

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA  
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNICA

ANÁLISE HISTOPATOLÓGICA E IMUNOISTOQUÍMICA DE  
ENCÉFALO DE CÃES COM CINOMOSE TRATADOS COM  
RIBAVIRINA

CAROLINA DIAS DE CAMPOS SANCHES

***BOTUCATU/SP***

***JULHO 2012***

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA  
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNICA

ANÁLISE HISTOPATOLÓGICA E IMUNOISTOQUÍMICA DE  
ENCÉFALO DE CÃES COM CINOMOSE TRATADOS COM  
RIBAVIRINA

CAROLINA DIAS DE CAMPOS SANCHES

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

Orientador: *Prof. Dr. Antonio Carlos Paes*

**BOTUCATU/SP**

**JULHO 2012**

Nome do Autor: Carolina Dias de Campos Sanches

Título: ANÁLISE HISTOPATOLÓGICA E IMUNOISTOQUÍMICA DE ENCÉFALO DE CÃES COM CINOMOSE TRATADOS COM RIBAVIRINA.

### COMISSÃO EXAMINADORA

Prof. Dr. Antonio Calos Paes

Presidente e Orientador

Departamento de Higiene Veterinária e Saúde Pública

FMVZ – UNESP – Botucatu

Prof. Adj. Marcio Garcia Ribeiro

Membro

Departamento de Higiene Veterinária e Saúde Pública

FMVZ – UNESP – Botucatu

Prof. Dr. Osimar de Carvalho Sanches

Membro

Departamento de Patologia Animal

Faculdade de Ciências Agrárias da Universidade do Oeste Paulista

UNOESTE

Presidente Prudente – SP

Data da Defesa: 31 de julho de 2012

## **DEDICATÓRIA**

Dedico esta obra aos meus pais Claudio de Campos Sanches e Letizia Dias de Campos Sanches, que sempre me apoiaram em todos os momentos da minha vida.

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço ao meu mestre Antonio Carlos Paes pela orientação e pela amizade que formamos durante esses anos.

Às residentes do Ambulatório de Enfermidades Infecciosas dos Animais Domésticos, Anna Paula, Isa, Clau, Karen, Rafinha, Fernanda, Carol e Moisés pelo encaminhamento dos casos para que este projeto fosse realizado.

Ao Professor Osimar de Carvalho Sanches, da Disciplina de Patologia Veterinária da Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade do Oeste Paulista (UNOESTE), Presidente Prudente, pela inestimável ajuda na confecção de toda parte histológica desta dissertação.

À Profa. Noeme do Departamento de Patologia que nos forneceu o material necessário para as análises imunoistoquímicas.

Ao Professor Márcio Garcia Ribeiro e a Professora Jane Megid por fornecer conhecimento tão grandioso.

Ao Prof. João Pessoae à Pós-graduanda Cláudia Tozato do Laboratório de Diagnóstico Molecular do Departamento de Microbiologia e Imunologia, Instituto de Biociências da UNESP, Botucatu-SP, pelo processamento do qPCR.

Ao Prof. José Carlos de Figueiredo Pantoja que realizou toda Análise Estatística da dissertação.

Ao CNPq que forneceu bolsa para minha manutenção em Botucatu.

Aos funcionários da instituição Pardal e Sr. Roberto que sempre estiveram prontos para ajudar com as necrópsias e coleta de material.

## LISTA DE TABELAS

TABELA 1: Análise entre as idades entre os grupos controle e tratados.....	21
TABELA 2: Análise entre as raças dos grupos controle e tratados.....	21
TABELA 3: Análise entre o sexo dos animais entre os grupos controle e tratados.....	21
TABELA 4: Score de lesão histopatológica.....	22
TABELA 5: Análise estatística das das lesões histopatológicas comparando grupo tratado e controle, coradas em EOSINA-HEMATOXILINA.....	24
TABELA 6: Estatística das alterações em encéfalo.....	24
TABELA 7: Score de presença e marcação viral nos tecidos.....	25
TABELA 8: Estatística da análise imunoistoquímica.....	25

## LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1: – Análise histopatológica de cerebelo e tronco encefálico de cães com cinomose em fase neurológica. Butucatu/SP- 2012.....26

FIGURA 2 – Análise histopatológica de tálamo, hipocampo e córtex cerebral de cães com cinomose em fase neurológica. Butucatu/SP- 2012.....26

FIGURA 3: Material coletado na Enfermidade Infecciosas dos Animais Domésticos - FMVZ-UNESP/Botucatu. Lâmina confeccionada no Serviço de Anatomia Patológica da Universidade do Oeste Paulista (UNOESTE) – Presidente Prudente – SP, sob a orientação do Prof. Dr. Osimar de Carvalho Sanches. Imagens histopatológicas em coloração eosina-hematoxilina: A: desmielinização acentuada e macrófagos - cerebelo 400x; B: cerebelo - desmielinização - 100x; C: cerebelo - subs branca - desmielinização acentuada - 100 x; D: maguito perivascular.....27

FIGURA 4: Material coletado na Enfermidade Infecciosas dos Animais Domésticos - FMVZ-UNESP/Botucatu. Lâmina confeccionada no Serviço de Anatomia Patológica da Universidade do Oeste Paulista (UNOESTE) – Presidente Prudente – SP, sob a orientação do Prof. Dr. Osimar de Carvalho Sanches. Imagens imonohistoquímicas: E:córtex cerebral; F: tronco encefálico; G: telencefálico com marcação viral em linfócitos do manguito perivascular); H: tálamo.....28

<b>RESUMO .....</b>	<b>1</b>
<b>ABSTRACT.....</b>	<b>2</b>
<b>1 INTRODUÇÃO.....</b>	<b>3</b>
<b>2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....</b>	<b>4</b>
<b>3 JUSTIFICATIVA.....</b>	<b>8</b>
<b>4 OBJETIVOS.....</b>	<b>9</b>
4.1. GERAIS.....	9
4.2. ESPECÍFICOS.....	9
<b>5 MATERIAIS E MÉTODOS .....</b>	<b>10</b>
5.1 ANIMAIS.....	10
5.2 GRUPOS.....	11
5.3 COLHEITA DO ENCÉFALO .....	11
5.4. TÉCNICA DE BIOLOGIA MOLECULAR .....	11
5.4.1 RT-PCR em Tempo Real (RT-qPCR) e NESTED-PCR em Tempo Real (NESTED-qPCR).....	12
5.5. PROCESSAMENTO HISTOPATOLÓGICO E IMUNOHISTOQUÍMICO.....	13
<b>6 ANÁLISE ESTATÍSTICA.....</b>	<b>15</b>
<b>7 RESULTADOS E DISCUSSÕES.....</b>	<b>16</b>
7.1 DADOS GERAIS .....	16
7.2 ANÁLISE HISTOPATOLÓGICA .....	17
7.3. AVALIAÇÃO IMUNOHISTOQUÍMICA.....	18
<b>8 CONCLUSÃO .....</b>	<b>20</b>
<b>ANEXO.....</b>	<b>21</b>
<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>29</b>
<b>ARTIGO PARA PUBLICAÇÃO.....</b>	<b>26</b>



SANCHES, C.D.C. **Análise histopatológica e imunoistoquímica de encéfalo de cães com cinomose tratados com ribavirina.** Botucatu, 2012. 49p. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Campus de Botucatu, Universidade Estadual Paulista, SP.

## **RESUMO**

A cinomose é uma doença infecto-contagiosa viral, sistêmica e letal causada pelo Morbilivírus que acomete cães de todas as idades e apresenta sinais clínicos respiratórios, gastrintestinais, dermatológicos, oftálmicos e neurológicos, que podem ocorrer sequencialmente ou isoladamente. Este estudo teve como objetivo comparar lesões encefálicas utilizando a histopatologia e avaliar a quantidade de vírus pela imunoistoquímica em cães tratados com Ribavirina na dose de 30mg/Kg por via oral uma vez ao dia por 15 dias e animais não tratados com esse fármaco, e que devido a evolução desfavorável da doença foram eutanasiados. Os animais foram atendidos e tratados durante a rotina do Setor de Enfermidades Infecciosas dos Animais Domésticos- FMVZ- UNESP/ Botucatu, SP. A análise histopatológica constituiu na avaliação de córtex cerebral, cerebelo, tálamo, tronco encefálico, hipocampo e visualização de manguitos perivasculares em meninges. A partir dessas regiões foi possível identificar e classificar lesões como: desmielinização; presença de manguitos perivasculares, edema, necrose neuronal, alterações vasculares (congestão, hemorragia e trombose) e alterações inflamatórias (meningite, meningoencefalite e meningoencefalomielite). Foi observado que a desmielinização se manteve altamente presente nos dois grupos, e que quando comparados estatisticamente não existe diferença significativa entre os grupos, assim como na formação de manguitos perivasculares. Houve diminuição considerável do edema em todas as estruturas avaliadas, e a ribavirina® se mostrou eficaz na redução da inflamação encefálica, assim como a necrose neuronal foi menor em quase todas as estruturas avaliadas no grupo tratado, com exceção do tálamo. A análise estatística comparativa da marcação viral entre os grupos se mostrou significativa somente para o cerebelo, tálamo e tronco encefálico.

**Palavras-chave:** cão, cinomose, tratamento, ribavirina, imunoistoquímica, encéfalo, histopatologia

## **ABSTRACT**

Distemper is a viral infectious disease, caused by systemic and lethal morbillivirus that affects dogs of all ages and clinical signs respiratory, gastrointestinal, dermatological, ophthalmic and neurological disorders, which may occur sequentially or separately. This study aimed to compare brain lesions using histopathology and assess the amount of virus by immunohistochemistry in dogs treated with Ribavirin at a dose of 30mg/Kg orally once daily for 15 days and animals not treated with this drug, and that due to the unfavorable development of the disease were euthanized. The animals were treated and handled during routine Division of Infectious Diseases of Domestic Animals-FMVZ-UNESP / Botucatu, SP. Histopathologic analysis was to evaluate the cerebral cortex, cerebellum, thalamus, brainstem, hippocampus and viewing perivascular cuffs in the meninges. From these regions it was possible to identify and classify lesions such as demyelination, the presence of perivascular cuffing, edema, neuronal necrosis, vascular changes (congestion, hemorrhage and thrombosis) and inflammatory changes (meningitis, meningoencephalitis and meningo-encephalomyelitis). It was observed that the demyelination remained strongly present in both groups, and compared statistically no significant difference between groups, as well as the formation of perivascular cuffs. There was a considerable decrease of the edema measured in all structures, and ribavirin ® was effective in reducing brain inflammation, and neuronal necrosis was lower in almost all structures evaluated in the group treated with the exception of the thalamus. The comparative statistical analysis of the viral marking between groups was significant only for the cerebellum, thalamus and brainstem.

**Keywords:** dog, canine distemper, treatment, ribavirin, immunohistochemistry, brain, histopathology

## 1. Introdução

A cinomose é uma doença infecto-contagiosa viral, de distribuição mundial, quase sempre fatal, que acomete vários mamíferos das famílias *Canidae* (cães, raposas, lobos e coiotes), *Felidae* (leões, tigres, leopardos e onças), *Mustelidae* (furões e martas), *Procyonidae* (guaxinins), *Ursidae* (urso e panda gigante), *Ailuridae* (panda vermelho), *Viverridae* (civeta, gineta) (MARTELLA, 2008) causando lesões principalmente no sistema respiratório, gastrointestinal e no sistema nervoso central (SNC) (SUMMERS, 1995; SANTOS, 2011).

O agente etiológico da cinomose (CDV- *canine distemper vírus*) é um *Morbilivírus* da Família Paramyxoviridae pleomórfico, com 150nm a 300nm de diâmetro, envelopado com um genoma de RNA de fita simples linear com peso molecular de  $7,0 \times 10^6$  D, contendo capsídeo viral composto por seis polipeptídeos principais. O polipetídeo H glicosilado é responsável pela adsorção do vírus a sítios receptores das células suscetíveis e o peptídeo glicosilado F causa a fusão de células infectadas (ZEE, 2003). O nucleocapsídeo possui simetria helicoidal de 13 a 18 nm de diâmetro e aparência característica de espinha de peixe (SONNE, 2009). É sensível a luz solar, calor e não resiste a temperaturas entre 50° a 60°C por 30 minutos (GREENE, 2012).

Estudos sobre cinomose abrangendo aspectos como etiologia, epidemiologia, patogenia, patologia, imunologia e técnicas de diagnóstico são realizadas há mais de dois séculos entretanto, estudos neuroistopatológicos completos da cinomose são escassos e antigos, pois foram realizados principalmente nas décadas de 1940 e 1950 (SILVA, 2009). Estudos neuroistopatológicos recentes são ainda mais incomuns (AMUDE *et al.* 2007).

Com efeito, o presente estudo pretende encontrar uma diminuição nas lesões provocada pelo vírus, nos animais tratados com ribavirina, assim como a diminuição da quantidade viral presente no encéfalo de animais naturalmente infectados com a cinomose.

## 2. Revisão da Literatura

Os cães infectados pelo vírus da cinomose desenvolvem sinais clínicos e lesões respiratórias, gastrintestinais, dermatológicas, oftálmicas e neurológicas, que podem ocorrer sequencialmente ou isoladamente (GREENE, 2012).

Os cães jovens são mais afetados, embora possa ocorrer em animais de todas as idades (JÓZWIK & FRYMUS, 2002). O declínio de anticorpos maternos, a não utilização de vacinas e a falha vacinal são responsáveis pelo grande número de casos que ainda são observados (CHAPPUIS, 1995). O vírus tem predileção por células epiteliais, linfóides (principalmente células T) e o tecido nervoso (ALVES *et al.*, 2006).

Durante a encefalite aguda de cães jovens a expressão do RNA mensageiro (mRNA) e da proteína viral são elevadas nas áreas afetadas e uma possível consequência é o aumento da produção do Fator de Necrose Tumoral (TNF) pelos astrócitos. Este efeito tem sido apontado como causa da destruição de oligodendrócitos e da perda de mielina (GROÖNE *et al.*, 2003).

A encefalite multifocal em cães adultos acomete frequentemente animais entre 4 e 6 anos, com curso crônico. Esta enfermidade não é precedida nem coincidente com os sinais sistêmicos. O antígeno do vírus fica restrito a poucos astrócitos e a expressão do Complexo de Histocompatibilidade Principal (MHC) é proeminente em todas as células da micróglia, sendo responsável pela desmielinização contínua e infiltração mononuclear perivascular disseminada.

As alterações têm início com hiperplasia dos astrócitos e proliferação microglial na substância branca. Esta forma também está associada com a alta concentração de anticorpos antimielínicos, podendo ser uma reação secundária ao processo inflamatório. Anticorpos contra o vírus interagem com macrófagos infectados em lesões no SNC, causando sua ativação com liberação de radicais livres de oxigênio. Esta atividade, por sua vez, pode levar à destruição de oligodendrócitos e bainha de mielina (MANGIA & PAES, 2008).

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

1992; VANDEVELDE e ZURBRIGGEN, 2005). Esta fase da enfermidade pode ser utilizada como modelo experimental para a esclerose múltipla em humanos.

Em necrópsias de cães com cinomose, existem poucas ou nenhuma alteração característica da doença, somente lesões secundárias devidas ao desenvolvimento da doença como dermatite pustular (GREENE, 2012), pneumonia, enfisema, focos hemorrágicos e congestão (LAN *et al.*, 2006), timo parcialmente ou completamente atrofiado e linfonodos ocasionalmente reativos, congestos e/ou hemorrágicos (SONNE, 2008). A hiperqueratose ortoqueratótica e/ou paraqueratótica de coxins também estão presentes nessa doença (ENGELHARDT *et al.*, 2005). Cães infectados antes da erupção dos dentes permanentes podem apresentar hipoplasia do esmalte dentário. Nestes animais, há a exposição da dentina que na macroscopia é demonstrado por áreas de coloração amarelada nos dentes permanentes (GELBERG, 2007).

Alterações macroscópicas no sistema nervoso central (SNC) não são comuns, embora quando presentes manifesta hiperemia das leptomeninges (SILVA, 2009) e excesso de líquido cefalorraquidiano, por vezes com dilatação ventricular (GREENE, 2012). Malacia e cavitação podem ocorrer na substância branca em alguns casos com lesão inflamatória crônica ou desmielinização acentuada (SUMMERS *et al.*, 1995). Certas lesões macroscópicas na substância branca ocorrem com determinada frequência, a ponto de garantir a sua visualização em exame macroscópico cuidadoso do SNC (SUMMERS *et al.*, 1995). Outros autores afirmam que lesões macroscópicas podem ser observadas no lobo piriforme em alguns cães que apresentam convulsão em “goma de mascar” ou generalizadas (McGRATH, 1960). Estudos realizados por Silva *et al.* (2007) confirmaram que aproximadamente 12% dos cães necropsiados morreram devido às complicações neurológicas causadas pelo vírus da cinomose.

O diagnóstico da infecção pelo vírus da cinomose é de difícil realização e geralmente é fundamentado nos sinais clínicos e no histórico de vacinação (NELSON & COUTO, 2001). Achados macroscópicos e sinais clínicos apenas sugerem o diagnóstico de cinomose, mas para a confirmação do mesmos são necessários exames complementares, achados hematológicos como leucopenia por linfopenia.

Em alguns animais se observa trombocitopenia e anemia regenerativa, ou a visualização de corpúsculos de inclusão em leucócitos e hemácias

(GREENE, 2012) e no estágio crônico da inflamação, o líquido cefalorraquidiano pode apresentar aumento de proteína acima de 25mg/dL, principalmente representado por IgG antivírus e aumento de células com predomínio de linfócitos (CORRÊA & CORRÊA, 1992; TIPOLD *et al.*, 1992; SUMMERS *et al.*, 1995; GREENE, 2012).

Adicionalmente, técnicas como isolamento viral, imunofluorescência direta, reação de cadeia pelo PCR em amostras de líquido, sangue periférico e medula óssea, e a imunistoquímica, têm contribuído com o diagnóstico etiológico de diversas viroses em animais. As principais vantagens dessa técnica, precedida por uma etapa de transcrição reversa (RT-PCR) para os vírus RNA, incluem a rapidez na obtenção dos resultados, a não exigência da infeciosidade da partícula viral e os altos níveis de sensibilidade e especificidade (FRISK *et al.*, 1999; GEBARA *et al.*, 2004; SAITO *et al.*, 2005).

Atualmente, a RT-PCR tem sido utilizada com sucesso na detecção do vírus da cinomose em diferentes tipos de amostras biológicas provenientes de cães com sinais clínicos respiratórios, digestórios e neurológicos (GEBARA *et al.*, 2004).

As alterações histopatológicas, caracterizadas principalmente pela visualização de corpúsculos de inclusão viral eosinofílicos, intracitoplasmáticos e intranucleares (Corpúsculo de Lentz), localizados em células epiteliais linfóides e no SNC também confirmam o diagnóstico (SONNE, 2009).

A falta de tratamento antiviral efetivo para a infecção do vírus da cinomose requer tratamento suporte e sintomático (TIPOLD *et al.*, 1992; CORRÊA & CORRÊA, 1992). A ribavirina é um fármaco antiviral, análogo à guanósina, inibidora da replicação “*in vitro*” de certos RNA e DNA-vírus e, no grupo dos *Paramyxovirus*, todos são sensíveis a ribavirina, dos quais o vírus do sarampo é o mais sensível (CHANG & HEEL, 1981).

Segundo Elia *et al.* (2008) a ribavirina causa mutações no vírus da cinomose que levam a um erro catastrófico na formação do genoma viral. Pode ser especulado que a ribavirina interfere com a RNA polimerase pela competição com nucleosídeos naturais e produz erro na terminação da cadeia de RNA do vírus. Além disso, a ribavirina afeta o vírus ainda no meio extracelular, de maneira precoce no seu ciclo de replicação.

Segundo Mangia (2011), a ribavirina demonstrou efetividade contra o vírus da cinomose em animais na fase aguda com sinais neurológicos, com

melhora sensível do quadro clínico. Além disso, observou-se que o Dimetil-Sulfóxido (DMSO) potencializou a ação antiviral da ribavirina, aumentando o seu poder de difusão tecidual, tornando sua ação mais eficaz frente ao vírus.

Nos resultados de Mangia (2011) foi observada variação do estado clínico dos animais do experimento a partir do décimo dia de administração da ribavirina por via oral. Sugeriu-se que o sistema imune influenciou no quadro geral do animal, com relação à produção de radicais livres de oxigênio (ROS), citocinas e anticorpos antimielina consequente à ação viral, que tem início ao redor de três semanas pós-infecção (GREENE, 2012).

Segundo os relatos de Vandeveld & Zurbruggen (2005) podemos afirmar que a presença de linfócitos no líquido, mesmo após o tratamento, pode significar uma resposta a essa produção de citocinas, desencadeada na presença do antígeno viral, que induzem a migração de mais células e podem manter a inflamação no SNC, resultando em resposta imunomediada. Estas complicações imunológicas podem ser responsáveis pelo óbito de alguns animais da pesquisa de Mangia (2011), que não chegaram ao final do tratamento. No entanto, na análise dos valores absolutos de linfócitos, Mangia (2008) verificou que houve uma diminuição da contagem de linfócitos no líquido, porém não ocorreu normalidade, demonstrando um processo inflamatório ativo no SNC.

### 3. Justificativa

A cinomose na forma neurológica apresenta elevada morbidade e letalidade na população canina, mesmo em animais vacinados. Esta forma da doença impossibilita os cães a levarem vida normal devido às graves sequelas, ou mesmo apresenta alta letalidade devido às lesões de áreas vitais do sistema nervoso central (SNC).

Na região de Botucatu/SP, considerada região endêmica, o Serviço Ambulatorial de Enfermidades Infecciosas dos Animais da FMVZ-UNESP atende cerca de 400 casos/ano<sup>1</sup> de animais com suspeita de cinomose. Com o tratamento sintomático e de suporte, comumente utilizado nesta enfermidade, se observa taxa de mortalidade de aproximadamente 50% dos animais que atingem a fase neurológica.

Não havendo na literatura nenhum protocolo efetivo de tratamento para os cães nessa fase mais letal da cinomose, além de número reduzido de estudos experimentais, investigamos uma forma de ação terapêutica visando a diminuição da gravidade das lesões neurológicas e consequentes sequelas da doença em cães afetados.

Para tal, foi utilizada a ribavirina, medicamento antiviral nucleotídeo que atinge alta concentração no líquido (aproximadamente 70% em relação ao plasma sanguíneo). Partindo do princípio que a ribavirina foi pouco testada em cães, verificamos a necessidade de avaliar sua eficácia quando associada a outros fármacos a confirmação dos efeitos celulares.

Para tanto foram realizadas duas análises microscópicas do encéfalo: a histopatologia que detectou as lesões causadas pelo vírus e a imunohistoquímica, que marcou a presença do vírus da cinomose.

Para análise da eficácia da droga, na diminuição das lesões microscópicas e na multiplicação viral, foi feita a análise histocitológica e imunohistoquímica dos encéfalos dos animais tratados e não tratados.

<sup>1</sup> A.C. Paes, 2012 (Comunicação Pessoal)



## **4. Objetivos**

### 4.1. Gerais

Avaliar os achados histopatológicos e imunoistoquímicos de encéfalos de cães com cinomose tratados com ribavirina.

### 4.2. Específicos

1. Avaliar a atuação da ribavirina no encéfalo contra o vírus da cinomose.
2. Comparar a quantidade de vírus presente em encéfalo de animais tratados e não tratados com ribavirina utilizando a técnica de imunoistoquímica.
3. Avaliar pela histopatologia as lesões causadas pelo vírus no encéfalo de animais tratados com ribavirina e em animais não tratados com o antiviral.
4. Utilizar a técnica de RT-PCR em tempo real para diagnóstico positivo dos animais utilizando sangue total de todos os animais do estudo.

## **5. Materiais e Métodos**

Foram utilizados animais em fase clínica neurológica de cinomose, que por conveniência foram atendidos e eutanasiados no setor de Enfermidades Infecciosas dos Animais, do Hospital Veterinário, da FMVZ, UNESP/Botucatu/SP.

Antes da eutanásia, os cães foram submetidos a coleta de sangue total através da veia jugular. Em seguida, os animais foram eutanasiados conforme o protocolo sugerido pelo Departamento de Anestesiologia Veterinária da FMVZ – UNESP – Botucatu, SP, composto por Xilasina 2% na dose de 2mg/Kg IM. Após 5 minutos da aplicação de Tiopental 2,5%, diluído em 40 mL de H<sub>2</sub>O em 1g de Tiopental (25mg/Kg/IV) e 2 minutos após solução de KCl 19,1% (1-2mL/Kg/IV).

O sangue total foi processado no Laboratório de Diagnóstico Molecular no Instituto de Biociências da UNESP-Botucatu/SP do Departamento de Microbiologia e Imunologia, para a realização da RT-PCR em tempo real.

Após a eutanásia foi realizada a extração do encéfalo e armazenamento em frascos contendo formol 10% tamponado, visando a avaliação histopatológica na coloração de Hematoxilina e Eosina (HE) e para análise imunoistoquímica.

### **5.1 Animais**

Foram utilizados 26 cães em fase neurológica com suspeita de cinomose, sem predileção por idade e sexo. Foram utilizados cães com sinais neurológicos mostrando padrão inflamatório/infeccioso, com caráter progressivo e multifocal. Os animais foram divididos em dois grupos, compostos por 12 animais sem ribavirina e 14 animais tratados com ribavirina.

Os casos graves, com evolução desfavorável e que não responderam ao tratamento, e se encontravam em agonia e situação incompatível com a vida foram eutanasiados, e os encéfalos utilizados no estudo.

## 5.2. Grupos

Foram utilizados 26 animais distribuídos em dois grupos conforme segue:

*Grupo 1:* composto por 12 animais não tratados com ribavirina atendidos na rotina ambulatorial nos quais houve a opção pela eutanásia do animal devido a evolução desfavorável da doença.

*Grupo 2:* composto por 14 animais tratados com ribavirina na dose de 30 mg/Kg, a cada 24 horas, durante 15 dias, eutanasiados devido a evolução desfavorável da doença.

Foram colhidas amostras de sangue através de punção de veia jugular de todos os animais dos grupos no momento da eutanásia, que em seguida foram devidamente congeladas em freezer a  $-80^{\circ}\text{C}$ .

## 5.3 Colheita do encéfalo

Com o auxílio de uma serra, foi realizada a extração da calota craniana com total visualização do encéfalo que retirado do crânio foi armazenado em frasco contendo formol 10%.

## 5.4. Técnica de Biologia Molecular

As técnicas de biologia molecular foram realizadas no Laboratório de Diagnóstico Molecular do Departamento de Microbiologia e Imunologia, Instituto de Biociências da UNESP, Botucatu-SP.

A extração do material genético foi realizada através do kit Total RNA purification kit (17200; NORGEN) conforme recomendações do fabricante.

#### **5.4.1. RT-PCR em Tempo Real (RT-qPCR) e NESTED-PCR em Tempo Real (NESTED-qPCR)**

A reação de RT-qPCR e a análise de dados foram executadas no equipamento de Real Time-PCR ABI 7300 System (Applied BioSystems). A reação foi realizada utilizando o kit Quanti fast SYBER Green RT-PCR (204156; Quiagen) em volume final de 20.0 µl, contendo 6.6 µl de água livre de Dnase/Rnase, 0.6 µL de cada iniciador CDV-1 sense (5'-ACAGGATTGCTGAGGACCTAT-3') e CDV-2 antisense (5'-CAAGATAACCATGTACGGTGC-3') descritos por Frisk et al., 1999, para concentração final de 300nM, 10.0 µL de 2x SYBER Green Master mix, 0.2 µL de Fast RT Mix e 2.0 µL de RNA. A reação de transcrição reversa foi realizada a 50°C por 10 minutos, desnaturação inicial a 95°C por 5 minutos, 40 ciclos de 95°C por 10 segundos e 60°C por 30 segundos, seguidos da curva de dissociação.

As amostras negativas na RT-qPCR foram submetidas à reação de NESTED-qPCR com a finalidade de aumentar a sensibilidade do método diagnóstico. A reação de NESTED-qPCR e análise dos dados foram executadas no equipamento de Real Time-PCR ABI 7300 System (Applied BioSystems). A reação foi realizada utilizando o kit Maxima® SYBER Green/ROX qPCR Master Mix (2X) (K0221; Fermentas) em volume final de 20 µl, contendo 0.4 µl de cada iniciador CDV-For (5'-AGC TAG TTT CAT CTT AAC TAT CAA ATT-3') e CDV-Rev (5'-TTA ACT CTC CAG AAA ACT CAT GC-3'), descrito por Elia et al., 2006, para concentração final de 300 nM, 10 µl de Go Taq qPCR Master Mix 2X e 0.18 µl de ROX passive reference dye. A reação de NESTED-qPCR foi realizada com desnaturação inicial a 94°C por 2 minutos, 20 ciclos de 94°C por 3 segundos e 60°C por 30 segundos, seguidos da curva de dissociação.

### **5.5. Processamento Histopatológico e Imunoistoquímico**

Todas as amostras de encéfalos do grupo tratado com Ribavirina e do grupo não tratado foram colhidos e fixados em solução de formalina a 10% tamponada, por 72 horas. Após a fixação foram lavados por 1 hora e em seguida armazenados em solução de álcool a 70%. Todas as amostras amostras do encéfalo foram colhidas obedecendo dois cortes. O primeiro corte foi sagital mediano no verme cerebelar até o tronco encefálico, separando uma porção do cerebelo e tronco encefálico (Fig. 1); já o segundo corte foi realizado na inserção do quiasma óptico, transversalmente ao córtex cerebral, separando o tálamo, hipocampo e córtex cerebral (Fig. 2). Os fragmentos do encéfalo foram processados de acordo com a técnica de rotina histopatológica para inclusão em parafina. Cortes com 4  $\mu\text{m}$  de espessura foram obtidos em micrótomo rotativo, depositados em lâminas e em seguida permaneceram em estufa a 60°C por 12 horas para fixação dos cortes à lâmina. Os cortes destinados a técnicas de imunistoquímica, compostos por 7 encéfalos de cada grupo, foram depositados em lâminas histológicas (Tissue-Tek<sup>®</sup>, AutoWrite). Após este procedimento, as lâminas foram submetidas aos processos de desparafinização e hidratação; e em seguida as mesmas foram coradas pelos métodos da Hematoxilina e Eosina (HxE), e pelo anticorpo monoclonal Canine Distemper Vírus (Lifespan biosciences), clone DV2-12.

As lâminas destinadas à técnica de imunistoquímica, foram submetidas ao bloqueio da peroxidase endógena, utilizando solução de água oxigenada a 30 volumes diluída em metanol na proporção de 1:9, por 15 minutos. Em seguida as lâminas foram lavadas em solução de TRIS pH 7,4. Depois os cortes foram imersos em solução tampão de citrato 10 mM, pH 6,0 e submetidos à recuperação antigênica em forno de microondas (potência máxima – 700 watts) por 5 minutos, deixando esfriar e repetindo o mesmo procedimento mais duas vezes. O material foi resfriado até atingir a temperatura ambiente. Após esfriarem as lâminas foram lavadas por três vezes por 5 minutos em solução de TRIS-HCl pH 7,4.

As lâminas foram incubadas com o anticorpo primário em câmara úmida por 18 horas, a 4°C, e lavadas em solução TRIS-HCl, pH 7,4. Em seguida, foram incubadas com o anticorpo secundário anti-mouse (kit Estreptoavidina DBS – Cód. KP-500- BIOGEN) à temperatura ambiente por trinta minutos. O kit Estreptoavidina DBS (KP-500- Biogen) é pronto para uso, não necessitando diluição prévia. Após esta etapa o material foi lavado com TRIS-HCl, pH 7,4.

Para visualização da reação, os cortes foram tratados com solução de 3,3'diaminobenzidina (Sistema Substrato DAB, DABC-032 – Spring Bioscience) durante dez minutos. Posteriormente os cortes foram lavados por três vezes com TRIS-HCl pH 7,4, e contra-corados com hematoxilina de Mayer. As lâminas foram avaliadas pela intensidade da marcação imunoistoquímica em todas as porções do encéfalo descritas anteriormente. As reações foram graduadas como negativa ou positiva.

## 6. Análise Estatística

Inicialmente a distribuição das variáveis-resposta foi analisada com um dos critérios para escolha do método analítico. Estatísticas descritivas foram produzidas para descrever características da população (peso, raça, sexo e idade) incluída em cada grupo do estudo. O teste de Kruskal-Wallis (PAGANO e GAUVREAU, 2000) foi usado para comparar o escore mediano de cada variável-resposta entre os grupos tratados e não tratados. A análise estatística foi realizada com o procedimento PROC NPAR1WAY (SAS Institute, 2009) e significância estatística foi definida para valores de  $P < 0,05$ .

## 7. Resultados e Discussão

### 7.1. Dados gerais

Os animais utilizados no estudo foram selecionados pelos sinais clínicos como alterações neurológicas compatíveis com a enfermidade. Os animais que tinham histórico neurológico de no máximo 7 dias de evolução, foram selecionados para o tratamento com Ribavirina 30mg/Kg uma vez ao dia por 15 dias. Neste caso foram selecionados 14 animais para se obter o grupo dos animais tratados, que pela evolução desfavorável da doença optou-se pela eutanásia. No caso do grupo controle, não houve a adição do fármaco no tratamento. Assim, pela evolução da doença os animais foram eutanasiados, este grupo não tratado foi composto por 12 animais.

A idade dos cães variou entre 4 meses e 8 anos. Do total de cães, 12 animais (46,15%) tinham mais de 1 ano de idade, 6 animais do grupo tratado e 6 animais do grupo controle, enquanto que 14 animais (53,85%) eram filhotes. Desdes, 8 animais no grupo tratado e 6 animais do grupo controle (Tabela 1). A presença de maior quantidade de filhotes também foi relatada por outros autores (JÓZWIK e FRYMUS, 2002; SONNE, 2008). Sabe-se que apesar do vírus afetar animais de todas as idades, os filhotes são mais predispostos, principalmente pela queda da imunidade materna, não utilização de vacinas e a realização de programas de imunização incorretos (SONNE, 2008; GREENE, 2012).

Dentre os 26 cães, 19 eram SRD (sem raça definida) constituindo 47,37% (9 animais) do grupo controle e 52,63% (10 animais) do grupo tratado. Foram amostrados um Husky no grupo tratado, um Pastor Alemão em cada grupo, um Pointer no grupo tratado, dois Poodle's no grupo controle e um no grupo tratado (Tabela 2). Outros estudos com cinomose em cães também mostraram que não existe predisposição racial na doença (GREENE, 2012; SONNE, 2008).

O sexo dos animais variou entre dez fêmeas (38,46%), cinco fêmeas em cada grupo. Foram utilizados 16 machos (61,54%), dos quais 9 machos no grupo tratado e sete machos no grupo sem tratamento (Tabela 3). Apesar destes dados demonstrarem maior acometimento em cães machos, nenhuma predisposição sexual é apontada na cinomose canina (GREENE, 2012).

Dentre as características idade, sexo e raça não foram encontradas diferenças estatisticamente significantes entre os grupos, demonstrando valor de



$p$  maior que 0,05 concluindo assim, a homogeneidade entre os grupos controle e tratado.

## 7.2. Análise histopatológica

A análise histopatológica constituiu na avaliação dos seguintes segmentos encefálicos: córtex cerebral, cerebelo, tálamo, tronco encefálico, hipocampo e no caso de visualização de manguito perivascular também foi identificado em meninge. A partir dessas regiões foi possível identificar e classificar lesões como: desmielinização; presença de manguitos perivasculares, edema, necrose neuronal, alterações vasculares (congestão, hemorragia e trombose) e alterações inflamatórias (meningite, meningoencefalite e meningoencefalomielite).

A desmielinização é uma lesão que está sempre presente quando o SNC de cães é acometido pelo vírus da cinomose (GREENE, 2012). No presente estudo, na microscopia das estruturas encefálicas, observou-se que a desmielinização frequente nos dois grupos, e que quando comparados estatisticamente não ocorreu diferença significativa, com exceção do cerebelo, onde houve diminuição significativa da lesão no grupo tratado. O cerebelo teve como principal lesão microscópica a desmielinização. SONNE (2008) também observou esta lesão em 89,6% dos casos, enquanto Silva *et al.* (2007) constataram a desmielinização em 89,4% dos cães com cinomose. Portanto, no presente estudo, o uso da ribavirina diminuiu a ação do vírus nessa região encefálica.

Já em relação a formação de manguitos perivasculares não foi visualizada diminuição, se mantendo baixa em ambos os grupos. Nem todos os animais apresentaram a formação de manguitos perivasculares, fato também referido por SONNE (2008) que notou essa alteração em 20,7% dos cães com cinomose nervosa. Casos de cinomose com inflamação constituída de infiltrado mononuclear perivascular são classificados como subagudos ou crônicos. Na doença subaguda, a desmielinização é mais intensa do que na fase aguda, e é acompanhada de inflamação leve. No entanto, não ocorre malácia, que é possível notar nos resultados deste experimento. O conceito

corrente de que cães jovens apresentam lesões predominantemente agudas (FENNER, 2004; SUMMERS *et al.*, 1995), não foi confirmado no presente estudo, pois a maioria dos filhotes apresentou lesões classificadas como subagudas ou crônicas, assim indicando que é impreciso inferir as lesões da cinomose com base exclusivamente na idade dos cães. Neste caso, a cepa viral presente em cada animal é desconhecida, justificando a desproporção encontrada deste tipo de alteração, já que algumas cepas apresentam tropismo pelos neurônios provocando necrose laminar cortical, enquanto outras possuem tropismo por astrócitos e oligodendrócitos causando desmielinização e outras causam infecções persistentes no sistema nervoso central (KOUTINAS *et al.*, 2004).

Houve diminuição considerável do edema em todas as estruturas avaliadas, nos animais estudados. A ribavirina se mostrou bastante eficaz no tocante à redução inflamatória encefálica, assim como a necrose neuronal foi menor em quase todas as estruturas avaliadas no grupo tratado, com exceção do tálamo.

Dentre as alterações vasculares e inflamatórias podemos destacar a diferença entre os grupos apenas em relação a congestão das estruturas. Em contraste, alterações como hemorragia, trombose, meningite, meningoencefalite e meningoencefalomielite não apresentaram diferenças estatisticamente significantes entre os grupos.

### **7.3. Avaliação Imunoistoquímica**

A análise imunoistoquímica foi realizada em sete animais de cada grupo. Assim, de maneira similar a avaliação histopatológica, as mesmas estruturas encefálicas foram analisadas para avaliação e marcação viral imunoistoquímica. No grupo tratado a maior marcação viral ocorreu em cerebelo, tronco encefálico, tálamo, córtex cerebral e hipocampo respectivamente. Já no grupo controle ocorreu também em cerebelo, tálamo, tronco encefálico, córtex cerebral e hipocampo.

No cerebelo, tálamo e tronco encefálico dos animais tratados com ribavirina, ocorreu uma redução estatisticamente significativa do número de partículas virais nas estruturas neurais mencionadas observadas na imunoistoquímica. Este achado evidencia que este fármaco antiviral exerceu ação eficaz frente ao Morbilivírus, embora os animais não tenham sobrevivido. Porém sinaliza que a ribavirina possui ação terapêutica em cães com cinomose, como foi demonstrado no estudo de Mangia (2011), no qual foi obtido êxito aumentando o número de cães sobreviventes em animais tratados com este antiviral.

Os resultados do presente estudo evidenciaram que a ribavirina exerceu ação antiviral em cerebelo, córtex cerebral, tálamo, hipocampo e tronco encefálico, evidenciada pela redução de edema e necrose neuronal.

Também foi observado pelo estudo histopatológico que a ação da ribavirina no cerebelo, diminuiu de forma significativa as lesões desmielinizantes no órgão, por provável difusão e ação direta sobre o Morbilivírus, impedindo dessa maneira o estabelecimento do quadro de inflamação crônica que leva a consequente atividade autoimune contra bainha de mielina.

Mais estudos são necessários para elucidar a atuação da droga frente ao vírus da cinomose, mas já é possível conseguir fundamentar um novo protocolo no tratamento desta doença cujo neuropatologia é de extrema complexidade e letalidade.

## **8. Conclusões**

- 1.** A utilização da Ribavirina® reduziu a quantidade de vírus significativamente em cerebelo, tronco encefálico e tálamo nos animais tratados.
- 2.** A Ribavirina® mostrou ação antiinflamatória em todas as áreas encefálicas avaliadas, com característica redução de edema e necrose, observados nos exames histopatológicos ao avaliarmos o grau das lesões.

## ANEXO

TABELA 1: Análise entre as idades entre os grupos controle e tratados

Idade					
Grupo	n	Média	Mediana	Mínimo (meses)	Máximo (meses)
C	12	22,75	11	4	96
T	14	19,57	12	6	72
<b>p= 0.94</b>					

TABELA 2: Análise entre as raças dos grupos controle e tratados

Raça			
	controle	tratados	
<b>Husky</b>	0 0%	1 100%	1
<b>Pastor Alemão</b>	1 50,00%	1 50,00%	2
<b>Pointer</b>	0 0%	1 100%	1
<b>Poodle</b>	2 66,67%	1 33,33%	3
<b>SRD</b>	9 47,37%	10 52,63%	19
<b>p= 1,00</b>			

TABELA 3: Análise entre o sexo dos animais entre os grupos controle e tratados

Sexo		
	controle	Tratados
<b>fêmeas</b>	5 50%	5 50%
<b>machos</b>	7 43,70%	9 56,35%
<b>p= 1,00</b>		

TABELA 4: Score de lesão histopatológica

**Legenda:** **Id:** identificação; **m:** macho; **f:** fêmea; **idade é dada em meses;** **srd:** sem raça definida; **poi:** Pointer; **hus:** Husky; **poo:** Poodle; **pal:** Pastor Alemão; **t:** tratados; **c:** controle; **dcor:** desmielinização em córtex cerebral; **dcer:** desmielinização em cerebelo; **dtal:** desmielinização em tálamo; **dtro:** desmielinização em tronco encefálico; **dhpc:** desmielinização em hipocampo; **mcor:** manguito perivascular em córtex cerebral; **mcer:** manguito perivascular em cerebelo; **mtal:** manguito perivascular em tálamo; **mtro:** manguito perivascular em tronco encefálico; **mhpc:** manguito perivascular em hipocampo; **mng:** manguito perivascular meningeano; **ecor:** edema em córtex cerebral; **ecer:** edema em cerebelo; **etal:** edema em tálamo; **etro:** edema em tronco encefálico; **ehpc:** edema em hipocampo; **ncor:** necrose neuronal em córtex cerebral; **ncer:** necrose neuronal em cerebelo; **ntal:** necrose neuronal em tálamo; **ntro:** necrose neuronal em tronco encefálico; **nhpc:** necrose neuronal em hipocampo; **avcong:** alterações vasculares – congestão; **avhem:** alterações vasculares – hemorragia; **avtro:** alterações vasculares – trombose; **men:** meningite; **mng:** meningoencefalite; **mem:** meningoencefalomielite.

**0:** ausência de alteração; **1:** alteração leve; **2:** alteração moderada; **3:** alteração acentuada

id	sexo	Idade	raça	grupo	dcor	dcer	dtal	dtro	dhipc	Mcor	mcer	mtal	Mtro	mhipc	mng	ecor	ecer	etal	etro	ehpc	ncor	ncer	ntal	ntro	nhipc	avcong	Avhem	avtro	men	mgc	Mem
1	m	72	srd	t	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2	2	2	2	2	1	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0
2	m	12	poi	t	0	2	1	0		0	0	0	0	0	0	2	2	2	2	2	1	2	1	1	1	1	1	0	0	0	0
3	m	13	srd	t	2	2	1	2	1	0	0	0	0	0	1	3	3	3	3	3	1	1	0	1	1	1	0	0	1	0	0
4	f	24	srd	t	0	2	0	2	2	3	3	3	3	3	3	3	2	2	2	2	1	1	1	2	1	1	0	0	0	1	0
5	f	8	hus	t	0	2	1	2	1	1	1	1	1	1	1	2	2	2	2	2	1	1	1	1	1	1	0	0	0	1	0
6	m	6	srd	t	3	3	3	3	3	0	0	0	0	0	1	3	3	3	3	3	1	1	1	1	1	1	0	0	1	0	0
7	f	18	srd	t	2	2	1	1	1	0	0	0	0	0	0	2	2	2	2	2	1	1	1	0	1	2	1	0	0	0	0
8	m	6	srd	t	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0	1	2	1	1	1	1	0	0	0	0	0	2	1	0	1	0	0
9	m	6	srd	t	3	2	2	2	1	0	0	0	0	0	1	2	2	2	2	2	1	1	1	1	0	2	0	0	0	1	0
10	f	12	srd	t	3	3	2	2	2	0	0	0	0	0	1	2	2	2	2	2	1	1	1	0	0	1	0	0	1	0	0
11	m	10	poo	t	2	3	2	2	2	0	0	0	0	0	1	2	1	1	1	1	1	0	1	0	0	2	0	0	1	0	0
12	f	15	srd	t	2	2	2	1	1	0	0	0	0	1	0	2	2	2	2	2	1	1	1	1	1	2	2	0	0	0	0
13	m	12	pal	t	2	2	2	1	1	0	0	0	0	1	0	2	2	2	2	2	1	1	1	1	1	2	0	0	0	0	0

14	m	60	srd	t	2	2	2	2	1	0	0	0	0	1	2	2	2	2	1	1	1	1	1	2	0	0	0	1	0	
15	m	12	srd	c	1	3	2	3	0	2	1	2	0	0	3	3	3	3	2	1	3	1	1	2	2	0	0	0	0	0
16	m	9	poo	c	1	3	1	1	1	0	0	0	0	0	3	3	3	3	3	1	3	1	3	3	3	0	0	0	0	0
17	m	13	srd	c	1	3	2	1	2	0	0	0	0	1	3	3	3	3	1	3	1	1	2	2	0	0	0	1	0	0
18	m	9	poo	c	3	3	2	1	2	0	0	1	0	0	3	3	3	3	1	2	0	1	1	2	0	0	0	0	0	1
19	m	15	srd	c	1	3	3	3	2	2	0	1	2	3	3	3	3	2	2	2	1	2	2	2	0	0	2	0	0	0
20	f	10	srd	c	3	3	1	1	1	0	0	0	0	0	3	3	3	3	1	1	0	1	2	1	0	0	0	0	0	0
21	m	14	srd	c	1	3	1	1	1	0	0	0	0	0	3	3	3	3	1	1	1	1	3	0	0	0	0	0	0	0
22	f	96	pal	c	3	3	1	3	0	0	3	1	0	2	3	3	3	2	1	2	1	2	1	3	1	0	2	2	0	0
23	f	4	srd	c	1	3	2	3	1	0	0	0	0	0	3	3	3	3	2	2	1	1	2	0	0	0	0	0	0	0
24	f	9	srd	c	3	3	3	3	3	2	1	3	1	0	3	3	3	3	2	2	2	1	3	0	0	0	0	0	2	0
25	f	72	srd	c	2	1	2	1	0	0	0	1	0	0	3	2	3	2	2	2	2	2	2	2	1	0	1	0	0	0
26	m	10	srd	c	1	3	3	3	1	0	2	2	2	2	3	3	3	3	2	2	2	2	2	3	2	0	0	2	0	0

**TABELA 5: Análise estatística das das lesões histopatológicas comparando grupo tratado e controle, coradas em EOSINA-HEMATOXILINA.**

Legenda: **mt:** média grupo tratados; **mc:** média grupo controle; **p:** estatisticamente significativa.

	<b>córtex cerebral</b>	<b>Cerebelo</b>	<b>tálamo</b>	<b>Tronco</b>	<b>hipocampo</b>	<b>Meningeano</b>
<b>Desmielinização</b>	mt: 1,6428 mc: 1,7500 p= 0,9365	mt: 2,0714 mc: 2,8333 p= 0,0047	mt: 1,4285 mc: 1,9166 p= 0,2001	mt: 1,50 mc: 2,00 p= 0,2782	mt: 1,3846 mc: 1,1666 p= 0,5259	
<b>Manguito Perivascular</b>	mt: 0,3571 mc: 0,3333 p= 0,8532	mt: 0,2857 mc: 0,6666 p= 0,2902	mt: 0,2857 mc: 0,6666 p= 0,168	mt: 0,2857 mc: 0,5833 p= 0,1777	mt: 0,4285 mc: 0,0833 p= 0,2139	mt: 0,7857 mc: 0,7500 p= 0,7835
<b>Edema</b>	mt: 2,2142 mc: 3,000 p= 0,0006	mt: 2,000 mc: 2,9166 p= 0,0009	mt: 2,0 mc: 3,0 p= 0,0003	mt: 2,0000 mc: 2,9166 p= 0,0009	mt: 2,0714 mc: 2,8333 p= 0,0022	
<b>Necrose Neuronal</b>	mt: 0,9285 mc: 1,6666 p= 0,0034	mt: 0,9285 mc: 2,0000 p= 0,009	mt: 0,8571 mc: 1,2500 p= 0,0713	mt: 0,7857 mc: 1,5000 p= 0,0432	mt: 0,714 mc: 1,3333 p= 0,0109	

**TABELA 6: Estatística das alterações em encéfalo.**

**mt:** média grupo tratados; **mc:** média grupo controle; **p:** estatisticamente significativa

<b>Alterações vasculares e inflamatórias</b>			
	<b>mt</b>	<b>mc</b>	<b>P</b>
<b>Congestão</b>	1,5	2,4166	0,0025
<b>Hemorragia</b>	0,3571	0,6666	0,4522
<b>Trombose</b>	0	0	1
<b>Meningite</b>	0,3571	0,5	0,8792
<b>Meningoencefalite</b>	0,2857	0,6666	0,474
<b>Meningoencefalomielite</b>	0	0,0833	0,3255



**TABELA 7: Score de presença e marcação viral nos tecidos.**

**0:** ausência de alteração; **1:** alteração leve; **2:** alteração moderada; **3:** alteração acentuada.

Identificação	Córtex cerebral	Cerebelo	Tálamo	Tronco encefálico	Hipocampo
01 tratado	1	3	2	2	1
02 tratado	2	3	3	3	2
03 tratado	1	2	1	1	1
05 tratado	1	2	1	2	1
06 tratado	1	2	2	2	1
09 tratado	1	2	1	2	1
12 tratado	2	2	1	1	1
01 controle	2	3	3	3	2
05 controle	2	3	3	3	2
06 controle	1	3	3	3	1
07 controle	3	3	3	3	2
09 controle	2	3	3	3	1
11 controle	3	3	3	3	1
13 controle	1	3	2	3	1

**TABELA 8: Estatística da análise imunoistoquímica.**

**mt:** média grupo tratados; **mc:** média grupo controle; **p:** estatisticamente significativa

Imunoistoquímica			
	Mt	mc	P
<b>Córtex</b>	1,2857	2	0.1164
<b>cerebelo</b>	2,2857	3	0.0216
<b>Talamo</b>	1,5714	2,8571	0.0204
<b>Tronco</b>	1,8571	3	0.0114
<b>hipocampo</b>	1,1428	1,4285	0.3090

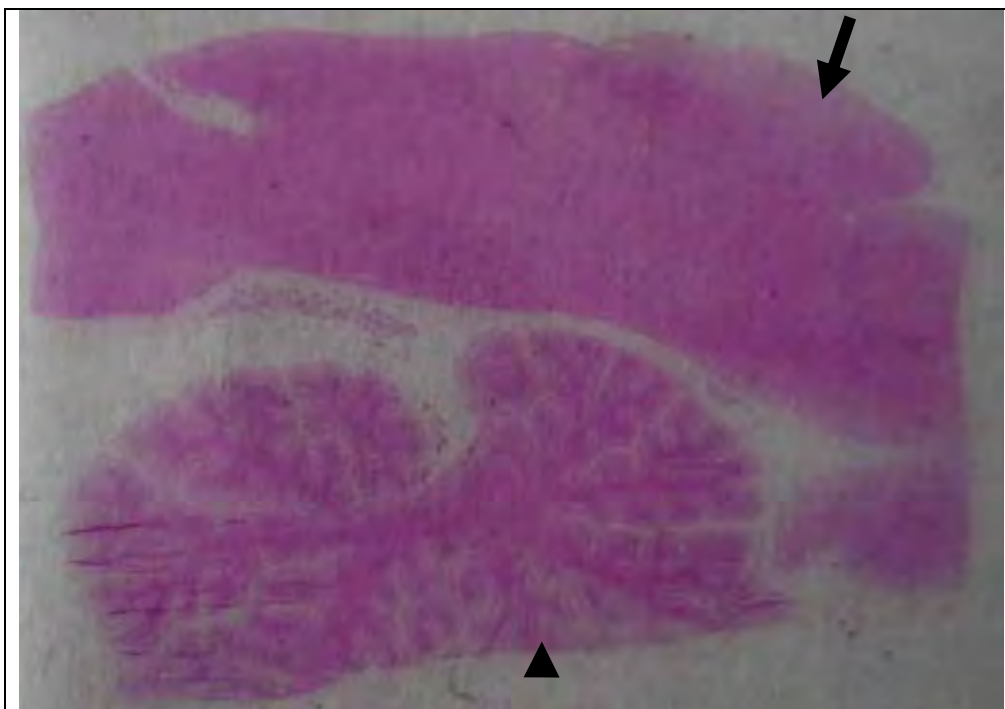


Fig. 1 – Análise histopatológica de cerebelo (cabeça de seta) e tronco encefálico (seta) de cães com cinomose em fase neurológica. Butucatu/SP- 2012.

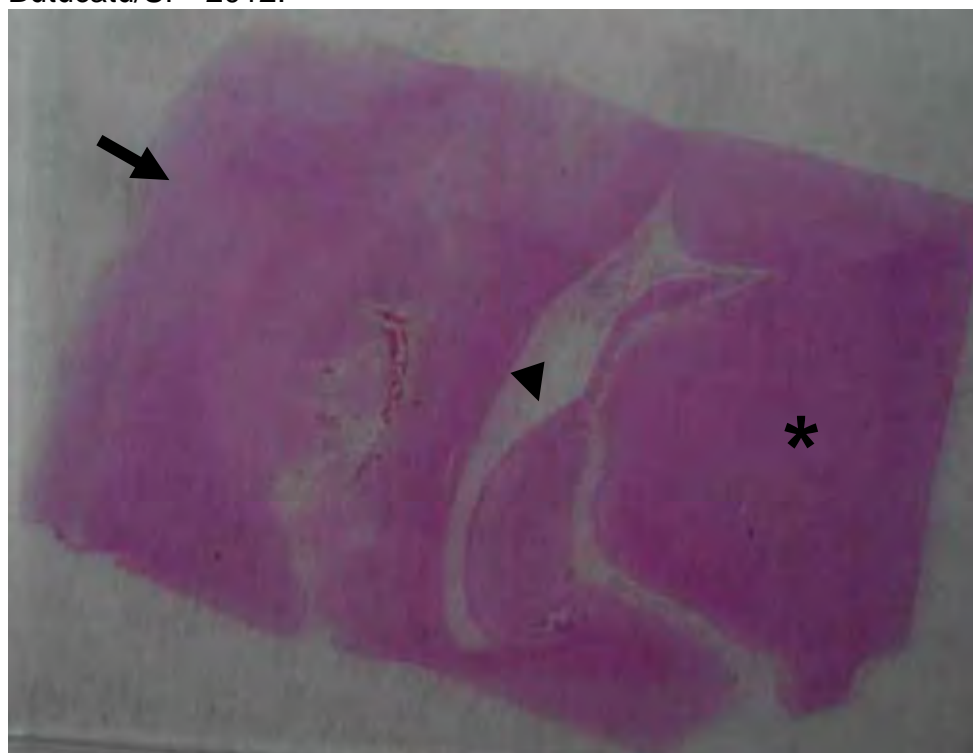
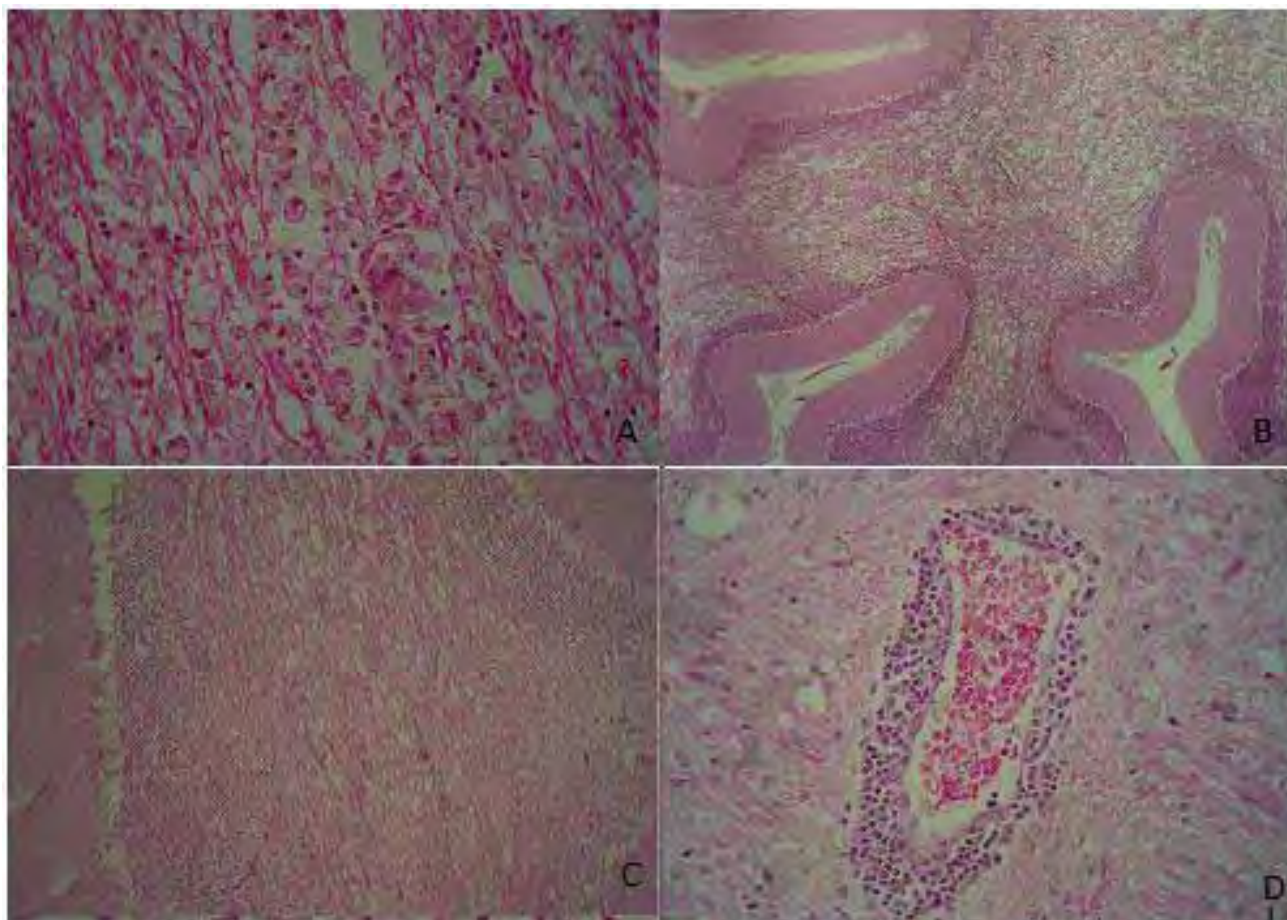
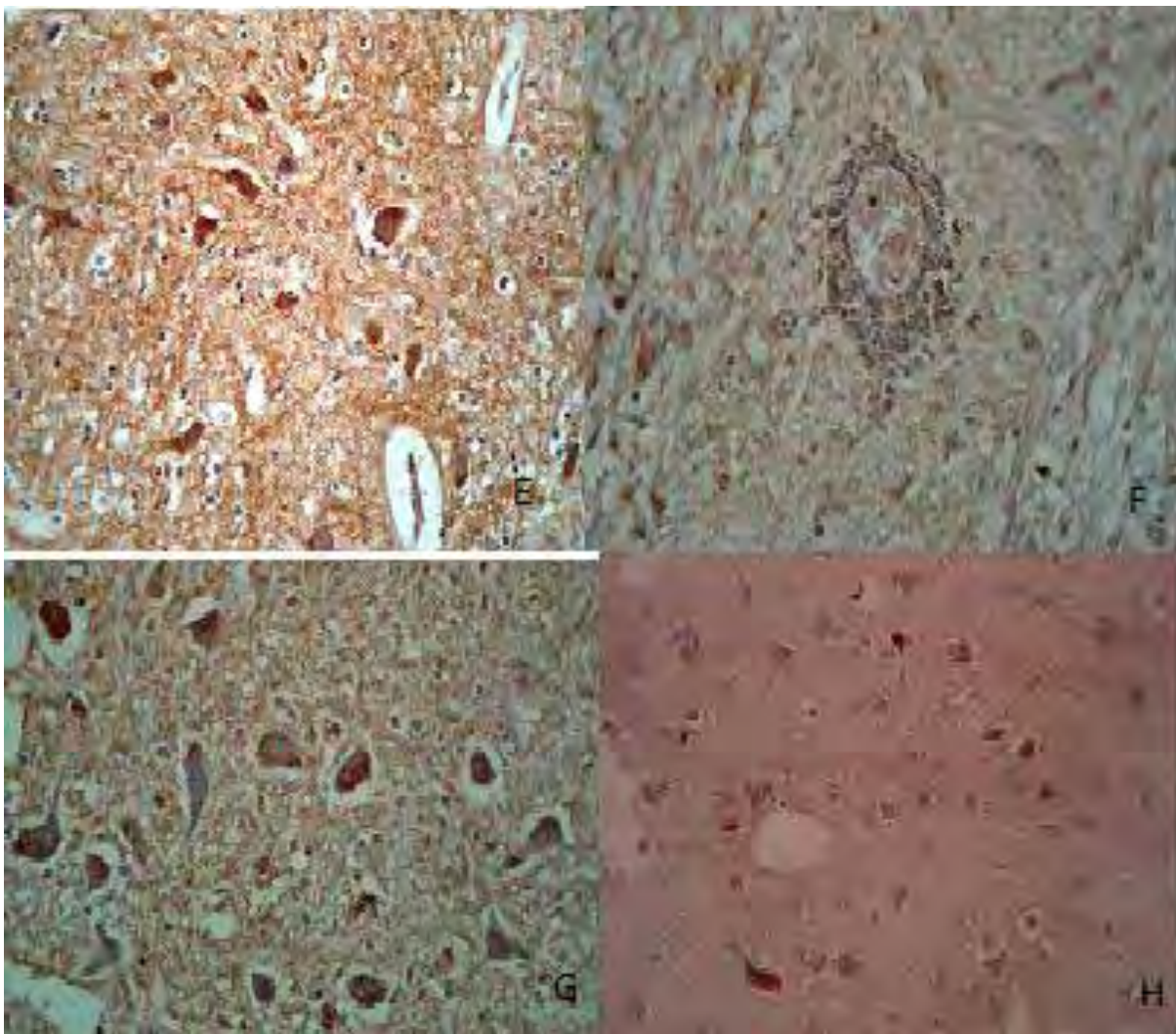


Fig. 2 – Análise histopatológica de tálamo (\*), hipocampo (cabeça de seta) e córtex cerebral (seta) de cães com cinomose em fase neurológica. Butucatu/SP- 2012

**Fonte:** Material coletado no Serviço Ambulatorial de Enfermidades Infecciosas dos Animais Domésticos - FMVZ-UNESP/Botucatu. Lâmina confeccionada no Serviço de Anatomia Patológica da Universidade do Oeste Paulista UNOESTE)Presidente Prudente – SP, sob a orientação do Prof. Dr. Osimar de Carvalho Sanches. Coloração Eosina- Hematoxilina



**FIGURA 3:** Material coletado na Enfermidade Infecciosas dos Animais Domésticos - FMVZ-UNESP/Botucatu. Lâmina confeccionada no Serviço de Anatomia Patológica da Universidade do Oeste Paulista (UNOESTE) – Presidente Prudente – SP, sob a orientação do Prof. Dr. Osimar de Carvalho Sanches. **Imagens histopatológicas em coloração eosina-hematoxilina:** A: desmielinização acentuada e macrófagos - cerebelo 400x; B: cerebelo - desmielinização - 100x; C: cerebelo - subs branca - desmielinização acentuada - 100 x; D: maguito perivascular



**FIGURA 4:** Material coletado na Enfermidade Infecciosas dos Animais Domésticos - FMVZ-UNESP/Botucatu. Lâmina confeccionada no Serviço de Anatomia Patológica da Universidade do Oeste Paulista (UNOESTE) – Presidente Prudente – SP, sob a orientação do Prof. Dr. Osimar de Carvalho Sanches. **Imagens imonohistoquímicas:** E:córtex cerebral; F: tronco encefálico; G: telencefálico com marcação viral em linfócitos do manguito perivascular); H: tálamo

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Alves, C.M.; Vasconcelos, A.C.; Martins, A.S.; Del Puerto, H.L.; Santos, F.G.A.; Nunes, J.E.S.; Campos, P.P.; Moro, L. Morphometric analysis of the thymus of puppies with the Snyder Hill Strain canine distemper virus. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*, v.58, n.4, p.472-479, 2006.

AMUDE, A.M.; ALFIERI, A.A.; ALFIERI, A.F. Clinicopathological findings in dogs with distemper encephalomyelitis presented without characteristic signs of the disease. *Res. Vet. Sci.* n.82, p.416–422, 2007.

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. *Vet. Microbiol.* n.4, p.351-358, 1995.

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.

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.

ELIA, G.; DECARO, N.; MARTELLA, V.; CIRONE, F.; LUCENTE, M.S.; LORUSSO, E.; TRANI, L.; BUONAVOGLIA, C. Detection of canine distemper virus in dogs by real-time RT-PCR. *Journal of virological methods*. v.36, no.1-2, p.171-6. 2006.

[Engelhardt, P.](#); [Wyder, M.](#); [Zurbriggen, A.](#); [Gröne, A.](#) Canine distemper virus associated proliferation of canine footpad keratinocytes in vitro. *Veterinary Microbiology*, v.42, n.10, p.1-12, 2005.

EYNARD, A.R.; VALENTICH, M.A.; ROVASIO, R.A. *Histologia e embriologia humanas: bases celulares e moleculares*. P. 46-67. Porto Alegre: Artmed. 2011

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

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*, Belo Horizonte, v. 56, n. 2, p. 168-174, 2004.

GELBERG, H.B. Alimentary System In: McGAVIN, M, D.; ZACHARY, J.F. *Pathologic Basis of Veterinary Disease*. p.25-41. 4 ed. St. Louis: Mosby Elsevier, 2007, p.301-391.

GREENE, C.E. *Infectious Disease of the Dog and Cat*. 4° Ed. Philadelphia: Saunders, 2012.

GROÖNE, A.; GRÖTERS, S.; KOUTINAS, A.; SARIDOMICHELAKIS, M.; BAUMGÄRTNER, W. Non-cytocidal infection of keratinocytes by canine distemper virus in the so-called hard pad disease of canine distemper. *Vet. Microbiol.* n. 96, p. 157–163, 2003.

JÓZWIK A. e FRYMUS T. Natural distemper in vaccinated and unvaccinated dogs in Warsaw. *J. Vet. Med. B.* n.49, p. 413-414, 2002.

KOUTINAS, A.F.; BAUMGÄRTNER, W.; TONTIS, D.; POLIZOPOULOU, Z.; SARIDOMICHELAKIS, M.N.; LEKKAS, S. Histopathology and immunohistochemistry of canine distemper virus-induced footpad hyperkeratosis (hard pad disease) in dogs with natural canine distemper. *Vet. Pathol.* n. 41, p. 2–9, 2004.

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. *Vet. Microbiol.* n. 115, p. 32-42, 2006.

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.; PAES, A. C. Neuropatologia da Cinomose. *Revista Veterinária e Zootecnia*, v. 15, n.3, p. 416-27, 2008.

MANGIA, S.H. *Avaliação ro tratamento experimental de cães naturalmente infectados com o vírus da cinomose na fase neurológica com ribavirina, prednisona e DMSO através da RT-PCR*. 2011. Tese (Doutorado) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista - Botucatu.

MARTELLA, V.; ELIA, G., BUONOVOLGIA, C. Canine distemper virus. *The Veterinary Clinics of North America . Small Animal Practice*, Philadelphia, v. 38, n. 4, p. 787-797, July 2008.

McGRATH, J.D. Inflammatory and infectious diseases. In: McGRATH, J. D. *The neurologic examination of the dog with clinic-pathological observations*. 2nd ed. Philadelphia: Lea & Febiger, 1960. cap. 12, p. 123-147.

NELSON, R. W., COUTO, C. G. *Medicina Interna de Pequenos Animais*. 2ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2001. p. 1084.

PAGANO, M. e K. GAUVREAU. 2000. *Principles of Biostatistics*. Duxbury Press, Belmont, California.

SAITO, T.B.; ALFIERI, A.A.; WOSIACKI, S.R.; NEGRÃO, F.J.; MORAIS, H.S. A.; ALFIERI, A.F. Detection of canine distemper virus by reverse transcriptase-polymerase chain reaction in the urine of dogs with clinical signs of distemper encephalitis. *Research in Veterinary Science*, 2005.

SANTOS, R.L. e ALESSI, A.C. *Patologia Veterinária*. Editora Roca: São Paulo. 2011 p. 525-610.

SAS INSTITUTE. 2009. *SAS/STAT User's Guide*. Version 9.2, SAS Institute Inc., Cary, NC.

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, suppl 1, p. 269-272, 2006.

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*, Rio de Janeiro, v. 27, n. 5, p. 215-220, maio 2007.

SILVA, M.C.; FIGHERA, R.A.; MAZZANTI, A.; BRUM, J.S.; PIEREZAN, F.; BARROS, C.S.L. Neuropatologia da cinomose canina: 70 casos (2005-2008) *Pesq. Vet. Bras.* v. 29, n. 8, p. 643-652, 2009.



SONNE, L.; OLIVEIRA, E.C.; PESCADOR, C.A.; SANTOS, A.S.; PAVARINI, S.P.; CARISSIMI, A.S.; DRIEMEIER, D. Achados patológicos e imunohistoquímicos em cães infectados naturalmente pelo vírus da cinomose canina *Pesq. Vet. Bras.* v. 29, n. 2, p.143-149, 2009.

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

VANDEVELDE, M.; ZURBRIGGEN, A. Demyelination in canine distemper virus infection: a review. *Acta Neuropathologica*, New York, v. 109, n. 1, p. 56-68, 2005.

VANDEVELDE, M.; ZURBRIGGEN, A. The neurobiology of canine distemper virus infection. *Veterinary Microbiology*, Amsterdam, v. 44, n. 2-4, p. 271-280, 1995.

ZEE, Y.C. Paramyoviridae. In: HIRSH, D.C., ZEE, Y.C. *Microbiologia Veterinária*. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, p.374-378, 2003.

Trabalho a ser enviado para Pesquisa Veterinária Brasileira

**Análise Histopatológica E Imunoistoquímica De Encéfalo De Cães Com  
Cinomose Tratados Com Ribavirina**

**Histopathological Brain Analysis and Immunohistochemistry Of  
Distemper Disease In Dogs With Treatment based on Ribavirin**

SANCHES, C.D.C.<sup>1</sup>, SANCHES, O.C.<sup>2</sup>, PAES, A.C.<sup>3</sup>

---

<sup>1</sup> 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: [carolsanches@rantac.com.br](mailto:carolsanches@rantac.com.br)

<sup>2</sup> Departamento de Patologia Animal, Faculdade de Ciências Agrárias da Universidade do Oeste Paulista. UNOESTE. Presidente Prudente – SP. E-mail: [osimarsanches@yahoo.com.br](mailto:osimarsanches@yahoo.com.br)

<sup>3</sup> Departamento de Higiene Veterinária e Saúde Pública, FMVZ, UNESP/Botucatu. E-mail: [paesacmi@fmvz.unesp.br](mailto:paesacmi@fmvz.unesp.br)

**ABSTRACT [Histopathological Brain Analysis and Immunohistochemistry Of Distemper Disease In Dogs With Treatment based on Ribavirin]**

Distemper is a viral infectious disease, systemic and lethal caused by a morbillivirus that affects dogs of all ages and shows respiratory, gastrointestinal, dermatological, ophthalmic and neurological disorders, which may occur sequentially or separately. This study aimed to compare brain lesions by histopathology and assess the amount of virus by immunohistochemistry in dogs examined during the routine of the de Enfermidades Infecciosas dos Animais Domésticos- FMVZ- UNESP/ Botucatu and treated with ribavirin at a dose of 30mg/Kg by orally once daily for 15 days and animals not treated with this drug, and by the unfavorable evolution of the disease were euthanized. Histopathologic analysis was to evaluate the cerebral cortex, cerebellum, thalamus, brainstem, hippocampus and viewing perivascular cuffs in the meninges. From these regions it was possible to identify and classify lesions such as demyelination, the presence of perivascular cuffing, edema, neuronal necrosis, vascular changes such as congestion, hemorrhage and thrombosis and inflammatory disorders such as meningitis, meningoencephalitis and meningo-encephalomyelitis. In this study, we observed that the demyelination remained strongly present in both groups, and compared statistically there is no significant difference between groups, as well as the formation of perivascular cuffs. There was a considerable decrease of the edema measured in all structures, and Ribavirin ® proved to be very effective for the reduction of brain inflammation, and neuronal necrosis was lower in almost all structures evaluated in the group treated with the exception of the thalamus . The comparative statistical analysis of the viral marking between groups showed significant only in the cerebellum, thalamus and brainstem.

**Keywords:** canine distemper, treatment, ribavirin, immunohistochemistry, brain, histopathology

**RESUMO [Análise Histopatológica E Imunoistoquímica De Encéfalo De Cães Com Cinomose Tratados Com Ribavirina]**

A cinomose é uma doença infecto-contagiosa viral, sistêmica e letal causado por um Morbilivírus que acomete cães de todas as idades e apresenta sinais clínicos respiratórios, gastrintestinais, dermatológicos, oftálmicos e neurológicos, que podem ocorrer sequencialmente ou isoladamente. Este estudo teve como objetivo comparar lesões encefálicas através da histopatologia e avaliar a quantidade de vírus pela imunoistoquímica em cães atendidos durante a rotina do Setor de Enfermidades Infecciosas dos Animais Domésticos- FMVZ- UNESP/ Botucatu e tratados com Ribavirina na dose de 30mg/Kg por via oral uma vez ao dia por 15 dias e animais não tratados com essa droga, e que através da evolução desfavorável da doença foram eutanasiados. A análise histopatológica constituiu na avaliação de córtex cerebral, cerebelo, tálamo, tronco encefálico, hipocampo e visualização de manguitos perivasculares em meninges. A partir dessas regiões foi possível identificar e classificar lesões como: desmielinização; presença de manguitos perivasculares, edema, necrose neuronal, alterações vasculares como: congestão, hemorragia e trombose e alterações inflamatórias como meningite, meningoencefalite e meningoencefalomielite. No presente estudo, observou-se que a desmielinização se manteve altamente presente nos dois grupos, e que quando comparados estatisticamente não existe uma diferença significativa entre os grupos, assim como na formação de manguitos perivasculares. Houve uma diminuição considerável do edema em todas as estruturas avaliadas, sendo que a Ribavirina® se mostrou bastante eficaz em relação à redução da inflamação encefálica, assim como a necrose neuronal foi menor em quase todas as estruturas avaliadas no grupo tratado, com exceção do tálamo. A análise estatística comparativa da marcação viral entre os grupos se mostrou relevante apenas em cerebelo, tálamo e tronco encefálico.

**Palavras-chave:** cinomose, tratamento, ribavirina, imunoistoquímica, encéfalo, histopatologia

## INTRODUÇÃO

Os cães infectados pelo vírus da cinomose desenvolvem sinais clínicos e lesões respiratórias, gastrintestinais, dermatológicas, oftálmicas e neurológicas, que podem ocorrer sequencialmente ou isoladamente (GREENE, 2006).

Os cães jovens são mais afetados embora possa ocorrer em animais de todas as idades (JÓZWIK & FRYMUS, 2002). A queda de anticorpos maternos, a não utilização de vacinas e a falha vacinal são responsáveis pelo grande número de casos que ainda são observados (CHAPPUIS, 1995). O vírus tem predileção por células epiteliais, linfóides (principalmente células T) e o tecido nervoso (ALVES *et al.*, 2006).

Durante a encefalite aguda de cães jovens a expressão do RNA mensageiro (mRNA) e da proteína viral são altas nas áreas afetadas e uma possível consequência é o aumento da produção do Fator de Necrose Tumoral (TNF) pelos astrócitos. Este tem sido apontado como causa da destruição de oligodendrócitos e da perda de mielina (GROÖNE *et al.*, 2003).

A encefalite multifocal em cães adultos acomete freqüentemente animais entre os quatro e seis anos, com curso crônico. Esta enfermidade não é precedida nem coincidente com os sinais sistêmicos. O antígeno do vírus fica restrito a poucos astrócitos e a expressão do Complexo de Histocompatibilidade Principal (MHC) é proeminente em todas as células da micróglia, sendo responsável pela desmielinização contínua e disseminada infiltração mononuclear perivascular. As alterações têm início com hiperplasia dos astrócitos e proliferação microglial na substância branca. Esta forma também está associada com a alta concentração de anticorpos antimielínicos, podendo ser uma reação secundária ao processo inflamatório. Anticorpos contra o vírus interagem com macrófagos infectados em lesões no SNC, causando sua ativação com liberação de radicais livres de oxigênio. Esta atividade por sua vez pode levar à destruição de oligodendrócitos e bainha de mielina (MANGIA & PAES, 2008).

O estágio crônico da doença está caracterizado por complicações imunológicas. A inflamação está associada com a síntese de anticorpos citotóxicos-dependentes, que podem induzir a desmielinização por ação dos anticorpos anti-mielina. Vandeveld & Zurbriggen (1995) concluíram que as reações auto-imunes na cinomose são provavelmente um epifenômeno e que não são primárias neste processo de desmielinização (TIPOLD *et al.*, 1992; VANDEVELDE e ZURBRIGGEN, 2005). Esta fase da enfermidade pode ser utilizada como modelo experimental para a esclerose múltipla em humanos.

Em necrópsias de cães com cinomose, existem poucas ou nenhuma alteração característica da doença, existem lesões secundárias referentes ao desenvolvimento da doença como dermatite pustular (GREENE, 2006), pneumonia, enfisema, focos hemorrágicos e congestão (LAN *et al.*, 2006), timo parcialmente ou completamente atrofiado e linfonodos ocasionalmente reativos, congestos e/ou hemorrágicos (SONNE, 2008). A hiperqueratose ortoqueratótica e/ou paraqueratótica de coxins também estão presentes nessa doença (ENGELHARDT *et al.*, 2005). Cães infectados antes da erupção dos dentes permanentes, podem apresentar hipoplasia do esmalte dentário, com isso, há a exposição da dentina que na macroscopia é demonstrado por áreas de coloração amarelo bege nos dentes permanentes (GELBERG, 2007).

Alterações macroscópicas no sistema nervoso central (SNC) não são comuns. Mas quando presentes observa-se hiperemia das leptomeninges (SILVA, 2009) e excesso de líquido cefalorraquidiano, por vezes com dilatação ventricular (GREENE, 2006). Malacia e cavitação podem ocorrer na substância branca em alguns casos com lesão inflamatória crônica ou desmielinização acentuada (SUMMERS *et al.*, 1995). Alguns autores comentam que lesões macroscópicas na substância branca ocorrem com determinada frequência a ponto de garantir a sua visualização em um exame macroscópico cuidadoso do SNC (SUMMERS *et al.*, 1995). Outros autores afirmam que lesões macroscópicas podem ser observadas no lobo piriforme em alguns cães que apresentam convulsão em “goma de mascar” ou generalizadas (McGRATH, 1960). Estudos realizados por Silva *et al.* (2007) confirmam que

aproximadamente 12% dos cães necropsiados morreram devido às complicações neurológicas causadas pelo vírus da cinomose.

O diagnóstico da infecção pelo vírus da cinomose é de difícil realização e geralmente é fundamentado nos sinais clínicos e no histórico de vacinação (NELSON & COUTO, 2001). Achados macroscópicos e sinais clínicos apenas sugerem o diagnóstico de cinomose, mas para a confirmação do mesmos são necessários exames complementares, achados laboratoriais em sangue periférico como leucopenia por linfopenia e em alguns casos trombocitopenia e anemia regenerativa ou até mesmo a visualização de corpúsculos de inclusão em leucócitos e hemácias (GREENE, 2006) e no estágio crônico da inflamação, o líquido cefalorraquidiano pode apresentar aumento de proteína acima de 25mg/dL, principalmente representado por IgG antivírus e aumento de células com predomínio de linfócitos (CORRÊA & CORRÊA, 1992; TIPOLD *et al.*, 1992; SUMMERS *et al.*, 1995; GREENE, 2006).

Adicionalmente, técnicas como isolamento viral, imunofluorescência direta, reação de polimerase em cadeia (PCR) em amostras de líquido, sangue periférico e medula óssea, e a imunohistoquímica, têm contribuído com o diagnóstico etiológico de diversas viroses em animais. As principais vantagens dessa técnica, precedida por uma etapa de transcrição reversa (RT-PCR), para os vírus RNA incluem a rapidez na obtenção dos resultados, a não exigência da infecciosidade da partícula viral e os altos níveis de sensibilidade e especificidade (FRISK *et al.*, 1999; GEBARA *et al.*, 2004; SAITO *et al.*, 2005).

Atualmente, a 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 respiratórios, digestivos e neurológicos (GEBARA *et al.*, 2004).

As alterações histopatológicas, caracterizadas principalmente pela visualização de corpúsculos de inclusão viral eosinofílicos intracitoplasmáticos e intranucleares (Corpúsculo de Lentz) localizados em células epiteliais linfóides e no SNC também confirmam o diagnóstico (SONNE, 2009).

A falta de um tratamento antiviral para a infecção do vírus da cinomose requer um tratamento suporte e sintomático (TIPOLD *et al.*, 1992; CORRÊA & CORRÊA, 1992). A ribavirina é uma droga antiviral, análoga à guanosina, inibidora da replicação “in vitro” de alguns RNA e DNA-vírus e, no grupo dos

*Paramyxovirus*, todos os componentes são sensíveis a ribavirina, sendo o vírus do sarampo o mais sensível (CHANG & HEEL, 1981).

Segundo Elia et al. (2007) a ribavirina causa mutações no vírus da cinomose que levam a um erro catastrófico na formação do genoma viral. Pode ser especulado que a ribavirina interfere com a RNA polimerase pela competição com nucleosídeos naturais e produz erro na terminação da cadeia de RNA do vírus. Além disso, a ribavirina afeta o vírus ainda no meio extracelular, de maneira precoce no seu ciclo de replicação.

Segundo Mangia (2008), a ribavirina demonstrou efetividade contra o vírus da cinomose em animais na fase aguda com sinais neurológicos, com melhora sensível do quadro clínico. Além disso, observou-se que o Dimetil-Sulfóxido (DMSO) potencializou a ação antiviral da ribavirina, aumentando o seu poder de difusão tecidual, tornando sua ação mais eficaz frente ao vírus.

Nos resultados de Mangia (2008) foi observada variação do estado clínico dos animais do experimento a partir do décimo dia de administração da ribavirina por via oral. Sugeriu-se que o sistema imune influenciou no quadro geral do animal, com relação à produção de radicais livres de oxigênio (ROS), citocinas e anticorpos antimielina conseqüente à ação viral, que tem início ao redor de três semanas pós-infecção (GREENE, 2006).

Segundo os relatos de Vandeveld & Zurbriggen (2005) podemos afirmar que a presença de linfócitos no líquido, mesmo após o tratamento, pode significar uma resposta a essa produção de citocinas, desencadeada na presença do antígeno viral, que induzem a migração de mais células e podem manter a inflamação no SNC, resultando em resposta imunomediada. Estas complicações imunológicas podem ser responsáveis pelo óbito de alguns animais da pesquisa de Mangia (2008), que não chegaram ao final do tratamento. No entanto, na análise dos valores absolutos de linfócitos, Mangia (2008) verificou que houve uma diminuição da contagem de linfócitos no líquido, porém não houve normalidade, demonstrando um processo inflamatório ativo no SNC.

## **MATERIAL E MÉTODOS**



Foram utilizados animais em fase clínica neurológica de cinomose, que por conveniência foram atendidos e eutanasiados no setor de Enfermidades Infeciosas dos Animais, do Hospital Veterinário, da FMVZ, UNESP – Botucatu.

Anteriormente a eutanásia, esses cães foram submetidos a coleta de sangue total através da veia jugular. Logo em seguida os animais foram eutanasiados conforme o protocolo sugerido pelo Departamento de Anestesiologia Veterinária da FMVZ – UNESP – Botucatu, SP, composto por Xilasina 2% na dose de 2mg/Kg IM, após 5 minutos a aplicação de Tiopental 2,5% diluído em 40 mL de H<sub>2</sub>O em 1g de Tiopental na dose de 25mg/Kg/IV e 2 minutos após solução de KCl 19,1% na dose de 1-2mL/Kg/IV.

O sangue total foi processado no Laboratório de Diagnóstico Molecular no Instituto de Biociências da UNESP-Botucatu do Departamento de Microbiologia e Imunologia, para a realização da RT-PCR.

Após a eutanásia houve a extração do encéfalo e armazenamento em frascos contendo formol 10% tamponado para avaliação histopatológica na coloração de Hematoxilina e Eosina (HE) e para análise imunoistoquímica.

Foram utilizados 26 cães, com idade e sexo aleatório, em fase neurológica com suspeita de cinomose. Os sinais neurológicos devem seguir um padrão inflamatório/infeccioso, com caráter progressivo e multifocal. Os animais foram divididos em dois grupos, controle com 12 animais e 14 animais tratados com ribavirina.

Todos os animais foram atendidos no setor de Enfermidades Infeciosas dos Animais, do Hospital Veterinário, FMVZ, UNESP – Campus Botucatu e os casos irrecuperáveis que não responderem ao tratamento e se encontravam em sofrimento e situação incompatível com a vida foram eutanasiados e seus encéfalos utilizados neste procedimento de pesquisa.

Os animais foram divididos em 2 grupo cujo *Grupo 1*: composto por 12 animais não tratados com ribavirina atendidos na rotina nos quais houve a opção pela eutanásia do paciente devido a evolução desfavorável da doença; e *Grupo 2*: composto por 14 animais já tratados com ribavirina na

dose de 30 mg/Kg, a cada 24 horas, durante 15 dias eutanasiados devido a evolução desfavorável da doença.

Dessa forma, foram colhidas amostras de sangue através de punção de veia jugular de todos os animais dos grupos no momento da eutanásia e foram devidamente congeladas em freezer a  $-80^{\circ}\text{C}$ . Após a eutanásia, os encéfalos dos animais foram extraídos e armazenados em frasco devidamente fechado contendo Formol 10% tamponado para análise histopatológica e imunoistoquímica. Com o auxílio de uma serra, foi realizada a extração da calota craniana com total visualização do encéfalo que retirado do crânio foi armazenado em frasco contendo formol 10%.

O sangue coletado foi encaminhado para a realização de RT-PCR para finalidade de diagnóstico positivo dos animais incluídos no estudo no Laboratório de Diagnóstico Molecular no Instituto de Biociências da UNESP-Botucatu do Departamento de Microbiologia e Imunologia, sob a orientação do Prof. Adj. João Pessoa Araújo Jr.

Todos os encéfalos do grupo tratado com Ribavirina e do grupo não tratado foram colhidos e fixados em solução de formalina a 10% tamponada, por 72 horas. Após a fixação foram lavados por 1 hora e em seguida armazenados em solução de álcool a 70%. Três amostras do encéfalo foram colhidas obedecendo dois cortes. O primeiro corte foi sagital mediano no verme cerebelar até o tronco encefálico, separando uma porção do cerebelo e tronco encefálico (Fig. 1); já o segundo corte foi feito na inserção do quiasma óptico, transversalmente ao córtex cerebral, separando o tálamo, hipocampo e córtex cerebral (Fig. 2). Os fragmentos do encéfalo foram processados de acordo com a técnica de rotina histopatológica para inclusão em parafina. Cortes com 4  $\mu\text{m}$  de espessura foram obtidos em micrótomo rotativo, depositados em lâminas e em seguida permaneceram em estufa a  $60^{\circ}\text{C}$  por 12 horas para fixação dos cortes à lâmina. Os cortes destinados a técnicas de imunoistoquímica, compostos por 7 encéfalos de cada grupo, foram depositados em lâminas histológicas (Tissue-Tek<sup>®</sup> AutoWrite). Após este procedimento, as lâminas foram submetidas aos processos de desparafinização e hidratação; e em seguida as mesmas foram coradas pelos métodos da Hematoxilina e Eosina

(HxE), e pelo anticorpo monoclonal Canine Distemper Vírus (Lifespan biosciences), clone DV2-12.

As lâminas destinadas à técnica de imunistoquímica, foram submetidas ao bloqueio da peroxidase endógena, onde foi utilizada solução de água oxigenada a 30 volumes diluída em metanol na proporção de 1:9, por 15 minutos. Em seguida as lâminas foram lavadas em solução de TRIS pH 7,4. Depois os cortes foram imersos em solução tampão de citrato 10 mM, pH 6,0 e submetidos à recuperação antigênica em forno de microondas (potência máxima – 700 watts) por 5 minutos, deixando esfriar e repetindo mais duas vezes. O material foi resfriado até atingir a temperatura ambiente. Após esfriarem as lâminas foram lavadas por três vezes de 5 minutos em solução de TRIS-HCl pH 7,4.

As lâminas foram incubadas com o anticorpo primário, em câmara úmida por 18 horas a 4°C e lavadas em solução TRIS-HCl pH 7,4. Em seguida, foram incubadas com o anticorpo secundário anti-mouse (kit Estreptoavidina DBS – Cód. KP-500- BIOGEN) à temperatura ambiente por trinta minutos. O kit Estreptoavidina DBS – Cód. KP-500- BIOGEN é pronto para uso não necessitando diluição prévia. Após esta etapa o material foi lavado com TRIS-HCl pH 7,4.

Para visualização da reação, os cortes foram tratados com solução de 3,3'diaminobenzidina (SISTEMA SUBSTRATO DAB, DABC-032 – SPRING BIOSCIENCE) durante dez minutos; posteriormente os cortes foram lavados em três vezes com TRIS-HCl pH 7,4, e contra-corados com hematoxilina de Mayer. As lâminas foram avaliadas pela intensidade da marcação imunistoquímica em todas as porções do encéfalo descritas anteriormente. As reações foram graduadas como negativa ou positiva.

A Análise Estatística, inicialmente a distribuição das variáveis-resposta foi analisada com um dos critérios para escolha do método analítico. Estatísticas descritivas foram produzidas para descrever características da população (peso, raça, sexo e idade) incluída em cada grupo do estudo. O teste de Kruskal-Wallis (Pagano e Gauvreau, 2000) foi usado para comparar

o escore mediano de cada variável-resposta entre os grupos controle e tratamento. A análise estatística foi realizada com o procedimento PROC NPAR1WAY (SAS Institute, 2009) e significância estatística foi definida como  $P < 0.05$ .

O processamento do material encefálico e a confecção das lâminas histopatológicas e imunoistoquímicas foram realizadas no Serviço de Anatomia Patológica da Universidade do Oeste Paulista (UNOESTE) – Presidente Prudente – SP, sob a orientação do Prof. Dr. Osimar de Carvalho Sanches.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os animais utilizados no projeto foram selecionados através dos sinais clínicos como alterações neurológicas compatíveis com a enfermidade. Os animais que tinham histórico neurológico de no máximo 7 dias de evolução, foram selecionados para o tratamento com Ribavirina® 30mg/Kg uma vez ao dia por 15 dias, neste caso foram selecionados 14 animais para se obter o grupo dos animais tratados, que pela evolução desfavorável da doença optou-se pela eutanásia. No caso do grupo controle, não houve a adição da droga no tratamento, assim, pela evolução da doença os animais foram eutanasiados, este grupo foi composto por 12 animais.

A idade dos cães variou entre 4 meses e 8 anos, sendo que 12 animais (46,15%) tinham mais de 1 ano de idade, 6 animais do grupo tratado e 6 animais do grupo controle; e 14 animais (53,85%) eram filhotes onde desses 8 animais no grupo tratado e 6 animais do grupo controle. A presença de maior quantidade de animais filhotes também foi relatada por outros autores (JÓZWIK e FRYMUS, 2002; SONNE, 2008). Sabe-se que apesar do vírus afetar animais de todas as idades, os filhotes são mais predispostos, principalmente pela queda da imunidade materna, não utilização de vacinas e a realização de programas de imunização incorretos (SONNE, 2008, GREENE e APPEL, 2006).

Dentre os 26 cães, 19 eram SRD (sem raça definida) constituindo 47,37% (9 animais) do grupo controle e 52,63% (10 animais) do grupo tratado, 1 Husky no grupo tratado, 1 Pastor Alemão em cada grupo, 1 Pointer no grupo tratado, 2 Poodle's no grupo controle e 1 no grupo tratado. Apesar destes dados, outros

autores já demonstraram que não existe predisposição racial na cinomose canina (GREENE e APPEL, 2006, SONNE, 2008).

O sexo variou entre 10 fêmeas (38,46%), 5 fêmeas em cada grupo e 16 machos (61,54%), constituindo 9 machos no grupo tratado e 7 machos no grupo controle. Apesar destes dados demonstrarem maior acometimento em cães machos, nenhuma predisposição sexual é apontada na cinomose canina (GREENE e APPEL, 2006).

Dentre as características idade, sexo e raça estatisticamente não foi encontrada diferenças significantes entre os grupos, demonstrando valor de  $p$  maior que 0,05 concluindo assim, a homogeneidade entre os grupos controle e tratado.

## **ANÁLISE HISTOPATOLÓGICA**

A análise histopatológica constituiu na avaliação dos seguintes segmentos encefálicos: córtex cerebral, cerebelo, tálamo, tronco encefálico, hipocampo e no caso de visualização de manguito perivascular também foi identificado em meninge. A partir dessas regiões foi possível identificar e classificar lesões como: desmielinização; presença de manguitos perivasculares, edema, necrose neuronal, alterações vasculares como: congestão, hemorragia e trombose e alterações inflamatórias como meningite, meningoencefalite e meningoencefalomielite.

A desmielinização é um evento que está sempre presente quando o SNC é acometido pelo vírus (GREENE e APPEL, 2006) e no presente estudo, na microscopia das estruturas encefálicas, observou-se que a desmielinização se manteve altamente presente nos dois grupos, e que quando comparados estatisticamente não existe uma diferença significativa entre os grupos, a não ser no cerebelo, onde houve uma diminuição significativa da lesão no grupo tratado. O cerebelo teve como principal lesão microscópica a desmielinização, confirmado por SONNE (2008) que encontrou esta lesão em 89,6% dos casos

e por Silva *et al.* (2007) no qual a desmielinização foi encontrada em 89,4% dos cães. Portanto, podemos concluir que a utilização da Ribavirina® diminuiu a ação do vírus nessa região encefálica.

Já em relação a formação de manguitos perivasculares não foi visualizado uma diminuição, se mantendo baixa em ambos os grupos. Nem todos os animais apresentaram a formação de manguitos perivasculares, característica também visualizada por outros autores como SONNE (2008) que notou essa alteração em apenas 20,7% dos animais de seu experimento. Casos de cinomose com inflamação constituída de infiltrado mononuclear perivascular são classificados como subagudos ou crônicos. Na doença subaguda, a desmielinização é mais intensa do que na fase aguda e é acompanhada de inflamação leve, mas não ocorre malácia, o que é possível notar nos resultados deste experimento. O conceito corrente de que cães jovens apresentam lesões predominantemente agudas (FENNER, 2004; SUMMERS *et al.*, 1995), não foi confirmado por esse estudo, pois a maioria dos filhotes apresentou lesões interpretadas como subagudas ou crônicas, assim concluímos que é impreciso inferir as lesões da cinomose com base apenas na idade dos cães. Neste caso, a cepa viral presente em cada animal é desconhecida, justificando a desproporção encontrada deste tipo de alteração, já que algumas cepas apresentam tropismo pelos neurônios provocando necrose laminar cortical, enquanto outras possuem tropismo por astrócitos e oligodendrócitos causando desmielinização e outras causam infecções persistentes no sistema nervoso central (KOUTINAS *et al.*, 2004).

Houve uma diminuição considerável do edema em todas as estruturas avaliadas, sendo que a Ribavirina® se mostrou bastante eficaz em relação à redução inflamatória encefálica, assim como a necrose neuronal foi menor em quase todas as estruturas avaliadas no grupo tratado, com exceção do tálamo.

Das alterações vasculares e inflamatórias podemos destacar diferença entre os grupos apenas em relação a congestão das estruturas, já alterações como hemorragia, trombose, meningite, meningoencefalite e

meningoencefalomielite não apresentaram diferenças significativas entre os grupos.

### **AVALIAÇÃO IMUNOISTOQUÍMICA**

A análise imunoistoquímica foi realizada com 7 animais de cada grupo, e assim como para a avaliação histopatológica, as mesmas estruturas encefálicas foram analisadas para avaliação e marcação viral imunoistoquímica. No grupo tratado a maior marcação viral ocorreu em cerebelo, tronco encefálico, tálamo, córtex cerebral e hipocampo respectivamente, já no grupo controle ocorreu também em cerebelo, tálamo, tronco encefálico, córtex cerebral e hipocampo respectivamente.

No cerebelo, tálamo e tronco encefálico dos animais tratados com Ribavirina®, houve uma redução estatisticamente significativa do número de partículas virais nas estruturas neurais mencionadas observadas na imunoistoquímica. Isto evidencia que a droga antiviral exerceu ação eficaz frente ao Morbilivírus, embora os animais, obviamente, não tenham sobrevivido. Porém uma clara demonstração de que o caminho para o tratamento da cinomose passa pelo uso da Ribavirina®, como foi demonstrado no estudo de Mangia (2011), no qual foi obtido êxito, aumentando o número de sobreviventes em relação ao tratamento padrão sem o uso do antiviral.

Os resultados evidenciaram que a Ribavirina® exerceu ação antiviral em cerebelo, córtex cerebral, tálamo, hipocampo e tronco encefálico, evidenciada pela redução de edema e necrose neuronal.

Também observamos pelo estudo histopatológico que a Ribavirina®, no cerebelo, diminuiu de forma significativa as lesões desmielinizantes no órgão, por provável difusão e ação direta sobre o Morbilivírus impedindo dessa maneira o estabelecimento do quadro de inflamação crônica que leva a consequente atividade autoimune contra bainha de mielina.

## **CONCLUSÕES**

A utilização da Ribavirina® reduziu a quantidade de vírus significativamente em cerebelo, troco encefálico e tálamo nos animais tratados.

A Ribavirina® mostrou ação antiinflamatória em todas as áreas encefálicas avaliadas, com característica redução de edema e necrose, observados nos exames histopatológicos ao avaliarmos o grau das lesões.

Mais estudos são necessários para elucidar a atuação da droga frente ao vírus da cinomose, mas já é possível conseguir fundamentar um novo protocolo no tratamento desta doença cujo neuropatologia é de extrema complexidade e letalidade.



## REFERÊNCIAS

ALVES, C.M. *et al.*. Morphometric analysis os the thymus of puppies with the Snyder Hill Strain canine distemper virus. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.58, n.4, p.472-479, 2006.

AMUDE, A.M.; ALFIERI, A.A.; ALFIERI, A.F. Clinicopathological findings in dogs with distemper encephalomyelitis presented without characteristic signs of the disease. **Res. Vet. Sci.** n.82, p.416–422, 2007.

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. **Vet. Microbiol.** n.4, p.351-358, 1995.

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.

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.

ENGELHARDT, P *et al.*, Canine distemper virus associated proliferation of canine footpad keratinocytes in vitro. **Veterinary Microbiology**, v.42, n.10, p.1-12, 2005.

EYNARD, A.R.; VALENTICH, M.A.; ROVASIO, R.A. **Histologia e embriologia humanas: bases celulares e moleculares**. P. 46-67. Porto Alegre: Artmed. 2011

FRISK, A. L.; KÖNIG, M.; MORITZ, A.; BAUMGÄRTNER, W. Detection of canine distemper virus nucleoprotein RNA by reverse transcription-PCR using

serum, whole blood, and cerebrospinal fluid from dogs with distemper. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 37, n. 11, p. 3634-3643, nov. 1999.

GEBARA, C. M. S. *et al.* Lesões histológicas no sistema nervoso central de cães com encefalite e diagnóstico molecular da infecção pelo vírus da cinomose canina. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, Belo Horizonte, v. 56, n. 2, p. 168-174, 2004.

GELBERG, H.B. Alimentary System In: McGAVIN, M, D.; ZACHARY, J.F. **Pathologic Basis of Veterinary Disease**. p.25-41. 4 ed. St. Louis: Mosby Elsevier, 2007, p.301-391.

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.

GROÖNE, A.; GRÖTERS, S.; KOUTINAS, A.; SARIDOMICHELAKIS, M.; BAUMGÄRTNER, W. Non-cytocidal infection of keratinocytes by canine distemper virus in the so-called hard pad disease of canine distemper. **Vet. Microbiol.** n. 96, p. 157–163, 2003.

JÓZWIK A. e FRYMUS T. Natural distemper in vaccinated and unvaccinated dogs in Warsaw. **J. Vet. Med. B.** n.49, p. 413-414, 2002.

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. **Vet. Microbiol.** n. 115, p. 32-42, 2006.

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. **Avaliação ro tratamento experimental de cães naturalmente infectados com o vírus da cinomose na fase neurológica com ribavirina, prednisona e DMSO através da RT-PCR.** 2011. Tese (Doutorado) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista - Botucatu.

MANGIA, S. H.; PAES, A. C. Neuropatologia da Cinomose. **Revista Veterinária e Zootecnia**, v. 15, n.3, p. 416-27, 2008.

MARTELLA, V.; ELIA, G., BUONOVOLIA, C. Canine distemper virus. **The Veterinary Clinics of North America . Small Animal Practice**, Philadelphia, v. 38, n. 4, p. 787-797, July 2008.

McGRATH, J.D. Inflammatory and infectious diseases. In: McGRATH, J. D. **The neurologic examination of the dog with clinic-pathological observations.** 2nd ed. Philadelphia: Lea & Febiger, 1960. cap. 12, p. 123-147.

NELSON, R. W., COUTO, C. G. **Medicina Interna de Pequenos Animais.** 2ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2001. p. 1084.

PAGANO, M. & K. Gauvreau. 2000. **Principles of Biostatistics.** Duxbury Press, Belmont, California.

SAITO, T.B.; ALFIERI, A.A.; WOSIACKI, S.R.; NEGRÃO, F.J.; MORAIS, H.S. A.; ALFIERI, A.F. Detection of canine distemper virus by reverse transcriptase-polymerase chain reaction in the urine of dogs with clinical signs of distemper encephalitis. **Research in Veterinary Science**, 2005.

SANTOS, R.L. e ALESSI, A.C. Patologia Veterinária. Editora Roca: São Paulo. 2011 p. 525-610.

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, suppl 1, p. 269-272, 2006.

SAS Institute. 2009. SAS/STAT User's Guide. Version 9.2, SAS Institute Inc., Cary, NC.

SILVA, M.C. *et al.* Aspectos clinicopatológicos de 620 casos neurológicos de cinomose em cães. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, Rio de Janeiro, v. 27, n. 5, p. 215-220, maio 2007.

SILVA, M.C.; FIGHERA, R.A.; MAZZANTI, A.; BRUM, J.S.; PIEREZAN, F.; BARROS, C.S.L. Neuropatologia da cinomose canina: 70 casos (2005-2008) **Pesq. Vet. Bras.** v. 29, n. 8, p. 643-652, 2009.

SONNE, L.; OLIVEIRA, E.C.; PESCADOR, C.A.; SANTOS, A.S.; PAVARINI, S.P.; CARISSIMI, A.S.; DRIEMEIER, D. Achados patológicos e imuno-histoquímicos em cães infectados naturalmente pelo vírus da cinomose canina **Pesq. Vet. Bras.** v. 29, n. 2, p.143-149, 2009.

SUMMERS, B.A.; CUMMING, J. F.; LAHUNTA, A. Inflammatory disease of the central nervous system, p.95-188. In: (Ed.), **Veterinary Neurophathology**. 1995. Mosby, St Louis.

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

VANDEVELDE, M.; ZURBRIGGEN, A. Demyelination in canine distemper virus infection: a review. **Acta Neuropathologica**, New York, v. 109, n. 1, p. 56-68, 2005.

VANDEVELDE, M.; ZURBRIGGEN, A. The neurobiology of canine distemper virus infection. **Veterinary Microbiology**, Amsterdam, v. 44, n. 2-4, p. 271-280, 1995.

ZEE, Y.C. Paramyoviridae. In: HIRSH, D.C., ZEE, Y.C. **Microbiologia Veterinária**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, p.374-378, 2003.