com cinomose nos diferentes grupos experimentais após o tratamento. Botucatu, SP, 2011.

Grupo	Mínimo	P25	Mediana	P75	Máximo
G1	0	0	0 ^b	0	1

G2	0	0	0 ^b	0	1
G3	0	0	1 ^a	1	3
G4	0	0	0 ^b	1	1
G5	0	0	0 ^b	0	0
G6	0	0	0 ^b	0	0

Estatística: Kruskal-Wallis, valores significativos representados pelas letras diferentes, $p=0,0105$.

P25: percentil 25.

P75: percentil 75.

0: negativo; 1: + de turbidez; 2: ++ de turbidez; 3: +++ de turbidez.

G1: grupo 1; G2: grupo 2; G3: grupo 3; G4: grupo 4; G5: grupo 5; G6: grupo 6.

Com esses resultados pode-se identificar o efeito dos tratamentos experimentais, já que após o tratamento apenas os animais dos grupos controle apresentaram mediana e percentil 75 com turbidez. Nos grupos 1 e 2 ainda foi possível observar animais com no máximo uma cruz de turbidez. Diferente do que aconteceu, os animais dos grupos 5 e 6 tiveram ausência de turbidez no teste de Pandy, podendo identificar que não houve produção de imunoglobulinas quando os animais foram tratados com a ribavirina em associação com anti-inflamatórios.

Após as análises físico-químicas, o líquido foi avaliado conforme a sua celularidade, que deve ser um dos critérios mais importantes na avaliação da encefalite causada pelo vírus da cinomose.

A contagem de hemácias, assim como a coloração e a dosagem de sangue oculto, está relacionada diretamente com a contaminação da amostra com sangue periférico. Normalmente não é esperado encontrar esse tipo de célula no líquido de animais normais, porém em todos os tipos de inflamação pode-se encontrar uma pequena quantidade de hemácias circulantes. Os dados da contagem de hemácias não mostraram significância estatística em nenhum dos momentos de colheita de material.

No primeiro momento, o valor da mediana da contagem de hemácias foi mais alto no G1, seguido do G4. No grupo 1 foi encontrada coloração avermelhada do líquido dos animais deste grupo, então se pode considerar a contaminação no momento da colheita. O G4 apresentou também elevação na dosagem de sangue oculto, desta forma também se pode relacionar com a contaminação por sangue periférico durante a colheita de material.

Apenas os grupos 3 e 6 não apresentaram valores de percentis 75 altos, mostrando que apresentaram menor alteração da contagem de hemácias no líquido e ao mesmo tempo demonstram que é comum ocorrer a contaminação da amostra com sangue periférico.

No primeiro momento não houve tratamento, portanto não apresentou significância clínica pelos achados entre os grupos. Esses dados demonstraram que a contaminação com sangue periférico pode ocorrer sem mesmo alterar a coloração das amostras, já que a grande quantidade de hemácias não é esperada na encefalite pela cinomose.

No segundo momento, após o tratamento experimental, foi possível identificar um valor alto da mediana do grupo 1. No entanto, todos os grupos apresentaram valores elevados nos dados de contagem máxima encontrada, demonstrando que em todos os grupos houve pelo menos um animal que teve seu líquido contaminado com sangue periférico durante a colheita.

A contagem de células nucleadas também não apresentou resultado significativo estatisticamente em nenhum dos momentos de colheita. Porém, para a avaliação do grau de inflamação do SNC, a contagem de células nucleadas é de extrema importância clínica, assim esses dados foram adicionados em tabelas e representados graficamente (Tabela 35).

TABELA 35 – Mediana e percentis da contagem de células nucleadas do líquido dos cães com cinomose nos diferentes grupos experimentais no primeiro momento de colheita de material. Botucatu, SP, 2011.

Grupo	Mínimo	P25	Mediana	P75	Máximo
G1	2,0	22,0	50,5	104,0	207,0
G2	2,0	3,0	37,0	79,0	265,0
G3	2,0	8,0	14,0	23,0	183,0
G4	3,0	9,0	11,5	15,0	8775,0
G5	0,0	1,0	10,0	21,0	30,0
G6	1,0	2,0	4,5	16,0	44,0

Estatística: Kruskal-Wallis, $p=0,0666$.

P25: percentil 25.

P75: percentil 75.

G1: grupo 1; G2: grupo 2; G3: grupo 3; G4: grupo 4; G5: grupo 5; G6: grupo 6.

Os grupos 5 e 6 apresentaram valores de mediana dentro dos valores de normalidade no início do tratamento, demonstrando que o processo inflamatório nesses animais teriam uma característica mais aguda, sem a presença de células nucleadas no líquido.

O grupo 1 apresentou maior mediana dos valores da contagem de células nucleadas, seguido do grupo 2. A maior contagem de células nucleadas demonstra um processo mais crônico na patogenia da enfermidade.

Apenas um animal do G4 apresentou valor de 8775 células/dL, demonstrando um processo inflamatório acentuado, sendo que este animal morreu durante o período de tratamento.

No final do tratamento, os dados da contagem de células nucleadas não apresentaram resultado significativo estatisticamente, mas estes dados foram tabulados pela relevância clínica (Tabela 36).

TABELA 36 – Mediana e percentis da contagem de células nucleadas no líquido dos cães com cinomose nos diferentes grupos experimentais após o tratamento. Botucatu, SP, 2011.

Grupo	Mínimo	P25	Mediana	P75	Máximo
G1	5,0	5,0	23,0	74,0	100,0
G2	2,0	3,0	11,0	31,0	60,0
G3	3,0	7,0	14,0	82,0	275,0
G4	2,0	2,0	2,0	20,0	20,0
G5	0,0	1,0	2,5	98,5	378,0
G6	0,0	0,0	4,0	7,0	10,0

Estatística: Kruskal-Wallis, $p=0,0811$.

P25: percentil 25.

P75: percentil 75.

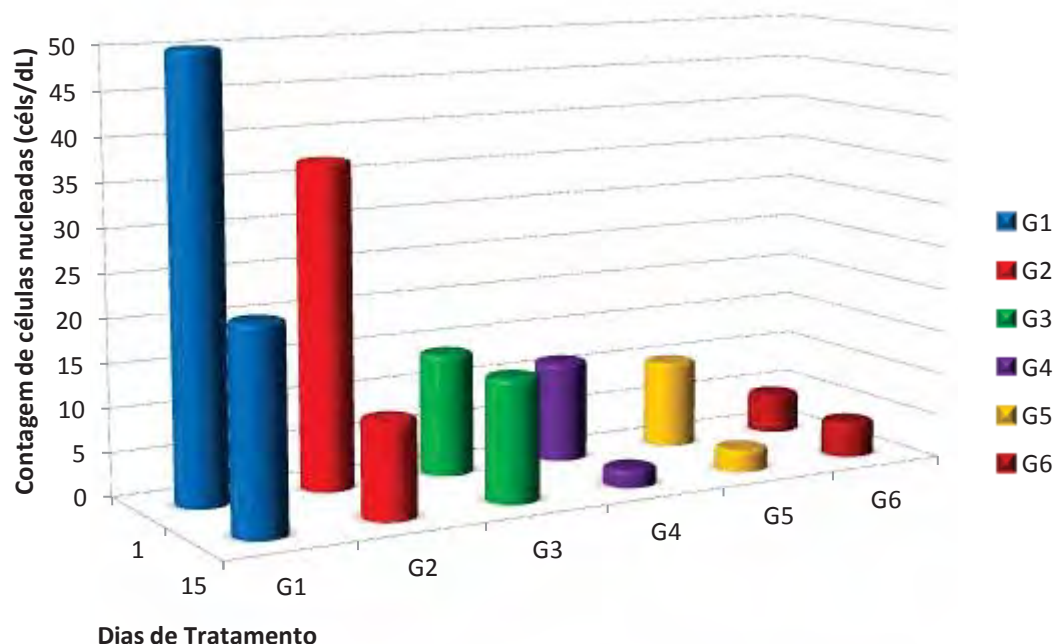
G1: grupo 1; G2: grupo 2; G3: grupo 3; G4: grupo 4; G5: grupo 5; G6: grupo 6.

Após o período de tratamento, o G1 ainda apresentou o maior valor de mediana da contagem de células nucleadas, sendo que o G3 manteve o valor da mediana de antes e depois, enquanto que todos os outros grupos apresentaram redução destes valores.

O G3 foi tratado apenas com DMSO e serviu como grupo controle em relação ao processo inflamatório nos outros grupos, já que não apresentou queda desta contagem, diferente do que foi encontrado nos outros grupos.

O G4 apenas tratado com prednisona foi o que apresentou maior queda desses valores de mediana, porém foi o grupo com menor número de animais com melhora clínica. O G5 também teve esse tipo de apresentação dos seus valores da contagem de células e recebeu a mesma dose de prednisona, porém também recebeu a ribavirina, e neste grupo ocorreu o segundo índice de melhora clínica dos seis grupos tratados.

Os valores das medianas da contagem de células nucleadas do líquido foram representados graficamente para melhor visualização destes dados (Figura 17).



Estatística: Kruskal-Wallis

G1: grupo 1; G2: grupo 2; G3: grupo 3; G4: grupo 4; G5: grupo 5; G6: grupo 6.

FIGURA 17 – Representação gráfica dos valores de medianas da contagem de células nucleadas do líquido dos cães com cinomose, antes e após o tratamento experimental. Botucatu, SP, 2011.

A figura é capaz de evidenciar a discrepância dos valores dessa contagem antes e após o tratamento, tanto no G1 que não recebeu anti-inflamatório, quanto nos grupos 2, 4, 5 e 6 que receberam o DMSO ou a prednisona. No entanto, foi possível verificar que nos animais do G3 não houve diminuição dos valores antes e após, demonstrando que o efeito anti-inflamatório do DMSO não está relacionado com a diminuição do número de células. Então, o G2 teve a sua queda nos valores provavelmente por uma ação direta da ribavirina e não por ação anti-inflamatória do DMSO.

O G6 também apresentou uma queda pequena nesses valores, portanto as duas contagens, antes e após o tratamento, estavam dentro dos valores de normalidade, neste caso a celularidade não serviu como parâmetro para afirmar se houve redução ou não da inflamação por ação dos fármacos.

Após a contagem de células nucleadas no líquido foi realizado o diferencial entre as células presentes; estes dados foram trabalhados em porcentagem e no seu valor absoluto. Para a atual pesquisa, os linfócitos e as células mononucleares são os tipos celulares mais importantes, assim o diferencial de células ficou em linfócitos, mononucleares e as outras células foram todas agrupadas, dentre estas células encontra-se neutrófilos, eosinófilos e células do SNC.

Os dados da porcentagem e dos valores absolutos de linfócitos no primeiro momento não apresentaram resultado significativo estatisticamente, porém estes dados foram tabulados pela sua importância para o estudo realizado (Tabela 37).

TABELA 37 – Mediana e percentis da porcentagem e do valor absoluto de linfócitos na citologia líquórica dos cães com cinomose nos diferentes grupos experimentais antes do tratamento. Botucatu, SP, 2011.

Grupo	Mínimo		P25		Mediana		P75		Máximo	
	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%
G1	0,0	0,0	12,7	58,0	31,4	80,5	84,2	88,0	165,6	99,0
G2	0,0	0,0	1,8	61,0	28,5	86,5	76,6	94,0	254,4	97,0
G3	0,3	9,0	1,8	16,0	5,9	65,0	19,7	86,0	179,3	98,0
G4	0,9	8,0	1,4	28,0	8,9	56,0	11,8	79,0	1228,5	100,0
G5	0,0	0,0	1,6	35,0	4,2	67,5	12,4	89,0	29,1	97,0
G6	0,0	0,0	0,7	32,0	3,1	69,0	5,1	78,0	34,3	90,0

Estatística: Kruskal-Wallis, p(n)=0,1398, p(%)=0,5287

P25: percentil 25.

P75: percentil 75.

n: valor absoluto de linfócitos; %: valor da porcentagem de linfócitos.

G1: grupo 1; G2: grupo 2; G3: grupo 3; G4: grupo 4; G5: grupo 5; G6: grupo 6.

É possível notar que apenas o G4 apresentou valor da mediana abaixo de 60% de linfócitos. A presença de mais de 60% de linfócitos no líquido é esperada em cães com encefalite pelo vírus da cinomose. Ao mesmo tempo, o G4 foi o grupo que apresentou maior valor relativo e absoluto de linfócitos no líquido. E o G2 foi o grupo que apresentou maior mediana de porcentagem de linfócitos com 86,5% no primeiro momento de colheita de material.

TABELA 38 - Mediana e percentis da porcentagem e do valor absoluto de linfócitos na citologia líquórica dos cães com cinomose nos diferentes grupos experimentais após o tratamento. Botucatu, SP, 2011.

Grupo	Mínimo		P25		Mediana		P75		Máximo	
	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%
G1	4,2	49,0	4,7	61,0	22,5	93,0	49,0	98,0	68,8	99,0
G2	2,0	73,0	2,8	83,5	8,6	95,0	29,9	99,0	43,8	100,0
G3	1,0	20,0	4,2	36,0	13,0	79,0	55,0	93,0	81,2	99,0

G4	0,7	25,0	0,7	25,0	1,7	36,0	5,0	88,0	5,0	88,0
G5	0,0	0,0	0,0	0,0	0,6	33,5	2,0	67,3	5,5	91,0
G6	0,0	0,0	0,0	0,0	0,8	12,0	3,4	80,0	5,8	86,0

Estatística: Kruskal-Wallis, $p(n)=0,0032$, $p(\%)=0,0006$

P25: percentil 25.

P75: percentil 75.

n: valor absoluto de linfócitos; %: valor da porcentagem de linfócitos.

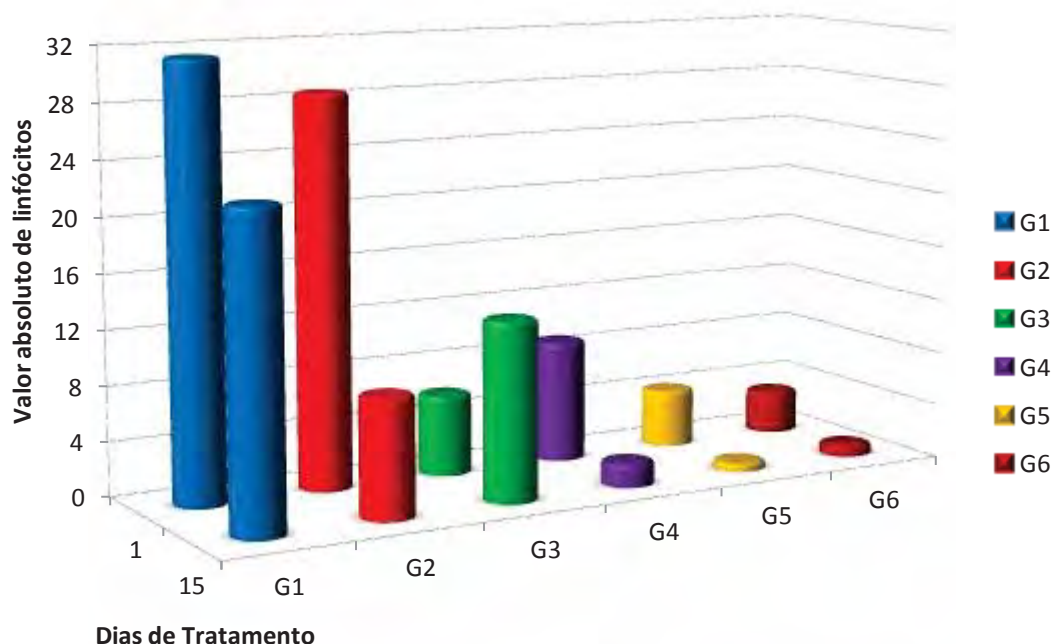
G1: grupo 1; G2: grupo 2; G3: grupo 3; G4: grupo 4; G5: grupo 5; G6: grupo 6.

Tanto o valor absoluto quanto o percentual apresentaram significância estatística entre o valor máximo e o mínimo das medianas dos grupos experimentais. O G1 apresentou 93% de linfócitos e o G6 apenas 12%. Apesar desta diferença houve uma queda na mediana dos valores absolutos de linfócitos em todos os grupos experimentais, exceto no G3 que no primeiro momento apresentou 5,9 linfócitos no diferencial, enquanto que após 15 dias tratando com DMSO a mediana foi de 13 linfócitos.

Além da queda da mediana, também é possível notar que os valores máximos diminuíram em relação ao primeiro momento de colheita de material em todos os grupos experimentais.

Nos grupos 1, 2 e 3, que não receberam prednisona houve aumento dos valores mínimos, ou seja, nestes grupos os animais passaram a apresentar maior semelhança de valores, diminuindo a diferença entre o máximo e o mínimo, significando que a presença de linfócitos no líquido ficou mais constante, mesmo que em valores menores.

Os dados das medianas de valores absolutos de linfócitos encontrados no líquido foram organizados para melhor visualização do efeito dos tratamentos frente à patogenia da enfermidade (Figura 18).



Estatística: Kruskal-Wallis

G1: grupo 1; G2: grupo 2; G3: grupo 3; G4: grupo 4; G5: grupo 5; G6: grupo 6.

FIGURA 18 – Representação gráfica das medianas de valores absolutos de linfócitos no líquido dos cães com cinomose, nos diferentes grupos, antes e após o tratamento experimental. Botucatu, SP, 2011.

É possível identificar que os valores das medianas dos grupos 4, 5 e 6 quase chegaram a zero após o tratamento com prednisona. Em todos os grupos tratados com a ribavirina também foi possível identificar uma queda nesses valores, mas a presença do anti-inflamatório fez grande diferença tanto nos valores de celularidade quanto no número de linfócitos.

As células mononucleares que também apresentam papel importante na patogenia da enfermidade são os macrófagos e os plasmócitos, avaliados tanto no percentual de células encontradas, quanto no valor absoluto, da mesma forma como foi realizado com os linfócitos. Em nenhuma das análises foram encontrados resultados significativos estatisticamente, porém pela importância clínica os dados são apresentados na Tabela 39.

TABELA 39 - Mediana e percentis da porcentagem e do valor absoluto de células mononucleares na citologia líquórica dos cães com cinomose nos diferentes grupos experimentais no primeiro momento de colheita de material. Botucatu, SP, 2011.

Grupo	Mínimo		P25		Mediana		P75		Máximo	
	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%

G1	0,0	0,0	1,0	10,0	5,5	17,5	14,4	19,0	37,3	34,0
G2	0,0	0,0	0,5	3,0	1,1	6,0	7,5	15,0	11,9	26,0
G3	1,0	2,0	1,7	10,0	3,2	19,0	4,2	84,0	18,2	91,0
G4	0,0	0,0	1,6	16,0	2,8	20,5	9,8	55,0	1667,2	82,0
G5	0,0	0,0	0,4	3,0	0,8	13,5	2,3	36,0	7,6	69,0
G6	0,0	0,0	0,56	15,0	1,2	22,0	4,0	39,0	10,9	100,0

Estatística: Kruskal-Wallis, $p(n)=0,1957$, $p(\%)=0,1178$

P25: percentil 25. P75: percentil 75.

n: valor absoluto de linfócitos; %: valor da porcentagem de linfócitos.

G1: grupo 1; G2: grupo 2; G3: grupo 3; G4: grupo 4; G5: grupo 5; G6: grupo 6.

Mesmo não apresentando resultado significativo estatisticamente, em relação a mediana dos valores percentuais, verificou-se que o G6 apresentou maior quantidade dessas células (22%), enquanto que o G2 teve a menor taxa com 6% apenas, no primeiro momento, antes do início dos tratamentos experimentais.

Com relação às medianas dos valores absolutos, o G1 foi o que mais apresentou esse tipo de célula no líquido, quando os animais chegaram ao Hospital Veterinário. Apenas o G4 apresentou mais de mil células mononucleares dentro dos valores máximos encontrados no líquido, porém o surgimento desse valor pode estar relacionado com a contaminação da amostra com sangue periférico (Tabela 40).

TABELA 40 - Mediana e percentis da porcentagem e do valor absoluto de células mononucleares na citologia líquórica dos cães com cinomose nos diferentes grupos após o tratamento experimental. Botucatu, SP, 2011.

Grupo	Mínimo		P25		Mediana		P75		Máximo	
	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%
G1	0,0	0,0	0,2	1,0	0,7	6,0	8,5	23,0	36,0	36,0
G2	0,0	0,0	0,1	0,5	0,2	4,0	1,5	7,0	3,6	10,0
G3	0,8	1,0	0,8	2,0	2,3	18,0	5,5	37,0	6,3	52,0
G4	0,1	6,0	0,1	6,0	1,2	45,0	9,0	60,0	9,0	60,0
G5	0,0	0,0	0,2	7,0	0,4	22,0	24,5	41,2	114,6	78,0
G6	0,0	0,0	0,0	0,0	0,3	14,0	3,6	36,0	5,4	77,0

Estatística: Kruskal-Wallis, $p(n)=0,3908$, $p(\%)=0,1579$

P25: percentil 25. P75: percentil 75.

n: valor absoluto de linfócitos; %: valor da porcentagem de linfócitos.

G1: grupo 1; G2: grupo 2; G3: grupo 3; G4: grupo 4; G5: grupo 5; G6: grupo 6.

Com a tabulação dos dados foi possível identificar que os valores máximos do número de células mononucleares diminuíram em todos os grupos, exceto no G5 que apresentou um aumento. As medianas dos valores absolutos também apresentaram diminuição dessas células em todos os grupos.

Além das células mononucleares e os linfócitos, foram encontradas outras células, com menor importância para o estudo. Estes resultados não mostraram significância estatística, e estas células não ultrapassaram os 10% da celularidade líquórica. Apenas o G4 apresentou valores altos deste tipo celular que somado aos outros resultados pode-se afirmar que houve contaminação pelo sangue periférico.

Após o tratamento, o G6 foi o grupo que apresentou a menor mediana, enquanto que os grupos 1 e 5 apresentaram aumento desses valores absolutos e relativos. O G3 e G5 mostraram valores absolutos máximos muito altos, o que pode representar uma contaminação da amostra por sangue periférico.

Os outros grupos tiveram suas medianas com valores mais baixos associados à diminuição da celularidade após o tratamento, como havia sido descrito anteriormente. Esses resultados não demonstraram importância clínica ao estudo.

4. Biologia Molecular:

Para diagnóstico e identificação da presença do agente etiológico após o tratamento foi realizada a RT-PCR das amostras de sangue periférico, medula óssea e líquido de todos os animais nos dois momentos. Quando alguma amostra apresentou resultado negativo foi realizado a hn-PCR.

No total foram realizadas 308 reações de RT-PCR, já que nem todos os animais sobreviveram aos 15 dias de tratamento, sendo que 130 (42,2%) foram positivas. Então, foram realizadas 178 reações da hn-PCR e 102 (57,3%) foram positivas. Assim, das 308 amostras analisadas, 232 (75,32%) foram positivas.

Os dados foram trabalhados segundo o momento de colheita de material e a amostra utilizada para a realização da pesquisa. Todos os animais foram positivos nos dois momentos da pesquisa em pelo menos uma das três amostras colhidas.

TABELA 41 – Relação das amostras positivas e negativas na PCR no diagnóstico da cinomose em cães antes do tratamento experimental, independente do grupo. Botucatu, SP, 2011.

Amostra	Positivas		Negativas	
	n	%	n	%
Sangue	57,0	95,0	3,0	5,0
Medula óssea	54,0	90,0	6,0	10,0
Líquor	32,0	53,3	28,0	46,7

Estatística: Qui-quadrado.

n: número de amostras.
%: porcentagem.

No primeiro momento, o sangue periférico foi o material que mais resultou positivo com 95%, sendo que apenas três animais do G4 apresentaram resultado negativo nas duas técnicas de biologia molecular realizadas. Estes dados apresentaram resultados estatisticamente significativos com $p=0,0075$.

A medula óssea no primeiro momento apresentou 90% de positivos, sendo que nenhum dos animais do G4 apresentou resultado negativo e no G2 houve 20% de negativos. Os outros grupos apresentaram uma taxa de 10% de animais que não apresentavam o vírus na medula óssea. Portanto, esses dados não apresentaram resultado estatisticamente significativo ($p=0,8176$).

O líquido foi a amostra que menos apresentou positividade (53,3%), porém esta ainda foi maior do que os resultados negativos (46,7%). Dos 28 animais que apresentaram negatividade no líquido, seis eram dos grupos 2 e 4; cinco dos grupos 3 e 6 e três dos grupos 1 e 5. Estes dados também não apresentaram significado estatístico, pois $p=0,5859$. Após o tratamento, as amostras também foram avaliadas independentes do grupo experimental (Tabela 42).

TABELA 42 - Relação das amostras positivas e negativas de cães na RT-PCR após o tratamento experimental, independente do grupo. Botucatu, SP, 2011.

Amostra	Positivas		Negativas	
	n	%	n	%
Sangue	42,0	97,7	1,0	2,3
Medula óssea	38,0	86,4	6,0	13,6
Líquor	12,0	27,3	32,0	72,7

Estatística: Qui-quadrado.
n: número de amostras.
%: porcentagem.

Após 15 dias de tratamento, houve um aumento na porcentagem de amostras positivas, ou seja, das 43 amostras de sangue colhidas, 42 foram positivas, sendo que o único animal que apresentou ausência do vírus no sangue pertence ao G3. Este grupo e G4 são grupos controle e não receberam a ribavirina nos protocolos de tratamento, mesmo assim tiveram o vírus presente no sangue periférico. Estes resultados não apresentaram significância estatística ($p=0,3844$).

Mesmo após o tratamento, a medula óssea ainda foi considerada como a segunda amostra com mais resultados positivos. Das 44 amostras, 86,4% foram positivas e 13,6% negativas. Das seis amostras negativas, duas foram de animais tratados nos grupos 5 e 6 e um animal em cada grupo G2 e G3. Esses dados também não apresentaram resultado significativo estatisticamente ($p=0,5759$).

O líquido novamente foi o que apresentou menor número de amostras, e após um período de 15 dias de tratamento, houve menor porcentagem de

positivos (27,3%). Sendo que 100% dos animais do G3 apresentaram resultado negativo do líquido após o período de tratamento, mostrando que mesmo sem o antiviral o vírus não seria encontrado livre no líquido com maior tempo de evolução da doença, condizendo com a literatura existente.

Para melhor apresentação dos dados, os resultados positivos e negativos no líquido nos diferentes grupos após o tratamento são apresentados na Tabela 43.

TABELA 43 – Resultados positivos e negativos da RT-PCR para detecção do vírus da cinomose do líquido dos cães nos diferentes grupos, após o tratamento experimental. Botucatu, SP, 2011.

Grupos	Positivo		Negativo		Total	
	n	%	n	%	n	%
G1	5,0	55,6	4,0	44,4	9,0	100,0
G2	2,0	25,0	6,0	75,0	8,0	100,0
G3	0,0	0,0	7,0	100,0	7,0	100,0
G4	2,0	50,0	2,0	50,0	4,0	100,0
G5	1,0	12,5	7,0	87,5	8,0	100,0
G6	2,0	25,0	6,0	75,0	8,0	100,0
Total	12,0	27,3	32,0	72,7	44,0	100,0

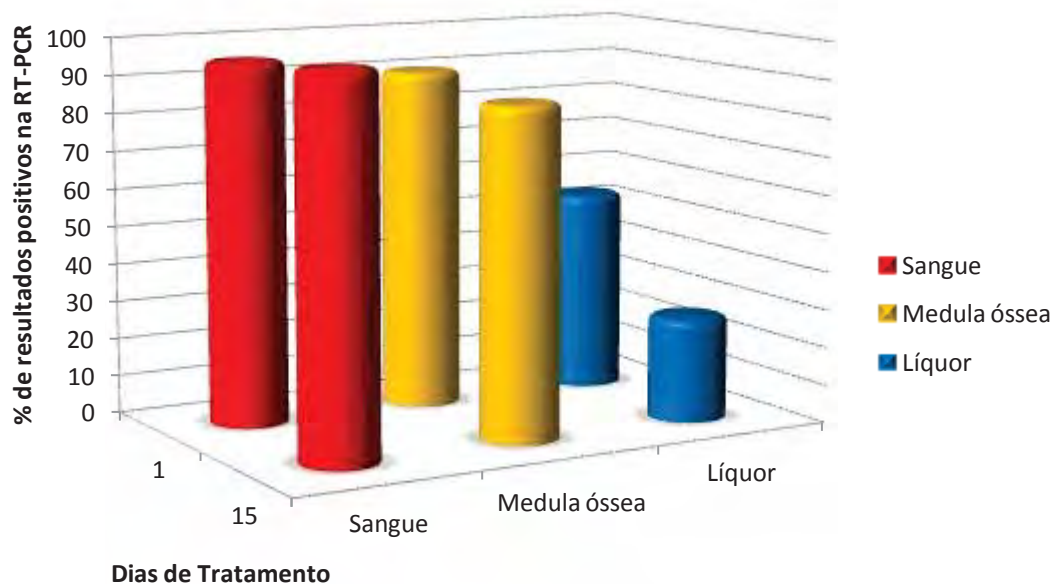
Estatística: Qui-quadrado, $p=0,1446$.

n: número de amostras.

%: porcentagem.

G1: grupo 1; G2: grupo 2; G3: grupo 3; G4: grupo 4; G5: grupo 5; G6: grupo 6.

O grupo com maior positividade na RT-PCR no líquido foi o G1, sendo que os outros grupos (2, 3, 5 e 6) apresentaram mais amostras negativas do que positivas, demonstrando que o vírus após o período de 15 dias não estava mais livre no líquido. Como houve diminuição da celularidade pelo controle do processo inflamatório, principalmente nos grupos 4, 5 e 6, menores seriam as chances de detectar vírus nesta amostra (Figura 19).



Estatística: Qui-quadrado.

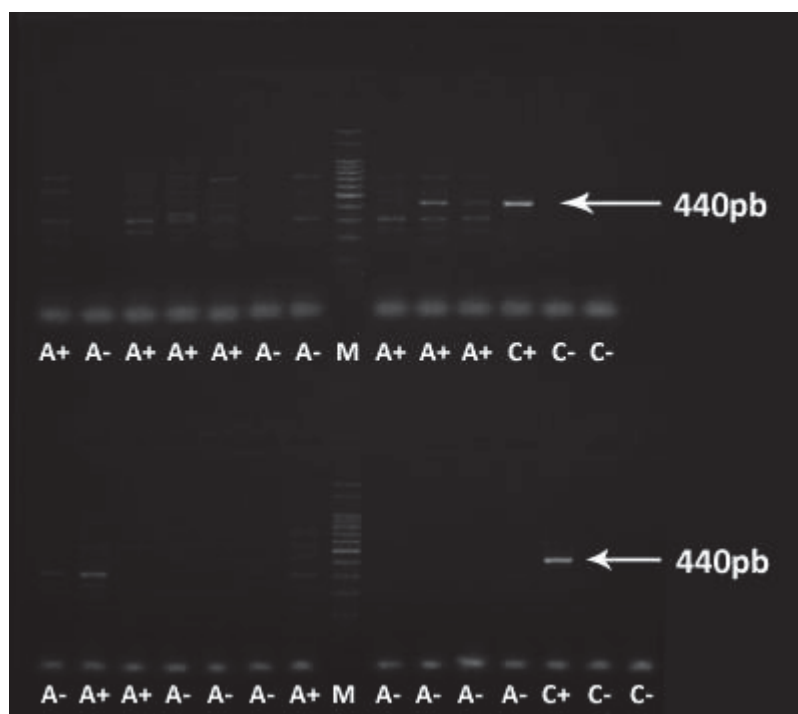
FIGURA 19 – Representação gráfica dos resultados positivos para o vírus da cinomose nas diferentes amostras de cães, antes e após o tratamento, independente do grupo experimental. Botucatu, SP, 2011.

O líquido foi a pior amostra para a realização da RT-PCR e foi a amostra que apresentou maior queda nos valores percentuais, após o tratamento experimental. Apesar de ter sido a pior amostra com relação a positividade, no processo de eletroforese, foi a amostra que apresentou menos bandas inespecíficas no gel, tanto na RT-PCR quanto na hn-PCR. Na RT-PCR identificou-se bandas com 440 pb e na hn-PCR o produto esperado foi de 331 pb (Figura 20).

Quando foi analisado pelo Teste McNemar o efeito do momento em cada amostra nos diferentes grupos não mostrou resultado significativo estatisticamente. Esses dados não foram representados em tabelas por não apresentarem significado clínico ao estudo.

Sangue e Medula
óssea

Líquor

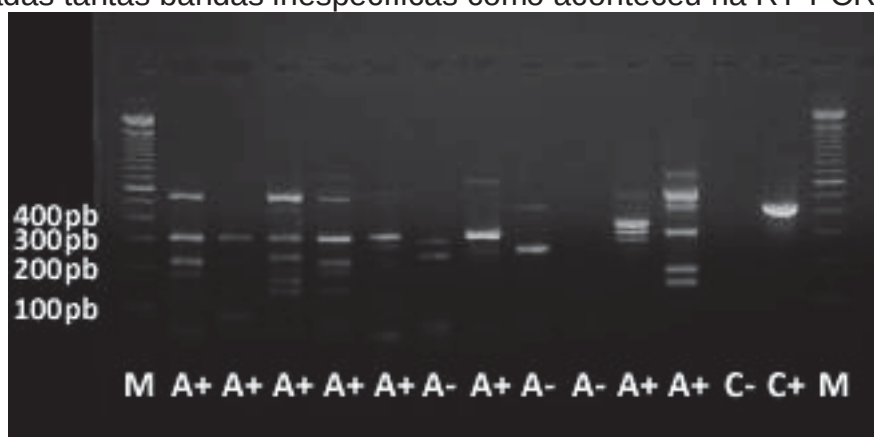


A+: amostra positiva
A-: amostra negativa
C+: controle positivo
C-: controle negativo
M: marcador ("Loading")
pb: pares de bases

FIGURA 20 – Eletroforese após RT-PCR para detecção do vírus da cinomose de amostras de sangue, medula óssea e líquido de cães. Botucatu, SP, 2011.

Podem-se identificar as bandas inespecíficas encontradas principalmente nas amostras de sangue e medula óssea. Ao mesmo tempo foi possível identificar a banda do tamanho esperado com 440 pb.

Nas amostras que foram negativas na RT-PCR foi realizada a hn-PCR, utilizando um terceiro "primer". Neste caso, pode-se esperar a visualização de duas bandas no gel da eletroforese, onde um é resultado da reação anterior com 440 bp, e o produto esperado deve ter 331 pb, no entanto não foram encontradas tantas bandas inespecíficas como aconteceu na RT-PCR.



A+: amostra positiva
A-: amostra negativa
C+: controle positivo

C-: controle negativo
M: marcador ("Loading")
pb: pares de bases

FIGURA 21 – Eletroforese após hn-PCR para detecção do vírus da cinomose de amostras de sangue e medula óssea de cães. Botucatu, SP, 2011.

TABELA 44 – Resultados positivos e negativos da hn-PCR para detecção do vírus da cinomose de amostras de cães nos diferentes grupos experimentais independente do momento de colheita do material. Botucatu, SP, 2011.

Grupos	Positivo		Negativo		Total	
	n	%	n	%	n	%
G1	27,0	77,1	8,0	22,9	35,0	100,0
G2	14,0	48,3	15,0	51,7	29,0	100,0
G3	13,0	46,4	15,0	53,6	28,0	100,0
G4	14,0	56,0	11,0	44,0	25,0	100,0
G5	16,0	55,2	13,0	44,8	29,0	100,0
G6	18,0	56,3	14,0	43,8	32,0	100,0
Total	102,0	57,3	76,0	42,7	178	100,0

Estatística: Qui-quadrado, $p=0,1543$.

n: número de amostras. %: porcentagem.

G1: grupo 1; G2: grupo 2; G3: grupo 3; G4: grupo 4; G5: grupo 5; G6: grupo 6.

O grupo com maior número de hn-PCR foi G1, onde das 35 amostras, 77,1% foram positivas, sendo o grupo que mais apresentou positividade na hn-PCR. Este resultado pode estar relacionado com o tempo de armazenamento das amostras, já que foi o primeiro grupo a ser estudado.

No entanto, o G6 foi o segundo grupo com mais amostras negativas na RT-PCR que foram verificadas pela hn-PCR. Este grupo teve o menor tempo de armazenamento, porém a taxa de positividade foi menor em relação ao G1. Estes resultados não apresentaram significância estatística, mas demonstraram a importância da realização da hn-PCR para confirmação do resultado.

A realização da hn-PCR também foi avaliada frente à amostra utilizada para a reação. Estes dados apresentaram significância estatística pela necessidade de realização dessa reação em muitas amostras de líquido em relação ao sangue periférico e medula óssea (Tabela 45).

TABELA 45 – Relação dos resultados positivos e negativos da hn-PCR para detecção do vírus da cinomose em relação ao tipo de amostra de cães, independente do grupo experimental. Botucatu, SP, 2011.

Amostras	Positivo		Negativo		Total	
	n	%	n	%	n	%
Sangue	43,0	91,5	4,0	8,5	47,0	100,0
Medula óssea	30,0	71,4	12,0	28,6	42,0	100,0
Líquor	29,0	32,6	60,0	67,4	89,0	100,0
Total	102,0	57,3	76,0	42,7	178	100,0

Estatística: Qui-quadrado, $p=0,0000$.

n: número de amostras.

%: porcentagem.

A amostra com maior número de hn-PCR foi o líquido e 67,4% foi negativo nesta reação, demonstrando que não é a amostra mais indicada para o diagnóstico molecular da cinomose. As amostras de sangue e medula óssea apresentaram mais positividade e menor necessidade de realização da hn-PCR.

A medula óssea foi a melhor amostra, pois foi a que menos necessitou de hn-PCR e apresentou grande quantidade de resultados positivos na reação.

Estes dados apresentaram resultado significativo estatisticamente não só quando trabalhados independente do grupo experimental, mas também nos diferentes grupos (Tabela 46).

Das 35 amostras do G1 que foram realizadas hn-PCR, 18 eram de líquido, 11 de sangue e seis de medula óssea. O G1 apresentou 27 (77,1%) das amostras positivas na hn-PCR e 22,9% negativas. Das amostras negativas, sete foram de líquido e uma de medula óssea e 100% das amostras de sangue deste grupo foram positivas. Das amostras de medula óssea 83,3% foram positivas (Tabela 46).

No G2 foram realizadas 29 reações de hn-PCR, sendo que 15 (51,7%) foram negativas e 14 (48,3%) positivas. Das amostras negativas 12 foram de líquido e três de medula óssea. Novamente 100% das amostras de sangue foram positivas. Neste grupo, as amostras de medula óssea apresentaram 57,1% de positividade (Tabela 46).

No G3 foram realizadas 28 reações de hn-PCR, sendo que 16 de líquido, seis de medula e seis de sangue. Dessas 28 amostras, 15 (53,6%) foram negativas e 13 (46,4%) foram positivas. Assim como no G2, das amostras de líquido, 75% foram negativas e das amostras de sangue e medula, 83,3% e 66,7%, respectivamente foram positivas (Tabela 46).

Das 25 amostras que foram processadas pela técnica de hn-PCR no G4, 11 foram de líquido, sete de medula óssea e sete de sangue periférico. Neste grupo 100% das medulas foram positivas e apenas 27,3% das amostras de líquido. Das amostras negativas, oito foram de líquido e três de sangue (Tabela 46).

No G5 foram realizadas 29 reações de hn-PCR, sendo que 16 foram de líquido, sete de medula óssea e seis de sangue periférico. Dessas 29 amostras, 16 (55,2%) foram positivas e 13 (44,8%) foram negativas. Da mesma forma

que aconteceu na maioria dos grupos, 62,5% das amostras de líquido foram negativas e 57,1% das de medulas e 100% das amostras de sangue também foram positivas, respectivamente (Tabela 46).

TABELA 46 – Relação dos resultados da hn-PCR para detecção do vírus da cinomose em cada tipo de amostra de cães nos diferentes grupos experimentais. Botucatu, SP, 2011.

Grupo	Sangue		Medula óssea		Líquor		Valor de p
	+	-	+	-	+	-	
G1	11,0	0,0	5,0	1,0	11,0	7,0	0,0495
%	100,0	0,0	83,3	16,7	61,1	38,9	
G2	8,0	0,0	4,0	3,0	2,0	12,0	0,0005
%	100,0	0,0	57,1	42,9	14,3	85,7	
G3	5,0	1,0	4,0	2,0	4,0	12,0	0,0270
%	83,3	16,7	66,7	33,3	25,0	75,0	
G4	4,0	3,0	7,0	0,0	3,0	8,0	0,0101
%	57,1	42,9	100,0	0,0	27,3	72,7	
G5	6,0	0,0	4,0	3,0	6,0	10,0	0,0316
%	100,0	0,0	57,1	42,9	37,5	62,5	
G6	9,0	0,0	6,0	3,0	3,0	11,0	0,0008
%	100,0	0,0	66,7	33,3	21,4	78,6	
Total	43,0	4,0	30,0	12,0	29,0	60,0	0,0000
%	91,5	8,5	71,4	28,6	32,6	67,4	

Estatística: Qui-quadrado. +: positivo; -: negativo; %: porcentagem; G1: grupo 1; G2: grupo 2; G3: grupo 3; G4: grupo 4; G5: grupo 5; G6: grupo 6.

Assim como nos outros grupos, o G6 apresentou 32 amostras para a realização da hn-PCR, sendo 14 de líquido, nove de sangue e nove de medula. Dessas, 18 (56,3%) foram positivas e 14 (43,8%) negativas. Das amostras de líquido 78,6% foram negativas 66,7% das de medula óssea e 100% das de sangue foram positivas, respectivamente.

Esses resultados não avaliaram o tratamento experimental, mas foi possível identificar a melhor amostra a ser utilizada neste tipo de estudo, que seriam as amostras de sangue e medula associadas, sendo realizada a hn-PCR nas amostras negativas na RT-PCR.

A realização da hn-PCR foi comparada nos momentos de colheita de material, ou seja, antes e após o tratamento experimental com relação aos resultados positivos ou negativos (Tabela 47).

TABELA 47 – Relação dos resultados positivos e negativos da hn-PCR para detecção do vírus da cinomose de amostras de cães, realizadas antes e após o tratamento experimental independente do grupo. Botucatu, SP, 2011.

Momento	Positivo		Negativo		Total	
	n	%	n	%	n	%
1º dia	74,0	66,7	37,0	33,3	111,0	100,0
15º dia	28,0	41,8	39,0	58,2	67,0	100,0
Total	102,0	57,3	76,0	42,7	178	100,0

Estatística: Qui-quadrado, $p=0,0019$.

n: número de amostras.

%: porcentagem.

Estes dados apresentaram resultado significativo estatisticamente e foi possível identificar uma queda no número de reações positivas no segundo momento de colheita de material. Esta queda aconteceu independente do grupo, ou seja, se o animal foi tratado com o antiviral ou não, podendo estar relacionada com a patogenia da cinomose (Tabela 48).

TABELA 48 – Resultados da hn-PCR para detecção do vírus da cinomose de amostras de cães, antes e após o tratamento nos diferentes grupos experimentais. Botucatu, SP, 2011.

Grupo	1º dia		15º dia		Valor de p
	Positivo	Negativo	Positivo	Negativo	
G1	19,0	4,0	8,0	4,0	0,2565
%	82,6	17,4	66,7	33,3	

G2	10,0	8,0	4,0	7,0	0,5348
%	55,6	44,4	36,4	63,6	
G3	11,0	6,0	2,0	9,0	0,0430
%	64,7	35,3	18,2	81,8	
G4	9,0	9,0	5,0	2,0	0,3049
%	50,0	50,0	71,4	28,6	
G5	13,0	4,0	3,0	9,0	0,0179
%	76,5	23,5	25,0	75,0	
G6	12,0	6,0	6,0	8,0	0,3232
%	66,7	33,3	42,9	57,1	
Total	74,0	37,0	28,0	39,0	0,0019
%	66,7	33,3	41,8	58,2	

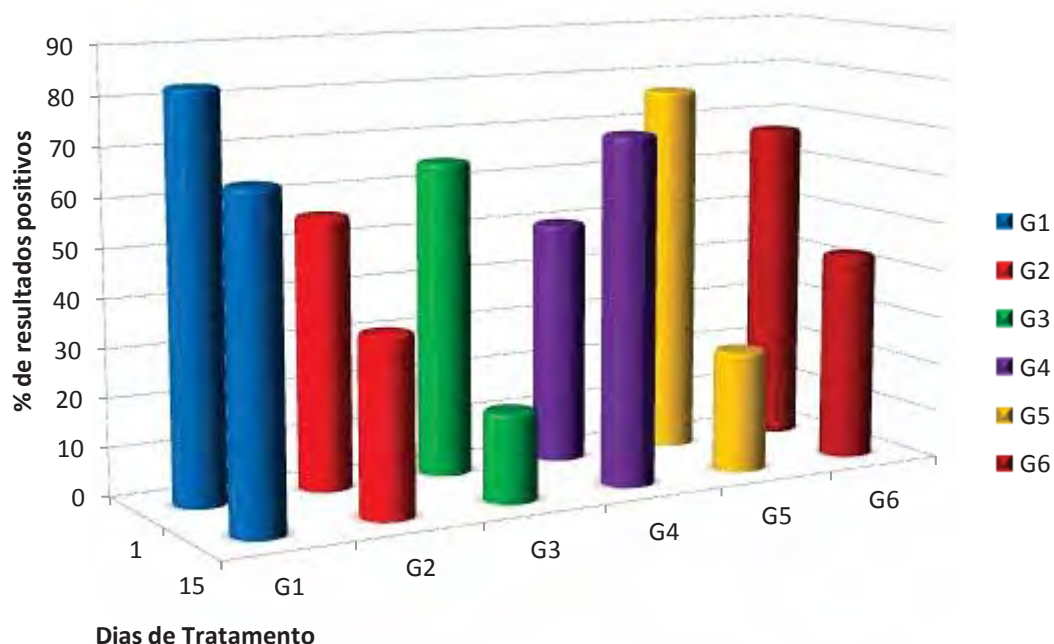
Estatística: Qui-quadrado.

%: porcentagem.

G1: grupo 1; G2: grupo 2; G3: grupo 3; G4: grupo 4; G5: grupo 5; G6: grupo 6.

Apenas no G3 e G5 foi observado o resultado significativo entre o primeiro momento e após 15 dias de tratamento. No entanto, na maior parte dos grupos experimentais foi encontrada uma queda dos valores percentuais no segundo momento de colheita de material, esta queda só não ocorreu no G4, onde foi observado um aumento dos valores percentuais. Este grupo é considerado controle e os animais foram tratados apenas com prednisona, mostrando que apesar de ser o grupo com maior número de óbitos foi o único que apresentou elevação dos valores no segundo momento, após o tratamento.

É importante lembrar que em todos os grupos houveram óbitos, portanto o número de animais deve diminuir de um momento para outro, assim deve-se trabalhar com os dados percentuais (Figura 22).



Estatística: Qui-quadrado.

%; porcentagem.

G1: grupo 1; G2: grupo 2; G3: grupo 3; G4: grupo 4; G5: grupo 5; G6: grupo 6.

FIGURA 22 – Representação gráfica dos valores percentuais dos resultados positivos da hn-PCR para detecção do vírus da cinomose em amostras de cães, antes e após o tratamento nos diferentes grupos experimentais. Botucatu, SP, 2011.

A figura 22 evidencia o aumento dos valores percentuais de resultados positivos na hn-PCR no G4, diferente do que ocorreu em todos os outros grupos que apresentaram diminuição destes valores.

Como a hn-PCR foi realizada apenas nas amostras que resultaram negativa na RT-PCR, estes dados demonstram que dando grande quantidade de resultados negativos após o período de 15 dias de tratamento e mesmo realizando a hn-PCR os resultados continuaram em sua maior parte negativos no segundo momento.

Como o G3 é um grupo controle, ou seja, os animais não receberam o tratamento antiviral, e apresentou maior queda dos valores percentuais de resultados positivos, demonstra que este deveria ser um resultado esperado na patogenia da cinomose. Portanto, o que foi possível verificar é que os grupos tratados tiveram uma queda, mas que não foi muito acentuada como no G3.

Discussão

Para compor os grupos experimentais, não houve distinção de sexo e raça entre os animais selecionados e o atual estudo apresentou 45% de fêmeas e 55% de machos. Na pesquisa realizada por Sonne (2008) a autora encontrou 59,26% de machos e 40,74% de fêmeas infectadas com o vírus da cinomose. 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) afirmam 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 sequelas comparadas com as raças dolicocefálicas (HEADLEY & GRAÇA, 2000; GREENE, 2006).

Os animais incluídos na pesquisa não apresentaram diferença estatística conforme a raça, mas a frequência encontrada foi de 75% de cães sem raça definida, 10% de cães da raça Poodle e 3,3% das raças Border Collie e Pinscher e esses dados não demonstram susceptibilidade racial. Já na pesquisa realizada por Sonne (2008), a frequência de cães sem raça definida foi de 44,44%, seguida de animais da raça Poodle com 11,11%, apresentando dados semelhantes a atual pesquisa. Portanto, a frequência não indica predisposição racial, mas sim o número de animais atendidos e um casual índice elevado de Poodles.

Headley e Graça (2000) encontraram 63% dos casos de encefalite pela cinomose em animais com menos de 18 meses, sugerindo que a maior taxa de mortalidade nesta forma aconteça 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, 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.

Na pesquisa realizada por Sonne (2008), dos 40 animais incluídos 78,5% apresentavam idade de dois a seis meses e em 11,1% dos animais a faixa etária situou-se entre sete meses e um ano de idade.

Nos animais do presente estudo a idade variou de três meses a 13 anos, no entanto as medianas das idades variaram de sete a 48 meses de idade, concordando com os dados dos autores acima. Sendo que os animais dos grupos 5 e 6 foram mais jovens com mediana de 10 e sete meses

respectivamente, e pelas conclusões de Headley e Graça (2000) estes animais teriam maior predisposição à morrerem pela doença na sua forma neurológica.

Pelo estudo da patogenia da doença, verificou-se que a infecção do tecido epitelial e SNC ocorreram 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 utilizou-se 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 medianas variaram de quatro a sete dias de evolução, e que nos grupos 1 e 6 o período de início de tratamento foi menor e nos grupos 2, 3 e 4 foi maior. No entanto, estes dados não mostraram interferência na sobrevida dos animais e muito menos na amplificação da resposta inflamatória no sistema nervoso.

O diagnóstico da cinomose é difícil de ser realizado, depende de técnicas caras e de capacitação técnica para realização, como ELISA (LATHA et al., 2007), imunofluorescência (MEGID et al, 2000) e RT-PCR (SAITO et al, 2000; GEBARA et al., 2004). Em vários casos a combinação de alguns principais sintomas como, inflamação conjuntival, secreção respiratória, diarreia, doença com três semanas ou mais e sinais neurológicos sugerem um diagnóstico presuntivo da cinomose (KIM et al., 2006). Em regiões endêmicas, a cinomose deve sempre ser considerada como um importante diagnóstico para cães com alterações neurológicas, independente do tipo, curso, extensão e natureza da doença neurológica (AMUDE et al., 2010a). Assim os autores referem que chega-se na suspeita clínica baseando-se na história, sintomatologia e achados hematológicos (SILVA et al., 2005; GREENE, 2006).

Como descrito na literatura, os animais do experimento foram selecionados a partir de suspeitas clínicas e de algumas características epidemiológicas e sinais extraneurais. Estes sinais clínicos encontrados na cinomose foram divididos na atual pesquisa em alterações oculares, sinais respiratórios e digestivos. Dos animais incluídos no estudo 63,3% apresentavam sinais oculares, como secreção ocular, ceratoconjuntivite seca, úlcera de córnea e alopecia das pálpebras. Os animais dos grupos 5 e 6 foram os que apresentaram maior número de acometimento ocular, em relação aos outros grupos. Estes dados de sinais oculares podem estar relacionados com a idade dos animais, já que os animais dos grupos 5 e 6 são os mais jovens e podem ter o sistema imune menos desenvolvido permitindo a colonização bacteriana secundária.

Na pesquisa realizada por Sonne (2008), 50% dos animais apresentavam sinais oculares e 35,2% secreção nasal. Os sinais no sistema respiratório são rinite, descarga nasal serosa a mucopurulenta, pneumonia intersticial inicial 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). Os sinais respiratórios descritos foram observados em 41,7% dos animais incluídos na pesquisa.

No sistema gastrointestinal há ocorrência de vômitos intermitentes, anorexia, diarreia pastosa a líquida, escura, com ou sem a presença de sangue, havendo desidratação em poucos animais (CORRÊA & CORRÊA, 1992; GREENE, 2006). Dos animais incluídos na pesquisa, 38,3% deles apresentaram sinais gastroentéricos. Esta sintomatologia foi a de menor frequência nos animais estudados.

Já na pesquisa de Sonne (2008), os achados necroscópicos foram de 48,1% dos animais com conteúdo intestinal diarreico.

Os animais incluídos no estudo além de apresentarem sinais neurológicos, tiveram uma alta frequência de sinais oculares, menor em sinais respiratórios e, a seguir, sinais gastroentéricos. No G5 foi possível verificar um alto índice de sinais oculares e respiratórios e no G6 de sinais oculares e gastroentéricos. Ao mesmo tempo estes foram os grupos que apresentaram as menores medianas de idade (abaixo de 12 meses). Concordando com os dados de patogenia da enfermidade, animais mais jovens sofrem mais com o processo de imunossupressão, levando a infecção bacteriana secundária nos locais de replicação viral (GREENE, 2006).

Segundo Tipold et al. (1992) apenas dois terços dos cães infectados desenvolvem sinais extraneurais, incluindo conjuntivite, febre, sinais respiratórios, envolvimento gastroentérico, tonsilite e caquexia, ao passo que

um terço desenvolve sinais neurológicos sem sinais extraneurais no exame físico.

Os sinais clínicos, curso da doença e o tipo de envolvimento do SNC dependem da virulência da cepa viral, condições ambientais, idade e estado imune do hospedeiro (SHELL, 1990; TIPOLD et al., 1992; GREENE, 2006). Filhotes e cães imunossuprimidos são propensos a desenvolvem necrose neuronal, enquanto que cães mais velhos ou imunocompetentes desenvolvem desmielinização (SHELL, 1990).

Os sinais neurológicos são múltiplos e consequentes da replicação viral em neurônios e células gliais, refletindo desta forma, a distribuição do vírus e as consequentes lesões no SNC (TIPOLD et al., 1992; GREENE, 2006).

Deve ser considerado o objetivo da pesquisa cujos dados são relacionados, pois o trabalho de Amude (2005) foi realizado em animais que foram indicados para eutanásia e na atual pesquisa os animais deveriam sobreviver ao tratamento experimental pelo menos cinco dias, quando receberam ribavirina e três dias os do grupo controle. Por isso, alguns sinais neurológicos diferem bastante de uma pesquisa para outra, já que representam graus diferentes de acometimento do SNC.

No estudo de Silva et al. (2007) com 620 casos, a forma neurológica da cinomose foi caracterizada por uma grande variedade de sinais, sendo que os cães apresentavam um único sinal clínico ou uma combinação deles, sendo que este levantamento também foi realizado no atual estudo, havendo concordância nos dados obtidos.

Na atual pesquisa 68,3% dos animais apresentavam déficits posturais, sendo que os déficits de propriocepção foram separados totalizando 43,3% dos animais. Na pesquisa de Amude (2005) as plegias e paresias foram tratadas separadas, no atual estudo foram trabalhadas como alterações posturais e de andar. Na pesquisa de Silva et al. (2007) as alterações posturais e motoras ocorreram em 20,5% dos animais. Na presente pesquisa nenhum dos animais chegou apresentando nistagmo, este sinal surgiu após o início do tratamento como a evolução da enfermidade. A ataxia na pesquisa de Amude (2005) teve frequência de 62,5%, porém só foi considerada a ataxia cerebelar, mas nesta pesquisa foram consideradas as formas de ataxia cerebelar, vestibular e proprioceptiva, por isso tivemos um índice maior de 68,3% de frequência. O

estudo de Silva et al. (2007) apresentou um índice de 25% dos animais com ataxia.

A alteração de consciência foi encontrada em 21,7% dos animais incluídos no estudo, enquanto que Amude (2005) encontrou uma taxa de 25%, no entanto esse tipo de alteração neurológica é considerado principalmente nos casos de eutanásia, como foram os animais incluídos na pesquisa do referido autor. Assim como ocorreu com andar compulsivo e opistótono que foram encontrados em 25% dos casos da sua pesquisa, enquanto que no atual estudo foram incluídos 13,3% de animais com andar compulsivo e 8,3% com opistótono.

O sinal neurológico de balançar a cabeça teve frequência de 12,5% no estudo de Amude (2005), enquanto que nesta pesquisa foi de 28,3%. Com relação ao estrabismo vestibular que foi separado na pesquisa de Amude (2005), na atual pesquisa foi incluído junto às alterações de nervos cranianos que ficaram com 78,3%. As alterações comportamentais tiveram frequência de 6,7% no atual estudo, enquanto que Amude (2005) encontrou 12,5% delas. Não houve referência com relação ao choro noturno, no entanto pode ter sido considerado como alteração de comportamento, porém nesta pesquisa este sinal foi encontrado em 13,3% dos animais.

Amude (2005) encontrou 12,5% de animais que apresentavam mioclonias, enquanto que na atual pesquisa observou-se uma frequência em 45% dos animais. No estudo de Silva et al. (2007) os dados de animais com mioclonias foram mais semelhantes com 38,4% dos casos. Andar em círculos e pressionamento da cabeça contra objetos também foram encontrados nos animais da pesquisa de Amude (2005), porém com uma frequência de 12,5% e neste estudo foi encontrado em 8,3% e 3,3%, respectivamente.

As vacinas produzidas com as amostras do vírus da cinomose, isoladas de cães naturalmente infectados, como Snyder Hill, Rockborn, Onderstepoort, adequadamente atenuadas em culturas de células, são eficientes em induzir o estado de imunidade dos animais vacinados, protegendo-os contra infecção natural (BIAZZONO et al., 2001).

Na pesquisa de Amude (2005) os oito cães incluídos no estudo só apresentavam sinais neurológicos, sendo que quatro animais tinham recebido

pelo menos três doses da vacina contra a cinomose com vírus atenuado, dois não eram vacinados e outros dois tinham histórico vacinal.

Na atual pesquisa não foram incluídos animais que apresentavam histórico vacinal correto, ou seja, quando filhotes com mais de três doses de vacina de vírus vivo atenuado com orientação do médico veterinário ou adultos que recebessem anualmente uma dose. Os animais foram caracterizados de quatro formas: sem vacinação (55%), vacinação incompleta (10%), vacinação sem orientação veterinária (30%) e sem histórico de vacinação (5%). Este último item, em alguns momentos também influenciou a não escolha dos animais para o estudo, já que como o histórico não era conhecido, o animal poderia ter recebido a vacinação.

Mais de 50% das infecções pelo vírus da cinomose 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 susceptíveis 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 (RUDD et al., 2006).

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

Neste estudo foi avaliada a frequência dos animais que entraram em contato direto com outro animal doente e apenas 16,7% deles tinham tido esse contato, sendo que 55% dos animais não tinham outros contactantes em casa, porém 43,3% de todos os cães incluídos na pesquisa tinham acesso à rua, tanto sozinhos quanto com os proprietários. Desta forma, mesmo que a maior parte dos animais não tivesse entrado em contato direto com outros doentes, a infecção provavelmente aconteceu por meio do proprietário (indiretamente), pelo contato com animais não vacinados que podem ter a infecção sem apresentar sinais clínicos ou mesmo por contato direto com animais doentes nas ruas. Nos animais da pesquisa, o principal motivo da infecção ocorreu por falta de um histórico vacinal correto.

No estudo de Elia et al. (2008) foi observado que a relação entre 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 à eficácia da ribavirina frente ao vírus da cinomose “in vitro”. Mangia (2008) analisou a eficácia da ribavirina em cães naturalmente infectados com o vírus da cinomose e concluiu que a melhora dos sinais na maior parte dos animais estudados ocorreu a partir do sétimo dia de administração da droga. Por isso, no atual estudo não foram incluídos animais que morreram com menos de cinco dias de tratamento, pois se deduziu que poderia não haver ainda ação da ribavirina sobre o vírus da cinomose. No entanto, como nos grupos controle não havia droga experimental para ser testada, foram incluídos os animais que não morreram no período de três dias de tratamento, ou seja, animais que morreram com até dois dias de tratamento não entraram na pesquisa.

A atual pesquisa revelou que mesmo com a inclusão de mais dois grupos tratados com a ribavirina e dois grupos controle a média de dias de sobrevivência dos animais tratados com o antiviral foi maior do que dos animais que entraram no grupo não tratado. Este dado sugere-se que a ribavirina aumentou o tempo de vida dos animais naturalmente infectados com o vírus da cinomose apresentando encefalite.

A terapia antiviral na SSPE (encefalite causada pelo vírus do sarampo em humanos) tem como objetivo diminuir a progressão da doença ou estabilização temporal de progressão da doença, prolongar a sobrevivência, ou, menos provavelmente obter a melhora clínica. O benefício esperado é mais do que a taxa de 5% de remissão descrita na literatura (GUTIERREZ et al., 2010).

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 (WU et al., 2005). Hoje na terapia antiviral com ribavirina os pacientes com hepatite C tem uma sobrevivência de 55% (SUNG et al., 2011).

No atual estudo o tratamento experimental foi avaliado segundo a melhora clínica e a sobrevivência dos animais nos diferentes grupos, onde foi encontrada uma taxa de 60 a 70% entre os que sobreviveram ou apresentaram melhora clínica, que em relação ao tratamento usado em humanos apresentou melhores resultados, com exceção do G4 com 70% de óbitos.

A sobrevivência e melhora clínica do estudo foi melhor do que se espera da droga em humanos. Dos 60 animais incluídos no experimento, apenas 38,3% apresentaram melhora clínica, quando se soma os dados dos animais que

receberam o antiviral verificou-se que 12 (30%) animais morreram e 19 (47,5%) apresentaram melhora clínica evidente no período de internação.

Quando é feita a avaliação da sobrevida junto com a melhora clínica dos animais, verificou-se que 70% dos animais tratados com o antiviral apresentaram melhora clínica ou sobrevida, no entanto nos grupos controle essa taxa chegou a 50%. Pode-se identificar que clinicamente a ribavirina favoreceu a sobrevida ou a melhora dos animais tratados, assim como foi descrito por Mangia (2008).

Segundo Corrêa & Corrêa (1992), a cinomose na fase neurológica é progressiva, raramente estacionando, levando à morte em curso agudo ou crônico e sempre deixando sequelas que podem ser inabilitantes nos eventuais sobreviventes. Mangia (2008) observou que a eficácia da ribavirina não foi influenciada pelo período de evolução apresentado pelos animais ao início do tratamento. Foi sugerido que a ribavirina como forma de tratamento na fase neurológica da cinomose torna o prognóstico mais favorável.

Segundo Appel (1969) a taxa de mortalidade de cães infectados pelo vírus da cinomose chega a 50%, após três a quatro semanas de exposição viral. Dependendo da espécie afetada e do estado imunológico do indivíduo a mortalidade pode exceder 80% (HARDER & OSTERHAUS, 1997).

No estudo também foi possível identificar que os grupos tratados com a prednisona tiveram um resultado pior do que aqueles tratados apenas com ribavirina e DMSO.

Comparativamente os autores Fitch & Van De Beek (2008) afirmaram que a encefalite pelo Herpes Simplex Virus (HSV) é considerada a pior condição dentre as encefalites infecciosas, com índice de mortalidade de 70%, caso não seja tratada, reduzindo-se a 20 a 50% de mortalidade nos casos tratados com antivirais. Embora o controle da inflamação parecesse ser benéfico ao SNC, a única consideração do uso de esteróides nas infecções virais é a diminuição da retirada do vírus do organismo, prolongando ainda mais a enfermidade. Como não existem grandes estudos sobre o uso de corticosteróides na encefalite pelo HSV, ainda não há recomendação para a terapia adjuvante.

No entanto, Tipold et al. (1992) e Greene (2006) afirmam que os corticosteróides podem ser utilizados devido a imunopatologia das lesões neuronais e para reduzir o edema cerebral causados pelo vírus da cinomose, mantendo a terapia com doses antiinflamatórias. A imunossupressão causada pelos esteróides é a principal desvantagem, porque a resposta inflamatória é responsável por combater o vírus. Este aspecto foi facilmente identificado na atual pesquisa já que a taxa de letalidade no G4 foi de 70%.

Ao mesmo tempo, o G5 mostrou que quando há associação da ribavirina, mesmo em animais imunossuprimidos, há aumento da sobrevida e melhora clínica, chegando a 70% como ocorreu neste grupo.

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 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 atual estudo.

Contudo, a pesquisa evidenciou que animais que não foram vacinados apresentaram índices melhores de sobrevida e melhora clínica, assim como ocorreu na pesquisa de Mangia (2008). Na atual pesquisa foi identificado que animais que receberam a vacina sem orientação do médico veterinário também apresentaram taxas melhores de sobrevida e melhora clínica sendo demonstrado, desta forma, que a vacinação realizada sem orientação do médico veterinário não foi capaz de causar melhora dos índices de avaliação clínica, portanto pode-se afirmar que não possuem massa antigênica capaz de causar resposta imune nos animais vacinados com as mesmas.

Nenhum dos tratamentos mostrou diferença com relação ao histórico vacinal, mas foi possível notar que os grupos 1, 2 e 6 apresentaram taxas acima de 50% de melhora clínica para os animais que receberam a vacinação sem orientação veterinária. Já os animais que não receberam vacinação, os índices de melhora foram evidentes nos grupos 1, 4 e 5, sendo que os G4 e G5 são grupos tratados com doses imunossupressoras de prednisona.

Diferente do que foi descrito por Mangia (2008), os dados demonstram que o histórico vacinal não alterou os dados do tratamento experimental.

A disseminação do vírus no epitélio e nos tecidos do SNC ocorre no período de oito a 10 dias pós-infecção, por via hematogênica ou pelo líquido dependendo do estado imune humoral e da imunidade citomediada do animal (TIPOLD et al., 1992; VANDEVELDE & ZURBRIGGEN, 1995; 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 se ocorrer o aumento da titulação de anticorpos, mas podem persistir por longos períodos em tecidos uveais, 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).

Sabendo da interferência do sistema imune na sobrevida dos animais, o atual estudo mostrou que os animais que morreram eram mais novos que os animais que sobreviveram ou que apresentaram melhora clínica, independente do grupo tratado. Este resultado concorda com os dados da literatura.

No entanto, a pesquisa mostrou que os animais dos grupos controle que morreram eram mais velhos, enquanto que nos grupos tratados com a ribavirina e suas associações os animais que morreram eram mais jovens; discordando com a literatura analisada, já que se esperava em todos os grupos que animais mais jovens tivessem maior letalidade.

Assim, os dados encontrados na pesquisa indicaram que a ribavirina favoreceu a melhora clínica dos animais, já que a diminuição de partículas virais circulantes permite melhor resposta imune do hospedeiro e verificou que os cães que receberam ribavirina e apresentaram melhora clínica são animais com mais de 24 meses de idade, capazes de produzir uma resposta eficaz frente à infecção viral.

Em vários estudos envolvendo a ocorrência natural da encefalite pelo vírus da cinomose, sinais sistêmicos simultâneos com doença neurológica são a apresentação mais comum, assim como convulsões e mioclônias são sinais mais encontrados quando há acometimento do SNC (FRISK et al., 1999;

HEADLEY & GRAÇA, 2000; MORO et al., 2003; GEBARA et al., 2004). Concordando com os dados da literatura, os animais do presente estudo apresentaram no histórico, sinal sistêmico seguido ou concomitante com a doença encefálica. No entanto, não existem dados na literatura com relação a sobrevida dos animais em relação ao sinal clínico sistêmico, quando associado com sinais neurológicos.

A presente pesquisa verificou-se que animais com apresentação clínica da associação de sinais oculares com neurológicos tiveram maior índice de óbitos (72,7%) e os animais que não apresentaram sinais oculares tiveram maior índice de sobrevida e melhora clínica. Quando compara-se esses dados nos diferentes grupos experimentais, nota-se que quando não foi usada a prednisona a maior porcentagem de melhora clínica foi dos animais que não apresentavam sinais oculares e nos grupos 4, 5 e 6 os animais que melhoraram tinham sinais oculares.

Com relação a presença de sinais gastroentéricos nos animais estudados, notou-se que houve êxito no índice de melhora clínica dos animais na presença destes sinais, este fato ocorreu principalmente nos grupos 2, 3, 5 e 6.

Já a presença de sinais respiratórios não intervieram na sobrevida dos animais estudados quando analisados na chegada ao Hospital Veterinário, pois 50% dos animais que morreram apresentavam sinais respiratórios. Quando este sinal foi estudado nos diferentes grupos experimentais, os resultados demonstraram que não influenciaram na sobrevida dos animais nos diferentes tipos de tratamento experimental, já que os grupos controle apresentaram as mesmas características nas taxas de óbito e melhora clínica que os grupos experimentais. A presença deste sinal foi importante durante o período de internamento, pois que animais que apresentavam decúbito ficaram mais predispostos a desenvolverem sinais respiratórios mesmo com o uso de antimicrobianos, favorecendo a morte destes cães mesmo com o uso do antiviral. Em alguns casos, o desenvolvimento de pneumonia durante o período de internamento foi uma complicação da própria enfermidade que levou ao óbito dos animais.

A encefalomielite da cinomose normalmente é uma doença neurológica multifocal e os sinais clínicos refletem a difusão do vírus e a disseminação de lesões no SNC (SHELL, 1990; KOUTINAS et al., 2002). Algumas vezes os sinais neurológicos da cinomose sugerem uma localização restrita de lesões no SNC (TIPOLD et al., 1992; KOUTINAS et al., 2002).

Na pesquisa de Sonne (2008) foram analisados os encéfalos de 54 cães e foram encontradas lesões microscópicas em 29 deles. Nos animais analisados a encefalopatia foi classificada em 79,0% como aguda, 13,8% como subaguda e 6,9% como crônica. Em dois animais não se observou alterações microscópicas no cérebro e cerebelo, porém o antígeno viral foi visualizado por teste imunoistoquímico.

Estes autores demonstram a importância do estudo das lesões encefálicas em cães com cinomose. Na atual pesquisa os sinais neurológicos foram avaliados conforme o local da lesão que eles refletem, assim quanto maior a quantidade de sinais neurológicos, maior a área do SNC acometida e mais difusa é a distribuição viral. Os dados encontrados nos animais estudados mostraram que os que morreram tinham mais sinais neurológicos que os animais que sobreviveram ou apresentaram melhora clínica. Os resultados obtidos demonstraram que os animais que melhoraram apresentavam menos

sinais neurológicos do que os que morreram, mesmo recebendo o antiviral, o que mostra que o tratamento experimental não foi capaz de causar uma evolução clínica favorável na presença de muitos sinais neurológicos.

Quando avaliados de acordo com a quantidade de sinais, notou-se que os animais incluídos na pesquisa apresentaram taxas maiores de óbitos quando tinham mais de cinco sinais neurológicos em relação aos com um a quatro sinais, concordando com os dados de literatura que quanto maior a área afetada pior o prognóstico da doença (AMUDE, 2008).

Apenas no G3 os animais que apresentavam mais sinais neurológicos foram os que apresentaram melhora clínica, ou seja, mesmo a enfermidade sendo difusa, os animais tratados com DMSO apresentaram melhores índices de cura clínica. No G4 mesmo os animais apresentando poucos sinais neurológicos, morreram mostrando que o tratamento pode ter piorado a evolução do processo neurológico.

Visando não só a difusão viral, a localização das lesões foi relacionada com a sobrevida e foi encontrado que a maior parte dos animais que apresentaram mioclonias morreram, independente do grupo tratado.

Estudos experimentais mostram que uma lesão focal na medula espinhal pode ser responsável pela mioclonia. É especulado que o local de destruição é o neurônio motor inferior da medula espinhal ou o núcleo do nervo cranial. É possível que a lesão no núcleo basal inicie a mioclonia pela estabilização de um marca-passo na medula ou tronco encefálico (DE LAHUNTA, 1983). Sendo este sinal mais característico na encefalite de cães jovens (BRAUND, 1994).

Não há dados na literatura sobre a relação da incidência de mioclonias com o óbito dos animais, na verdade, esperava-se que fosse um sinal menos importante ao prognóstico até mesmo por afetar neurônios periféricos, no entanto pode estar associada ao número de óbitos de animais mais jovens, o que pode ter ocorrido no presente estudo.

Alguns sinais com menor frequência nos animais incluídos, porém que intervieram na sobrevida dos animais acometidos foram: alteração do nível de consciência, opistótono, agressividade e pressionamento da cabeça contra objetos. Estes sinais estão relacionados com lesões cerebrais, principalmente diencefálicas (DEWEY, 2006).

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 nos eritrócitos 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 (SILVA et al., 2005). Concordando com a literatura, a maior parte dos animais da pesquisa apresentava anemia quando chegou para o tratamento, já que todos os grupos tiveram medianas da contagem de hemácias abaixo dos valores de normalidade para cães (MEYER et al., 1995).

Como ocorreu na pesquisa anterior de Mangia (2008), os animais após o período de tratamento com a ribavirina apresentaram valores baixos da contagem de hemácias. Na atual pesquisa verificou-se que todos os grupos apresentaram uma queda na mediana da contagem de hemácias, mesmo os animais do grupo controle. Os animais dos grupos 3, 5 e 6 foram os que apresentaram valores inferiores à 3.500.000 hemácias/ μ L. Dois animais do G5

e um do G6 apresentaram valores da contagem de hemácias abaixo de 2.000.000 células/ μ L no 15º dia de tratamento, que podemos classificar como anemia grave (MEYER et al., 1995).

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 a causa para a 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).

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. Na dose de 30 mg/Kg também administrada no período de duas semanas apresentou um leve quadro de anemia, porém quando administrada junto com o glicocorticóide apresentou anemia grave.

Não foram encontrados na literatura relatos de efeitos colaterais potencializados por glicocorticóides no uso da ribavirina em qualquer espécie animal que já foi testada, portanto este é o primeiro relato de quadros de anemia severa em cães que receberam ribavirina em associação com a prednisona.

Mangia (2008) sugeriu que o DMSO minimizou os efeitos colaterais da ribavirina, causando uma queda menor nos valores de contagem de hemácias. Foi encontrada uma semelhança desse quadro quando comparou-se os grupos 5 e 6, e que o G6 que recebeu a associação com o DMSO manteve a contagem de hemácias mais alta do que os animais do G5.

A dosagem de hemoglobina apresentou semelhança com os resultados da contagem de hemácias, onde no primeiro momento a maior parte dos animais apresentava contagem de hemácias e dosagem de hemoglobina baixas quando chegaram ao Hospital Veterinário.

Após o tratamento experimental, o G2 foi o que melhor apresentou mediana da dosagem de hemoglobina, ao contrário do que aconteceu com os grupos 5 e 6. Foi possível identificar que a ribavirina em associação com a prednisona foi capaz de causar uma queda nos níveis de hemoglobina nos cães destes grupos experimentais, diferente do que foi encontrado nos animais do grupo controle e nos animais que não receberam a associação das duas drogas.

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, podendo chegar à 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. As mudanças na concentração de ribavirina celular são inversamente proporcionais às alterações nos níveis de hemoglobina (INOUE et al., 2004; HITOMI et al., 2011). No entanto, os níveis de hemoglobina em cães apresentaram a sua primeira queda próximo do 10º dia de tratamento e não apenas com duas semanas, como sugere a literatura. A incorporação de metabólitos fosforilados está relacionada com a dose administrada, ou seja, sugere que os animais do presente estudo receberam uma dose elevada e a incorporação de metabólitos ocorreu em um período inferior ao descrito na literatura.

Ao mesmo tempo, o glicocorticóide atua em várias regiões da célula, tanto na membrana celular quanto na membrana do núcleo e, desta forma, podem interferir aumentando o acúmulo dos metabólitos da droga nas hemácias. No entanto, não existem dados que relatem a administração da ribavirina junto com a prednisona, como ocorreu neste estudo, portanto esses dados são sugestões para novas pesquisas que venham trabalhar com o antiviral em cães.

Apesar dos grupos controle apresentarem quase 10 pontos percentuais abaixo dos valores de referência para cães no 15º dia de tratamento, nos grupos que receberam ribavirina, exceto o G2, os valores de volume globular chegaram a extremos, abaixo de 25%. Assim como os outros resultados, todos os animais mostraram anemia no último dia de tratamento, sendo que os grupos 1, 5 e 6 apresentaram os piores resultados tanto de volume globular quanto de hemácias e dosagem de hemoglobina.

Assim como sugerido por Mangia (2008) 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 seu acúmulo e posterior perda da hemoglobina. Esta sugestão surgiu 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. Por esta pesquisa ficou evidenciado que o tratamento com ribavirina, sem o DMSO, pode levar a anemia mais grave que a própria evolução da doença.

Tipold et al. (1992) afirmam que a trombocitopenia é um achado raro na cinomose, no entanto, Silva et al. (2005) afirmam que a trombocitopenia é um achado frequente. Sabe-se, apenas, que em infecções pelo *Morbillivirus* já se observou aumento de anticorpos antiplaquetas. A trombocitopenia é provavelmente do tipo imunomediada com remoção das plaquetas pelo sistema retículo endotelial. Essa 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*.

Em nenhum dos grupos foi encontrada uma alteração destes valores que fosse significativa clinicamente. No entanto, no último dia de tratamento apenas os G1 e G5 apresentaram medianas dentro dos valores de referência (MEYER et al., 1995), assim sugere que mesmo com o tratamento experimental ainda houve ação do vírus no sangue circulante.

O G6 foi o único grupo que apresentou mediana relativamente baixa no último dia de tratamento, porém não há dados na literatura que relatem efeitos colaterais das drogas experimentais sobre as plaquetas.

O leucograma é a característica mais variável com as contagens abrangendo de leucopenia a leucocitose. Infecções bacterianas oportunistas no trato digestório e respiratório podem ser observadas e isso justifica a leucocitose por neutrofilia e o desvio a esquerda (SILVA et al., 2005). Tudury et al. (1997) estudando a forma neurológica da cinomose relatou que anemia e linfopenia são os achados hematológicos mais frequentes na enfermidade.

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.

No presente estudo, na contagem de leucócitos foi possível identificar que a mediana do G3 foi menor em relação aos outros grupos no último dia de tratamento, o que nos permite afirmar que os animais deste grupo permaneceram infectados até o último dia de tratamento, porém este grupo não recebeu o antiviral. No entanto, o G1 também apresentou uma mediana abaixo da normalidade, mostrando que a leucopenia predominante no grupo pode ser um indício da não eficácia da ribavirina em interromper a ação viral nestas células.

O presente estudo revelou que as medianas dos grupos 4 e 5, que receberam doses imunossupressoras de prednisona, apresentaram uma contagem de leucócitos mais alta em relação aos outros grupos. Este achado foi descrito na pesquisa de Van Den Brandt et al. (2007), na qual os glicocorticóides mostraram induzir células CD8 α a formarem linfócitos T CD4+ e causaram apoptose de timócitos, mas mantendo ainda as células T maduras do sangue periférico mimetizando uma proliferação hemostásica. E complementando com o trabalho de Abraham et al. (2006) em que os autores afirmam que os glicocorticóides inibem a expressão dos mediadores inflamatórios dos macrófagos e de outras células, desta forma, são usados no tratamento de várias enfermidades inflamatórias imunomediadas.

Assim, mesmo que os animais dos G4 e G5 apresentassem imunossupressão, a contagem de leucócitos nesses animais tenderia para valores mais altos como ocorreu na pesquisa.

Os grupos 1, 2 e 3, que não receberam prednisona, demonstraram uma queda nesta contagem a partir do 12º dia de tratamento, demonstrando assim que esta alteração pode ser consequência natural da doença, já que os animais do G3 não receberam a ribavirina. A mediana do G6 demonstrou a mesma característica, evidenciando que a dose de 0,5 mg/Kg, a cada 12 horas, não foi capaz de aumentar a quantidade de leucócitos circulantes tanto quanto a dose imunossupressora.

Com relação a quantidade absoluta de neutrófilos, nenhum grupo apresentou medianas abaixo ou acima dos valores de referência para cães (MEYER et al., 1995), demonstrando a pouca relevância clínica frente aos achados estatísticos. Desta forma, os tratamentos experimentais não intervieram nos valores de neutrófilos em todos os grupos pesquisados.

Um quadro proeminente da infecção de cães gnobióticos com vírus da cinomose é a linfopenia prolongada e depleção linfóide sistêmica. A causa da linfopenia ocorre provavelmente devido a habilidade do vírus em se replicar e destruir os tecidos linfóides (MORO & VASCONCELOS, 1998).

Entretanto, nos relatos atuais foi observado que a cinética da infecção viral não está relacionada com a da depleção de linfócitos e a morte celular. No período de três a seis dias após 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 hemostasia de linfócitos (KUMAGAI et al., 2004; SCHOBESBERGER et al., 2005).

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. Na pesquisa de Mangia (2008) o índice de linfopenia foi de 75%.

Baseado nos relatos de Schobesberger et al. (2005), a determinação do número de linfócitos tem um valor prognóstico no desenvolvimento da doença.

No presente estudo foi possível verificar que o G3 apresentou melhor resposta linfocitária ao final do tratamento. No entanto, foi o único grupo que não recebeu ribavirina e prednisona. Nos grupos tratados com estas drogas os valores de linfócitos foram menores no décimo quinto dia de internação. Sendo que dos grupos tratados, os grupos 1, 5 e 6 apresentaram medianas da contagem de linfócitos muito baixas, considerada uma linfopenia relativamente acentuada.

Existem autores que afirmam que a ribavirina tem efeitos imonureguladores, 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). Como este foi um achado sugerido na pesquisa de Mangia (2008), é possível que a presença de linfopenia nos grupos tratados com ribavirina seja uma alteração da sua toxicidade em cães também.

Na presente pesquisa foi possível detectar que todos os grupos que receberam o tratamento antiviral apresentaram uma queda nos valores de linfócitos principalmente no último dia de internamento. Os grupos 3 e 4, que não receberam ribavirina apresentaram aumento no número de linfócitos circulantes após o sétimo dia de tratamento.

Na contagem de eosinófilos houve diferença estatística na mediana dos grupos 2 e 3 em relação aos outros grupos no sétimo dia de tratamento, sendo que estes achados podem estar relacionados com o uso do DMSO. Porém, não existem dados na literatura que mostrem o aumento de eosinófilos circulantes pelo uso do DMSO em cães. Somente Randhawa (2006) afirma que 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 a liberação de histamina pela ativação de mastócitos.

No entanto, no presente estudo observou-se que ao final do tratamento, mesmo que os valores de eosinófilos tenham aumentado, não ficou caracterizada uma eosinofilia já que os valores de referência não foram ultrapassados (MEYER et al., 1995).

Não foram encontrados resultados significativos em relação aos outros tipos celulares examinados no hemograma, como basófilos e monócitos.

Segundo Tipold et al. (1992) os achados hematológicos frequentes em cães com cinomose são linfopenia, às vezes associado com leucopenia ou leucocitose, anemia, monocitose e raramente trombocitopenia. No entanto, na atual pesquisa a monocitose não foi encontrada em nenhum momento nos diferentes grupos experimentais. Porém, foi encontrada uma taxa de 3,3% dos monócitos ativados no dia em que os animais chegaram para atendimento no Hospital Veterinário.

Foi encontrado também um aumento gradativo no número de monócitos ativados durante o período de internamento dos animais. Apenas os grupos 4 e 6 não apresentaram monócitos ativados no sangue periférico em nenhum momento do tratamento.

As inclusões citoplasmáticas denominadas corpúsculos 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).

É importante ressaltar que a viremia ocorre no período de quatro a seis dias, quando após a replicação em órgãos linfóides, causa um aumento na temperatura corporal, ocorrendo leucopenia causada por danos virais nas células linfóides (CORRÊA & CORRÊA, 1992; VANDEVELDE & ZURBRIGGEN, 1995; VANDEVELDE & ZURBRIGGEN, 2005; GREENE, 2006).

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

Pela literatura existente, não era para se encontrar o corpúsculo de Lentz, já que as fases virêmicas acontecem no início da infecção e os animais que foram incluídos na pesquisa já apresentavam sinais neurológicos. No entanto, no primeiro momento, encontrou-se 1,7% de inclusões. Após 15 dias de tratamento, 2,4% dos animais apresentaram inclusões no sangue. Este achado neste momento da pesquisa pode ter sido o primeiro indício do aparecimento de partículas virais na circulação sanguínea após o tratamento com a ribavirina, já que a inclusão foi encontrada em um único animal do G5.

Segundo Jain (1993) os linfócitos reativos estão presentes nas respostas imunes com formação de anticorpos, e são geralmente caracterizados por atipia e linfócitos altamente basofílicos ou imunocompetentes.

Os linfócitos na sua forma reativa apresentam um significado importante na referida enfermidade, pois caracterizam uma resposta imune ao vírus. Este achado foi encontrado em 8,3% dos animais incluídos na pesquisa. Porém, este achado hematológico não apresentou resultado estatístico significativo em nenhum dos momentos, com a apresentação esporádica nos diferentes grupos, sugerindo que não houve influência do tratamento na sua ocorrência.

No exame bioquímico de função hepática e renal, os achados não são específicos para a infecção pelo vírus da cinomose (TIPOLD et al., 1992; GREENE, 2006). Pela análise da dosagem de creatinina sérica, pode-se afirmar que não houve lesão renal aguda nos animais tratados com ribavirina. No entanto, as alterações na dosagem de uréia sérica, demonstraram no primeiro momento e no décimo segundo dia de tratamento uma elevação dos valores, sugerindo processos de desidratação encontrado nos animais dos grupos 1, 2 e 5, principalmente. Assim, os dados encontrados concordam com a literatura.

As dosagens bioquímicas de função hepática (ALT, FA e GGT) não apresentaram resultados significativos clinicamente entre os grupos. Estes

resultados demonstram que a ribavirina e o DMSO não exercem efeitos hepatotóxicos, apesar da metabolização ocorrer no fígado, como descrito por Hayden & Douglas (1990) e Paes (1999), respectivamente.

No grupo 5 foi encontrado um animal com aumento das enzimas hepáticas, caracterizando uma lesão hepática no último dia de tratamento. Este animal apresentou valores de ALT, FA e GGT altas, com 3317 UI/L, 2694 UI/L e 329 UI/L respectivamente, todas no último dia de tratamento. Mesmo com as enzimas hepáticas altas, o animal ainda assim apresentava função hepática não comprometida por manter normal o valor de albumina sérica.

Segundo Greene (2006), a elevação das globulinas plasmáticas é frequente em várias reações inflamatórias e, em particular, o componente alfa-2, que aumenta significativamente nas infecções bacterianas e víricas, notadamente na cinomose. Assim como descrito por Mangia (2008) houve aumento das proteínas séricas dos G1 e G2, e no presente estudo houve uma queda em todos os grupos experimentais na dosagem de proteína sérica a partir do décimo dia de tratamento.

Com relação a fração de albumina sérica, foi possível verificar que as medianas estão mais próximas dos valores mais baixos de referência (MEYER et al., 1995) no primeiro dia. Apenas o grupo 6 apresentou mediana abaixo de 2,7 g/dL, portanto a maioria dos animais deste grupo não mostrou lesão hepática nas outras dosagens bioquímicas, indicando que a hipoalbuminemia encontrada pode estar relacionada com a pressão oncótica do sangue, onde há uma diminuição na produção de albumina para compensar a hiperglobulinemia.

Na dosagem de globulinas séricas, o G6 apresentou valores normais de globulinas, então a hipoalbuminemia pode estar relacionada com alguns animais que apresentavam anorexia. Os outros grupos experimentais apresentaram valores acima do normal para cães, demonstrando hiperglobulinemia até o décimo dia de tratamento, como descrito na literatura.

Os grupos 5 e 6 mostraram uma queda mais acentuada dos valores de globulinas no décimo quinto dia, sendo que estes animais receberam a prednisona, que possui efeito antiinflamatório, já que a presença de hiperglobulinemia em cães com cinomose pode representar o aumento de imunoglobulinas produzidas frente a presença do vírus.

Quando comparadas as curvas dos resultados de globulina e albumina sérica permitem afirmar que houve uma compensação das duas dosagens demonstrando que a diminuição da fração albumina está relacionada com a pressão oncótica dentro dos vasos sanguíneos por causa da hiperglobulinemia produzida a partir da infecção viral.

Os dados do exame de urina do tipo I mostram que os animais desenvolveram cistite, tanto no primeiro momento quanto durante o tratamento. Este exame teve como principal objetivo identificar presença de lesão renal e hepática agudas. Apenas os grupos 2, 5 e 6 apresentaram valores altos da concentração de proteínas na urina de alguns cães no décimo quinto dia de tratamento, podendo significar uma lesão renal aguda, onde ainda não houve aumento das dosagens de uréia e creatinina.

Sabe-se que 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). Portanto, o uso associado com outras drogas como o DMSO e a prednisona pode ter levado a uma lesão renal de alguns cães no último dia de tratamento. Para concluir este dado seria

necessário o estudo destes animais por período mais longo, avaliando a função renal após cessar a administração da droga, o que não ocorreu na presente pesquisa.

Com relação à função hepática, no décimo dia de tratamento dos animais do G1 foi possível detectar a presença de traços de bilirrubina na urina na maior parte deles.

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). Assim, pode-se sugerir que a presença de bilirrubina possa ser consequência da hemólise causada pela ribavirina e não necessariamente por uma lesão hepática. Da mesma forma aconteceu no décimo quinto dia de tratamento, um aumento da quantidade de bilirrubina na urina em todos os grupos, sendo que o G5 foi o que apresentou a maior dosagem de bilirrubina na urina.

Outra hipótese para estes achados seriam indícios de uma sobrecarga do sistema hepatobiliar destes cães, na dose e intervalo entre doses da ribavirina utilizada na pesquisa. No entanto, nenhuma das amostras de urina apresentou positividade para a presença de sais biliares na urina nos grupos experimentais e em nenhum dos momentos, o que diminui as chances que seja uma alteração no sistema hepatobiliar.

Pelo sedimento urinário foi possível detectar a presença de cistite, mesmo que branda nos animais dos grupos 5 e 6, já que foram encontrados leucócitos, hemácias e bactérias. No primeiro momento de colheita de material a presença de cistite pode estar relacionada com o caráter imunossupressor da enfermidade.

Segundo Moro & Vasconcelos (1998) 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.

Além da imunossupressão causada pelo vírus, os animais destes grupos são os mais jovens, o que pode estar relacionado também pela imaturidade do sistema imune. Provavelmente por este motivo, estes animais apresentaram alterações de infecção e inflamação da vesícula urinária todo o período de tratamento.

A análise do líquido é um dos melhores métodos de diagnóstico das afecções do encéfalo e da medula espinhal. O exame do líquido 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). No presente estudo e de Mangia (2008), o processo inflamatório no SNC foi confirmado pelo exame do líquido dos cães com encefalite pela cinomose, antes e após o tratamento experimental.

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 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. De

acordo com os autores, na atual pesquisa as características citadas não contribuíram para a identificação do processo inflamatório causado pelo vírus da cinomose.

Segundo alguns autores, 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 células/ μ L, com predomínio de linfócitos (CORRÊA & CORRÊA, 1992; TIPOLD, et al., 1992; SUMMERS et al., 1995; GREENE, 2006). Portanto, é possível afirmar que a maior parte dos animais encontravam-se na fase crônica da enfermidade, já que todos os grupos apresentaram medianas para dosagem de proteínas no primeiro momento acima de 25 mg/dL.

O G3 foi o grupo que apresentou menor valor de mediana da dosagem de proteínas no líquido após o tratamento experimental, porém os valores variaram muito. Sendo que os valores máximos encontrados nos diferentes grupos experimentais mostraram que em todos os grupos houve uma diminuição, porém nos grupos 3 e 5 houve um aumento, mesmo sendo estes grupos tratados com anti-inflamatórios.

Apenas os grupos 4 e 5 apresentaram elevação da quantidade de proteína após o tratamento, sendo que nestes grupos foi utilizada a prednisona na sua dose imunossupressora. Desta forma, a prednisona não foi capaz de diminuir o processo inflamatório como desejado já que houve aumento dos valores de proteína no líquido dos animais tratados.

O G6 também foi tratado com a prednisona, porém com doses menores e apresentou diminuição dos valores de proteína no líquido. Assim, pode-se afirmar que a prednisona em doses anti-inflamatórias foi capaz de reduzir a quantidade de proteína no líquido, enquanto que quando administrada em doses imunossupressoras houve aumento desses valores.

A literatura explica que no sistema nervoso, a administração crônica de glicocorticóides ou o estresse não são uniformemente anti-inflamatórios e em algumas circunstâncias agem aumentando o processo inflamatório, que foi identificado pelo aumento da migração de células inflamatórias, pelo nível de mediadores inflamatórios e pela ativação do fator de transcrição. No sistema nervoso lesado, níveis de estresse do glicocorticóide podem induzir uma resposta pró-inflamatória, e que em níveis basais ou de baixo estresse possuem um efeito tradicional anti-inflamatório (SORRELLS & SAPOLSKY, 2007).

Os autores ainda afirmam que o uso de glicocorticóides para lesões no SNC pode ser deletério, porém estes efeitos são compensados pela diminuição da inflamação pela administração crônica. Os efeitos benéficos para o processo inflamatório acontecem pelo bloqueio dos receptores de TNF- α e pela inibição da proliferação de astrócitos no local da morte de neurônios. O fato é que altas concentrações de glicocorticóides aumentam a extensão da neurotoxicidade e da resposta inflamatória nos locais lesados (SORRELLS & SAPOLSKY, 2007).

O aumento de anticorpos antivírus 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). Para avaliar a produção de imunoglobulinas inespecíficas no líquido dos animais da pesquisa foi utilizado o teste de Pandy. Sendo que, no primeiro momento a maior parte dos animais não apresentou

reação no teste de Pandy. Após 15 dias de tratamento apenas com o DMSO, o G3 apresentou uma cruz de turbidez no teste.

Pelo teste de Pandy, pode-se identificar o efeito dos tratamentos experimentais, já que após o tratamento apenas os animais do grupo controle que apresentaram mediana e percentil 75 com turbidez no teste de Pandy.

Feitosa et al. (1997) encontraram positividade no teste de Pandy em todos os animais estudados com cinomose, 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 hematoencefálica.

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., 1997). Por isso não houve relevância dos resultados encontrados na contagem de hemácias no líquido dos animais incluídos na pesquisa, demonstrando que em todos os grupos houve pelo menos um animal que teve seu líquido contaminado com sangue periférico durante a colheita de material.

Gama et al. (2005) encontraram 50% dos animais infectados e com sintomatologia neurológica apresentando pleocitose, com mais de oito células/ μL . A ausência de células no líquido, em cães com cinomose e sinais nervosos, está associada a estágios iniciais e agudos desta enfermidade.

Feitosa et al. (1997) afirmam a ocorrência de pleocitose em cães com cinomose e a contagem de células nucleadas variou de 19 a 400 células/ μL . No presente estudo foi encontrada variação de zero a 8775 células/ μL no líquido dos animais no primeiro momento, antes do tratamento experimental.

Outros autores consideram pleocitose quando há aumento de células nucleadas acima de 10 células/ μL , o que foi estabelecido no presente estudo (GREENE, 2006). Desta forma, os grupos 5 e 6 apresentavam valores de medianas dentro da normalidade no início do tratamento, demonstrando que o processo inflamatório nesses animais foi agudo. No entanto, o G1 apresentou maior mediana para células nucleadas, seguido do G2, sendo considerado como processo crônico na patogenia da cinomose. O G3 foi tratado apenas com DMSO e serviu como grupo controle em relação ao processo inflamatório nos outros grupos, já que não apresentou queda desta contagem, diferente do que foi encontrado nos outros grupos.

Como mecanismo de ação do DMSO a literatura descreve que possui efeitos neuroprotetores em ratos em diferentes doses quando administrado antes e depois da isquemia. Os autores mostraram que houve atenuação na destruição da barreira hematoencefálica também. A ação ocorre frente a formação de radicais livres de oxigênio locais sem fagocitose, de forma que o DMSO diminui o estresse oxidativo dos tecidos (NAGEL et al., 2007). Já Farkas et al. (2004) observaram que o mesmo é capaz de prevenir a produção da cicloxigenase-2 e a perda de neurônios. Além disso, o DMSO pode apresentar efeitos na função neurocondutora (ALI, 2001). Tsvyetlynska et al. (2005) sugerem que o DMSO age na transmissão sináptica do glutamato na medula espinhal, auxiliando na locomoção dos animais. Pela literatura verificou-se que o DMSO não age na proliferação de células e na liberação de citocinas quimiotáticas, esperando-se que no presente estudo não houvesse

intervenção do DMSO no número de células nucleadas no líquido dos animais afetados.

Assim, pode-se afirmar que o G2 apresentou queda nos valores da contagem de células nucleadas no líquido no segundo momento, provavelmente por uma ação apenas da ribavirina.

O G4 apenas tratado com prednisona foi o que apresentou maior queda desses valores, porém foi o grupo com menor número de animais com melhora clínica. O G5 também teve o mesmo comportamento com relação a contagem de células, e recebeu a mesma dose de prednisona, entretanto, associada à ribavirina. Destaca-se que neste grupo ocorreu a segunda melhor resposta para melhora clínica.

A partir destes dados foi possível verificar que a prednisona na sua dose imunossupressora levou ao aumento da dosagem de proteínas e uma diminuição da contagem de células nucleadas no líquido. Sugere-se que a prednisona faça uma imunomodulação nessa dose em cães e não uma potente ação antiinflamatória.

Pela literatura existente pode-se afirmar que os glicocorticóides são reconhecidos por inibir a proliferação de linfócitos T e a produção de uma variedade de citocinas, incluindo interferon alfa. A IL-7 age mantendo a população policlonal de linfócitos T imaturos e as células T de memória, e, portanto, controla o estoque de células T (TALAYEV et al., 2005).

Ao mesmo tempo Feitosa et al. (1997) afirmam que os altos níveis de proteínas no líquido são encontrados em animais com cinomose com uma porcentagem maior de plasmócitos, uma vez que todos os animais 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.

Assim, a prednisona provavelmente age na população de linfócitos T, enquanto os plasmócitos encontrados no líquido causam o aumento de proteínas sob ação do mesmo glicocorticóide.

A pleocitose do líquido nas encefalites virais é caracterizada por apresentar mais que 60% de linfócitos, mas também pode ser encontrada na meningoencefalomielite granulomatosa e na encefalite bacteriana tratada com antimicrobianos (CHRISMAN, 1992). Na cinomose, Feitosa et al. (1997) afirmam que a pleocitose ocorre predominantemente por um aumento de linfócitos, havendo também a presença de monócitos, macrófagos e raros neutrófilos. Todos os grupos do estudo apresentaram medianas acima de 60% de linfócitos no primeiro momento, exceto o G4. Ao mesmo tempo, o G4 foi o grupo que apresentou maior valor relativo e absoluto de linfócitos no líquido.

Após o tratamento experimental, o G1 apresentou 93% de linfócitos e o G6 apenas 12%, que apresentou resultado significativo estatisticamente. Apesar desta diferença houve uma queda na mediana dos valores absolutos de linfócitos em todos os grupos, exceto no G3 onde os animais foram tratados apenas com DMSO.

Apesar da ausência de manguitos perivasculares, numerosas células CD8⁺ são encontradas nas lesões agudas desmielinizantes e também distribuídas difusamente no parênquima cerebral, correlacionando 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

microglia serve como iniciadora para a invasão de células T no SNC (VANDEVELDE & ZURBRIGGEN, 2005).

Nos grupos 1, 2 e 3, que não receberam prednisona houve aumento dos valores mínimos, ou seja, nestes grupos os animais passaram a apresentar maior semelhança de valores, diminuindo a diferença entre o máximo e o mínimo, significando que a presença de linfócitos no líquido ficou mais constante, mesmo que em valores menores. Assim como Mangia (2008) relatou, 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 induz a migração de mais células e podem manter a inflamação no SNC, resultando em resposta imunomediada, conforme descrito por Wünschmann et al. (1999) e Markus et al. (2002).

Para confirmar o que foi sugerido anteriormente, as medianas da contagem de linfócitos dos grupos 4, 5 e 6 quase chegaram a zero após o tratamento, sendo que estes grupos foram tratados com prednisona.

Em todos os grupos tratados com ribavirina também foi possível identificar uma queda nesses valores, mas a presença do anti-inflamatório fez grande diferença tanto nos valores de celularidade quanto no número de linfócitos.

Com relação às células mononucleares, foi encontrada uma queda dos valores relativos do primeiro dia em relação ao último dia de tratamento em todos os grupos, exceto no G5 que apresentou um aumento. As medianas dos valores absolutos também apresentaram diminuição entre os dois momentos em todos os grupos.

Como descrito na literatura, as outras células encontradas no líquido não ultrapassaram 10% da celularidade líquórica. Somente o G4 apresentou valores altos deste tipo celular que somado aos outros resultados sugere que houve contaminação pelo sangue periférico. As alterações encontradas neste tipo celular após o tratamento mostraram apenas contaminações do líquido com sangue durante a colheita de material.

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). Os resultados demonstraram que a técnica de RT-PCR é um método eficiente para realização do diagnóstico rápido, precoce e "in vivo" (FRISK et al., 1999; SATO et al., 2006; SAITO et al., 2006; ELIA et al., 2008).

Foram realizadas 308 reações da RT-PCR, sendo que 130 (42,2%) foram positivas. Foram realizadas 178 reações da hn-PCR e 102 (57,3%) foram positivas. Assim, das 308 amostras analisadas, 232 (75,32%) foram positivas.

A degradação autolítica do RNA viral causada por RNases endógenas pode ser considerada nos casos de resultado falso-negativo (FRISK et al., 1999). 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 pela RT-PCR, quando o cão apresenta 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.

Assim, sugere-se que parte das amostras que ficaram armazenadas durante quatro anos, mesmo que em frascos adequados e no freezer à -80°C

possam ter sofrido com a degradação autolítica de RNAses endógenas mais do que as amostras colhidas recentemente. Ao mesmo tempo, os animais apresentaram diminuição da celularidade líquórica após o tratamento, diminuindo as chances de encontrar o RNA viral nas amostras. Por isso, a pesquisa teve 75,32% de amostras positivas, já que a técnica tem alta sensibilidade e especificidade.

Segundo Amaral (2007) os iniciadores utilizados foram capazes de amplificar o produto de 440 pb na RT-PCR e na hn-PCR um produto de 331 pb, como na presente pesquisa. Encontrou uma frequência de 43 positivos na hn-PCR das 50 amostras testadas, sendo que o maior número ocorreu nos casos de secreções genitais, seguido de urina, secreção ocular e células brancas do sangue periférico. Segundo Frisk et al. (1999) 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 imunoistoquímica do SNC.

Kim et al. (2006) afirmam que amostras incluindo sangue periférico, secreção conjuntival, nasal, urina, líquido, e secreção vaginal, tecidos pulmonares, estomacais, intestinais e urinário podem ser utilizados para o diagnóstico de cinomose pela técnica RT-PCR. Entretanto, secreção conjuntival é a mais apropriada para o diagnóstico precoce da cinomose.

A presente pesquisa, 95% das amostras de sangue periférico foram positivas, concordando com os resultados de Frisk et al. (1999). A medula óssea foi a segunda amostra que apresentou maior positividade (90%), seguida do líquido que apresentou 53,3% de positividade, concordando com os resultados encontrados na literatura.

Após o tratamento, houve um aumento das amostras positivas de sangue (97,7%) e diminuiu as amostras positivas do líquido (27,3%). A diminuição da positividade das amostras de líquido pode estar relacionada diretamente com a diminuição da celularidade do líquido, consequente da diminuição do processo inflamatório no SNC promovido pelas drogas experimentais.

Amaral (2007) e outros autores (FRISK et al., 1999; SHIN et al., 2004) observaram que a associação de colheita de diferentes amostras biológicas por animal aumentou o número de resultados positivos. Como foi realizado na presente pesquisa, onde se encontrou positividade em todos os animais antes e após o tratamento experimental. Além disso, nos animais do presente estudo, seria indicado o uso do sangue e medula óssea como melhores amostras para o diagnóstico da cinomose.

Amude et al. (2006) obtiveram resultados negativos de urina e líquido de cães com sintomatologia, exclusivamente neurológica, com diagnóstico de cinomose confirmado pela PCR e pela presença de lesões histopatológicas características no SNC. Este achado pode explicar porque 100% dos animais do G3 apresentaram resultado negativo no líquido após o período de tratamento.

Com relação a presença de bandas inespecíficas encontradas na presente pesquisa, pelos dados de Amaral (2007), autora que desenhou os iniciadores utilizados, não ocorreu a formação destas bandas no seu estudo, sugerindo que as bandas encontradas tenham surgido em função do método de extração utilizado, que foi diferente ao adotado pela referida pesquisadora, que obteve a mesma sensibilidade analítica para a Nested-PCR.

Shin et al. (2004) levantaram a hipótese de utilização da nested-PCR para diagnóstico da cinomose. 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 & FRIMUS, 2005).

RT-PCR combinada com o nested-PCR mostrou-se mais específica e sensível para o diagnóstico ante-mortem da cinomose, especialmente nas formas subagudas e crônicas, quando o vírus não se encontra mais em epitélios e a reação de imunofluorescência é negativa (JÓZWIK & FRIMUS, 2005).

Na atual pesquisa confirmou-se a necessidade da realização da hn-PCR porque das 178 amostras negativas na RT-PCR, 57,3% foram positivas na hn-PCR. Sendo que das 178 amostras, 89 eram de líquido, 47 de sangue e 42 de medula óssea.

Quando analisa-se os resultados da hn-PCR em relação ao tratamento experimental utilizado, verifica-se que houve aumento dos valores percentuais de positividade na hn-PCR no G4, diferente do que ocorreu em todos os outros grupos que apresentaram diminuição destes valores. O G4 é um dos grupos controle e não recebeu antiviral, somente a prednisona em dose imunossupressora, assim sugere que este tratamento não foi capaz de combater o vírus e diminuir sua distribuição no organismo.

No entanto, o G3 também é um grupo controle, ou seja, os animais não receberam o tratamento antiviral, e apresentou maior queda dos valores percentuais dos resultados positivos, demonstrando que este deveria ser um resultado esperado na patogenia da cinomose. Portanto, o que foi possível verificar é que os grupos tratados tiveram uma queda, mas que não foi acentuada como no G3.

Considerado um ensaio clínico, o presente estudo apresentou algumas limitações, como o número de animais em cada grupo experimental, dificultando nas análises estatísticas quando comparadas nos diferentes grupos. O experimento só foi realizado em animais que apresentavam até 10 dias de evolução clínica e, portanto, não pode-se afirmar sobre seu uso em animais com maior tempo de evolução clínica neurológica. O estudo só foi realizado em animais com até seis anos de idade, da mesma forma não se sabe se em animais mais velhos a ribavirina teria outros efeitos ou apresentaria efeitos colaterais, como descritos em humanos, com lesões hepáticas e renais.

As limitações da metodologia de biologia molecular que para afirmar a verdadeira eficácia da ribavirina o uso da PCR em tempo real poderia nos informar com relação ao número de partículas virais. Este método não foi empregado pela dificuldade de financiamento para tais técnicas moleculares.

A metodologia clínica ficou limitada por não apresentar técnicas de mensuração do processo inflamatório completo no líquido dos animais, como o estudo de citocinas pró e inflamatórias.

Junto com o estudo clínico, outros trabalhos com estudo da biodisponibilidade da ribavirina em cães poderiam informar sobre sua concentração líquórica em animais com encefalite pela cinomose. Estes estudos poderiam informar a correta dose e intervalo entre doses mais indicado para utilização da ribavirina em cães. O período de utilização da droga e o surgimento de efeitos colaterais também devem ser pesquisados, pois que o atual estudo só utilizou a droga durante 15 dias. A utilização de outras

dosagens da ribavirina e em cães não somente com sintomatologia neurológica, devem ser estudadas.

Enfatiza-se ainda a importância de pesquisas que avaliem o desenvolvimento de vírus da cinomose mutantes em animais tratados com ribavirina, a partir do sequenciamento genético viral, após a utilização destes medicamentos.

Conclusões

1. Gerais:

- O melhor tratamento foi o G2; seguido do G1, sendo que deste grupo seis animais apresentaram melhora clínica; depois G5, sendo que deste grupo cinco animais apresentaram melhora e G3 com três animais que apresentaram melhora clínica. Os outros grupos de tratamento apresentaram baixos índices de sobrevida e melhora não sendo suficiente para estabelecimento do protocolo de tratamento.

2. Específicos:

- As principais alterações hematológicas encontradas foram anemia, trombocitopenia, linfopenia absoluta e em menor frequência monócitos ativados, corpúsculo de inclusão e linfócitos reativos. As principais alterações líquóricas foram hiperproteinorraquia e pleocitose linfocítica.
- O principal efeito adverso da ribavirina foi a anemia por hemólise. A ribavirina ainda impediu o aumento dos valores de linfócitos sanguíneos.
- Os efeitos adversos da prednisona na dose imunossupressora apresentou aumento da dosagem de proteína no líquido e de leucócitos no sangue periférico.
- O DMSO não apresentou efeitos colaterais nas doses utilizadas.
- O efeito colateral mais grave da associação dos fármacos foi a anemia nos grupos que receberam ribavirina e prednisona.
- O efeito antiinflamatório no SNC do DMSO não foi identificado. A prednisona causou aumento de proteína e diminuição da celularidade no líquido nos animais tratados com doses imunossupressoras. Com doses antiinflamatórias, ela levou a diminuição da concentração de proteína e não foi possível identificar o efeito sobre a celularidade do líquido.
- Os animais que tiveram maiores índices de melhora clínica apresentavam vacinação sem orientação do médico veterinário, com aproximadamente 24 meses de idade, sinais gastroentéricos, com três tipos de sinais neurológicos, dos sinais neurológicos as alterações em nervos cranianos apresentaram maior frequência nos animais que sobreviveram ou melhoraram.
- Antes do tratamento, o vírus da cinomose foi encontrado em 95% das amostras de sangue, 90% das medulas ósseas e 53,3% de líquido. Após o tratamento experimental a frequência do vírus foi de 97,7% nas amostras de sangue, 86,4% nas amostras de medula óssea e 27,3% nas amostras de líquido.

Referências

Bibliográficas

- ABRAHAM, S. M.; LAWRENCE, T.; KLEIMAN, A.; WARDEN, P.; MEDGHALCHI, M.; TUCKERMANN, J.; SAKLATVALA, J.; CLARK, A. R. Antiinflammatory effects of dexamethasone are partly dependent on induction of dual specificity phosphatase 1. *JEM*, v. 203, n. 8, p. 1883-1889, 2006.
- 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, 2005.
- ALI, B. H. Dimethyl Sulfoxide: Recent pharmacological and toxicological research. *Veterinary and Human Toxicology*, v. 43, n. 4, p. 228-231, 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.

AMARAL, H. A. *Detecção do vírus da cinomose pela técnica de RT-PCR em cães com sintomatologia neurológica*. 2007. Tese (Doutorado). Universidade de São Paulo, Programa de Pós-Graduação em Clínica Veterinária, São Paulo, SP.

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. *Avaliação neurológica e laboratorial de casos de encefalomyelite pelo vírus da cinomose canina na ausência de sinais sistêmicos e mioclonia*. 2005. Dissertação (Mestrado). Universidade Estadual de Londrina, Centro de Ciências Agrárias, Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal, Londrina, PR.

AMUDE, A. M. *Encefalomyelite pelo vírus da cinomose canina: aspectos neuroclínicos e neuropatológicos e uso das técnicas de RT-PCR e imunoistoquímica no auxílio do diagnóstico post mortem*. 2008. Tese (Doutorado). Universidade Estadual de Londrina, Centro de Ciências Agrárias, Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal, Londrina, PR.

AMUDE, A. M.; ALFIERI, A. A.; ALFIERI, A. F. The nervous form of canine distemper. *Veterinária e Zootecnia*, v. 13, p. 125-136, 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.

AMUDE, A. M.; ALFIERI, A. F.; ALFIERI, A. A. Clinical courses and neurological signs of canine distemper virus infection in dogs. *Current Research, Technology and Education Topics in Applied Microbiology and Microbial Biotechnology*, v. 1, p. 723-728, 2010a.

AMUDE, A. M.; ALFIERI, A. F.; ALFIERI, A. A. Use of immunohistochemistry and molecular assays such as RT-PCR for precise *post mortem* diagnosis of distemper-related encephalitis. *Current Research, Technology and Education Topics in Applied Microbiology and Microbial Biotechnology*, v. 2, p. 1539-1545, 2010b.

APPEL, M. J. G. Pathogenesis of canine distemper. *American Journal of Veterinary Research*, v. 30, n. 7, p. 1167-1182, 1969.

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

AYRES, M.; AYRES JR, M.; AYRES, D.L.; SANTOS, A.S. *BioEstat 5.0. Aplicações estatísticas nas áreas das ciências biológicas e médicas*. Belém: Instituto de Desenvolvimento Sustentável Mamirauá. 2007. 364p.

BAKAR, B.; KOSE, E. A.; SONAL, S.; ALHAN, A.; KILINC, K.; KESKIL, I. S. Evaluation of the neurotoxicity of DMSO infused into the carotid artery of rat. *Injury*, 2011. Doi: 10.1016/j.injury.2011.08.021.

BAKAR, B.; ORUCKAPTAN, H. H.; HAZER, B. D.; SAATCI, I.; ATILLA, P.; KILIC, K.; MUFTUOGLU, S. F. Evaluation of the toxicity of Onyx compared with n-Butyl 2-Cyanoacrylate in the subarachnoid space of a rabbit model: an

- experimental research. *Neuroradiology*, v. 52, p. 125-134, 2010. Doi: 10.1007/s00234-009-0594-8.
- BANIC, B.; NIPIC, D.; SUPUT, D.; MILISAV, I. DMSO modulates the pathway of apoptosis triggering. *Cellular & Molecular Biology Letters*, v. 16, p. 328-341, 2011. Doi: 10.2478/s11658-011-0007-y
- BARNES, P. J. Therapeutic strategies for allergic disease. *Nature*, v. 402 sup., p. 31-38, 1999.
- BARNHAM, K. J.; MASTERS, C. L.; BUSH, A. I. Neurodegenerative disease and oxidative stress. *Nature Reviews Drug Discovery*, v. 3, p. 205-214, 2004.
- BARRETT, T. Morbillivirus infections, with special emphasis on Morbillivirus of carnivores. *Veterinary Microbiology*, v. 69, p. 3-13, 1999.
- BAUMGÄRTNER, W.; ÖRVELL C.; REINACHER, M. Naturally occurring canine distemper virus encephalomyelitis: distribution and expression of viral polypeptides in the nervous tissues. *Acta Neuropathologica*, v. 78, p. 504-512, 1989.
- BEAN, B. Antiviral therapy: current concepts and practices. *Clinical Microbiology Reviews*, v. 5, n. 2, p. 146-182, abr. 1992.
- BEKTASOGLU, B.; CELIK, S. E.; ÖZYERK, M.; GÜKLÜ, K.; APAK, R. Novel hydroxyl radical scavenging antioxidant activity assay for water-soluble antioxidants using a modified CUPRAC method. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, v. 345, p. 1194-1200, 2006.
- 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.
- BODUR, H.; ERBAY, A.; AKINCI, E.; ÖNGÜRÜ, P.; BAYAZIT, N.; EREN, S. S.; KUBAR, A. Effect of oral ribavirina treatment on the viral load and disease progression in Crimean-Congo hemorrhagic fever. *International Journal of Infectious Disease*, v. 15, p. e44-e47, 2011. Doi: 10.1016/j.ijid.2010.09.009
- BÖHM, M. et al. Serum antibody titers to canine parvovirus, adenovirus and distemper virus in dog in the UK wich had not been vaccinated for at least three years. *Veterinary Record*, v. 154, p. 457-463, 2004.
- BOLAND, E. W.; HEADLEY, N. E. Effectiveness of antacids in reducing digestive disturbances in patients treated with prednisone and prednisolone. *California Medicine*, v. 89, n. 4, p. 262-266, 1958.
- BOLLO, E.; ZURBRIGGEN, A.; VANDEVELDE, M.; FANKHAUSER, R. Canine distemper virus clearance in chronic inflammatory demyelination. *Acta Neuropathologica*, v. 54, p. 31-41, 1986.
- BRAUND, K. G. *Clinical Syndromes in Veterinary Neurology*. 2nd ed. St Louis: Mosby, 1994.
- BRAYTON, C. F. Dimethyl Sulfoxide (DMSO): A Review. *Cornell veterinarian*, v. 76, p. 61-90, 1986.
- BRENNAN, K. C.; BELTRAN-PARRAZAL, L.; LOPEZ-VALDES, H. E. THERIOT, J.; TOGA, A. W.; CHARLES, A. C. Distinct vascular conduction with cortical spreading depression. *J. Neurophysiol.*, v. 97, n. 6, p. 4143-4151, 2007.
- BROWNE, M. J. Mechanism and specificity of action of ribavirin. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, v. 15, n. 6, p. 747-753, 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.

CASHMAN, K. A.; SMITH, M. A.; TWENHAFEL, N. A.; LARSON, R. A.; JONES, K. F.; ALLEN, R. D.; DAI, D.; CHINSANGARAM, J.; BOLKEN, T. C.; HRUBY, D. E.; AMBERG, S. M.; HENSLEY, L. E.; GUTTIERI, M. C. Evaluation of Lassa antiviral compound ST-193 in a guinea pig model. *Antiviral Research*, v. 90, p. 70-79, 2011. Doi: 10.1016/j.antiviral.2011.02.012.

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 veterinaria e zootecnia*, v. 59, n. 3, p. 654-659, 2007.

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.

CHALOUPKA, J. C.; VIÑUELA, F.; VINTERS, H. V.; ROBERT, J. Technical feasibility and histopathologic studies of ethylene vinyl copolymer (EVAL) using a swine endovascular embolization model. *American Journal of Neuroradiology*, v. 15, p. 1107-1115, 1994.

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.

CHARREL, R. N.; COUTARD, B.; BARONTI, C.; CANARD, B.; NOUGAIREDE, A.; FRANGEUL, A.; MORIN, B.; JAMAL, S.; SCHMIDT, C. L.; HILGENFELD, R.; KLEMPA, B.; LAMBALLERIE, X. Arenaviruses and hantaviruses: from epidemiology and genomics to antivirals. *Antiviral Research*, article in press, 2011. Doi: 10.1016/j.antiviral.2011.02.009

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.

CHRISMAN, C. L. Cerebrospinal fluid analysis. *Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice*, v. 22, p. 781-807, 1992.

CONRAD, C. D.; McLAUGHLIN, K. J.; HARMAN, J. S.; FOLTZ, C.; WIECZOREK, L.; LIGHTNER, E.; WRIGHT, R. L. Chronic glucocorticoids increase hippocampal vulnerability to neurotoxicity under conditions that produce CA3 dendritic retraction but fail to impair spatial recognition memory. *J. Neurosci.*, v. 27, n. 31, p. 8278-8285, 2007.

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, 2001.

CROTTY, S.; CAMERON, C.; ANDINO, R. Ribavirin's antiviral mechanism of action: lethal mutagenesis? *J. Mol. Med.*, v. 80, p. 86-95, 2002. Doi: 10.1007/s00109-0308-0

CROXTALL, J. D.; van HAL, P. T. W.; CHOUDHURY, Q.; GILROY, D. W.; FLOWER, R. J. Different glucocorticoids vary in their genomic and non-genomic

mechanism of action in A549 cells. *British Journal of Pharmacology*, v. 135, p. 511-519, 2002.

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.

Dal POZZO, F.; GALLIGIONI, V.; VACCARI, F.; GALLINA, L.; BATTILANI, M.; SCAGLIARINI, A. Antiviral efficacy of EICAR against canine distemper virus (CDV) in vitro. *Research in Veterinary Science*, v. 88, p. 339-44, 2010. Doi: 10.1016/j.rvsc.2009.08.010

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 autologous bone marrow graft infusion. *Progress in Clinical and Biological Research*, v. 333, p. 531-540, 1991.

DEAN AG, DEAN JA, COULOMBIER D, BRENDDEL KA, SMITHDC, BURTON AH, DICKER RC, SULLIVAN K, FAGAN RF, ARNER, TG. *Epi Info, Version 6: a word processing, database, and statistics program for public health on IBM-compatible microcomputers*. Centers for Disease Control and Prevention, Atlanta, Georgia, U.S.A., 1996.

DE LAHUNTA, A. *Veterinary Neuroanatomy and Clinical Neurology*. 2nd ed. Philadelphia: W. B. Saunders, 1983.

DEWEY, C. W. *Neurologia de cães e gatos: guia prático*. 2 ed. São Paulo: Roca, 2006. 352 p.

D'INTINO G.; VACCARI, F.; SILVILIA, S.; SCALIARINI, A.; GANDINI, G.; GIARDINO, L.; CALZÀ, L. A molecular study of hippocampus in dogs with convulsion during canine distemper virus encephalitis. *Brain Research*, v. 1098, p. 186-195, 2006.

DUDECK, O.; JORDAN, O.; HOFFMANN, K. T.; OKUDUCU, A. F.; TESMER, K.; KREUZER-NAGY, T.; RÜFENACHT, D. A.; DOELKER, E.; FELIX, R. Organic solvents as vehicles for precipitating liquid embolics: a comparative angiototoxicity study with superselective injections of swine rete mirabile. *American Journal of Neuroradiology*, v. 27, p. 1900-1906, 2006.

EK-KOMMONEN, C.; SIHVONEN, L.; PEKKANEN, K.; RIKULA, U.; NUOTIO, L. Outbreak of canine distemper in vaccinated dogs in Finland. *The Veterinary Record*, v. 141, n. 15, p. 380-383, 1997.

ELALDI, N.; BODUR, H.; ASCIOGLU, S.; CELIKBAS, A.; OZKURT, Z.; VAHABOGLU, H.; LEBLEBICIOGLU, H.; YILMAZ, N.; ENGIN, A.; SENCAN, M.; AYDIN, K.; DOKMETAS, I.; CEVIK, M. A.; DOKUZOGUZ, B.; TASYARAN, M. A.; OZTURK, R.; BAKIR, M.; UZUN, R. Efficacy of oral ribavirina treatment in Crimean-Congo haemorrhagic fever: a quasi-experimental study from Turkey. *Journal of Infection*, v. 58, p. 238-244, 2009.

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*, v. 77, p. 108-13, 2008.

ENRIA, D. A.; BRIGGILER, A. M.; LEVIS, S.; VALLEJOS, D.; MAIZTEGUI, J. I.; CANONICO, P. G. Preliminary report tolerance and antiviral effect of ribavirin in patients with Argentine Hemorrhagic Fever. *Antiviral Research*, v. 7, p. 353-9, 1987.

FARIA, C. D. C.; LONGUI, C. A. Aspectos Moleculares da Sensibilidade aos Glicocorticóides. *Arq. Bras. Endocrinol. Metab.*, v. 50, n. 6, p. 983-995, 2006.

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.

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. 174-151, 1997.

FELLAY, J.; THOMPSON, A. J.; GE, D.; GUMBS, C. E.; URBAN, T. J.; SHIANN, K. V.; LITTLE, L. D.; QIU, P.; BERTELSEN, A. H.; WATSON, M.; WARNER, A.; MUIR, A. J.; BRASS, C.; ALBERCHT, J.; SULKOWSKI, M.; McHUTCHISON, J. G.; GOLDSTEIN, D. B.; ITPA gene variants protect against anaemia in patients treated for chronic hepatitis C. *Nature*, v. 464, p. 405-408, 2010. Doi: 10.1038/nature08825.

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, 1981.

FITCH, M. T.; VAN DE BEEK, D. Drug Insight: steroids in CNS infectious disease – new indications for an old therapy. *Nature Clinical Practice Neurology*, v. 4, n. 2, p. 97-104, 2008. Doi: 10.1038/ncpneuro0713.

FÖRSTER, C.; SILWEDEL, C.; GOLENHOFEN, N.; BUREK, M.; KIETZ, S.; MANKERTZ, J.; DRENCKHAHN, D. Occludin as direct target for glucocorticoid-induced improvement of blood-brain barrier properties in a murine *in vitro* system. *J. Physiol.*, v. 565.2, p. 475-486, 2005.

FORSYTH, M. A.; KENNEDY, S.; WILSON, S.; EYBATON, T.; BARRETT, T. Canine distemper virus in a Caspian seal. *Veterinary Record*, v. 143, n. 24, p. 662-664, 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, 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, 2005.

GASKIN, J. M. Canine distemper virus in domesticated cats and pigs. *Adv. Enzymol. Relat. Areas Mol. Biol.*, v. 40, p. 803-806, 1974.

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 veterinaria e zootecnia, v. 56, n. 2, p. 168-174, 2004.

GELLA, A.; DURANY, N. Oxidative stress in Alzheimer disease. *Cell Adhesion & Migration*, v. 3, p. 88-93, 2009.

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.

GOWTAGE-SEQUEIRA, S.; BANYARD, A.; BARRETT, T.; BUCZKOWSKI, H.; FUNK, S. M.; CLEAVELAND, S. Epidemiology, pathology, and genetic analysis of a canine distemper epidemic in Namibia. *Journal of Wildlife Disease*, v. 45, n. 4, p. 1008-1020, 2009.

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 β , -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.

GRÜNEWALD, R. A. Ascorbic acid in the brain. *Brain Res. Rev.*, v. 18, p. 123-133, 1993.

GUTIERREZ, J.; ISSACSON, R. S.; KOPPEL, B. S. Subacute sclerosing panencephalitis: an update. *Developmental Medicine & Child Neurology*, v. 52, p. 901-907, 2010. Doi: 10.1111/j.1469-8749.2010.03717.x

HAINES, D. M.; MARTIN, K. M.; CHELACK, B. J.; SARGENT, R. A.; OUTERBRIDGE, C. A.; CLARK, E. G. Immunohistochemical detection of canine distemper virus in haired skin, nasal mucosa, and footpad epithelium: a method for antemortem diagnosis of infection. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, v. 11, n. 5, p. 396-399, 1999.

HALLIWELL, G.; GUTTERIDGE, J. M.; ARUOMA, O. I. The deoxyribose method: a simple "test-tube" assay for determination of rate constants for reactions of hydroxyl radicals. *Analytical Biochemistry*, v. 165, p. 215-219, 1987.

HAMELIN, M. E.; PRINCE, G. A.; BOIVIN, G. Effect of ribavirin and glucocorticoid treatment in a mouse model of human metapneumovirus infection. *Antimicrobial agents and Chemotherapy*, v. 50, n. 2, p. 774-7, 2006. Doi: 10.1128/AAC.50.2.774-777.2006

HARA, S.; KIMURA, H.; HOSHINO, Y.; HAYASHI, N.; NEGORO, T.; OKUMURA, A.; KAJITA, Y.; SAKUMA, T.; NAKAYAMA, T.; HOSOYA, M.; TOMODA, A.; MORISIMA, T. Combination therapy with intraventricular interferon- α and ribavirin for subacute sclerosing panencephalitis and monitoring measles virus RNA by quantitative PCR assay. *Brain & Development*, v. 25, p. 367-9, 2003. Doi:10.1016/S0387-7604(03)00017-2

HARDER, T. C.; OSTERHAUS, A. D. M. E. Canine distemper virus – a morbilivirus in search of new host? *Trends in Microbiology*, v. 5, p. 120-124, 1997.

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 Livingstone, 1990. p. 370-393.

- HEADLEY, S. A.; AMUDE, A. M.; ALFIERI, A. F.; BRACARENCE, A. P. F. R. L.; ALFIERI, A. A.; SUMMERS, B. A. Molecular detection of canine distemper virus and the immunohistochemical characterization of the neurologic lesions in naturally occurring old dog encephalitis. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, v. 21, p. 588-597, 2009.
- 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.
- 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, 1991.
- HITOMI, Y.; CIRULLI, E. T.; FELLAY, J.; MCHUTCHISON, J. G.; THOMPSON, A. J.; GUMBS, C. E.; SHIANNA, K. V.; URBAN, T. J.; GOLDSTEIN, D. B. Inosine Triphosphate protects against ribavirin-induced adenosine triphosphate loss by adenylosuccinate synthase function. *Gastroenterology*, v. 140, p. 1314-21, 2011. Doi: 10.1053/j. gastro.2010.12.038
- 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, 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, 2001.
- 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, 2004.
- 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.
- JELLINGER, K. A. Recent advances in our understanding of neurodegeneration. *Journal of Neural Transmission*, v. 116, p. 1111-1162, 2009.
- 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.
- JEULIN, H.; VENARD, V.; CARAPITO, D.; FINANCE, C.; KEDZIEREWICZ, F. Effective ribavirin concentration in mice brain using cyclodextrin as a drug carrier: Evaluation in a measles encephalitis model. *Antiviral Research*, v. 81, p. 261-266, 2009.
- 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.

- 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.
- KELLY, K. A.; HILL, M. R.; YOUKHANA, K.; WANKER, F.; GIMBLE, J. M. Dimehtyl sulfoxide modulates NF-kappa B and cytokine activation in lipopolysaccharide-treated murine macrophages. *Infect. Immun.*, v. 62, n. 8, p. 3122-3128, 1994.
- 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.
- KLOESCH, B.; LISZT, M.; BROELL, J.; STEINER, G. Dimethyl sulphoxide and dimethyl sulphone are potent inhibitors of IL-6 and IL-8 expression in the human chondrocyte cell line C-28/I2. *Life Science*, v. 89, p. 473-478, 2011. Doi: 10.1016/j.lfs.2011.07.015
- KLOVERPRIS, H.; FOMSGAARD, A.; HANDLEY, A.; ACKLAND, J.; SULLIVAN, M.; GOULDER, P. Dimethyl sulfoxide (DMSO) exposure to human peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) abolish T cell responses only in high concentrations and following conincubation for more than two hours. *Journal of Immunological Methods*, v. 356, p. 70-78, 2010. Doi: 10.1016/j.jim.2010.01.014
- KOO, N.; KIM, K. M. Distinct effects on M₂-type pyruvate kinase are involved in the Dimethylsulfoxide-induced modulation of cellular proliferation and degranulation of mast cells. *Archives of Pharmacal Research*, v. 32, n. 11, p. 1637-1642, 2009.
- KOUTINAS, A. F.; POLIZOPOULOU, Z. S.; BAUMGÄRTNER, W.; LEKKAS, S.; KONTOS, V. Relation of clinical sings to pathological changes in 19 cases of canine distemper encephalomyelitis. *Journal of the Comparative Pathology*, v. 126, p. 47-56, 2002.
- KRISHNAN, S. M.; DIXIT, N. M. Ribavirin-Induced Anemia in Hepatitis C Virus patients undergoing combination therapy. *PLoS Computational Biology*, v. 7, n. 2, p. e1001072, 2011. Doi: 10.1371/journal.pcbi.1001072.
- 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.
- 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.
- LEE, B. J.; MATSUNAGA, H.; IKUTA, K.; TOMONAGA, K. Ribavirin inhibits Borna disease vírus proliferation and fatal neurological disease in neonatally infected gerbils. *Antiviral Research*, v. 80, p. 380-4, 2008. Doi: 10.1016/j.antiviral.2008.08.001

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.

LEMBERGER, K. Y.; GONDIM, L. F. P.; PESSIER, A. P.; McALLISTER, M. M.; KINSEL, M. J. *Neospora caninum* infection in a free-ranging raccoon (*Procyon lotor*) with concurrent canine distemper virus infection. *The Journal of Parasitology*, v. 91, n. 4, p. 960-961, 2005. Doi: 10.1645/GE-407R.1

LIN, C. C.; YEH, L. T.; LAU, J. Y. N. Specific, sensitive and accurate liquid chromatographic-tandem mass spectrometric method for the measurement of ribavirin in rat and monkey plasma. *Journal of Chromatography B*, v. 779, p. 241-8, 2002.

LIN, C.; YEH, L.; LUU, T.; LOURENCO, D.; LAU, J. Y. N. Pharmacokinetics and metabolism of [14C] 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.

LONGUI, C. A. Glucocorticoid therapy: minimizing side effects. *Jornal de Pediatria*, v. 83, supl. 5, p. S163-171, 2007. Doi: 10.2223/JPED.1713

LOPES, R. M.; FRANCO, A.; TASKER, J. G. Glucocorticoids shift arachidonic acid metabolism toward endocannabinoid synthesis: a non-genomic anti-inflammatory switch. *European Journal of Pharmacology*, 2008. Doi: 10.1016/j.ejphar.2007.12.033.

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

MANGIA, S. H.; PERROTTI, I. B. M.; MARTINHO, A. P. V.; PAES, A. C. Tratamento de cão com encefalite aguda pela cinomose. 5º NEUROVET – Simpósio de Neurologia Veterinária, 10, 2011, Pet Eventos. *Anais...* Florianópolis: Pet Eventos, 2011.

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.

MATSUMOTO, S.; SHINGU, C.; KOGA, H.; HAGIWARA, S.; IWASAKA, H.; NOGUCHI, T.; YOKOI, I. An electron spin resonance study for real-time detection of ascorbyl free radicals after addition of dimethyl sulfoxide in murine hippocampus or plasma during kainic acid-induced seizures. *Neurochem. Res.*, v. 35, p. 1010-1016, 2010. Doi: 10.1007/s11064-010-0148-9

McCARTHY, A. J.; SHAW, M. A.; GOODMAN, S. J. Pathogen evolution and disease emergence in carnivores. *Proceedings of the Royal Society of London, Series B* 274, p. 3165-3174, 2007.

MEYER, D. J.; COLES, E. H.; RICH, L. J. *Medicina de Laboratório Veterinária: Interpretação e Diagnóstico*. Eds. São Paulo: Roca, 1995. 308 p.

- 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, 2002.
- 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.
- 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, 2006.
- MÜLLER, C. F.; FATZER, R. S.; BECK, K.; VANDEVELDE, M.; ZURBRUGGEN, A. Studies on canine distemper virus persistence in the central nervous system. *Acta Neuropathologica*, v. 89, p. 438-445, 1995.
- 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.
- MUTINELLI, F.; VANDEVELDE, M.; GRIOT, C.; RICHARD, A. Astrocytic infection in canine distemper virus-induced demyelination. *Acta Neuropathologica*, v. 77, p. 333-335, 1998.
- 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.
- NING, Q.; BROWN, D.; PARODO, J.; CATTRAL, M.; GOREZYNSKI, R.; COLE, E.; FUNG, L.; DING, J. W.; LIU, M. F.; ROTSTEIN, O.; PHILIPS, M. J.; LEVY, G. Ribavirin inhibits viral-induced macrophage production of TNF, IL-1, the procoagulant fgl1 prothrombinase and preserves Th1 cytokine production but inhibits Th2 cytokine response. *The Journal of Immunology*, v. 160, p. 3487-93, 1998.
- OGLE, J. W.; TOLTZIS, P.; PARKER, D.; ALVAREZ, N.; McINTOSH, K.; LEVIN, M. J.; LAUER, B. A. Oral ribavirin therapy for subacute sclerosing panencephalitis. *The Journal of Infectious Disease*, v. 159, n. 4, p. 748-50, 1989.
- OKA, T.; TAKAGI, H.; TOHYA, Y.; MURAKAMI, K.; TAKEDA, N.; WAKITA, T.; KATAYAMA, K. Bioluminescence technologies to detect calicivirus protease

activity in cell-free system and in infected cells. *Antiviral Research*, v. 90, p. 9-16, 2011. Doi: 10.1016/j.antiviral.2011.02.002

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.

PARDO, M. C.; TANNER, P.; BAUMAN, J.; SILVER, K.; FISCHER, L. Immunization of puppies in the presence of maternally derived antibodies against canine distemper virus. *Journal of Comparative Pathology*, v. 137, suppl. 1, p. S72-S75, 2007. Doi: 10.1016/j.jcpa.2007.04.015

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

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

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, 1999.

QIU, W.; ZHENG, Y.; ZHANG, S.; FAN, Q.; LIU, H.; ZHANG, F.; WANG, W.; LIAO, G.; HU, R. Canine distemper outbreak in Rhesus Monkeys, China. *Emerging Infectious Disease*, v. 17, n. 8, p. 1541-1543, 2011. Doi: 10.3201/eid1708.101153. www.cdc.gov/eid.

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.

REBEC, G. V.; PIERCE, R. C. A vitamin as neuromodulator: ascorbate release into the extracellular fluid of the brain regulates dopaminergic and glutamatergic transmission. *Prog. Neurobiol.*, v. 43, p. 537-565, 1994.

RICHARDS, T. R.; WHELAN, N. C.; PINARD, C. L.; ALCALA, F. C.; WOLFE, K. C. Optic neuritis caused by canine distemper virus in Jack Russell terrier. *Can. Vet. J.*, v. 52, p. 398-402, 2011.

RIGOPOULOU, E. I.; ABBOTT, W.G.H.; WILLIAMS, R.; NAOUMOV, N. V. Direct evidence for immunomodulatory properties of ribavirin on T-cell reactivity to hepatitis C virus. *Antiviral Research*, v. 75, p. 36-42, 2007. Doi: 10.1016/j.antiviral.2006.11.008

RIKULA, U.; NUOTIO, L.; SIHVONEN, L. Vaccine coverage, herd immunity and occurrence of canine distemper from 1990-1996 in Finland. *Vaccine*, v. 25, p. 7994-7998, 2007.

ROSENBLUM, W. I.; WEI, E. P.; KONTOS, H. A. Dimethylsulfoxide and ethanol, commonly used diluents, prevent dilation of pial arterioles by openers of K_{ATP} ion channels. *Eur. J. Pharmacol.*, v. 430, n. 1, p. 101-106, 2001.

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, 2006.

SANTOS, N. C.; FIGUEIRA-COELHO, J.; MARTINS-SILVA, J.; SALDANHA, C. Multidisciplinary utilization of dimethyl sulfoxide: pharmacological, cellular, and

molecular aspects. *Biochem. Pharmacol.*, v. 65, n. 7, p. 1035-1041, 2003. Doi: 10.1016/S0006-2952.

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.

SANTOS, V. G. *Aspectos clínicos e laboratoriais da cinomose, ehrlichiose e borreliose em cães (Canis familiaris, Linnaeus, 1758) naturalmente infectados*. 2008. Dissertação (Mestrado). Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Instituto de Veterinária, Curso de Pós-Graduação em Medicina Veterinária, Seropédica, RJ.

SATO, 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*, v. 80, n. 1, p. 116-119, 2006.

SCAGLIARINI, A.; VACCARI, F.; GALLINA, L.; DAL POZZO, F.; PROSPERI, S. In vitro evaluation of antiviral activity of ribavirina against canine distemper virus. *Veterinary Research Communications*, v. 31, supplement 1, p. 269-72, 2006.

SCHATZBERG, S. J.; LI, Q.; PORTER, B. F.; BARBER, R. M.; CLAIBORNE, M. K.; LEVINE, J. M.; LEVINE, G. J.; ISRAEL, S. K.; YOUNG, B. D.; KIUPEL, M.; GREENE, C.; RUONE, S.; ANDERSON, L.; TONG, S. Broadly reactive pan-paramyxovirus reverse transcription polymerase chain reaction and sequence analysis for the detection of canine distemper virus in a case of canine meningoencephalitis of unknown etiology. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, v. 21, p. 844-849, 2009.

SHAH, N.; SUNDERLAND, A.; GRDZELISHVILI, V. Z. Cell type mediated resistance of Vesicular Stomatitis Virus and Sendai virus to ribavirina. *PLoS ONE*, v. 5, n. 6, p. e11265, 2010.

SHELL, L. G. Canine Distemper. *Compendium on Continuing Education for the Practicing Veterinarian*, v. 12, p. 173-179, 1990.

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, 2004.

SHIN, Y.; MORI, T.; OKITA, M.; GEMMA, T.; KAI, C.; MIKAMI, T. Detection of canine distemper virus nucleocapsid protein gene in canine peripheral blood mononuclear cells by RT-PCR. *Journal of Veterinary Medical Science*, v. 57, p. 439-445, 1995.

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, 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, 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, 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.

SONNE, L. *Achados patológicos e imunoistoquímicos de cães infectados pelo vírus da cinomose canina*. 2008. Dissertação (Mestrado). Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Faculdade de Veterinária, Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, Porto Alegre, RS.

SORRELLS, S. F.; SAPOLSKY, R. M. An inflammatory review of glucocorticoid actions in the CNS. *Brain Behav. Immun.*, v. 21, n. 3, p. 259-272, 2007.

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.

STOJKOV, D.; LAVRNJA, I.; PEKOVIC, S.; DACIC, S.; BJELOBABA, I.; MOSTARICA-STOJKOVIC, M.; STOSIC-GRUJICIC, S.; JOVANOVIC, S.; NEDELJKOVIC, N.; RAKIC, L.; STOJILJKOVIC, M. Therapeutic effects of combined treatment with ribavirina and tiazofurin on experimental autoimmune encephalomyelitis development: clinical and histopathological evaluation. *Journal of the Neurological Sciences*, v. 267, p. 76-85, 2008. Doi: 10.1016/j.ins.2007.10.010

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.

SUÁREZ, C. S.; OTERO, R. S.; SELLERO, I. S.; ÁLVAREZ, E. M. Antioxidant properties of dimethyl sulfoxide and its viability as a solvent in the evaluation of neuroprotective antioxidants. *Journal of Pharmacological and Toxicological Methods*, v. 63, p. 209-215, 2011. Doi: 10.1016/j.vascn.2010.10.004.

SUMMERS, B. A.; APPEL, M. J. Aspects of canine distemper virus and measles virus encephalomyelitis. *Neuropathology and Applied Neurobiology*, v. 20, p. 525-534, 1994.

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

SUN, X.; LI, P.; LUO, W.; CHEN, S.; FENG, N.; WANG, J.; LUO, Q. Investigating the effects of dimethylsulfoxide on hemodynamics during cortical spreading depression by combining laser speckle imaging with optical intrinsic

- signal imaging. *Lasers in Surgery and Medicine*, v. 42, p. 649-655, 2010. Doi: 10.1002/lsm.20975
- SUN, Z.; LI, A.; YE, H.; SHIN, Y.; HU, Z.; ZENG, L. Natural infection with canine distemper virus in hand-feeding rhesus monkeys in China. *Veterinary Microbiology*, v. 20, p. 193-205, 1989. Doi: 10.1016/0378-1135(89)90043-6
- SUNG, H.; CHANG, M.; SAAB, S. Management of hepatitis C antiviral therapy adverse effects. *Curr. Hepatitis Rep.*, v. 10, p. 33-40, 2011. Doi: 10.1007/s11901-010-0078-7
- 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.
- TALAYEV, V. Y.; ZAICHENKO, I. Y.; BABAYKINA, O. N.; LOMUNOVA, M. A.; TALAYEVA, E. B.; NIKONOVA, M. F. *Ex vivo* stimulation of cord blood mononuclear cells by dexamethasone and interleukin-7 results in the maturation of interferon- γ -secreting effector memory T cells. *Clinical and Experimental Immunology*, v. 141, p. 440-448, 2005. Doi: 10.1111/j.1365-2249.2005.02863.
- 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.
- THOMAS, E.; FELD, J. J.; LI, Q.; HU, Z.; FRIED, M. W.; LIANG, T. J. Ribavirin potentiates interferon action by augmenting interferon-stimulated gene induction in Hepatitis C Virus cell culture models. *Hepatology*, v. 53, p. 32-41, 2011. Doi: 10.1002/hep.23985
- THOMAS, W. B.; SORJENEN, D. C.; STEISS, J. E. A retrospective evaluation of 38 cases of canine distemper encephalomyelitis. *Journal of American Animal Hospital Association*, v. 29, 129-133, 1993.
- 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.
- TSVETLYNSKA, N. A.; HILL, R. H.; GRILLNER, S. Role of AMPA receptor desensitization and the side effects of DMSO vehicle on reticulospinal EPSPs and locomotor activity. *Journal of Neurophysiology*, v. 94, n. 6, p. 3951-3960, 2005.
- TUDURY, A. E.; ARIAS, M. V. B.; BRACARENSE, A. P. F. L.; MEGID, J.; DIAS JR., R. F. Observações Clínicas e Laboratoriais em Cães com Cinomose Nervosa. *Ciência Rural*, v. 27, p. 229-235, 1997.
- 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.
- VANDEVELDE, M.; ZURBRIGGEN, A.; HIGGINS, R. J.; PALMER, D. Spread and distribution of viral antigen in nervous canine distemper. *Acta Neuropathologica*, v. 67, p. 211-218, 1985.
- VAN DEN BRANDT, J.; LÜHDER, F.; McPHERSON, K. G.; de GRAAF, K. L.; TISCHNER, D.; WIEHR, S.; HERRMANN, T.; WEISSERT, R.; GOLD, R.; REICHARDT, H. M. Enhanced glucocorticoid receptor signaling in T cells impacts thymocyte apoptosis and adaptive immune responses. *The American Journal of Pathology*, v. 170, n. 3, p. 1041-1053, 2007. Doi: 10.2353/ajpath.2007.060804.
- 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.
- VIGNUZZI, M.; STONE, J. K.; ANDINO, R. Ribavirin and lethal mutagenesis of poliovirus: molecular mechanisms, resistance and biological implications. *Virus Research*, v. 107, p. 173-81, 2005. Doi: 10.1016/j.virusres.2004.11.007
- 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, 2004.
- WEI, E. P.; KONTOS, H. A.; BECKMAN, J. S.; FARACI, F. M. Antioxidants inhibit ATP-sensitive potassium channels in cerebral arterioles. *Stroke*, v. 29, n. 4, p. 817-823, 1998.
- 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.
- WRIGHT, P. J.; CRAMERI, G.; EATON, B. T. RNA synthesis during infection by Hendra virus: an examination by quantitative real-time PCR of RNA accumulation, the effect of ribavirin and the attenuation of transcription. *Archives of Virology*, v. 150, p. 521-32, 2005. Doi: 10.1007/s00705-004-0417-5
- 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, 2005.
- 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.
- WYDE, P. R.; MOORE-POVEDA, D. K.; De CLERCQ, E.; NEYTS, J.; MATSUDA, A.; MINAKAWA, N.; GUZMAN, E.; GILBERT, B. E. Use of cotton rats to evaluate the efficacy of antivirals in treatment of measles virus infections. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, v. 44, n. 5, p. 1146-52, 2000.
- 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.
- ZHANG, G.; DENG, A.; XU, Q.; LIANG, Y.; CHEN, N.; WEN, T. Complete genome sequence of *Bacillus amyloliquefaciens* TA208, a strain for industrial

production of guanosine and ribavirin. *J. Bacteriol.*, article in press, 2011. Doi: 10.1128/JB.00440-11

Trabalho a ser enviado para Pesquisa Veterinária Brasileira:

Efeitos colaterais do uso da ribavirina, prednisona e DMSO em cães naturalmente infectados pelo vírus da cinomose.

The side effects of ribavirin, prednisone and DMSO in dogs naturally infected by canine distemper virus

MANGIA, S. H.¹; MORAES, L. F.²; TAKAHIRA R. K.³; RODRIGO R. G.⁴; SALCEDO, E. S.⁵; MEGID, J.⁶; SILVA, A. V.⁷; PAES, A. C.⁸

ABSTRACT [The side effects of ribavirin, prednisone and DMSO in dogs naturally infected by canine distemper virus.] The present study aims at the identification of undesirable effects of ribavirin, prednisone and DMSO in dogs naturally infected by canine distemper virus. The research analyzed 60 dogs with clinical neurological signs and 10 days of evolution. The animals were hospitalized for the appropriate support treatment; were daily observed, and complete blood cells count, biochemical analysis, and urine exam type I were conducted. Groups 1 and 2 were treated with ribavirin and its combination with DMSO; Groups 3 and 4 treated with prednisone and DMSO, Group 5 treated with ribavirin and prednisone, while Group 6 with ribavirin, prednisone and DMSO. The animals were anesthetized for the cerebrospinal fluid, bone marrow and blood samples collection before the treatment for the diagnose based on RT-PCR. The negative samples were analyzed using the hn-PCR technique. All

¹ Autor para correspondência. Departamento de Higiene Veterinária e Saúde Pública, FMVZ, UNESP/Botucatu. End: Rubião Júnior, s/n – Botucatu, SP. CEP: 18.618-000, Caixa Postal: 560. E-mail: simangia@hotmail.com

² Departamento de Clínica Veterinária, FMVZ, UNESP/Botucatu. E-mail: liviafm@gmail.com

³ Departamento de Clínica Veterinária, FMVZ, UNESP/Botucatu. E-mail: takahira@fmvz.unesp.br

⁴ Departamento de Higiene Veterinária e Saúde Pública, FMVZ, UNESP/Botucatu. E-mail: rgmotta@fmvz.unesp.br

⁵ Departamento de Clínica Veterinária, FMVZ, UNESP/Botucatu. E-mail: soteloedu@gmail.com

⁶ Departamento de Higiene Veterinária e Saúde Pública, FMVZ, UNESP/Botucatu. E-mail: jane@fmvz.unesp.br

⁷ Grupo de pesquisa em parasitologia, Laboratório de Análises Clínicas e Parasitologia, Departamento de Ciências Biológicas, Universidade Estadual de Feira de Santana, BA. E-mail: aristeusilva@gmail.com

⁸ Departamento de Higiene Veterinária e Saúde Pública, FMVZ, UNESP/Botucatu. E-mail: paesacmi@fmvz.unesp.br

the animals presented positive results in at least one of the 2 tests. The adverse result of ribavirin and its association with prednisone was characterized by haemolytic anemia, confirmed by the evaluation of bilirubin occurrence only in the urine of dogs treated with ribavirin. Prednisone's immunosuppressive dose led to the increase of protein dosage and leukocytes blood count, while CSF's cellularity decreased. The anti-inflammatory dose led to the blood protein concentration's decrease.

INEDX TERMS: Canine Distemper, Ribavirin, DMSO, Prednisone, undesirable effects.

RESUMO [Efeitos colaterais do uso da ribavirina, prednisona e DMSO em cães naturalmente infectados pelo vírus da cinomose.] O estudo tem o objetivo de identificar efeitos indesejáveis da ribavirina, prednisona e DMSO em cães naturalmente infectados com o vírus da cinomose. Foram utilizados 60 cães apresentando quadro neurológico da cinomose com evolução de 10 dias. Os animais foram internados e receberam tratamento de suporte; foram avaliados diariamente e realizados hemograma, dosagem bioquímica e exame de urina tipo I. Os grupos 1 e 2 foram tratados com ribavirina e sua associação com DMSO; os grupos 3 e 4 com DMSO e prednisona e o grupos 5 com ribavirina e prednisona e o grupo 6 com ribavirina, prednisona e DMSO. Os animais foram anestesiados para a colheita de líquido, medula óssea e sangue, antes do tratamento para diagnóstico através da RT-PCR. As amostras negativas foram analisadas pela técnica de hn-PCR. Todos os animais apresentaram resultado positivo em pelo menos uma das duas reações. O efeito adverso da ribavirina e a sua associação com a prednisona foi a anemia hemolítica, que foi confirmada pela observação de bilirrubina na urina apenas dos cães tratados com ribavirina. A prednisona na dose imunossupressora levou ao aumento da dosagem de proteína e diminuição da celularidade no líquido, aumento de leucócitos no sangue e a dose antiinflamatória levou a diminuição da concentração de proteína no líquido.

TERMOS DE INDEXAÇÃO: Cinomose, ribavirina, prednisona, DMSO, efeitos indesejáveis.

INTRODUÇÃO

A cinomose é uma doença viral muito antiga que afeta cães e outros carnívoros em todo o mundo. Entretanto, mesmo com uso de estratégias vacinais, ela ainda é uma doença importante na população canina, apresentando a maior taxa de mortalidade depois da raiva (Summers & Appel 1994).

A cinomose é uma enfermidade infectocontagiosa, causada por um RNA vírus da ordem *Mononegavirales*, família *Paramyxovirus*, gênero *Morbillivirus*. Possui três formas de apresentação clínica: aguda, subaguda e crônica, com manifestações gastroentéricas, respiratórias e neurológicas. São descritas

basicamente 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).

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, Vandeveldt & 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 com ocorrência ocasional de surtos (Böhm et al. 2004).

A ribavirina é uma droga antiviral, análoga à guanosina, inibidora da replicação *in vitro* de alguns RNA e DNA-vírus, incluindo *Herpesvirus*, *Poxvirus*, 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 experimento de Elia et al. (2008) a ribavirina mostrou-se altamente efetiva na prevenção da replicação do vírus da cinomose “in vitro” em baixas concentrações, de aproximadamente 6,5-12,5 µg/mL, concordando com os valores encontrados para a inibição do vírus do sarampo.

Segundo Elia et al. (2008) a ribavirina causa mutações no vírus da cinomose e estas levam a um erro catastrófico no RNA do genoma viral. Pode ser especulado que a ribavirina interfira com a RNA polimerase pela competição com nucleosídeos naturais e produz erro na terminação da cadeia do vírus.

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, a seguir em humanos, roedores e cães (Lin et al. 2003).

A anemia ocorre em 30% dos casos tratados e resulta em 9% a 22% de pacientes que necessitam a redução da dose para continuar o tratamento. A ocorrência de anemia está relacionada com a dose de ribavirina, função renal e a idade do paciente (Sung et al. 2011).

Mangia (2008) pela primeira vez testou o uso da ribavirina em cães naturalmente infectados com o vírus da cinomose. Todos os animais apresentavam a fase neurológica de doença e foram tratados com 30 mg/Kg de ribavirina por via oral, a cada 24 horas, durante 15 dias. Nenhum animal apresentou sinais de efeitos colaterais como descrito na terapêutica humana com a mesma droga.

Mangia et al. (2011) demonstraram a eficácia do tratamento com ribavirina na dose de 30 mg/Kg, por via oral, a cada 24 horas, durante 15 dias em um caso com encefalite aguda pelo vírus da cinomose, quando associada ao DMSO na dose de 1 g/Kg, por via intravenosa, a cada 24 horas.

Os glicocorticóides são os reguladores mais estudados do sistema neuroendócrino e são reconhecidos por inibir a proliferação de linfócitos T e a produção de uma variedade de citosinas, incluindo interferon- γ (IFN). A interleucina-7 (IL-7) age mantendo a população policlonal de linfócitos T imaturos e as células T de memória, e, portanto, controla o tamanho do estoque de células T (Talayev et al. 2005).

Na pesquisa de Van den Brandt et al. (2007), os glicocorticóides mostraram induzir células CD8 α a formarem linfócitos T CD4+ e causaram apoptose de timócitos, mas mantendo ainda as células T maduras do sangue periférico mimetizando uma proliferação hemostática.

No trabalho de revisão de Sorrells & Sapolsky (2007), os autores concluíram que em ambos os sistemas, nervoso e imune periférico, a exposição prévia ao estresse ou ao glicocorticóide pode resultar na produção de uma resposta imune a uma subsequente inflamação. No sistema nervoso, a administração crônica de glicocorticóides ou o estresse não são uniformemente antinflamatórios e em algumas circunstâncias agem aumentando o processo inflamatório; assim foi observado pelo aumento da migração de células inflamatórias, pelo nível de mediadores inflamatórios e pela ativação do fator de transcrição. No sistema nervoso lesado, níveis de estresse do glicocorticóide podem induzir uma resposta pró-inflamatória e em níveis basais ou de baixo estresse possuem um efeito tradicional antinflamatório; esta resposta é oposta à encontrada no sistema imune periférico. Outra conclusão encontrada na pesquisa foi que os efeitos pró-inflamatórios no cérebro são diferentes conforme a região, o uso de sintéticos versus glicocorticóides endógenos e o tempo de exposição ao glicocorticóide no que diz respeito a resposta inflamatória.

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 Dimetil-Sulfóxido (DMSO) pode torná-la permeável a substâncias lipofílicas, indicando que este pode servir como veículo de transporte de drogas nucleotídeas por membranas celulares.

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).

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. 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).

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 indicada é de 1 g/Kg, em solução de 10-45%, administrado lentamente, em gatos, cães e cavalos (Brayton 1986).

O objetivo do estudo é identificar efeitos colaterais causados pelo uso de ribavirina, prednisona e DMSO em cães naturalmente infectados com o vírus da cinomose e apresentando encefalite.

MATERIAL E MÉTODOS

Foram utilizados 60 cães com sinais clínicos neurológicos de cinomose, diagnosticados a partir do histórico de vacinação, desenvolvimento clínico da doença e exame físico. A confirmação foi realizada pela técnica da reação em cadeia pela polimerase pela transcriptase reversa (RT-PCR).

Para a inclusão dos animais no estudo, os sinais neurológicos deveriam ter apresentação clínica multifocal e caráter progressivo de no máximo 10 dias de evolução. Os animais incluídos apresentaram sinais de acometimento dos sistemas respiratório e/ou gastroentérico juntos ou anteriormente à apresentação neurológica, ou até mesmo descamação de pele ou descarga ocular mucopurulenta.

Os animais foram divididos em seis grupos de 10 animais de forma aleatória na medida em que foram atendidos no Hospital Veterinário da FMVZ, UNESP – Campus Botucatu, no Serviço de Enfermidades Infecciosas dos Animais.

Grupos 1 e 2: compostos por animais já tratados com a ribavirina e sua associação com o DMSO, respectivamente nas doses de 30 mg/Kg e 20mg/Kg, a cada 24 horas, durante 15 dias. Dessa forma, foram utilizados os materiais colhidos (sangue, medula óssea e líquido) para avaliação do tratamento pela RT-PCR. Estas amostras foram devidamente armazenadas em freezer a – 80°C desde 2007.

Grupo 3: foram incluídos animais que serviram de controle para o tratamento antiviral específico e para a avaliação da ação anti-inflamatória do DMSO. Estes animais receberam 50 mg/Kg de DMSO, diluído na concentração de 10 a 20%, por via intravenosa, a cada 24 horas, durante 15 dias.

Grupo 4: foram incluídos animais que serviram de controle para o tratamento antiviral específico e para a avaliação da ação antiinflamatória da prednisona. Estes animais receberam 4 mg/Kg de prednisona, por via oral, a cada 24 horas, durante 7 dias, após receberam a dose de 2 mg/Kg de prednisona, também por via oral a cada 24 horas até completar os 15 dias de tratamento. Após este período os animais foram encaminhados para o término do tratamento no próprio domicílio com redução gradativa da dose.

Grupo 5: os animais incluídos neste grupo receberam a ribavirina na dose de 30 mg/Kg, por via oral, a cada 24 horas, durante 15 dias. Nestes foi administrado em associação a prednisona na dose de 4 mg/Kg, por via oral, a cada 24 horas, durante sete dias, com posterior redução da dose para 2 mg/Kg, por via oral, a cada 24 horas, até completar o período de 15 dias. Após este período os animais foram encaminhados para o término do tratamento no próprio domicílio com redução gradativa da dose da prednisona por mais duas semanas. Este grupo foi considerado o grupo desafio da droga antiviral, já que a dose do glicocorticoide foi imunossupressora.

Grupo 6: os animais foram tratados com a ribavirina, prednisona e DMSO. Neste grupo os cães receberam 30 mg/Kg de ribavirina, por via oral, a cada 24 horas, durante 15 dias; o DMSO foi administrado na dose de 50 mg/Kg, diluído na concentração de 10 a 20%, por via intravenosa, a cada 24 horas; e a prednisona foi administrada na sua dose antiinflamatória de 0,5 mg/Kg, por via oral, a cada 12 horas, durante sete dias, sendo reduzida para 0,25 mg/Kg, a cada 24 horas até completar 15 dias de tratamento. Após este período o animal terminou o tratamento em domicílio com manutenção da dose e aumento do intervalo para 48 horas por mais sete dias.

Todos os animais receberam tratamento sintomático e de suporte básico, que inclui suplementação vitamínica, fluidoterapia nos casos de desidratação e antibioticoterapia para combater infecções secundárias. Todos os animais foram avaliados neurologicamente e clinicamente todos os dias e foram realizados exames complementares de forma rotineira.

A Ribavirina⁹ utilizada na pesquisa possui apresentação de cápsulas de 250 mg e para facilitar o cálculo da dose a droga foi diluída. A diluição foi realizada de forma asséptica onde foram utilizadas oito cápsulas de ribavirina para 50 mL de água destilada ou solução fisiológica 0,9% estéril, formando uma solução de 40 mg/mL para administração oral. Depois de diluída, a ribavirina foi armazenada em frascos âmbar e mantida em refrigeração constante em geladeira.

A prednisona foi adquirida em farmácia de manipulação (Cruz Vermelha, Botucatu, SP), na forma de solução oral, na concentração de 40 mg/mL em frascos de 50 mL.

O DMSO¹⁰ foi utilizado a sua forma comercial Dimetil Sulfóxido P. A., na concentração de 99,9%, sendo que para a administração intravenosa, a droga foi diluída em solução fisiológica 0,9% estéril na proporção de 10 a 20% para administração intravenosa.

⁹ Ribavirina: Ribavirin® Laboratório Blau

¹⁰ DMSO: Dimetil Sulfóxido P.A.® Laboratório Vetec Química Fina

Todos os animais do experimento foram anestesiados conforme o protocolo sugerido pelo Departamento de Anestesiologia Veterinária da FMVZ – UNESP – Botucatu, SP para a colheita de líquido.

Foram realizadas duas colheitas de líquido em cada animal, no momento em que o mesmo chegou ao ambulatório, antes de qualquer tratamento e, após um período de 15 dias, referente ao tempo do tratamento experimental. A técnica de colheita de líquido seguiu a descrição feita por Dewey (2006). O líquido foi colhido em três tubos por gotejamento e a quantidade de líquido colhida variou de 0,5 a 3 ml, dependendo do tamanho do animal.

As amostras de sangue foram colhidas com seringas e agulhas esterilizadas e descartáveis, no volume de 10 mL, sendo então acondicionados em tubos com EDTA A 7,5% e sem anticoagulantes, para retirada de soro. O local da punção foi a veia jugular, após o procedimento as amostras foram levadas diretamente ao Laboratório Clínico Veterinário para realização de hemograma e análises bioquímicas de função hepática e renal. O sistema hepatobiliar foi avaliado a partir da atividade sérica da alanina-aminotransferase (ALT), fosfatase alcalina (FA) e gama-glutamilttransferase (GGT) e da concentração de albumina. O sistema renal foi avaliado pela mensuração dos resíduos nitrogenados, uréia e creatinina no soro, e pelo exame de urina tipo I.

Nos animais dos grupos 3 e 4 foi colhido apenas sangue para hemogramas de acompanhamento nos dias 1°, 7° e 15°, já que foram utilizadas drogas conhecidas. E não foram realizados exames bioquímicos pelos mesmos motivos. Além disso, este grupo foi formado com o objetivo de terem seus resultados comparados com os resultados da RT-PCR dos grupos experimentais.

Já nos animais dos grupos 1, 2, 5 e 6, que receberam o antiviral, as amostras de sangue foram colhidas nos dias 1°, 4°, 7°, 10°, 12° e 15°.

As dosagens bioquímicas foram realizadas nos grupos 1, 2, 5 e 6 nos dias 1°, 5°, 10° e 15° para identificação de possíveis efeitos colaterais das drogas experimentais.

As amostras de urina foram colhidas com auxílio de seringas descartáveis e agulhas descartáveis esterilizadas através da punção da vesícula urinária e foram levadas diretamente ao Laboratório Clínico Veterinário da FMVZ, UNESP – Botucatu para a análise. No caso de animais muito pequenos ou que não mantinham a vesícula repleta foi utilizado a sondagem uretral para obtenção da urina. Essa técnica não foi escolhida por ser muito agressiva ao sistema urinário do animal podendo levar a casos de cistite ascendente.

O exame de urina do tipo I foi realizado nos animais dos grupos 1, 2, 5 e 6 nos dias 1°, 5°, 10° e 15° de tratamento com o antiviral com objetivo de identificar possíveis efeitos colaterais das drogas experimentais utilizadas.

Técnicas de biologia Molecular

A extração do RNA foi realizada a partir das amostras de sangue, medula óssea e líquido, utilizando-se o Kit para extração de RNA Invisorb® Spin Virus RNA Mini Kit (Invitack®).

Para realização da extração foram diluído 100 µL da amostra em 100 µL de água livre de nucleases. E para cada cinco amostras foram adicionados um

controle negativo que era composto apenas por 200 µL de água livre de nucleases. As reações foram realizadas em baterias de 10 amostras por vez. O controle positivo foi utilizado amostras de urina sabidamente positivas e para realização da extração utilizou-se a mesma diluição em água livre de nucleases.

O RNA foi imediatamente aliqotado em tubos menores com volume de 7 µL da amostra e acondicionados a -80°C.

Para conversão em cDNA as amostras (7 µL) foram retiradas do freezer -80°C e levadas diretamente ao termociclador para desnaturação do RNA, durante sete minutos em temperatura de 95°C.

Ao mesmo tempo foi preparado a mistura para formação de cDNA. A mistura era composta por 3 µL de água Mili-Q autoclavada; 1 µL de Randon Primer (250 ng/µL); 1 µL de dNTP (10 mM); 5 µL de Buffer 5x; 1 µL de DDT (0,1 M); 1 µL de inibidor de RNase (10 U/µL) e 1 µL tampão de M-MLV Reverse transcriptase. A mistura formou como volume final 13 µL.

Aliquotou-se 13 µL em cada microtubo previamente identificado com o RNA previamente aquecido, totalizando-se 20 µL. Levou-se ao termociclador no programa CINOCDNA (composto por ciclo de 25°C por 10 minutos; 37°C por 50 minutos e 70°C por 15 minutos, totalizando um período de 1 hora e 15 minutos).

Para a realização da reação de RT-PCR foi necessária a preparação de outra mistura com 17,35 µL de água Mili-Q autoclavada; 2,5 µL de Buffer 10x; 0,75 µL de Mg₂Cl₂ (50 mM); 0,5 µL de dNTP (10 mM); 1,25 µL do Primer CDV-NPS F1 (tabela 1); 1,25 µL do Primer CDV-NPS R1 (tabela 1); 0,15 µL de Taq DNA Platinum (5U/µL), com volume final de 23,75 µL da mistura.

Aliquotou-se 23,75 µL em cada microtubo previamente identificado, sempre mantido em gelo, na sala de aplicação foi pipetado 1,25 µL do cDNA em cada tubo, totalizando 25 µL de volume total. Após os microtubos foram levados ao termociclador no programa CINOPCR (composto por ciclo de 95°C por 10 minutos, 39 ciclos de 95°C por 30 segundos, 56°C por 30 segundos, 72°C por 30 segundos, depois 72°C por 10 minutos e 4º *for ever*) e, após, foi armazenado a -20°C.

A leitura do gel foi realizada em gel de agarose a 2% em transluminador UV, corados em brometo de etídeo, onde se esperou um produto amplificado com 440 pb.

A reação do hn-PCR foi realizada de forma semelhante a reação da PCR, utilizou-se para estas reações as amostras que foram negativas na PCR, onde aliqotou-se 23,75 µL da mistura e 1,25 µL do produto amplificado da PCR.

A mistura foi composta pelos mesmos reagentes, porém na hn-PCR utilizou-se Primer CDV-NPS R2 (tabela 1) no lugar do Primer CDV-NPS R1. E o produto esperado desta reação apresentou 331 pb na leitura do gel, assim como na reação anterior.

Os iniciadores (primers) utilizados nas duas reações amplificaram regiões específicas do gene da nucleoproteína [GenBak: X02000.1].

Análise estatística:

A comparação de frequências de ocorrências foi realizada pelos teste de Qui-quadrado ou G de Williams, de acordo com os resultados registrados em tabelas de contingência.

Para as variáveis ordinais as comparações entre os grupos foi realizada pelo teste de Kruskal-Wallis, seguido de comparação de medianas pelo teste de Dunn.

As variáveis discretas e contínuas foram submetidas à verificação do tipo de distribuição pelo teste de Shapiro-Wilkins; quando de distribuição Normal, os grupos foram comparados pela Análise de Variância Um Fator seguido de teste de Tukey; quando de distribuição Livre, os grupos foram comparados pelo teste de Kruskal-Wallis, seguido de comparação de medianas pelo teste de Dunn.

Em todas as análises, valores de P menores que 0,05 foram considerados significantes.

RESULTADOS

Todos os animais incluídos na pesquisa apresentaram positividade na RT-PCR ou na Hemi-nested PCR (hn-PCR) em pelo menos uma das três amostras colhidas, sangue periférico, medula óssea ou líquido.

O tratamento experimental foi avaliado segundo a melhora clínica e a sobrevida dos animais nos diferentes grupos. Os dados foram tratados da seguinte forma: os animais que vieram ao óbito, que apresentaram melhora clínica e que sobreviveram aos 15 dias de tratamento. No entanto, após o período de 15 dias de tratamento, alguns animais morreram, outros apresentaram piora ou ficaram com sequelas graves e foram eutanasiados, ou mesmo apresentaram melhora e sobreviveram, assim, estes animais foram agrupados todos juntos pela dificuldade de acompanhar a resposta, já que uma parte deles terminou o tratamento em domicílio (Figura 1).

Como pior resultado frente à sobrevida dos animais, o grupo 4 teve o pior desempenho com 70% dos animais vindo ao óbito e apenas um animal apresentou melhora clínica. Em compensação, os grupos tratados com ribavirina (1, 2, 5 e 6) tiveram os melhores resultados de quando observamos as taxas de melhora clínica.

Dos 60 animais incluídos no experimento, apenas 23 (38,3%) apresentaram melhora clínica, sendo um resultado semelhante ao número de óbitos (36,7%). Quando somamos os dados dos animais que receberam o

antiviral, verificamos que 12 (30%) animais vieram ao óbito e 19 (47,5%) apresentaram melhora clínica evidente no período de internação.

Os dados de hemograma foram comparados em todos os momentos nos grupos tratados com ribavirina (1, 2, 5 e 6), e nos dias 1, 7 e 15 de tratamento em todos os grupos, inclusive os dois grupos controle.

A figura 2 demonstra que todos os grupos apresentaram queda na mediana da contagem de hemácias, evidenciando a presença de anemia após o período de tratamento. Os animais dos grupos 3, 5 e 6 foram os que apresentaram valores inferiores à 3.500.000 células/ μ L.

Diferente dos outros grupos, dois animais do G5 e um animal do G6 apresentaram valores da contagem de hemácias abaixo de 2.000.000 células/ μ L no 15º dia de tratamento, que podemos classificar como anemia grave. Apenas um animal do G6 precisou receber transfusão sanguínea durante o período de tratamento, sendo este dado desconsiderado na mediana da contagem de hemácias.

Após o tratamento experimental, o G2 foi o que melhor apresentou mediana da dosagem de hemoglobina, ao contrário do que aconteceu com os grupos 5 e 6. Nesta tabela é possível identificar que a ribavirina em associação com a prednisona foi capaz de causar uma queda nos níveis de hemoglobina nos cães destes grupos experimentais, diferente do que foi encontrado nos animais do grupo controle e nos animais que não receberam a associação das duas drogas.

Além disso, os grupos 2 e 6 que receberam DMSO em associação às drogas experimentais mantiveram a dosagem de hemoglobina mais alta do que nos grupos 1 e 5 que usam as mesmas drogas sem o DMSO.

Os dados da mediana da dosagem de hemoglobina em todos os momentos foram esquematizados na figura 3.

Ficou evidenciado que o tratamento com ribavirina, sem o DMSO, pode levar a anemia mais grave que a própria evolução da doença. O antiviral quando associado à prednisona pode levar a quadros de anemia grave, principalmente quando a prednisona for administrada na dose de 4 mg/Kg, a cada 24 horas, como aconteceu no G5.

Com relação ao número de plaquetas não foi encontrado resultado com significância estatística. Nos dados da contagem de leucócitos foi possível identificar que a mediana do G3 foi menor em relação aos outros grupos no último dia de tratamento, chegando a 3.663 leucócitos/ μ L. Sendo que os valores de referência para cães são de 6.000-17.000 leucócitos/ μ L.

Ainda neste parâmetro, o G1 também apresentou uma mediana abaixo dos valores de referência com 4.550 leucócitos/ μ L, no 15º dia de tratamento. Enquanto que todos os outros grupos apresentaram medianas dentro dos valores de normalidade para cães.

Através do gráfico evidenciou que as medianas dos grupos 4 e 5, que receberam doses imunossupressoras de prednisona, apresentaram uma

contagem de leucócitos mais alta em relação aos outros grupos, sendo esta uma resposta esperada pelo uso de glicocorticóides.

Os grupos 1, 2 e 3, que não receberam prednisona, demonstraram uma queda nesta contagem a partir do 12º dia de tratamento, demonstrando assim que esta alteração pode ser uma consequência natural da doença, já que os animais do G3 não receberam ribavirina. A mediana do G6 demonstrou a mesma característica, evidenciando que a dose de 0,5 mg/Kg, a cada 12 horas, não foi capaz de aumentar a quantidade de leucócitos circulantes tanto quanto a dose imunossupressora.

Não foram encontrados resultados significativos na dosagem bioquímica de função hepática e renal dos animais que receberam as drogas experimentais.

No exame de urina tipo I também não apresentaram resultados importantes com relação as funções hepática e renal. No décimo quinto dia de tratamento não foi encontrado resultado significativo estatisticamente, porém todos os grupos apresentaram valores altos do percentil 75, evidenciando que todos os animais que apresentavam valores mais altos tinham uma média que variou de 2,0 a 5,0 no escore, representando de uma a quatro cruzes para a presença de bilirrubina na urina, que pode significar um início de lesão hepática. Estes dados foram organizados na tabela 2.

Esses dados mostram uma semelhança que é o aumento de bilirrubina na urina pelo menos em alguns animais de todos os grupos. A única droga em comum a todos os grupos é a ribavirina. Estes podem ser indícios que a partir do décimo quinto dia a ribavirina possa causar hemólise.

Os dados da dosagem de proteínas no líquido devem ser analisados conforme o grupo de tratamento e o G3 foi o que apresentou menor valor de mediana com 25 mg/dL, podendo ser considerado dentro da normalidade, sendo que neste grupo houve grande variação dos valores de proteína no líquido, que foram de 11 mg/dL, considerado normal à 154, 1 mg/dL, considerado um processo de inflamação severa do SNC. Este grupo é considerado controle, pois estes animais apenas receberam o DMSO e como foi encontrado no primeiro momento grande variação de valores, também ocorreu neste grupo, demonstrando que não houve efeito do tratamento.

Os valores máximos encontrados nos diferentes grupos experimentais mostraram que em todos os grupos houve uma diminuição, porém no G3 e G5 houve um aumento, ou seja, mesmo os animais sendo tratados com anti-inflamatórios, DMSO ou prednisona respectivamente, foram encontrados valores mais altos.

Nos grupos 1, 2, 3 e 6 foi observado que as medianas diminuíram de um momento para outro, diferente do que aconteceu nos grupos 4 e 5. Este aspecto foi demonstrado na figura 4.

Após o período de tratamento, o G1 ainda apresentou o maior valor de mediana da contagem de células nucleadas, sendo que o G3 manteve o valor da mediana de antes e depois, enquanto que todos os outros grupos apresentaram redução destes valores.

O G3 foi tratado apenas com DMSO e serviu como grupo controle em relação ao processo inflamatório nos outros grupos, já que não apresentou queda desta contagem, diferente do que foi encontrado nos outros grupos.

O G4 apenas tratado com prednisona foi o que apresentou maior queda desses valores de mediana, porém o foi grupo com menor número de animais com melhora clínica. O G5 também teve esse tipo de apresentação dos seus valores da contagem de células e recebeu a mesma dose de prednisona, porém também recebeu a ribavirina, e neste grupo houve o segundo índice de melhora clínica dos seis grupos tratados.

Os valores das medianas da contagem de células nucleadas do líquido foram representados graficamente para melhor visualização destes dados (Figura 5).

O gráfico foi capaz de evidenciar a discrepância dos valores dessa contagem antes e após o tratamento, tanto no G1 que não recebeu anti-inflamatório, quanto nos grupos 2, 4, 5 e 6 que receberam o DMSO ou a prednisona. No entanto, foi possível verificar que nos animais do G3 não houve diminuição dos valores antes e após, demonstrando que o efeito anti-inflamatório do DMSO não está relacionado com a diminuição do número de células. Então, o G2 teve a sua queda nos valores provavelmente por uma ação direta da ribavirina e não por ação anti-inflamatória do DMSO.

O G6 também apresentou uma queda pequena nesses valores, portanto as duas contagens, antes e após o tratamento, estavam dentro dos valores de normalidade, neste caso a celularidade não serviu como parâmetro para afirmar se houve redução ou não da inflamação por ação das drogas.

DISCUSSÃO E CONCLUSÃO

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 (Wu et al. 2005). Hoje a terapia antiviral com ribavirina em pacientes com hepatite C tem uma sobrevivência de 55% (Sung et al. 2011).

No atual estudo o tratamento experimental foi avaliado segundo a melhora clínica e a sobrevida dos animais nos diferentes grupos, onde foi encontrada uma taxa de 60 a 70% dos animais que sobreviveram ou apresentaram melhora clínica, que em relação ao tratamento usado em humanos foi melhor. O pior desempenho foi G4 com 70% de óbitos.

Quando é feita a avaliação da sobrevida junto com a melhora clínica dos animais, verificou-se que 70% dos animais tratados com o antiviral apresentaram melhora clínica ou sobrevida, no entanto nos grupos controle essa taxa chegou a 50%. Através do atual estudo podemos identificar que clinicamente a ribavirina favoreceu a sobrevida ou a melhora dos animais tratados, assim como foi descrito por Mangia (2008).

Como ocorreu na pesquisa anterior de Mangia (2008), os animais após o período de tratamento com a ribavirina apresentaram valores baixos da contagem de hemácias. Na atual pesquisa verificaram que todos os grupos

apresentaram uma queda na mediana da contagem de hemácias, mesmo os animais do grupo controle. Os animais dos grupos 3, 5 e 6 foram os que apresentaram valores inferiores à 3.500.000 hemácias/ μ L. Dois animais do G5 e um do G6 apresentaram valores da contagem de hemácias abaixo de 2.000.000 células/ μ L no 15º dia de tratamento, que podemos classificar como anemia grave.

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 a causa para a 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).

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. Na dose de 30 mg/Kg também administrada no período de duas semanas apresentou um leve quadro de anemia, porém quando administrado junto com o glicocorticóide apresentou anemia grave.

Não foi encontrado na literatura relatos de efeitos colaterais potencializados por glicocorticóides no uso da ribavirina em qualquer espécie animal que já foi testada, portanto este é o primeiro relato de quadros de anemia severa em cães que receberam ribavirina em associação com a prednisona.

A atual pesquisa revelou que as medianas dos grupos 4 e 5, que receberam doses imunossupressoras de prednisona, apresentam uma contagem de leucócitos mais alta em relação aos outros grupos. Este achado foi descrito na pesquisa de Van den Brandt et al. (2007), os glicocorticóides mostraram induzir células CD8 α a formarem linfócitos T CD4+ e causaram apoptose de timócitos, mas mantendo ainda as células T maduras do sangue periférico mimetizando uma proliferação hemostática. E complementando com o trabalho de Abraham et al. (2006) em que os autores afirmam que os glicocorticóides inibem a expressão dos mediadores inflamatórios dos macrófagos e de outras células, desta forma, são usados no tratamento de várias enfermidades inflamatórias imunomediadas.

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). Assim, pode sugerir que a presença de bilirrubina possa ser consequência da hemólise causada pela ribavirina e não necessariamente por uma lesão hepática. Da mesma forma aconteceu no décimo quinto dia de tratamento, houve um aumento da quantidade de bilirrubina na urina em todos os grupos, sendo que o G5 foi o que apresentou a maior dosagem de bilirrubina na urina.

Outra hipótese para estes achados seriam indícios de uma sobrecarga do sistema hepatobiliar destes cães, na dose e intervalo entre doses da ribavirina utilizada na pesquisa. No entanto, nenhuma das amostras de urina apresentou positividade para a presença de sais biliares na urina nos grupos experimentais e em nenhum dos momentos, o que diminui as chances que seja uma alteração no sistema hepatobiliar.

Apenas os grupos 4 e 5 apresentaram elevação da quantidade de proteína após o tratamento, sendo que nestes grupos foi utilizada a prednisona na sua dose imunossupressora. Desta forma, a prednisona não foi capaz de diminuir o processo inflamatório como desejado já que houve aumento dos valores de proteína no líquido dos animais tratados.

O G6 também foi tratado com a prednisona, porém com doses menores e apresentou diminuição dos valores de proteína no líquido. Assim, pode-se afirmar que a prednisona em doses anti-inflamatórias foi capaz de reduzir a quantidade de proteína no líquido, enquanto que quando administrada em doses imunossupressoras houve aumento desses valores.

A literatura explica que no sistema nervoso, a administração crônica de glicocorticóides ou o estresse não são uniformemente anti-inflamatórios e em algumas circunstâncias agem aumentando o processo inflamatório. Foi observado pelo aumento da migração de células inflamatórias, pelo nível de mediadores inflamatórios e pela ativação do fator de transcrição. No sistema nervoso lesado, níveis de estresse do glicocorticóide podem induzir uma resposta pró-inflamatória, e que em níveis basais ou de baixo estresse possuem um efeito tradicional anti-inflamatório (Sorrells & Sapolsky 2007).

O G4 apenas tratado com prednisona foi o que apresentou maior queda desses valores de mediana, porém foi o grupo com menor número de animais com melhora clínica. O G5 também teve esse tipo de apresentação dos seus valores da contagem de células e recebeu a mesma dose de prednisona, porém também recebeu a ribavirina, e neste grupo houve o segundo índice de melhora clínica.

A partir destes dados foi possível verificar que a prednisona na sua dose imunossupressora levou ao aumento da dosagem de proteínas e uma diminuição da contagem de células nucleadas no líquido. Sugere que a prednisona faça uma imunomodulação nessa dose em cães e não uma potente ação anti-inflamatória.

Pela literatura existente pode-se afirmar que os glicocorticóides são reconhecidos por inibir a proliferação de linfócitos T e a produção de uma variedade de citosinas, incluindo interferon alfa. A IL-7 age mantendo a população policlonal de linfócitos T imaturos e as células T de memória, e, portanto, controla o tamanho do estoque de células T (Talayev et al. 2005).

Ao mesmo tempo Feitosa et al. (1997) afirmam que os altos níveis de proteínas no líquido são encontrados em animais com cinomose com uma porcentagem maior de plasmócitos, 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.

Assim, a prednisona provavelmente age na população de linfócitos T, enquanto os plasmócitos encontrados no líquido causam o aumento de proteínas sob ação do mesmo glicocorticóide.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABRAHAM, S. M.; LAWRENCE, T.; KLEIMAN, A.; WARDEN, P.; MEDGHALCHI, M.; TUCKERMANN, J.; SAKLATVALA, J.; CLARK, A. R. Antiinflammatory effects of dexamethasone are partly dependent on induction of dual specificity phosphatase 1. *JEM*, v. 203, n. 8, p. 1883-1889, 2006.

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

AMARAL, H. A. *Detecção do vírus da cinomose pela técnica de RT-PCR em cães com sintomatologia neurológica*. 2007. Tese (Doutorado). Universidade de São Paulo, Programa de Pós-Graduação em Clínica Veterinária, São Paulo, SP.

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.

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.

DEWEY, C. W. *Neurologia de cães e gatos: guia prático*. 2 ed. São Paulo: Roca, 2006. 352 p.

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*, v. 77, p. 108-13, 2008.

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. 174-151, 1997.

HAYDEN, F. G.; DOUGLAS, R. G. JR. Antiviral Agents. In: MANDELL, G. L.; DOUGLAS, R. G. JR.; BENNETT, J. E. (Eds). *Principles and Practice of Infectious Disease*. New York: Churchill Livingstone, 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.

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, 2001.

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.

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.

LIN, C.; YEH, L.; LUU, T.; LOURENCO, D.; LAU, J. Y. N. Pharmacokinetics and metabolism of [14C] 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.

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

MANGIA, S. H.; PERROTTI, I. B. M.; MARTINHO, A. P. V.; PAES, A. C. Tratamento de cão com encefalite aguda pela cinomose. 5º NEUROVET – Simpósio de Neurologia Veterinária, 10, 2011, Pet Eventos. *Anais...* Florianópolis: Pet Eventos, 2011.

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.

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, 2004.

SORRELLS, S. F.; SAPOLSKY, R. M. An inflammatory review of glucocorticoid actions in the CNS. *Brain Behav. Immun.*, v. 21, n. 3, p. 259-272, 2007.

SUMMERS, B. A.; APPEL, M. J. Aspects of canine distemper virus and measles virus encephalomyelitis. *Neuropathology and Applied Neurobiology*, v. 20, p. 525-534, 1994.

SUNG, H.; CHANG, M.; SAAB, S. Management of hepatitis C antiviral therapy adverse effects. *Curr. Hepatitis Rep.*, v. 10, p. 33-40, 2011. Doi: 10.1007/s11901-010-0078-7

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.

TALAYEV, V. Y.; ZAICHENKO, I. Y.; BABAYKINA, O. N.; LOMUNOVA, M. A.; TALAYEVA, E. B.; NIKONOVA, M. F. *Ex vivo* stimulation of cord blood mononuclear cells by dexamethasone and interleukin-7 results in the maturation of interferon- γ -secreting effector memory T cells. *Clinical and Experimental Immunology*, v. 141, p. 440-448, 2005. Doi: 10.1111/j.1365-2249.2005.02863.

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

Van den BRANDT, J.; LÜHDER, F.; McPHERSON, K. G.; de GRAAF, K. L.; TISCHNER, D.; WIEHR, S.; HERRMANN, T.; WEISSERT, R.; GOLD, R.; REICHARDT, H. M. Enhanced glucocorticoid receptor signaling in T cells impacts thymocyte apoptosis and adaptive immune responses. *The American Journal of Pathology*, v. 170, n. 3, p. 1041-1053, 2007. Doi: 10.2353/ajpath.2007.060804.

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.

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, 2005.

Tabela 1 – Descrição da sequência de nucleotídeos iniciadores utilizados na reação de RT-PCR e hn-RT-PCR.

Primers (número de acesso aos genes)	Iniciadores
Primer ITS 1 F (10 pmol)	ATCCCCAGGRAACAAGCCTACAA
CVD-NPS F1 5'-3'	
Primer ITS 1 R (10 pmol)	CCTTGATGATGCCAAGCTCG
CVD-NPS R1 5'-3'	
Primer ITS 2 R (10 pmol)	CGAATTTTAACCTCCATG
CVD-NPS R2 5'-3'	

(AMARAL, 2007).

Tabela 2 - Mediana e percentis em escores da dosagem de bilirrubina na urina nos diferentes grupos experimentais, no décimo quinto dia de tratamento.

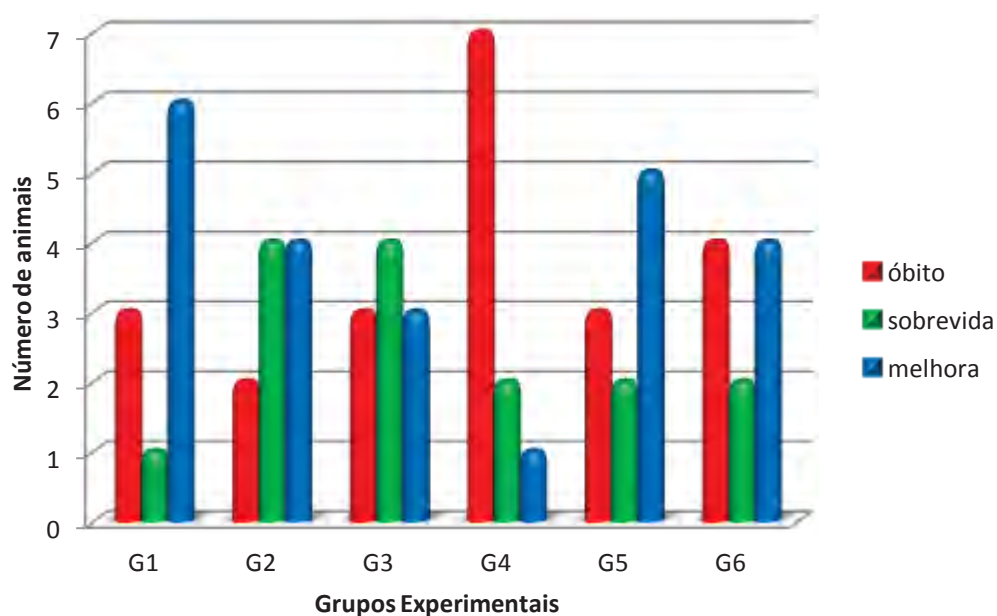
Grupo	Mínimo	P25	Mediana	P75	Máximo
G1	0,0	0,0	0,0	5,0	5,0
G2	0,0	0,0	0,0	2,0	5,0
G5	0,0	0,0	2,5	5,0	5,0
G6	0,0	0,0	0,5	2,0	5,0

Estatística: Kruskal-Wallis, $p=0,4952$.

P25: percentil 25. P75: percentil 75. 0: negativo; 1,0: traços de bilirrubina; 2,0: + de bilirrubina; 3,0: ++ de bilirrubina; 4,0: +++ de bilirrubina; 5,0: ++++ de bilirrubina.

G1: grupo 1; G2: grupo 2; G5: grupo 5; G6: grupo 6.

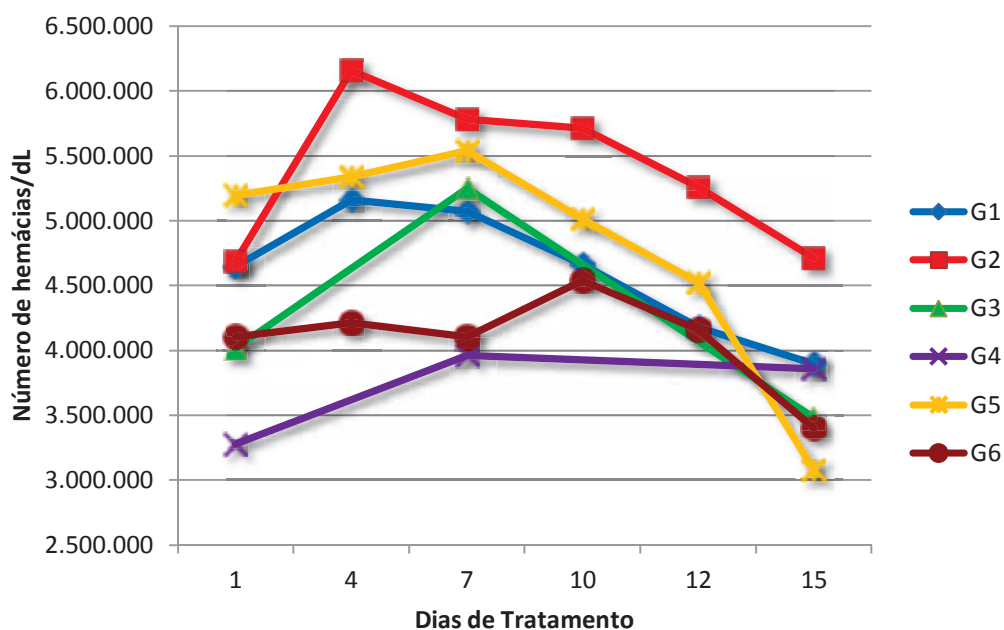
Figura 1 – Representação gráfica da avaliação do tratamento experimental segundo a sobrevivência dos animais nos diferentes grupos.



Estatística: Teste G de Willians; $p=0,4034$

G1: grupo 1; G2: grupo 2; G3: grupo 3; G4: grupo 4; G5: grupo 5; G6: grupo 6.

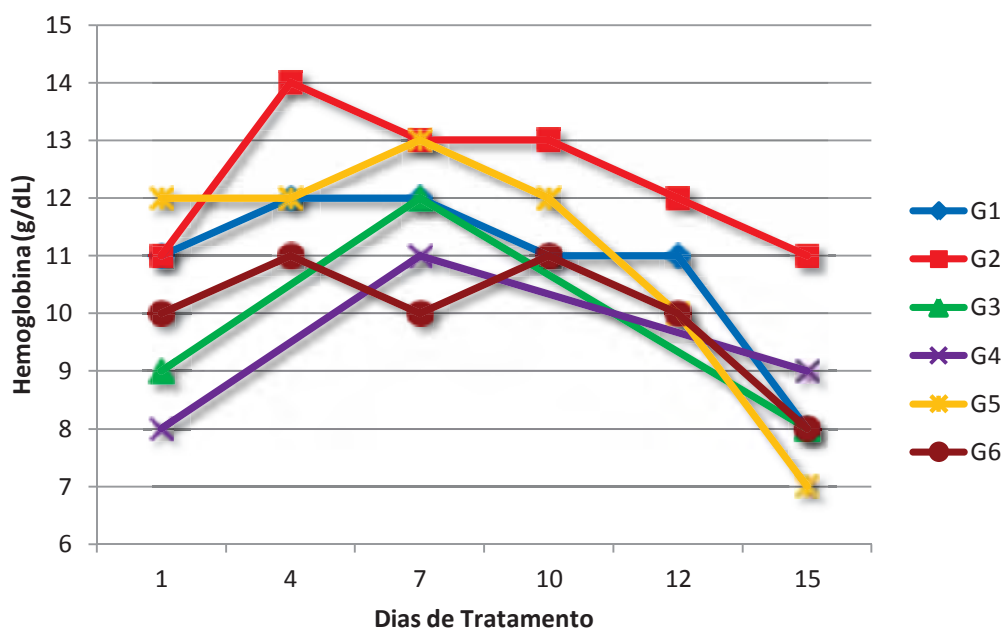
Figura 2 – Representação gráfica das medianas da contagem de hemácias em cada momento de colheita de material nos grupos experimentais.



Estatística: Teste de Kruskal-Wallis

G1: grupo 1; G2: grupo 2; G3: grupo 3; G4: grupo 4; G5: grupo 5; G6: grupo 6.

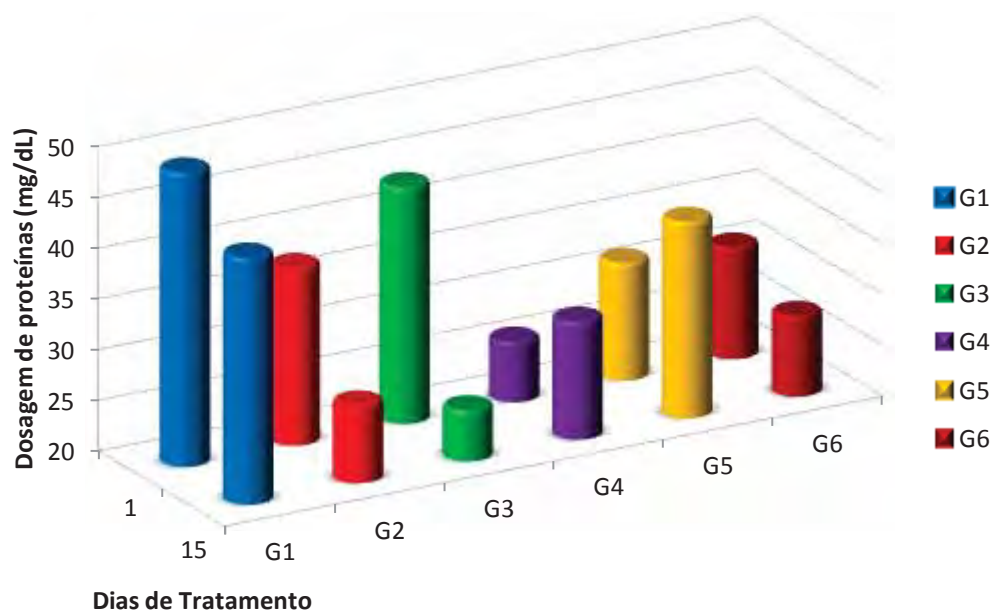
Figura 3 – Representação gráfica das medianas da dosagem de hemoglobina em cada momento de colheita de material nos grupos experimentais.



Estatística: Teste de Kruskal-Wallis

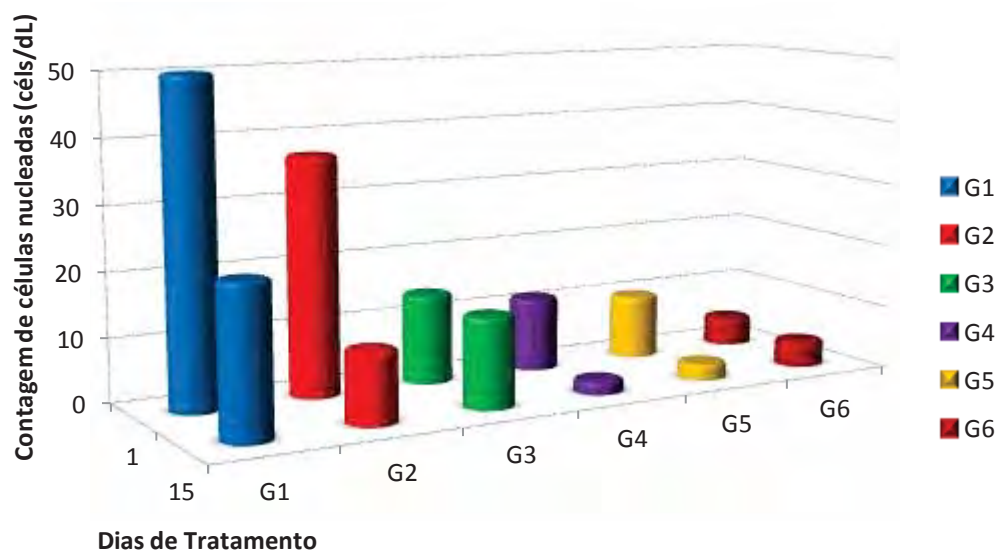
G1: grupo 1; G2: grupo 2; G3: grupo 3; G4: grupo 4; G5: grupo 5; G6: grupo 6.

Figura 4 – Representação gráfica das medianas da dosagem de proteínas no líquido antes e após o tratamento experimental.



G1: grupo 1; G2: grupo 2; G3: grupo 3; G4: grupo 4; G5: grupo 5; G6: grupo 6.
Estatística: Kruskal-Wallis

Figura 5 – Representação gráfica dos valores de medianas da contagem de células nucleadas, antes e após o tratamento experimental.



Estatística: Kruskal-Wallis
G1: grupo 1; G2: grupo 2; G3: grupo 3; G4: grupo 4; G5: grupo 5; G6: grupo 6.

Trabalho a ser enviado para Pesquisa Veterinária Brasileira:

RT-PCR e Hemi-Nested PCR antes e após o tratamento com ribavirina, prednisona e DMSO de cães com encefalite pelo vírus da cinomose.

RT-PCR and Hemi-Nested PCR before and after treatment based on ribavirin, prednisone and DMSO of dogs with encephalitis by cinine distemper virus.

MANGIA, S. H.²¹; MORAES, L. F.²²; TAKAHIRA R. K.²³; RODRIGO R. G.²⁴,
SALCEDO, E. S.²⁵; MEGID, J.²⁶; SILVA, A. V.²⁷; PAES, A. C.²⁸

²¹ Autor para correspondência. Departamento de Higiene Veterinária e Saúde Pública, FMVZ, UNESP/Botucatu. End: Rubião Júnior, s/n – Botucatu, SP. CEP: 18.618-000, Caixa Postal: 560. E-mail: simangia@hotmail.com

²² Departamento de Clínica Veterinária, FMVZ, UNESP/Botucatu. E-mail: liviafm@gmail.com

²³ Departamento de Clínica Veterinária, FMVZ, UNESP/Botucatu. E-mail: takahira@fmvz.unesp.br

²⁴ Departamento de Higiene Veterinária e Saúde Pública, FMVZ, UNESP/Botucatu. E-mail: rgmotta@fmvz.unesp.br

²⁵ Departamento de Clínica Veterinária, FMVZ, UNESP/Botucatu. E-mail: soteloedu@gmail.com

²⁶ Departamento de Higiene Veterinária e Saúde Pública, FMVZ, UNESP/Botucatu. E-mail: jane@fmvz.unesp.br

²⁷ Grupo de pesquisa em parasitologia, Laboratório de Análises Clínicas e Parasitologia, Departamento de Ciências Biológicas, Universidade Estadual de Feira de Santana, BA. E-mail: aristeusilva@gmail.com

²⁸ Departamento de Higiene Veterinária e Saúde Pública, FMVZ, UNESP/Botucatu. E-mail: paesacmi@fmvz.unesp.br

ABSTRACT [RT-PCR and Hemi-Nested PCR before and after treatment based on ribavirin, prednisone and DMSO of dogs with encephalitis by cinine distemper virus]

The present study aims at the identification of the frequency of canine distemper virus in the blood, bone marrow and cerebrospinal fluid's (CSF) samples collected from dogs naturally infected with the virus, with encephalitis and treated with ribavirin, prednisone and DMSO. A number of 60 dogs presenting canine distemper neurological signs were subjected to the support treatment and neurologically assessed on daily basis. Groups 1 and 2 were treated with ribavirin and its combination with DMSO; Groups 3 and 4 treated with prednisone and DMSO, Group 5 treated with ribavirin and prednisone, while Group 6 with ribavirin, prednisone and DMSO. The animals were anesthetized for the cerebrospinal fluid, bone marrow and blood samples collection before and after the treatment, then the RT-PCR of the samples was proceeded. The negative samples were analysed according to the hn-PCR technique. The canine distemper virus were found In 95% of blood samples, 90% of bone marrow and 53,3% of CSF before the treatment. Considering the survival and clinical improvement rates, the most successful treatment was the one applied to the G2 (80%); followed by G1 with 70% and 6 animals presenting clinical improvement; G5 with 70% and five animals with clinical improvement; G3 with 70% and three animals with clinical improvement; G6 with 60%; and the lowest rate G4 with 30%. After the treatment, the virus frequency rate was 97,7% in the blood, 86,4% in the bone marrow and 27,3% in the CSF.

INDEX TERMS: RT-PCR, hn-PCR, canine distemper virus, ribavirina, prednisone, DMSO

RESUMO [RT-PCR e Hemi-Nested PCR antes e após o tratamento com ribavirina, prednisona e DMSO de cães com encefalite pelo vírus da cinomose.]

O estudo tem objetivo de identificar a frequência da presença do vírus da cinomose nas amostras de líquido, sangue e medula óssea de cães com encefalite naturalmente infectados e tratados com ribavirina, prednisona e DMSO. Foram utilizados 60 cães apresentando quadro neurológico da cinomose com evolução de 10 dias. Os animais foram internados e receberam tratamento de suporte e foram avaliados neurologicamente todos os dias. Os grupos 1 e 2 foram tratados com ribavirina e sua associação com DMSO; os grupos 3 e 4 com DMSO e prednisona e o grupo 5 com ribavirina e prednisona e o grupo 6 com ribavirina, prednisona e DMSO. Os animais foram anestesiados para a colheita de líquido, medula óssea e sangue, antes e após o tratamento e realizada a RT-PCR das amostras. As amostras negativas foram analisadas pela técnica de hn-PCR. O vírus da cinomose foi encontrado em 95% das amostras de sangue, 90% de medula óssea e 53,3% de líquido antes do tratamento. Através dos índices de sobrevivência e melhora clínica, o melhor tratamento foi o G2 com 80%; seguido do G1 com 70%, sendo que seis animais apresentaram melhora clínica; G5 com 70% e cinco animais

melhoraram e o G3 com 70%, sendo três animais com melhora clínica; o G6 com 60%; o G4 com o pior índice com 30%. Após o tratamento, a frequência do vírus foi de 97,7% no sangue, 86,4% na medula óssea e 27,3% no líquido.

TERMOS DE INDEXAÇÃO: RT-PCR, hn-PCR, vírus da cinomose, ribavirina, prednisona e DMSO.

INTRODUÇÃO

A cinomose é uma doença viral muito antiga que afeta cães e outros carnívoros em todo o mundo. Entretanto, mesmo com uso de estratégias vacinais, ela ainda é uma doença importante na população canina, apresentando a maior taxa de mortalidade depois da raiva (Summers & Appel 1994).

A cinomose é uma enfermidade infectocontagiosa, causada por um RNA vírus da ordem *Mononegavirales*, família *Paramyxovirus*, gênero *Morbillivirus*. Possui três formas de apresentação clínica: aguda, subaguda e crônica, com manifestações gastroentéricas, respiratórias e neurológicas. São descritas basicamente 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).

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, Vandeveldt & 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 com ocorrência ocasional de surtos (Böhm et al. 2004).

A ribavirina é uma droga antiviral, análoga à guanosina, inibidora da replicação *in vitro* de alguns RNA e DNA-vírus, incluindo *Herpesvirus*, *Poxvirus*, 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 experimento de Elia et al. (2008) a ribavirina mostrou-se altamente efetiva na prevenção da replicação do vírus da cinomose “in vitro” em baixas concentrações, de aproximadamente 6,5-12,5 µg/mL, concordando com os valores encontrados para a inibição do vírus do sarampo.

Segundo Elia et al. (2008) a ribavirina causa mutações no vírus da cinomose e estas levam a um erro catastrófico no RNA do genoma viral. Pode ser especulado que a ribavirina interfira com a RNA polimerase pela competição com nucleosídeos naturais e produz erro na terminação da cadeia do vírus.

Mangia et al. (2011) demonstraram a eficácia do tratamento com ribavirina na dose de 30 mg/Kg, por via oral, a cada 24 horas, durante 15 dias em um caso com encefalite aguda pelo vírus da cinomose, quando associada ao DMSO na dose de 1 g/Kg, por via intravenosa, a cada 24 horas.

Os glicocorticóides são os reguladores mais estudados do sistema neuroendócrino e são reconhecidos por inibir a proliferação de linfócitos T e a produção de uma variedade de citosinas, incluindo interferon- γ (IFN). A interleucina-7 (IL-7) age mantendo a população policlonal de linfócitos T imaturos e as células T de memória, e, portanto, controla o tamanho do estoque de células T (Talayev et al. 2005).

No trabalho de revisão de Sorrells & Sapolsky (2007), os autores concluíram que em ambos os sistemas, nervoso e imune periférico, a exposição prévia ao estresse ou ao glicocorticóide pode resultar na produção de uma resposta imune a uma subsequente inflamação. No sistema nervoso, a administração crônica de glicocorticóides ou o estresse não são uniformemente anti-inflamatórios e em algumas circunstâncias agem aumentando o processo inflamatório; assim foi observado pelo aumento da migração de células inflamatórias, pelo nível de mediadores inflamatórios e pela ativação do fator de transcrição. No sistema nervoso lesado, níveis de estresse do glicocorticóide podem induzir uma resposta pró-inflamatória e em níveis basais ou de baixo estresse possuem um efeito tradicional anti-inflamatório; esta resposta é oposta à encontrada no sistema imune periférico. Outra conclusão encontrada na pesquisa foi que os efeitos pró-inflamatórios no cérebro são diferentes conforme a região, o uso de sintéticos versus glicocorticóides endógenos e o tempo de exposição ao glicocorticóide no que diz respeito a resposta inflamatória.

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 guanósina é hidrofóbica e sua interação com Dimetil-Sulfóxido (DMSO) pode torná-la permeável a substâncias lipofílicas, indicando que este pode servir como veículo de transporte de drogas nucleotídeas por membranas celulares.

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 anti-inflamatória, antiisquêmica, crioproteção e radioproteção (Brayton 1986, Paes 1999, Lind et al. 2000, Ali 2001, Kishioka et al. 2007).

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. 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).

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. 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. 2006, Sato et al. 2006, Elia et al. 2008).

As várias amostras incluindo sangue periférico, swab conjuntival, secreção nasal, urina, líquido, e swab vaginal, tecido pulmonar, estomacal, 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 “in vivo” da cinomose (Kim et al. 2006).

Shin et al. (2004) levantaram a hipótese de utilização do nested PCR para diagnóstico da cinomose. A efetividade da técnica foi demonstrada em amostras clínicas como 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).

O atual estudo teve como objetivo identificar a frequência do vírus da cinomose nas amostras de sangue periférico, medula óssea e líquido de animais com encefalite naturalmente infectados, através de técnicas altamente sensíveis e específicas como a RT-PCR e Hemi-Nested-PCR (hn-PCR).

MATERIAL E MÉTODOS

Foram utilizados 60 cães com sinais clínicos neurológicos de cinomose, diagnosticados a partir do histórico de vacinação, desenvolvimento clínico da doença e exame físico. A confirmação foi realizada pela técnica da reação em cadeia pela polimerase pela transcriptase reversa (RT-PCR).

Para a inclusão dos animais no estudo, os sinais neurológicos deveriam ter apresentação clínica multifocal e caráter progressivo de no máximo 10 dias de evolução. Os animais incluídos apresentaram sinais de acometimento dos sistemas respiratório e/ou gastroentérico juntos ou anteriormente à apresentação neurológica, ou até mesmo descamação de pele ou descarga ocular mucopurulenta.

Os animais foram divididos em seis grupos de 10 animais de forma aleatória na medida em que foram atendidos no Hospital Veterinário da FMVZ, UNESP – Campus Botucatu, no Serviço de Enfermidades Infecciosas dos Animais.

Grupos 1 e 2: compostos por animais já tratados com a ribavirina e sua associação com o DMSO, respectivamente nas doses de 30 mg/Kg e 20mg/Kg, a cada 24 horas, durante 15 dias. Dessa forma, foram utilizados os materiais colhidos (sangue, medula óssea e líquido) para avaliação do tratamento pela RT-PCR. Estas amostras foram devidamente armazenadas em freezer a – 80°C desde 2007.

Grupo 3: foram incluídos animais que serviram de controle para o tratamento antiviral específico e para a avaliação da ação antiinflamatória do DMSO. Estes animais receberam 50 mg/Kg de DMSO, diluído na concentração de 10 a 20%, por via intravenosa, a cada 24 horas, durante 15 dias.

Grupo 4: foram incluídos animais que serviram de controle para o tratamento antiviral específico e para a avaliação da ação antiinflamatória da prednisona. Estes animais receberam 4 mg/Kg de prednisona, por via oral, a cada 24 horas, durante 7 dias, após receberam a dose de 2 mg/Kg de prednisona, também por via oral a cada 24 horas até completar os 15 dias de tratamento. Após este período os animais foram encaminhados para o término do tratamento no próprio domicílio com redução gradativa da dose.

Grupo 5: os animais incluídos neste grupo receberam a ribavirina na dose de 30 mg/Kg, por via oral, a cada 24 horas, durante 15 dias. Nestes foi administrado em associação a prednisona na dose de 4 mg/Kg, por via oral, a cada 24 horas, durante sete dias, com posterior redução da dose para 2 mg/Kg, por via oral, a cada 24 horas, até completar o período de 15 dias. Após este período os animais foram encaminhados para o término do tratamento no próprio domicílio com redução gradativa da dose da prednisona por mais duas semanas. Este grupo foi considerado o grupo desafio da droga antiviral, já que a dose do glicocorticoide foi imunossupressora.

Grupo 6: os animais foram tratados com a ribavirina, prednisona e DMSO. Neste grupo os cães receberam 30 mg/Kg de ribavirina, por via oral, a cada 24 horas, durante 15 dias; o DMSO foi administrado na dose de 50 mg/Kg, diluído na concentração de 10 a 20%, por via intravenosa, a cada 24 horas; e a prednisona foi administrada na sua dose antiinflamatória de 0,5 mg/Kg, por via oral, a cada 12 horas, durante sete dias, sendo reduzida para 0,25 mg/Kg, a cada 24 horas até completar 15 dias de tratamento. Após este período o animal terminou o tratamento em domicílio com manutenção da dose e aumento do intervalo para 48 horas por mais sete dias.

Todos os animais receberam tratamento sintomático e de suporte básico, que inclui suplementação vitamínica, fluidoterapia nos casos de desidratação e antibioticoterapia para combater infecções secundárias. Todos os animais foram avaliados neurologicamente e clinicamente todos os dias e foram realizados exames complementares de forma rotineira.

A Ribavirina²⁹ utilizada na pesquisa possui apresentação de cápsulas de 250 mg e para facilitar o cálculo da dose a droga foi diluída. A diluição foi realizada de forma asséptica onde foram utilizadas oito cápsulas de ribavirina para 50 mL de água destilada ou solução fisiológica 0,9% estéril, formando uma solução de 40 mg/mL para

²⁹ Ribavirina: Ribavirin® Laboratório Blau

administração oral. Depois de diluída, a ribavirina foi armazenada em frascos âmbar e mantida em refrigeração constante em geladeira.

A prednisona foi adquirida em farmácia de manipulação (Cruz Vermelha, Botucatu, SP), na forma de solução oral, na concentração de 40 mg/mL em frascos de 50 mL.

O DMSO³⁰ foi utilizado a sua forma comercial Dimetil Sulfóxido P. A., na concentração de 99,9%, sendo que para a administração intravenosa, a droga foi diluída em solução fisiológica 0,9% estéril na proporção de 10 a 20% para administração intravenosa.

Todos os animais do experimento foram anestesiados conforme o protocolo sugerido pelo Departamento de Anestesiologia Veterinária da FMVZ – UNESP – Botucatu, SP para a colheita de líquido.

Foram realizadas duas colheitas de líquido em cada animal, no momento em que o mesmo chegou ao ambulatório, antes de qualquer tratamento e, após um período de 15 dias, referente ao tempo do tratamento experimental. A técnica de colheita de líquido seguiu a descrição feita por Dewey (2006). O líquido foi colhido em três tubos por gotejamento e a quantidade de líquido colhida variou de 0,5 a 3 ml, dependendo do tamanho do animal. Para a realização da RT-PCR, o líquido foi colhido diretamente em microtubos de 500 µL, livre de pirogênios, DNase, RNase e metais pesados e armazenado em freezer a -80°C.

O sangue foi colhido com agulhas e seringas esterilizadas de punção de veia jugular. A amostra foi acondicionada em tubos com anticoagulantes homogenizadas e, posteriormente, acondicionadas em microtubos de 500 µL, livre de pirogênios, DNase, RNase e metais pesados e armazenadas em freezer a -80°C para posterior processamento. Estas amostras também foram colhidas antes e após o tratamento experimental em todos os grupos, com intervalo de 15 dias.

As colheitas de medula óssea foram realizadas nos mesmos momentos das colheitas de líquido, antes do início do tratamento e após 15 dias de administração das drogas. Os animais estavam anestesiados para a colheita de líquido, facilitando a colheita no úmero, que foi realizada com agulha própria, com mandril e esterilizada. A colheita foi realizada com seringa esterilizada e com EDTA, o material foi depositado em microtubos de 500 µL, livre de pirogênios, DNase, RNase e metais pesados e armazenado em freezer a -80°C para posterior processamento em Laboratório de Biologia Molecular, da Disciplina de Enfermidades Infecciosas dos Animais da FMVZ, UNESP – Botucatu, assim como as amostras de sangue e líquido.

Técnicas de biologia Molecular

A extração do RNA foi realizada a partir das amostras de sangue, medula óssea e líquido, utilizando-se o Kit para extração de RNA Invisorb[®] Spin Virus RNA Mini Kit (Invitack[®]).

³⁰ DMSO: Dimetil Sulfóxido P.A.[®] Laboratório Vetec Química Fina

Para realização da extração foram diluído 100 µL da amostra em 100 µL de água livre de nucleases. E para cada cinco amostras foram adicionados um controle negativo que era composto apenas por 200 µL de água livre de nucleases. As reações foram realizadas em baterias de 10 amostras por vez. O controle positivo foi utilizado amostras de urina sabidamente positivas e para realização da extração utilizou-se a mesma diluição em água livre de nucleases.

O RNA foi imediatamente aliquotado em tubos menores com volume de 7 µL da amostra e acondicionados a -80°C.

Para conversão em cDNA as amostras (7 µL) foram retiradas do freezer -80°C e levadas diretamente ao termociclador para desnaturação do RNA, durante sete minutos em temperatura de 95°C.

Ao mesmo tempo foi preparado a mistura para formação de cDNA. A mistura era composta por 3 µL de água Mili-Q autoclavada; 1 µL de Randon Primer (250 ng/µL); 1 µL de dNTP (10 mM); 5 µL de Buffer 5x; 1 µL de DDT (0,1 M); 1 µL de inibidor de RNase (10 U/µL) e 1 µL tampão de M-MLV Reverse transcriptase. A mistura formou como volume final 13 µL.

Aliquotou-se 13 µL em cada microtubo previamente identificado com o RNA previamente aquecido, totalizando-se 20 µL. Levou-se ao termociclador no programa CINOCDNA (composto por ciclo de 25°C por 10 minutos; 37°C por 50 minutos e 70°C por 15 minutos, totalizando um período de 1 hora e 15 minutos).

Para a realização da reação de RT-PCR foi necessária a preparação de outra mistura com 17,35 µL de água Mili-Q autoclavada; 2,5 µL de Buffer 10x; 0,75 µL de Mg₂Cl₂ (50 mM); 0,5 µL de dNTP (10 mM); 1,25 µL do Primer CDV-NPS F1 (tabela 1); 1,25 µL do Primer CDV-NPS R1 (tabela 1); 0,15 µL de Taq DNA Platinum (5U/µL), com volume final de 23,75 µL da mistura.

Aliquotou-se 23,75 µL em cada microtubo previamente identificado, sempre mantido em gelo, na sala de aplicação foi pipetado 1,25 µL do cDNA em cada tubo, totalizando 25 µL de volume total. Após os microtubos foram levados ao termociclador no programa CINOPCR (composto por ciclo de 95°C por 10 minutos, 39 ciclos de 95°C por 30 segundos, 56°C por 30 segundos, 72°C por 30 segundos, depois 72°C por 10 minutos e 4º *for ever*) e, após, foi armazenado a -20°C.

A leitura do gel foi realizada em gel de agarose a 2% em transluminador UV, corados em brometo de etídeo, onde se esperou um produto amplificado com 440 pb.

A reação do hn-PCR foi realizada de forma semelhante a reação da PCR, utilizou-se para estas reações as amostras que foram negativas na PCR, onde aliquotou-se 23,75 µL da mistura e 1,25 µL do produto amplificado da PCR.

A mistura foi composta pelos mesmos reagentes, porém na hn-PCR utilizou-se Primer CDV-NPS R2 (tabela 1) no lugar do Primer CDV-NPS R1. E

o produto esperado desta reação apresentou 331 pb na leitura do gel, assim como na reação anterior.

Os iniciadores (primers) utilizados nas duas reações amplificaram regiões específicas do gene da nucleoproteína [GenBak: X02000.1].

Análise estatística:

A comparação de frequências de ocorrências foi realizada pelos testes de Qui-quadrado ou G de Williams, de acordo com os resultados registrados em tabelas de contingência.

Para as variáveis ordinais as comparações entre os grupos foram realizadas pelo teste de Kruskal-Wallis, seguido de comparação de medianas pelo teste de Dunn.

As variáveis discretas e contínuas foram submetidas à verificação do tipo de distribuição pelo teste de Shapiro-Wilkins; quando de distribuição Normal, os grupos foram comparados pela Análise de Variância Um Fator seguido de teste de Tukey; quando de distribuição Livre, os grupos foram comparados pelo teste de Kruskal-Wallis, seguido de comparação de medianas pelo teste de Dunn.

Em todas as análises, valores de P menores que 0,05 foram considerados significantes.

RESULTADOS

O tratamento experimental foi avaliado segundo a melhora clínica e a sobrevida dos animais nos diferentes grupos. Os dados foram tratados da seguinte forma: os animais que vieram ao óbito, que apresentaram melhora clínica e que sobreviveram aos 15 dias de tratamento. No entanto, após o período de 15 dias de tratamento, alguns animais morreram, outros apresentaram piora ou ficaram com sequelas graves e foram eutanasiados, ou mesmo apresentaram melhora e sobreviveram, assim, estes animais foram agrupados todos juntos pela dificuldade de acompanhar a resposta, já que uma parte deles terminou o tratamento em domicílio (Figura 1).

Como pior resultado frente à sobrevida dos animais, o grupo 4 teve o pior desempenho com 70% dos animais vindo ao óbito e apenas um animal apresentou melhora clínica. Em compensação, os grupos tratados com ribavirina (1, 2, 5 e 6) tiveram os melhores resultados de quando observamos as taxas de melhora clínica.

Dos 60 animais incluídos no experimento, apenas 23 (38,3%) apresentaram melhora clínica, sendo um resultado semelhante ao número de óbitos (36,7%). Quando somamos os dados dos animais que receberam o antiviral, verificamos que 12 (30%) animais vieram ao óbito e 19 (47,5%) apresentaram melhora clínica evidente no período de internação.

No total foram realizadas 308 reações da RT-PCR, já que nem todos os animais sobreviveram aos 15 dias de tratamento, sendo que 130 (42,2%) foram

positivas. Então, foram realizadas 178 reações da hn-PCR e 102 (57,3%) foram positivas. Assim, das 308 amostras analisadas, 232 (75,32%) foram positivas.

Os dados foram trabalhados segundo o momento de colheita de material e a amostra utilizada para a realização da pesquisa. Todos os animais foram positivos nos dois momentos da pesquisa em pelo menos uma das três amostras colhidas.

No primeiro momento, o sangue periférico foi amostra que mais resultou positivo com 95%, sendo que apenas três animais do G4 apresentaram resultado negativo nas duas técnicas de biologia molecular trabalhadas. Estes dados apresentaram resultados estatisticamente significativos com $p=0,0075$.

A medula óssea no primeiro momento apresentou 90% de positivos, sendo que nenhum dos animais do G4 apresentou resultado negativo e no G2 houve 20% de negativos. Os outros grupos apresentaram uma taxa de 10% de animais que não apresentavam o vírus na medula óssea. Portanto, esses dados não apresentaram resultado estatisticamente significativo ($p=8176$).

O líquido foi a amostra que menos apresentou positividade (53,3%), porém esta ainda foi maior do que os resultados negativos (46,7%). Dos 28 animais que apresentaram negatividade no líquido, seis eram dos grupos 2 e 4; cinco dos grupos 3 e 6 e três dos grupos 1 e 5. Estes dados também não apresentaram resultado estatístico, pois $p=5859$.

Após 15 dias de tratamento, houve um aumento da porcentagem de amostras positivas, ou seja, das 43 amostras de sangue colhidas, 42 foram positivas, sendo que o único animal que apresentou ausência do vírus no sangue pertence ao G3. Este grupo e G4 são grupos controle e não receberam a ribavirina nos protocolos de tratamento, mesmo assim tiveram o vírus presente no sangue periférico. Estes resultados não apresentaram significância estatística ($p=3844$).

Mesmo após o tratamento, a medula óssea ainda foi considerada como a segunda amostra com mais resultados positivos. Das 44 amostras, 86,4% foram positivas e 13,6% negativas. Das seis amostras negativas, duas foram de animais tratados nos grupos 5 e 6 e um animal em cada grupo G2 e G3. Esses dados também não apresentaram resultado significativo estatisticamente ($p=5759$).

O líquido novamente foi o que apresentou menor número de amostras, e após um período de 15 dias de tratamento, houve menor porcentagem de positivos (27,3%). Sendo que 100% dos animais do G3 apresentaram resultado negativo do líquido após o período de tratamento, mostrando que mesmo sem o antiviral o vírus não seria encontrado livre no líquido com maior tempo de evolução da doença, condizendo com a literatura existente.

A figura 2 evidencia que o líquido foi a pior amostra para a realização da RT-PCR e foi a amostra que apresentou maior queda dos valores percentuais, após o tratamento experimental.

Apesar de ter sido a pior amostra com relação a positividade, no processo de eletroforese, foi a amostra que menos apresentou bandas inespecíficas no gel, tanto na RT-PCR quanto na hn-PCR. Na RT-PCR identificou-se bandas com 440 pb e na hn-PCR o produto esperado foi de 331 pb.

O grupo que mais precisou fazer a hn-PCR foi G1, onde das 35 amostras, 77,1% foram positivas, sendo o grupo que mais apresentou positividade na hn-PCR.

Estes resultados não apresentaram significância estatística, mas demonstraram a importância da realização da hn-PCR para confirmação do resultado.

A realização da hn-PCR também foi avaliada frente à amostra utilizada para a reação. Estes dados apresentaram significância estatística pela necessidade de realização dessa reação em muitas amostras de líquido em relação ao sangue periférico e medula óssea (Tabela 2).

Das 35 amostras do G1 que foram realizadas hn-PCR, 18 eram de líquido, 11 de sangue e seis de medula óssea. O G1 apresentou 27 (77,1%) das amostras positivas na hn-PCR e 22,9% negativas. Das amostras negativas, sete foram de líquido e uma de medula óssea e 100% das amostras de sangue deste grupo foram positivas. Das amostras de medula óssea 83,3% foram positivas.

No G2 foram realizadas 29 reações de hn-PCR, sendo que 15 (51,7%) foram negativas e 14 (48,3%) foram positivas. Das amostras negativas 12 foram de líquido e três de medula óssea. Novamente 100% das amostras de sangue foram positivas. Neste grupo, as amostras de medula óssea tiveram 57,1% de positividade.

No G3 foram realizadas 28 reações de hn-PCR, sendo que 16 de líquido, seis de medula e sangue. Dessas 28 amostras, 15 (53,6%) foram negativas e 13 (46,4%) foram positivas. Assim como no G2, das amostras de líquido, 75% foram negativas e das amostras de sangue e medula, 83,3% e 66,7% respectivamente foram positivas.

Das 25 amostras que foram processadas pela técnica de hn-PCR no G4, 11 foram de líquido, sete de medula óssea e de sangue periférico. Neste grupo 100% das medulas foram positivas e apenas 27,3% das amostras de líquido. Das amostras negativas, oito foram de líquido e três de sangue.

No G5 foram realizadas 29 reações de hn-PCR, sendo que 16 foram de líquido, sete de medula óssea e seis de sangue periférico. Dessas 29 amostras, 16 (55,2%) foram positivas e 13 (44,8%) foram negativas. Da mesma forma que aconteceu na maioria dos grupos, 62,5% das amostras de líquido foram negativas, 57,1% das medulas foram positivas e 100% das amostras de sangue também foram positivas.

Assim como nos outros grupos, o G6 apresentou 32 amostras para a realização da hn-PCR, sendo que 14 foram líquido, nove de sangue e de

medula. Dessas 32 amostras, 18 (56,3%) foram positivas e 14 (43,8%) foram negativas. Das amostras de líquido 78,6% foram negativas e 66,7% das amostras de medula óssea foram positivas e 100% de sangue foi positivo.

Esses resultados não avaliaram o tratamento experimental, mas foi possível identificar a melhor amostra a ser utilizada neste tipo de estudo, que seria as amostras de sangue e medula associadas, sendo realizada a hn-PCR nas amostras negativas na RT-PCR.

Foi possível identificar uma queda no número de reações positivas no segundo momento de colheita de material. Esta queda aconteceu independente do grupo, ou seja, se o animal foi tratado com o antiviral ou não, pode estar relacionada com a patogenia da cinomose.

O gráfico evidencia o aumento dos valores percentuais de resultados positivos na hn-PCR no G4, diferente do que ocorreu em todos os outros grupos que apresentaram diminuição destes valores.

Como a hn-PCR foi realizada apenas nas amostras que resultaram negativo na RT-PCR, estes dados demonstram que dando grande quantidade de resultados negativos após o período de 15 dias de tratamento e mesmo realizando a hn-PCR os resultados continuaram em sua maior parte negativos no segundo momento.

Como o G3 é um grupo controle, ou seja, os animais não receberam o tratamento antiviral, e apresentou maior queda dos valores percentuais dos resultados positivos demonstra que este deveria ser um resultado esperado na patogenia da cinomose. Portanto, o que foi possível verificar é que os grupos tratados tiveram uma queda, mas que não foi muito acentuada como o G3.

DISCUSSÃO E CONCLUSÃO

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). Os resultados demonstraram que a técnica de RT-PCR é um método eficiente para realização do diagnóstico rápido, precoce e “in vivo” (Frisk et al. 1999, Sato et al. 2006, Saito et al. 2006, Elia et al. 2008).

No atual estudo foram realizadas 308 reações da RT-PCR, sendo que 130 (42,2%) foram positivas. Foram realizadas 178 reações da hn-PCR e 102 (57,3%) foram positivas. Assim, das 308 amostras analisadas, 232 (75,32%) foram positivas.

A degradação autolítica do RNA viral causada por RNases endógenas pode ser considerada na possibilidade de resultado falso-negativo (Frisk et al. 1999). 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 apresenta 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.

Assim, os animais que apresentaram diminuição da celularidade líquórica após o tratamento, tiveram menos chances de encontrar o RNA viral nas amostras. Por isso, a pesquisa teve 75,32% de amostras positivas, já que a técnica tem alta sensibilidade e especificidade.

Segundo Amaral (2007) os iniciadores utilizados foram capazes de amplificar o produto de 440 pb na RT-PCR e na hn-PCR um produto de 331 pb, assim como aconteceu na atual pesquisa.

Amaral (2007) encontrou uma frequência de 43 positivos na hm-PCR das 50 amostras testadas, sendo que o maior número ocorreu em zaragatoas genitais, seguido de urina e zaragatoas oculares e células brancas do sangue periférico. Segundo Frisk et al. (1999) 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 imunoistoquímica.

Kim et al. (2006) afirmam que amostras incluindo sangue periférico, swab conjuntival, secreção nasal, urina, líquido, e swab de vagina, tecidos pulmonares, estomacais, intestinais 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.

Na atual pesquisa, 95% das amostras de sangue periférico foram positivas, concordando com os resultados de Frisk et al. (1999). A medula óssea foi a segunda amostra que apresentou maior taxa de positividade (90%), seguida do líquido que apresentou 53,3% de positividade, concordando com os resultados encontrados na literatura.

Após o tratamento, houve um aumento das amostras positiva de sangue (97,7%) e diminuiu as amostras positivas do líquido (27,3%). A diminuição da positividade das amostras de líquido pode estar relacionada diretamente com a diminuição da celularidade do líquido, consequente da diminuição do processo inflamatório no SNC promovido pelas drogas experimentais.

Amaral (2007) e outros autores (Frisk et al., 1999, Shin et al. 2004) observaram que a associação de colheita de diferentes amostras biológicas por animal aumentou o número de resultados positivos. Como foi realizado na atual pesquisa, onde se encontrou positividade em todos os animais antes e após o tratamento experimental. Além disso, nos animais do atual estudo, seria indicado o uso do sangue e medula óssea como melhores amostras para o diagnóstico da referida enfermidade.

Amude et al. (2006) obtiveram resultados negativos de urina e líquido de cães com sintomatologia, exclusivamente neurológica, com diagnóstico de cinomose confirmado pela PCR e pela presença de lesões histopatológicas características no SNC. Este achado pode explicar que 100% dos animais do G3 apresentaram resultado negativo no líquido após o período de tratamento.

Com relação a presença de bandas inespecíficas encontradas na atual pesquisa, através dos dados de Amaral (2007), autora que desenhou os iniciadores utilizados, não houve a presença destas bandas no seu estudo.

Portanto, sugere que as bandas encontradas tenham surgido por causa do método de extração utilizado, o que foi diferente da pesquisa da autora supracitada.

Amaral (2007) mostrou que a técnica da hn-PCR apresentou a mesma sensibilidade analítica que a de Nested-PCR.

Shin et al. (2004) levantaram a hipótese de utilização o nested-PCR para diagnóstico da cinomose. 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 & Frimus 2005).

RT-PCR combinada com o nested-PCR mostrou 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 epitélios e a reação de imunofluorescência foi resultado negativo (Józwik & Frimus 2005).

Na atual pesquisa confirmou-se a necessidade da realização da hn-PCR porque das 178 amostras negativas na RT-PCR, 57,3% foram positivas na hn-PCR. Sendo que das 178 amostras, 89 eram de líquido, 47 de sangue e 42 de medula óssea.

Quando analisamos os resultados da hn-PCR em relação ao tratamento experimental utilizado, verificamos que houve aumento dos valores percentuais de resultados positivos na hn-PCR no G4, diferente do que ocorreu em todos os outros grupos que apresentaram diminuição destes valores. O G4 é um dos grupos controle e não recebeu antiviral, somente a prednisona em dose imunossupressora, assim sugere que este tratamento não foi capaz combater o vírus e diminuir sua distribuição no organismo.

No entanto, o G3 também é um grupo controle, ou seja, os animais não receberam o tratamento antiviral, e apresentou maior queda dos valores percentuais dos resultados positivos demonstra que este deveria ser um resultado esperado na patogenia da cinomose. Portanto, o que foi possível verificar é que os grupos tratados tiveram uma queda, mas que não foi acentuada como no G3.

REFERÊNCIAS

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

AMARAL, H. A. *Detecção do vírus da cinomose pela técnica de RT-PCR em cães com sintomatologia neurológica*. 2007. Tese (Doutorado). Universidade de São Paulo, Programa de Pós-Graduação em Clínica Veterinária, São Paulo, SP.

AMUDE, A. M.; ALFIERI, A. A.; ALFIERI, A. F. The nervous form of canine distemper. *Veterinária e Zootecnia*, v. 13, p. 125-136, 2006.

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

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.

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.

DEWEY, C. W. *Neurologia de cães e gatos: guia prático*. 2 ed. São Paulo: Roca, 2006. 352 p.

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*, v. 77, p. 108-13, 2008.

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, 1999.

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.

HAYDEN, F. G.; DOUGLAS, R. G. JR. Antiviral Agents. In: MANDELL, G. L.; DOUGLAS, R. G. JR.; BENNETT, J. E. (Eds). *Principles and Practice of Infectious Disease*. New York: Churchill Livingstone, 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.

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.

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 sulfoxide 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.

LIND, R. C.; BEGAY, C. K.; GANDOLFI, J. Hepatoprotection by Dimethyl Sulfoxide. *Toxicology and Applied Pharmacology*, v. 166, p. 145-150, 2000.

MANGIA, S. H.; PERROTTI, I. B. M.; MARTINHO, A. P. V.; PAES, A. C. Tratamento de cão com encefalite aguda pela cinomose. 5º NEUROVET – Simpósio de Neurologia Veterinária, 10, 2011, Pet Eventos. *Anais...* Florianópolis: Pet Eventos, 2011.

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.

SATO, 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*, v. 80, n. 1, p. 116-119, 2006.

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, 2004.

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, 2004.

SORRELLS, S. F.; SAPOLSKY, R. M. An inflammatory review of glucocorticoid actions in the CNS. *Brain Behav. Immun.*, v. 21, n. 3, p. 259-272, 2007.

SUMMERS, B. A.; APPEL, M. J. Aspects of canine distemper virus and measles virus encephalomyelitis. *Neuropathology and Applied Neurobiology*, v. 20, p. 525-534, 1994.

TALAYEV, V. Y.; ZAICHENKO, I. Y.; BABAYKINA, O. N.; LOMUNOVA, M. A.; TALAYEVA, E. B.; NIKONOVA, M. F. *Ex vivo* stimulation of cord blood mononuclear cells by dexamethasone and interleukin-7 results in the maturation of interferon- γ -secreting effector memory T cells. *Clinical and Experimental Immunology*, v. 141, p. 440-448, 2005. Doi: 10.1111/j.1365-2249.2005.02863.

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

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.

Tabela 1 – Descrição da sequência de nucleotídeos iniciadores utilizados na reação de RT-PCR e hn-PCR.

Primers (número de acesso aos genes)	Iniciadores
Primer ITS 1 F (10 pmol)	ATCCCCAGGRAACAAGCCTACAA
CVD-NPS F1 5'-3'	
Primer ITS 1 R (10 pmol)	CCTTGGTGATGCCAAGCTCG
CVD-NPS R1 5'-3'	
Primer ITS 2 R (10 pmol)	CGAATTTTAACCCTCCATG
CVD-NPS R2 5'-3'	

(AMARAL, 2007).

Tabela 2 – Relação dos resultados positivos e negativos da hn-PCR em relação ao tipo de amostra, independente do grupo experimental.

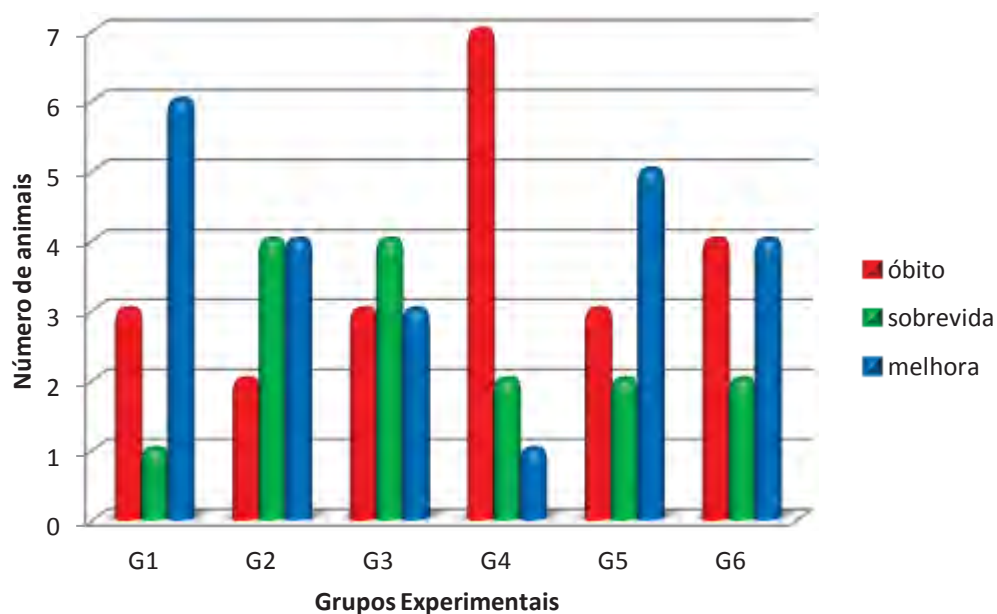
Amostras	Positivo		Negativo		Total	
	n	%	n	%	n	%
Sangue	43,0	91,5	4,0	8,5	47,0	100,0
Medula óssea	30,0	71,4	12,0	28,6	42,0	100,0
Líquor	29,0	32,6	60,0	67,4	89,0	100,0
Total	102,0	57,3	76,0	42,7	178	100,0

Estatística: Qui-quadrado, $p=0,0000$.

n: número de amostras.

%: porcentagem.

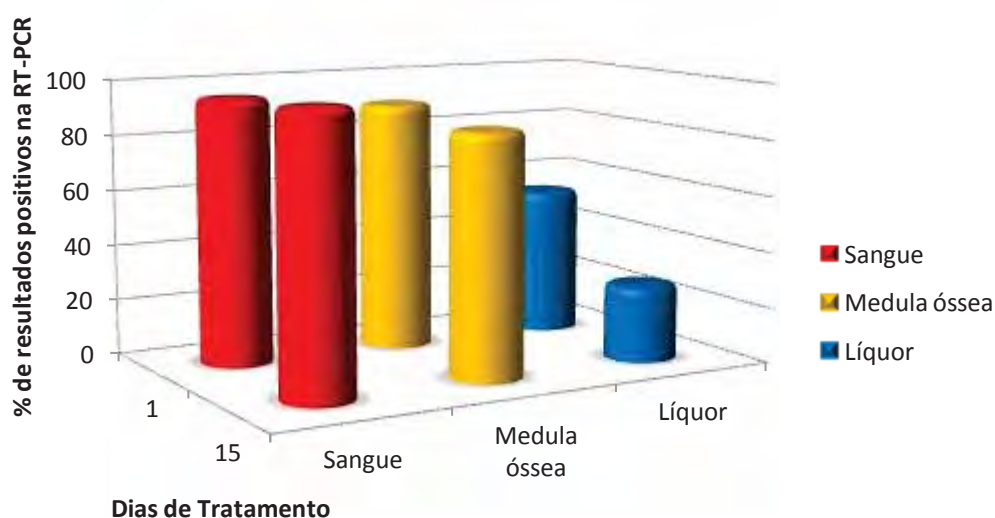
Figura 1 – Representação gráfica da avaliação do tratamento experimental segundo a sobrevivência dos animais nos diferentes grupos.



Estatística: Teste G de Willians; $p=0,4034$

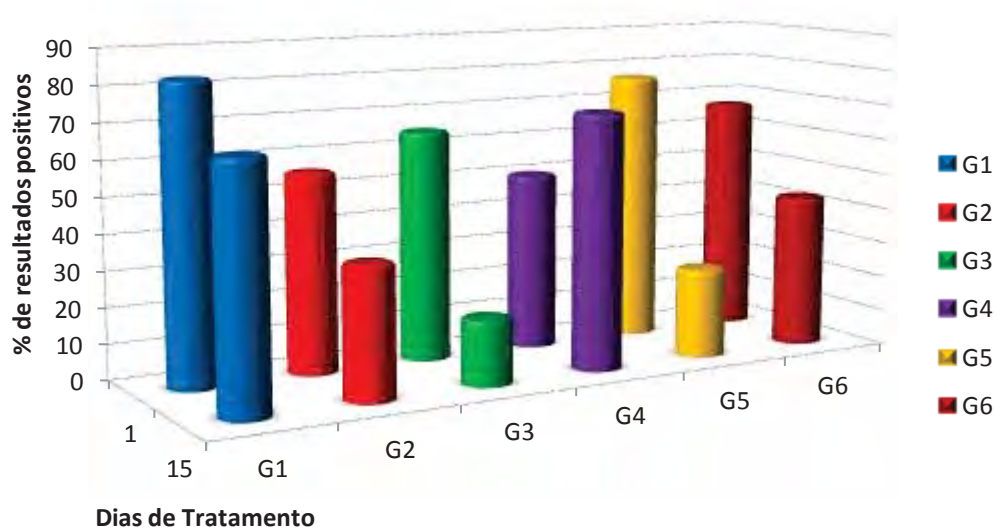
G1: grupo 1; G2: grupo 2; G3: grupo 3; G4: grupo 4; G5: grupo 5; G6: grupo 6

Figura 2 – Representação gráfica dos resultados positivos para o vírus da cinomose nas diferentes amostras, antes e após o tratamento, independente do grupo experimental.



Estatística: Qui-quadrado.

Figura 3 – Representação gráfica dos valores percentuais dos resultados positivos da hn-PCR antes e após o tratamento nos diferentes grupos experimentais.



Estatística: Qui-quadrado.

%: porcentagem.

G1: grupo 1; G2: grupo 2; G3: grupo 3; G4: grupo 4; G5: grupo 5; G6: grupo 6.

NORMAS DA REVISTA

Apresentação de manuscritos

1. Os trabalhos devem ser organizados, sempre que possível, em Título, ABSTRACT, RESUMO, INTRODUÇÃO, MATERIAL E MÉTODOS, RESULTADOS, DISCUSSÃO, CONCLUSÕES (ou combinação destes dois últimos), Agradecimentos e REFERÊNCIAS:

a) o **Título** do artigo deve ser conciso e indicar o conteúdo do trabalho; pormenores de identificação científica devem ser colocados em MATERIAL E MÉTODOS.

b) O(s) **Autor(es)** deve(m) sistematicamente encurtar os nomes, tanto para facilitar sua identificação científica, como para as citações bibliográficas. Em muitos casos isto significa manter o primeiro nome e o último sobrenome e abreviar os demais sobrenomes:

Paulo Fernando de Vargas Peixoto escreve Paulo V. Peixoto ou Peixoto P.V.; Franklin Riet-Correa Amaral escreve Franklin Riet-Correa ou Riet-Correa F.; Silvana Maria Medeiros de Sousa Silva poderia usar Silvana M.M.S. Silva, inverso Silva S.M.M.S., ou Silvana M.M. Sousa-Silva, inverso, Sousa-Silva S.M.M., ou mais curto, Silvana M. Medeiros-Silva, e inverso, Medeiros-Silva S.M.; para facilitar, inclusive, a moderna indexação, recomenda-se que os trabalhos tenham o máximo de 8 autores:

c) o **ABSTRACT** deverá ser apresentado com os elementos constituintes do RESUMO em português, podendo ser mais explicativos para estrangeiros.

Ambos devem ser seguidos de "INDEX TERMS" ou "TERMOS DE INDEXAÇÃO", respectivamente;

d) o **RESUMO** deve apresentar, de forma direta e no passado, o que foi feito e estudado, indicando a metodologia e dando os mais importantes resultados e conclusões. Nos trabalhos em inglês, o título em português deve constar em negrito e entre colchetes, logo após a palavra RESUMO;

e) a **INTRODUÇÃO** deve ser breve, com citação bibliográfica específica sem que a mesma assuma importância principal, e finalizar com a indicação do objetivo do trabalho;

f) em **MATERIAL E MÉTODOS** devem ser reunidos os dados que permitam a repetição do trabalho por outros pesquisadores. Na experimentação com animais, deve constar a aprovação do projeto pela Comissão de Ética local;

g) em **RESULTADOS** deve ser feita a apresentação concisa dos dados obtidos. Quadros devem ser preparados sem dados supérfluos, apresentando, sempre que indicado, médias de várias repetições. É conveniente, às vezes, expressar dados complexos por gráficos (Figuras), ao invés de apresentá-los em Quadros extensos;

h) na **DISCUSSÃO** devem ser discutidos os resultados diante da literatura. Não convém mencionar trabalhos em desenvolvimento ou planos futuros, de modo a evitar uma obrigação do autor e da revista de publicá-los;

i) as **CONCLUSÕES** devem basear-se somente nos resultados apresentados no trabalho;

j) **Agradecimentos** devem ser sucintos e não devem aparecer no texto ou em notas de rodapé;

k) a Lista de **REFERÊNCIAS**, que só incluirá a bibliografia citada no trabalho e a que tenha servido como fonte para consulta indireta, deverá ser ordenada alfabeticamente pelo sobrenome do primeiro autor, registrando-se os nomes de todos os autores, em caixa alta e baixa (colocando as referências em ordem cronológica quando houver mais de dois autores), o título de cada publicação e, abreviado ou por extenso (se tiver dúvida), o nome da revista ou obra, usando as instruções do "Style Manual for Biological Journals" (American Institute for Biological Sciences), o "Bibliographic Guide for Editors and Authors" (American Chemical Society, Washington, DC) e exemplos de fascículos já publicados (www.pvb.com.br).

2. Na elaboração do texto deverão ser atendidas as seguintes normas:

a) os trabalhos devem ser submetidos **segundo o exemplo de apresentação de fascículos recentes da revista e do modelo constante do site sob "Instruções aos Autores" (www.pvb.com.br)**. A digitalização deve ser na fonte **Helvética, corpo 11, entrelinha simples**; a **página** deve ser **no formato A4, com 2cm de margens** (superior, inferior, esquerda e direita), o texto deve ser

corrido e não deve ser formatado em duas colunas, com as legendas das figuras e os Quadros no final (logo após as REFERÊNCIAS). As Figuras (inclusive gráficos) devem ter seus arquivos fornecidos separados do texto. Quando incluídos no texto do trabalho, devem ser introduzidos através da ferramenta "Inserir" do Word; pois imagens copiadas e coladas perdem as informações do programa onde foram geradas, resultando, sempre, em má qualidade;

b) a redação dos trabalhos deve ser concisa, com a linguagem, tanto quanto possível, no passado e impessoal; no texto, os sinais de chamada para notas de rodapé serão números arábicos colocados em sobrescrito após a palavra ou frase que motivou a nota. Essa numeração será contínua por todo o trabalho; as notas serão lançadas ao pé da página em que estiver o respectivo sinal de chamada. Todos os Quadros e todas as Figuras serão mencionados no texto. Estas remissões serão feitas pelos respectivos números e, sempre que possível, na ordem crescente destes. ABSTRACT e RESUMO serão escritos corridamente em um só parágrafo e não deverão conter citações bibliográficas.

c) **no rodapé da primeira página deverá constar endereço profissional completo de todos os autores e o e-mail do autor para correspondência, bem como e-mails de outros autores;**

d) siglas e abreviações dos nomes de instituições, ao aparecerem pela primeira vez no trabalho, serão colocadas entre parênteses e precedidas do nome por extenso;

e) citações bibliográficas serão feitas pelo sistema "autor e ano"; trabalhos de até três autores serão citados pelos nomes dos três, e com mais de três, pelo nome do primeiro, seguido de "et al.", mais o ano; se dois trabalhos não se distinguirem por esses elementos, a diferenciação será feita através do acréscimo de letras minúsculas ao ano, em ambos. **Trabalhos não consultados na íntegra pelo(s) autor(es), devem ser diferenciados, colocando-se no final da respectiva referência, "(Resumo)" ou "(Apud Fulano e o ano.)"**; a referência do trabalho que serviu de fonte, será incluída na lista uma só vez. A menção de comunicação pessoal e de dados não publicados é feita no texto somente com citação de Nome e Ano, colocando-se na lista das Referências dados adicionais, como a Instituição de origem do(s) autor(es). Nas citações de trabalhos colocados entre parênteses, **não se usará vírgula entre o nome do autor e o ano, nem ponto-e-vírgula após cada ano**; a separação entre trabalhos, nesse caso, se fará apenas por vírgulas, exememplo: (Christian & Tryphonas 1971, Priester & Haves 1974, Lemos et al. 2004, Krametter-Froetcher et. al. 2007);

f) a Lista das REFERÊNCIAS deverá ser apresentada **isenta do uso de caixa alta**, com os nomes científicos em itálico (grifo), **e sempre em conformidade com o padrão adotado nos últimos fascículos da revista**, inclusive quanto à ordenação de seus vários elementos.

3. As Figuras (gráficos, desenhos, mapas ou fotografias) **originais devem ser preferencialmente enviadas por via eletrônica**. Quando as fotos forem obtidas através de câmeras digitais (com extensão ".jpg"), os arquivos deverão ser enviados como obtidos (sem tratamento ou alterações). Quando obtidas em papel

ou outro suporte, deverão ser anexadas ao trabalho, mesmo se escaneadas pelo autor. Nesse **caso**, cada Figura será identificada na margem ou no verso, a traço leve de lápis, pelo respectivo número e o nome do autor; havendo possibilidade de dúvida, deve ser indicada a parte inferior da figura pela palavra "pé". Os gráficos devem ser produzidos em 2D, com colunas em branco, cinza e preto, sem fundo e sem linhas. A chave das convenções adotadas será incluída preferentemente, na área da Figura; evitar-se-á o uso de título ao alto da figura. Fotografias deverão ser apresentadas preferentemente em preto e branco, em papel brilhante, ou em diapositivos ("slides"). Para evitar danos por grampos, desenhos e fotografias deverão ser colocados em envelope.

Na versão online, fotos e gráficos poderão ser publicados em cores; na versão impressa, somente quando a cor for elemento primordial a impressão das figuras poderá ser em cores.

4. As legendas explicativas das Figuras conterão informações suficientes para que estas sejam compreensíveis, (até certo ponto autoexplicativas, com independência do texto) e **serão apresentadas no final do trabalho.**

5. Os Quadros deverão ser explicativos por si mesmos e **colocados no final do texto.** Cada um terá seu título completo e será caracterizado por dois traços longos, um acima e outro abaixo do cabeçalho das colunas; entre esses dois traços poderá haver outros mais curtos, para grupamento de colunas. **Não há traços verticais. Os sinais de chamada serão alfabéticos, começando, se possível, com "a" em cada Quadro;** as notas serão lançadas logo abaixo do Quadro respectivo, do qual serão separadas por um traço curto à esquerda.

Anexo 1

FICHA CLÍNICA

Data: ____/____/____ - Xº dia

Nome: _____ Esp: Canina

Raça: _____ Idade: _____

RG: _____ Nº animal: _____

Grupo tratamento: () Ribavirina (I) () Ribavirina + DMSO (II)

Anamnese / Hitórico:

EXAME CLÍNICO NEUROLÓGICO:

Tempo de evolução: _____

1. Cabeça:

Nível de consciência: () Alerta () Delírios () Apático/Deprimido

() Semicomatoso (responsivo ao estímulo visual)

() Semicomatoso (responsivo ao estímulo auditório)

() Semicomatoso (responsivo somente aos estímulos neurológicos repetidos)

() Comatoso () Hiperexcitabilidade

Comportamento: () Convulsão () Agressividade () Balançar a cabeça

() Andar compulsivo () Andar em círculos

() Pressão da cabeça contra objetos () Vocalização

Postura: () Desvio lateral da cabeça () Giro ortotônico da cabeça e pescoço

() Tremores () Opistótono

2. Nervos cranianos:

N = normal; Ø = ausente; P = presente; D = diminuído; A =

Pares de Nervos		Direita	Esquerda
I Par – Olfatório			
II Par – Óptico			
III Par	Reflexo pupilar direto		

	Reflexo pupilar consensual			
	Estrabismo lateral			
IV Par	Estrabismo dorso medial			
V Par	Reflexo palpebral (sensitivo)			
	Sensibilidade da face (sensitivo)			
	Mastigação (motor)			
	Massa muscular (motor)			
VI Par	Estrabismo medial			
VII Par	Ptose auricular (motor)			
	Ptose palpebral (motor)			
	Ptose labial (motor)			
Pares de Nervos			Direita	Esquerda
VIII Par	Audição			
	Desvio da cabeça			
	Estrabismo ventro-lateral			
	Nistagmo	Fisiológico		
		Horizontal		
		Vertical		
		Rotacional		
		Posicional		
	Fase rápida			
IX e X Pares	Deglutição (motor)			
XI Par	Atrofia muscular	Braquicefálico		
		Esternocefálico		
		Omotransverso		
		Trapézio		
XII Par	Protusão / Desvio de língua			
	Atrofia			

3. Andar:

- () Padrão normal de locomoção;
 () Déficits dificilmente observados durante a locomoção em linha reta, mas confirmados após a realização de manobras especiais;
 () Déficits facilmente observados durante a locomoção em linha reta e exarcebados durante a realização de manobras especiais;
 () Apresenta postura anormal mesmo quando parado;
 () Quedas espontâneas durante a locomoção;
 () Decúbito permanente;
 () Ataxia.

5. Reações posturais:

Ø = Ausente

P = presente

	Anterior		Posterior	
	Direito	Esquerdo	Direito	Esquerdo
Paresia				
Hipermetria				
Hipometria				

Espasticidade				
Falcidez				

N = normal: Ø = ausente: P = presente: D = diminuído: A =

Membros Anteriores		
	Esq.	Dir.
Propriocepção		
Tônus do pescoço		
Sensibilidade	Superficial	
	Profunda	
Reflexo biceptal (face anglo-medial do cotovelo)		
Reflexo tricipital (olecrano)		
Reflexo carpo-radial		
Reflexo flexor		

Membros Posteriores		
	Esq.	Dir.
Propriocepção		
Propulsão extensora		
Sensibilidade	Superficial	
	Profunda	
Reflexo patelar		
Reflexo gastrocnêmio		
Reflexo tibial cranial		
Reflexo flexor		

5. Cauda e ânus:

N = normal; Ø = ausente; P = presente; D = diminuído; A =

	Tônus	Reflexos	Sensibilidade	
			Superficial	Profunda
Cauda				
Ânus				

6. Mioclonias:

Grupo muscular: _____

EXAMES COMPLEMENTARES:

- Hemograma completo

- Uréia

- ALT
- FA
- GGT
- Albumina
- Bilirrubinas

- Creatinina
- Urinálise

ADMINISTRADO RIBAVIRINA? () Sim () Não

ADMINISTRADO DMSO? () Sim () Não

ALGUM EFEITO TÓXICO? QUAL?