

BERNARDO DE CARO MARTINS

**CARACTERÍSTICAS DA CINOMOSE CANINA EM CÃES NATURALMENTE
INFECTADOS EM BELO HORIZONTE (2012-2014): ASPECTOS CLÍNICO-
NEUROLÓGICOS E SUA CORRELAÇÃO COM A CARGA VIRAL E
APOPTOSE NO ENCÉFALO**

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação *Stricto Sensu* em Ciência Animal da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito final para obtenção do título de Doutor em Ciência Animal.

Orientador: Profa. Eliane Gonçalves de Melo

Co-orientador: Prof. Marcos Bryan Heinemann

Co-orientador: Prof. Rubens Antônio Carneiro

Belo Horizonte

Escola de Veterinária da UFMG

2016

M386c Martins, Bernardo De Caro, 1985-
Características da cinomose canina em cães naturalmente infectados em Belo Horizonte (2012-2014): aspectos clínico-neurológicos e sua correlação com a carga viral e apoptose no encéfalo / Bernardo de Caro Martins. – 2016.
94 p. : il.

Orientadora: Eliane Gonçalves de Melo
Co-orientadores: Marcos Bryan Heinemann, Rubens Antônio Carneiro
Tese (doutorado) – Universidade Federal de Minas Gerais. Escola de Veterinária
Inclui bibliografia

I. Cão – Doenças – Teses. 2. Cinomose – Teses. 3. Apoptose – Teses. 4. Reação em cadeia de polimerase – Teses. I. Melo, Eliane Gonçalves de. II. Heinemann, Marcos Bryan. III. Carneiro, Rubens Antônio. IV. Universidade Federal de Minas Gerais. Escola de Veterinária. V. Título.

CDD – 636.708 96

FOLHA DE APROVAÇÃO

BERNARDO DE CARO MARTINS

Tese submetida à banca examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação em CIÊNCIA ANIMAL, como requisito para obtenção do grau de DOUTOR em CIÊNCIA ANIMAL, área de concentração em MEDICINA E CIRURGIA VETERINÁRIAS.

Aprovada em 04 de Fevereiro de 2016, pela banca constituída pelos membros:

Eliane Gonçalves de Melo

Prof^ª. Eliane Gonçalves de Melo
Presidente - Orientador

Fabiola de Oliveira Paes Leme

Prof^ª. Fabiola de Oliveira Paes Leme
Escola de Veterinária - UFMG

Vitor Márcio Ribeiro

Prof. Vitor Márcio Ribeiro
Pontifícia Universidade Católica de Minas Gerais - PUC-MG

Luciana Moro

Prof^ª. Luciana Moro
Instituto de Ciências Biológicas - UFMG

Bruno Benetti Junta Torres

Prof. Bruno Benetti Junta Torres
Universidade Federal Rural de Pernambuco - UFRPE

À Luna (in memoriam).....

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, Carmen e Rogério, pela confiança e incentivo a continuar estudando não importando os obstáculos. A buscar a felicidade em tudo que formos realizar, pois só assim conseguiremos o sucesso. Ao apoio incondicional desde a escolha do curso, até o término do doutorado. Obrigado, acima de tudo, por direcionar as escolhas sem controlá-las. Amo vocês!

Aos meus irmãos Carolina, Clarisse e Guilherme, pelo apoio e pela presença em todos os momentos dessa jornada. Amo vocês também!

À família de São Paulo (Vó Lita, Kika, Rosana, Sônia, Luiz, Mariana, Júlia, Rodrigo, Juliana, Tarcisio, Franklin e Marcelo) e de Brasília (Roberto, Maria, Magda, Juliana, Rodrigo) por sempre proporcionarem momentos de muita alegria quando nos encontramos. E aos familiares residentes em Belo Horizonte (Tia Magui, Renato e Vó Maria) por todo apoio em todos os momentos.

À minha orientadora Profa. Eliane por ter acreditado em um projeto distante de sua linha de pesquisa atual, e por ter incentivado para que este pudesse ter sucesso em todos os seus âmbitos. E pelos puxões de orelha quando eles foram necessários.

Ao co-orientador Prof. Marcos, que me auxiliou e incentivou em todos os momentos desse projeto, desde a escolha até sua finalização. Sua participação foi mais que essencial para que pudéssemos terminar esse projeto.

Ao co-orientador e grande amigo Prof. Rubens, que sempre será uma inspiração para todos que trabalham com a clínica de pequenos animais.

Aos professores componentes da banca Prof. Bruno Torres, Profa. Luciana Moro, Profa. Fabíola, Prof. Vítor e aos suplentes Prof. Alexandre Mazzanti e Prof. Paulo Ricardo pelas contribuições para que desta tese possam sair publicações importantes.

À Graciela, que foi essencial para que pudéssemos realizar os PCRs. Uma pessoa extraordinária que tem paciência, disponibilidade e excelente conhecimento. Muito obrigado Graci pela ajuda. Aos professores e alunos do departamento de virologia, em especial ao Prof. Andrey que nos cederam alguns kits para fazermos o PCR.

À UNESP Botucatu, representada pela Cláudia e Prof. João, que se disponibilizaram em rodar nossas amostras para o PCR, mesmo sem nos conhecer. Grande parte desse trabalho devemos a vocês.

Ao pessoal do grupo de neurologia que de alguma forma contribuiu para a realização deste projeto.

Ao meu grande amigo Bruno, que sempre será um modelo de profissional a ser seguido, por sua honestidade, destreza e pela luta de um ensino de qualidade, doa a quem doer. E também por ser um dos responsáveis pelo meu desenvolvimento na neurologia veterinária.

Aos meus amigos da graduação André, Balbino, Bruno (Kuririm), Carlinha, Facury, Gustavo (Homer), Larissa, Luiz Paulo, Mônica, Naiara, Rafael (Quick) e Stephanie.

Aos meus amigos da veterinária em especial a um grupo que compartilhou todos os momentos de distração e amizade e que considero como irmãos (Guilherme - meu irmão verdadeiro, Caian, Flávio, Sebastian, Rodrigo, Caxito, Adônis, Bruno Jerimum e Matheus). E também às minhas consideradas irmãs Stephanie e Isabela.

Aos professores da Escola de Veterinária Adriane (Tia), Júlio, Paulo Ricardo, Fabíola, Roberto Baracat, Marília, Rubens, Fernando Bretas e Roselene por todo incentivo e participação em minha formação pessoal e acadêmica.

Ao Hospital veterinário por proporcionar momentos de muito aprendizado e crescimento profissional. E também a Dra. Gleidice, com quem pude compartilhar e discutir diversos casos em pacientes oncológicos e que também considero uma amiga.

Ao apoio da CAPES, CNPQ e FAPEMIG pela bolsa e apoio financeiro que possibilitou a realização deste projeto.

À Alere por ceder os kits de imunocromatografia utilizados no diagnóstico da cinomose canina.

“Feliz aquele que transfere o que sabe e aprende o que ensina”

(Cora Coralina)

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS	10
LISTA DE TABELAS	11
LISTA DE QUADROS	12
LISTA DE ANEXOS	12
LISTA DE ABREVIATURAS	13
RESUMO	15
ABSTRACT	16
INTRODUÇÃO	17
CAPÍTULO 1. Revisão de Literatura	
1. Histórico	20
2. Etiologia	20
3. Epizootiologia	24
4. Patogenia	24
4.1 Linfotropismo e imunossupressão	25
4.2 Neuropatogenia	26
4.3 O vírus da cinomose canina e a desmielinização	27
4.4 Persistência viral no sistema nervoso central	29
4.5 O vírus da cinomose canina e a apoptose neural	29
5. Sinais Clínicos	30
6. Diagnóstico	32
6.1 Hematologia	33
6.2 Análise do líquido cefalorraquidiano	33
6.3 Sorologia	33
6.4 Imunofluorescência	33
6.5 Isolamento viral	34
6.6 Imunocromatografia	34
6.7 PCR	34
6.8 Histopatologia do sistema nervoso central	35
7. Tratamento	36
8. Prevenção	38
CAPÍTULO 2. Características da infecção natural pelo vírus da cinomose canina em Belo Horizonte	
RESUMO	40
INTRODUÇÃO	41
MATERIAL E MÉTODOS	41
Dados epizootiológicos	42
Exame clínico-neurológico	42
Avaliação hematológica	42
Teste rápido de imunocromatografia	43
Avaliação laboratorial do líquido cefalorraquidiano	44
Análise estatística	45

RESULTADOS E DISCUSSÃO	45
Dados epizootiológicos	45
Exame clínico-neurológico	48
Avaliação hematológica	50
Teste rápido de imunocromatografia	53
Avaliação laboratorial do fluido cérebro-espinhal	54
CONCLUSÕES	55
CAPÍTULO 3. Quantificação e correlação do grau de apoptose neural e da carga viral no encéfalo de cães naturalmente infectados pelo vírus da cinomose canina e suas relações com as manifestações neurológicas	
RESUMO	56
INTRODUÇÃO	57
MATERIAL E MÉTODOS	57
Avaliação da expressão gênica relativa de Bax, Bcl-2, caspase-3, caspase-8 por RT-PCR em tempo real	58
<i>Extração do RNA total</i>	59
<i>Síntese do cDNA (Transcrição reversa)</i>	59
<i>Reação em cadeia da polimerase em tempo real para avaliação da apoptose neural</i>	60
Avaliação da quantificação da carga viral por PCR em tempo real	60
<i>Extração do RNA total</i>	61
<i>Síntese do cDNA</i>	61
<i>Síntese do padrão para quantificação</i>	61
<i>Reação em cadeia da polimerase em tempo real para a detecção e quantificação do vírus da cinomose</i>	62
Análise estatística	62
RESULTADOS E DISCUSSÃO	62
Avaliação da expressão gênica relativa de Bax, Bcl-2, caspase-3, caspase-8 por RT-PCR em tempo real	62
Avaliação da quantificação da carga viral por PCR em tempo real no encéfalo e suas relações às manifestações neurológicas	70
<i>Correlação entre a carga viral e a expressão gênica dos fatores apoptóticos</i>	73
CONCLUSÕES	75
CONSIDERAÇÕES FINAIS	75
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	76

LISTA DE FIGURAS

CAPÍTULO 1	
Figura 1	Modelo esquemático da estrutura do vírus da cinomose canina, demonstrando as seis proteínas estruturais (N – Nucleocapsídeo; P – Fosfoproteína; M – Matriz proteica associada ao envelope; F – Proteína de fusão; H – Hemaglutinina; L – Proteína larga) codificadas pelos seis genes que compõem o RNA viral envoltas pelo envelope lipoprotéico (E)..... 22
Figura 2	Árvore filogenética do gene hemaglutinina do vírus da cinomose canina demonstrando os genótipos e subgenótipos descritos no mundo. As letras de A a G correspondem aos subgenótipos encontrados dentro do genótipo América do Sul..... 23
Figura 3	Esquema demonstrando a infecção do vírus da cinomose canina nas células do sistema nervoso central (SNC). O vírus penetra no SNC infectando as células endimárias por duas vias: 1) Monócitos infectados atingem o espaço subaracnóide devido a vasculite e a lesão da barreira hematoencefálica e se fundem as células endimárias; 2) O vírus se dissemina nas células do plexo coróide e após citólise permanecem no espaço subaracnóide até chegarem as células endimárias. Após infecção das células endimárias o vírus penetra nos astrócitos pelos prolongamentos astrocitários e se multiplica até atingir os oligodentrócitos e neurônios, resultando em desmielinização e morte neuronal..... 27
CAPÍTULO 2	
Figura 1	Esquema ilustrativo demonstrando os pontos de referência para coleta de fluido cérebro-espinhal no espaço occipito-atlântica em um cão 43
Figura 2	Fotografias dos testes de imunocromatografia (CDV Ag) realizados com amostras do fluido cérebro-espinhal de cães. Observa-se em A, coloração apenas da banda controle (C), indicando que a amostra avaliada é negativa. Em B, observa-se coloração das bandas controle (C) e teste (T), indicando que a amostra testada é positiva..... 44
CAPÍTULO 3	
Figura 1	Mensuração pela PCR em tempo real da expressão de Bcl-2. Comparação da razão dos valores relativos, expressos em médias e erros-padrão, do grupo cinomose em relação ao grupo controle negativo (nível basal=1), no lobo frontal (A), hipocampo (B), cerebelo (C) e entre eles (E) de cães naturalmente infectados com o vírus da cinomose canina e entre os controles negativos (D)..... 63

Figura 2	Mensuração pela PCR em tempo real da expressão de caspase-8. Comparação da razão dos valores relativos, expressos em médias e erros-padrão, do grupo cinomose em relação ao grupo controle negativo (nível basal=1), no lobo frontal (A), hipocampo (B) e cerebelo (C) e entre eles (E) de cães naturalmente infectados com o vírus da cinomose canina e entre os controles negativos (D).....	65
Figura 3	Mensuração pela PCR em tempo real da expressão de Bax. Comparação da razão dos valores relativos, expressos em médias e erros-padrão, do grupo cinomose em relação ao grupo controle negativo (nível basal=1), no lobo frontal (A), hipocampo (B) e cerebelo (C) e entre eles (E) de cães naturalmente infectados com o vírus da cinomose canina e entre os controles negativos (D).....	66
Figura 4	Mensuração pela PCR em tempo real da expressão de caspase-3. Comparação da razão dos valores relativos, expressos em médias e erros-padrão, do grupo cinomose em relação ao grupo controle negativo (nível basal=1), no lobo frontal (A), hipocampo (B) e cerebelo (C) e entre eles (E) de cães naturalmente infectados com o vírus da cinomose canina e entre os controles negativos (D).....	67
Figura 5	Mensuração pela PCR em tempo real da expressão dos fatores anti-apoptótico (Bcl-2) (A) e pro-apoptóticos (Bax, caspase-8 e caspase-3) (B;C;D). Comparação da razão dos valores relativos, expressos em médias e erros-padrão, do grupo cinomose em relação ao grupo cinomose+babesia, no lobo frontal, hipocampo e cerebelo.....	68
Figura 6	Mensuração pela PCR em tempo real da carga viral no lobo frontal, hipocampo e cerebelo de cães naturalmente infectados com o vírus da cinomose canina. Comparação da razão dos valores relativos, expressos em médias e erros-padrão entre os segmentos estudados.....	71

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO 2		
Tabela 1	Prevalência do vírus da cinomose canina em relação às variáveis sexo, idade, época do ano e estado vacinal em 90 cães infectados naturalmente.....	46
Tabela 2	Prevalência da cinomose canina em diversos modelos de distribuição em relação à idade dos animais infectados.....	47
Tabela 3	Prevalência dos sinais clínicos extra-neurais observados em 71 cães naturalmente infectados pelo vírus da cinomose canina.....	49
Tabela 4	Prevalência dos sinais neurológicos observados em 76 cães naturalmente infectados com o vírus da cinomose canina.....	50
Tabela 5	Alterações hematológicas observadas em 44 cães naturalmente infectados pelo vírus da cinomose	

	canina.....	52
Tabela 6	Classificação da anemia em relação à gravidade, morfologia e responsividade da medula óssea em 32 cães naturalmente infectados pelo vírus da cinomose canina.....	53
Tabela 7	Comparação do teste de imunocromatografia para pesquisa de antígeno realizado com amostras do fluido cérebro-espinal e de <i>swab</i> conjuntival em 76 animais com sinais clínico-neurológicos devido a infecção natural pelo vírus da cinomose canina.....	54
Tabela 8	Principais alterações do fluido cérebro-espinal de 16 cães infectados naturalmente com o vírus da cinomose canina.....	54
CAPÍTULO 3		
Tabela 1	Correlação da quantificação da carga viral do lobo frontal, hipocampo e cerebelo com o grau de apoptose neural dos fatores apoptóticos (Bcl-2, Bax, Caspase-8 e Caspase-3) de acordo com o coeficiente de variação de Pearson de 21 cães naturalmente infectados pelo vírus da cinomose canina.....	74

LISTA DE QUADROS

CAPÍTULO 1		
Quadro 1	Carnívoros terrestres susceptíveis ao vírus da cinomose canina.....	24
CAPÍTULO 3		
Quadro 1	<i>Primers</i> utilizados para reação de PCR para amplificação específica do cDNA dos genes alvos relacionados a apoptose.....	58
Quadro 2	Sinais clínicos neurológicos e sua correlação com a apoptose e carga viral observadas em 21 cães naturalmente infectados pelo vírus da cinomose canina que foram posteriormente submetidos ao exame necroscópico.....	72

LISTA DE ANEXOS

Anexo 1	Certificado da comissão de ética no uso de animais (CEUA/UFGM).....	88
Anexo 2	Modelo de ficha clínica utilizado para anotar os sinais clínicos sistêmicos dos animais com cinomose canina.....	89
Anexo 3	Modelo de ficha clínica utilizado para anotar os sinais clínicos neurológicos dos animais com cinomose canina.....	91

LISTA DE ABREVIATURAS

μ	Mi
μg	Micrograma
μl	Microlitro
Ag	Antígeno
ANOVA	Análise de variância
BHE	Barreira hematoencefálica
CC	Cinomose canina
CCZ	Centro de controle de zoonoses
cDNA	DNA complementar
CDV	<i>Canine distemper virus</i>
CHCM	Concentração de hemoglobina corpuscular média
CT	<i>Threshold</i>
CTCN	Contagem total de células nucleadas
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético
EV	Escola de Veterinária
FasL	Faz ligante
FCE	Fluido cérebro-espinhal
g	giros
HCM	Hemoglobina corpuscular média
IBTEC	Instituto de biotecnologia
ml	Microlitro
nm	Nanômetro
NMI	Neurônio motor inferior
NMS	Neurônio motor superior
PCR	Reação em cadeia de polimerase
PGE₂	Prostaglandina-E ₂
RC	<i>Swab</i> conjuntival
RDW	Distribuição do tamanho dos eritrócitos
RT	Transcrição reversa
SARA	Sistema ativador reticular ascendente
SLAM	Molécula sinalizadora de ativação de linfócitos
SNC	Sistema nervoso central
TNF-α	Fator de necrose tumoral
TR	Teste rápido de imunocromatografia

UFMG	Universidade Federal de Minas Gerais
UNESP	Universidade estadual paulista
VCC	Vírus da cinomose canina
VCM	Volume corpuscular médio
VG	Volume globular

RESUMO

A cinomose canina é uma das principais doenças infecciosas que resulta em altas taxas de morbidade e mortalidade em cães vacinados e não vacinados. Neste estudo, foram realizados dois experimentos com objetivo de avaliar as características da infecção pelo vírus da cinomose canina, a quantificação e correlação da carga viral e da expressão gênica de proteínas apoptóticas no sistema nervoso central e suas relações com as manifestações neurológicas em cães naturalmente infectados na região de Belo Horizonte, MG, Brasil entre 2012 a 2014. No primeiro, realizou-se um estudo clínico e epizootiológico com 90 cães naturalmente infectados pelo vírus da cinomose canina em Belo Horizonte atendidos no Hospital Veterinário da Escola de Veterinária da UFMG. Observou-se que a doença foi mais frequente em animais adultos (1-6 anos de idade) e não vacinados, não ocorrendo diferença nas categorias sexo e época do ano entre os animais infectados. Os sinais extraneurais e neurais foram variados, com predomínio de manifestações gastrentérica e respiratória e mioclonia e déficit motor, respectivamente. Os valores hematológicos de 44 cães revelaram predomínio de anemia arregenerativa e linfopenia e baixa ocorrência de corpúsculos de Sinaglia-Lentz. Amostras do fluido cérebro-espinhal de 16 cães revelaram predomínio de proteinorraquia associada à pleocitose linfocítica. Além disso, 100% dos animais com sinais neurológicos foram positivos para o teste de imunocromatografia para pesquisa de antígenos com amostras do fluido cérebro-espinhal. O contrário ocorreu com amostras de *swab* conjuntival, em que apenas 67% dos animais com sinais neurológicos foram positivos, contraindicando, por isso, sua utilização nessa fase da doença. No segundo experimento realizou-se a quantificação e correlação da apoptose neural e da carga viral no lobo frontal, hipocampo e cerebelo pela PCR em tempo real de 21 cães naturalmente infectados pelo vírus e se estes relacionavam-se aos sinais neurológicos manifestados. A avaliação da expressão gênica dos fatores pró (Bax, caspase-3, caspase-8) e anti-apoptóticos (Bcl-2) demonstrou que o vírus da cinomose canina induziu a morte celular por apoptose no hipocampo, tanto pela via intrínseca como extrínseca, e no cerebelo, pela via intrínseca ($p < 0,05$). A carga viral no cerebelo foi maior comparado ao lobo frontal e hipocampo. No entanto, não houve diferença estatística entre as cargas virais das três regiões encefálicas acometidas ($p > 0,05$). Não houve correlação significativa entre a expressão gênica dos fatores apoptóticos e a carga viral entre as regiões encefálicas ($p > 0,05$), sequer associação aos sinais neurológicos manifestados. Conclui-se que não existe correlação, positiva ou negativa, entre a quantidade de vírus, a expressão gênica dos fatores da apoptose no encéfalo e os sinais neurológicos de cães naturalmente infectados pelo vírus da cinomose canina.

Palavras-chave: cinomose canina, epizootia, reação em cadeia da polimerase em tempo real, apoptose, carga viral

ABSTRACT

Canine distemper is one of the most important infectious diseases in vaccinated and non vaccinated dogs with high rates of morbidity and mortality. In this study, two experiments were performed to evaluate canine distemper virus infection characteristics, genetic apoptotic proteins expression and virus load quantification and correlation and the relation with neurological signs in Belo Horizonte, MG, Brasil, between 2012-2014. The first evaluated the epizootiological pattern of dogs naturally infected with canine distemper in the Veterinary Hospital of UFMG. It was observed that the disease is more frequent in adult (1-6 years old) and in non-vaccinated dogs, without statistical difference in sex or season of the year between infected animals. The extraneural and neural signs were varied, with a predominance of gastroenteric and respiratory manifestations and myoclonus and motor deficit, respectively. Haematological indices of 44 dogs revealed, in most cases, nonregenerative anemia, lymphopenia e low counts of Sinoglia-Lentz corpuscles. Analysis of cerebrospinal fluid in 16 dogs showed that, in most cases, protein levels increased associated with lymphocytic pleocytosis. The immunochromatography test with cerebrospinal fluid samples was positive in 100% in animals with neurological signs being very useful in identifying the illness. Conversely, samples of conjunctival scrapings were not as useful in infection identification because only 67% of animals with neurological signs were positive. In the second experiment, we quantified and correlate neural apoptosis and viral load in the frontal lobe, hippocampus and cerebellum by real time PCR of 21 naturally infected dogs with canine distemper. We also evaluate the relation between these factors and neurological signs. Gene expression of anti (Bcl-2) and pro-apoptotic (Bax, caspase-3, caspase-8) factors showed that canine distemper virus induces apoptosis in the hippocampus, by the extrinsic and intrinsic pathways, and in cerebellum, by an intrinsic pathway ($p < 0,05$). Despite the higher viral load in cerebellum, there was no statistical difference in the amount of viral load among the three brain regions ($p > 0,05$). There was also no significant correlation between gene expression of apoptotic factors and viral load in the evaluated brain regions ($p > 0,05$), neither possible association with neurological signs too. We concluded that there is no correlation, positive or negative between virus load, apoptosis genetic expression in the brain and neurological signs in natural distemper canine virus infection in dogs

Key-words: canine distemper, outbreak, real time polymerase chain reaction, apoptosis, viral load

INTRODUÇÃO GERAL

O vírus da cinomose canina (VCC), um *Morbillivirus* da família Paramyxoviridae, é altamente contagioso e ocasiona doença multissistêmica grave com altas taxas de mortalidade em cães (Appel, 1987). A cinomose canina (CC) é conhecida há séculos, e até hoje persiste como uma das principais afecções que acometem os cães no mundo inteiro apesar da introdução de vacinas de vírus atenuado em meados de 1950 (Appel, 1987; Appel e Summers, 1995; Calderon et al., 2007). No Brasil representa 6% de todas as ocorrências clínicas e até 11% da causa dos óbitos de cães (Negrão et al., 2007).

O VCC é envelopado e contém uma fita de RNA negativa simples, não segmentada, com aproximadamente 15.000 nucleotídeos (Greene e Vandeveld, 2012). O RNA viral codifica seis proteínas estruturais: duas glicoproteínas de membrana - fusão (F) e hemaglutinina (H), matriz protéica associada ao envelope (M), fosfoproteína (P), polimerase larga (L) e a proteína do nucleocapsídeo (N) (Greene e Vandeveld, 2012). Os genes que codificam as proteínas H e F possuem alta mutagenicidade de nucleotídeos que variam entre as diferentes estirpes virais e regiões geográficas (Martella et al., 2006).

O VCC infecta, naturalmente, mamíferos terrestres e marinhos de várias famílias da ordem Carnívora e epizootias em outros mamíferos como macacos, javalis, leões e focas são preocupantes (Han et al., 2008, Greene e Vandeveld, 2012). Acomete cães de qualquer idade, sexo ou raça (Tipold et al., 1992). Após transmissão pelo contato com aerossol, secreções e excreções ou pela via transplacentária, o vírus infecta e se replica nos tecidos linfáticos e em seguida atinge vários sistemas incluindo o respiratório, gastrentérico, urogenital e o sistema nervoso central (SNC) (Appel et al., 1981). Os animais podem ser assintomáticos assim como apresentar uma combinação de sinais clínicos neurológicos e sistêmicos que podem aparecer isoladamente ou em associação. Os sinais clínico-neurológicos mais comuns incluem obnubilação, tetraparesia, andar em círculos, inclinação de cabeça, nistagmo, estrabismo, crises epilépticas focais e/ou generalizadas e mioclonia (Martella et al., 2008). A persistência do vírus no SNC é favorecida pela ausência de citólise durante a replicação e multiplicação do vírus e pela baixa translação do mRNA viral em algumas células como neurônios e oligodendrócitos (Zubriggen e Yamawaki, 1993; Zubriggen et al., 1995). As lesões neurológicas predominantemente observadas estão relacionadas à desmielinização, e as células neurais podem sofrer lesão pela excitotoxicidade e apoptose (Vandeveld e Zurbriggen, 1995; Brunner et al., 2007).

Acredita-se que o processo de apoptose seja um dos principais fatores responsáveis pela desmielinização na CC (Moro et al., 2003a). A apoptose é um tipo de morte celular ativa que ocorre em condições fisiológicas e patológicas (Elmore, 2007). É um processo complexo que envolve a participação de proteases e a regulação de fatores anti e pro-apoptóticos que são ativados pela via intrínseca e/ou extrínseca com participação de proteínas da família Bcl-2 (Bcl-2, Bcl-xl e Bax) e caspases efetoras (Majno e Joris, 1995; Finucane et al., 1999). Existem raros relatos sobre a expressão gênica de fatores apoptóticos no SNC de cães naturalmente ou experimentalmente infectados. Del Puerto e colaboradores (2010) identificaram indução das vias intrínseca e extrínseca da apoptose no cerebelo de quatro cães infectados naturalmente com o VCC (Del Puerto et al., 2010). No entanto, ainda não se sabe quais são os fatores que interferem na indução da apoptose no SNC nos animais infectados. Talvez a quantidade de vírus nas diferentes regiões do encéfalo possa estar correlacionada a esses mecanismos moleculares. Não existem estudos sobre a correlação entre o grau da apoptose neural com a carga viral. De forma inédita, esse estudo teve o propósito de avaliar a expressão gênica de fatores apoptóticos em três regiões encefálicas distintas (lobo frontal, hipocampo e cerebelo) e sua correlação com a carga viral e os sinais clínicos neurológicos.

O diagnóstico da CC pode ser realizado com uso de métodos específicos e sensíveis baseados em técnicas imunocromatográficas e de biologia molecular. A imunocromatografia é um teste de fácil execução e resultado instantâneo que pode ser realizado com amostras do fluido cérebro-espinhal (FCE), *swabs* conjuntivais e genitais, sangue e urina. Demonstrou-se também que a reação em cadeia da polimerase com transcrição reversa (RT-PCR) consiste de uma ferramenta diagnóstica adequada para detecção da sequência genômica do VCC em *swabs* ou amostras biológicas mesmo em animais assintomáticos (Elia et al., 2006). Nesse estudo, pela primeira vez, realizou-se a comparação da eficácia do teste de imunocromatografia para testar antígenos em amostra de FCE e de *swabs* conjuntivais em animais com sinais neurológicos.

Devido às similaridades histopatológicas a infecção pelo VCC tem um importante valor como modelo animal para o estudo da infecção por morbilivírus, como o vírus do sarampo e de doenças desmielinizantes como a esclerose múltipla e a panencefalite subaguda esclerosante na espécie humana (Appel e Gillespie, 1972; Adams et al., 1975; Koestner, 1975).

A CC continua sendo uma doença viral de impacto sócio-econômico no campo veterinário brasileiro devido aos altos custos de tratamentos, falhas na imunização vacinal e ao sofrimento dos proprietários e dos animais (Headley et al., 2012). A infecção de animais vacinados é preocupante e cada vez mais constante. Associado a isso, não existe ainda terapia efetiva para combater o vírus, sendo instituído apenas tratamento sintomático. Além disso, a diversidade socioeconômica das diferentes regiões brasileiras dificulta o estabelecimento das tendências epizootiológicas do VCC e do manejo da doença. Portanto, o conhecimento das características epizootiológicas em cada região do território brasileiro associado ao estudo da quantificação da carga viral e sua correlação com a expressão gênica de fatores apoptóticos no SNC e com os sinais neurológicos torna-se de extrema importância para gerar subsídios que poderão ser utilizados em futuras pesquisas de terapias antivirais e tratamento de doenças desmielinizantes.

OBJETIVOS GERAIS

Avaliar as características epizootiológicas da infecção pelo vírus da cinomose canina, a quantificação e correlação da carga viral e da expressão gênica de proteínas apoptóticas e suas relações com as manifestações neurológicas em cães naturalmente infectados na região de Belo Horizonte, MG, Brasil entre 2012 a 2014.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Analisar a distribuição do vírus da cinomose canina em relação ao sexo, idade, época do ano e condição vacinal (Capítulo 2).
- Avaliar os principais sinais clínicos sistêmicos e neurológicos em cães com cinomose canina (Capítulo 2).
- Avaliar o perfil hematológico e o fluido cérebro espinhal de cães naturalmente infectados com o vírus da cinomose canina (Capítulo 2).
- Comparar a eficácia do teste de imunocromatografia para pesquisa de antígeno de amostras conjuntivais e do fluido cérebro-espinhal em cães com sinais neurológicos decorrentes da infecção pelo vírus da cinomose canina (Capítulo 2).
- Quantificar a expressão gênica por PCR em tempo real de proteínas antiapoptóticas (Bcl-2) e pró-apoptóticas (Bax, Caspase-8, Caspase-3) no lobo frontal, hipocampo e cerebelo de cães naturalmente infectados pelo vírus da cinomose canina (Capítulo 3).
- Quantificar a carga viral por PCR em tempo real no lobo frontal, hipocampo e cerebelo de cães naturalmente infectados pelo vírus da cinomose canina (Capítulo 3).
- Correlacionar a expressão gênica dos fatores apoptóticos à carga viral no lobo frontal, hipocampo e cerebelo de cães com cinomose canina (Capítulo 3).
- Avaliar se existe relação entre a quantificação viral nos segmentos encefálicos e os sinais neurológicos (Capítulo 3).

CAPÍTULO 1

REVISÃO DE LITERATURA

1. HISTÓRICO

A cinomose canina (CC), cujos primeiros sinais clínicos em cães domésticos foram observados há mais de 250 anos, é uma doença infecciosa grave que até hoje gera impactos socioeconômicos para diversos países. Dados históricos sugerem que a primeira descrição da doença ocorreu na América do Sul em 1746 no Peru (Howell, 1965; Blancou, 2004) e após 24 anos, em 1760 foram reportados os primeiros casos europeus na Espanha e Inglaterra (Blancou, 2004). Nessa época, 900 cães morreram em apenas um dia devido a uma doença, que tinha as características clínicas da CC. Em 1764 na Itália e Irlanda e em 1770 na Rússia, foram observados cães com os mesmo sinais clínicos (Blancou, 2004). Em contrapartida, um estudo espaço-temporal realizado por Panzera e colaboradores (2015), sugeriu que as primeiras estirpes virais originaram-se dos Estados Unidos em 1880 e foram divididas em duas linhagens: a linhagem hoje denominada de América-1, que se disseminou posteriormente pela Ásia, e outra ancestral que se disseminou para as diferentes regiões geográficas e deu origem as outras nove linhagens caracterizadas até hoje (Panzera et al., 2015).

Especula-se que os relatos datados de 1746 foram baseados em sinais clínicos que se assemelhavam aos da CC, e causados por diferentes agentes etiológicos, ou que as possíveis estirpes que resultaram nesses sinais clínicos estejam extintas ou ainda não foram identificadas (Panzera et al., 2015).

A etiologia viral foi proposta apenas em 1905 pelo veterinário francês Henri Carré após isolamento viral, e a doença foi denominada de doença de Carré (Carré, citado por Chappuis, 1994). No entanto, os achados de Carré não foram inicialmente aceitos, pois se acreditava que a bactéria *Haemophilus bronchisepticus*, observada no sistema respiratório de animais com suspeita da doença, era a responsável pelos sinais respiratórios (Gledhill, 1953).

Em 1926 após estudos experimentais realizados em furões por Dunkin e Laidlaw, em que seis estirpes virais foram descritas, percebeu-se que essa doença poderia ser transmitida dos furões para os cães e vice-versa (Gledhill, 1953). Com isso reconheceu-se, a partir desse momento, que a CC era uma doença infecciosa aguda transmitida por um vírus, com um período de incubação de quatro dias, caracterizada por febre, secreção nasal e ocular, conjuntivite, alterações gastrintestinais, sinais respiratórios e manifestações neurológicas infrequentes (Gledhill, 1953).

Após 1940, os sinais neurológicos começaram a ser descritos com maior frequência e em 1947 Rubarth identificou que, geralmente, animais com encefalite apresentavam também hiperqueratose dos coxins plantares (Gledhill, 1953). A partir dessa década foram introduzidas vacinas com o vírus atenuado, o que ajudou a reduzir os casos de CC em diversos países (Appel, 1987). No entanto, ainda hoje são observadas epizootias em populações silvestres e altas taxas de morbidade e mortalidade em populações de cães não vacinados e vacinados (Krakowka et al., 1980; Tipold et al., 1996; Martela et al., 2010).

2. ETIOLOGIA

O VCC é um *Morbilivírus* da família *Paramyxoviridae* antigenicamente semelhante ao vírus do sarampo, peste bovina, peste dos pequenos ruminantes, morbilivírus dos cetáceos e vírus da cinomose focina (Greene e Vandeveld, 2012). O vírus é relativamente grande com um

diâmetro de 150-250 nm, composto por uma fita simples de RNA negativa não segmentada com aproximadamente 15.000 nucleotídeos (Greene e Vandeveldel, 2012). O RNA viral codifica seis proteínas estruturais. A proteína do nucleocapsídeo (N), polimerase larga (L) e a fosfoproteína (P) são associadas ao RNA e participam da transcrição e replicação viral. A hemaglutinina (H), e a proteína de fusão (F) são as determinantes antigênicas do vírus e estão localizadas no envelope viral, juntamente com a matriz proteica (M) (Figura 1) (Greene e Vandeveldel, 2012). A proteína H é fundamental para a infecção, já que é responsável pelo reconhecimento e ligação em receptores das células do hospedeiro (Von Messling et al., 2006). Os genes que codificam a proteína H possuem alta variabilidade de nucleotídeos, em torno de 10%, que se diferem entre as estirpes em várias regiões geográficas (Hass et al., 1997; Von Messling et al., 2001). Se duas estirpes apresentarem uma variação de mais de 4% de aminoácidos na proteína H, elas serão de linhagens diferentes (Martella et al., 2006).

Estudos de biologia molecular e sequenciamento viral com a proteína H identificaram nove linhagens circulantes no mundo: America-I, America-II, Asia-I, Asia-II, Europa II (silvestre), Ártica, África do Sul, América do Sul-I/Europa, América do Sul-II (Figura 2) (Hass et al., 1997; Mochizuki et al., 1999; Martella et al., 2006; Calderón et al., 2007; Woma et al., 2010; Panzera et al., 2012). Recentemente identificou-se uma nova linhagem circulante na Colômbia, denominada de América do Sul III (Espinal et al., 2014). Informações moleculares das estirpes circulantes no Brasil demonstraram o predomínio da linhagem América do Sul I (Budaszewski et al., 2014).

O VCC é envelopado e extremamente sensível ao calor, à falta de umidade e a desinfetantes, sendo inativado e destruído em temperaturas de 50 a 60° C em 30 minutos. Em tecidos e secreções pode sobreviver por até uma hora a 37° C e até três horas em temperatura ambiente. Em temperaturas próximas de zero a quatro graus permanece no ambiente por algumas semanas. Desinfecções rotineiras do ambiente são suficientes para eliminação do vírus em hospitais e canis, não sendo necessário realizar vazios sanitários (Greene e Vandeveldel, 2012).

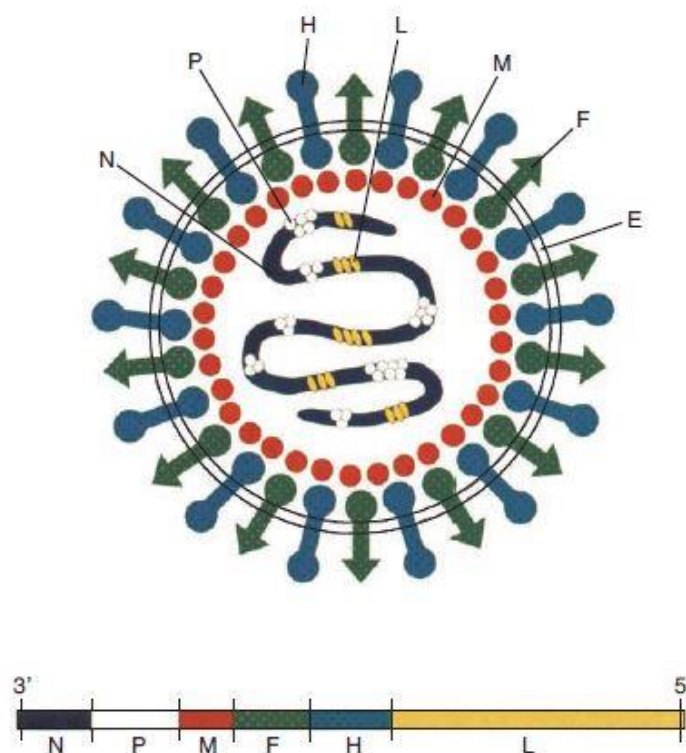
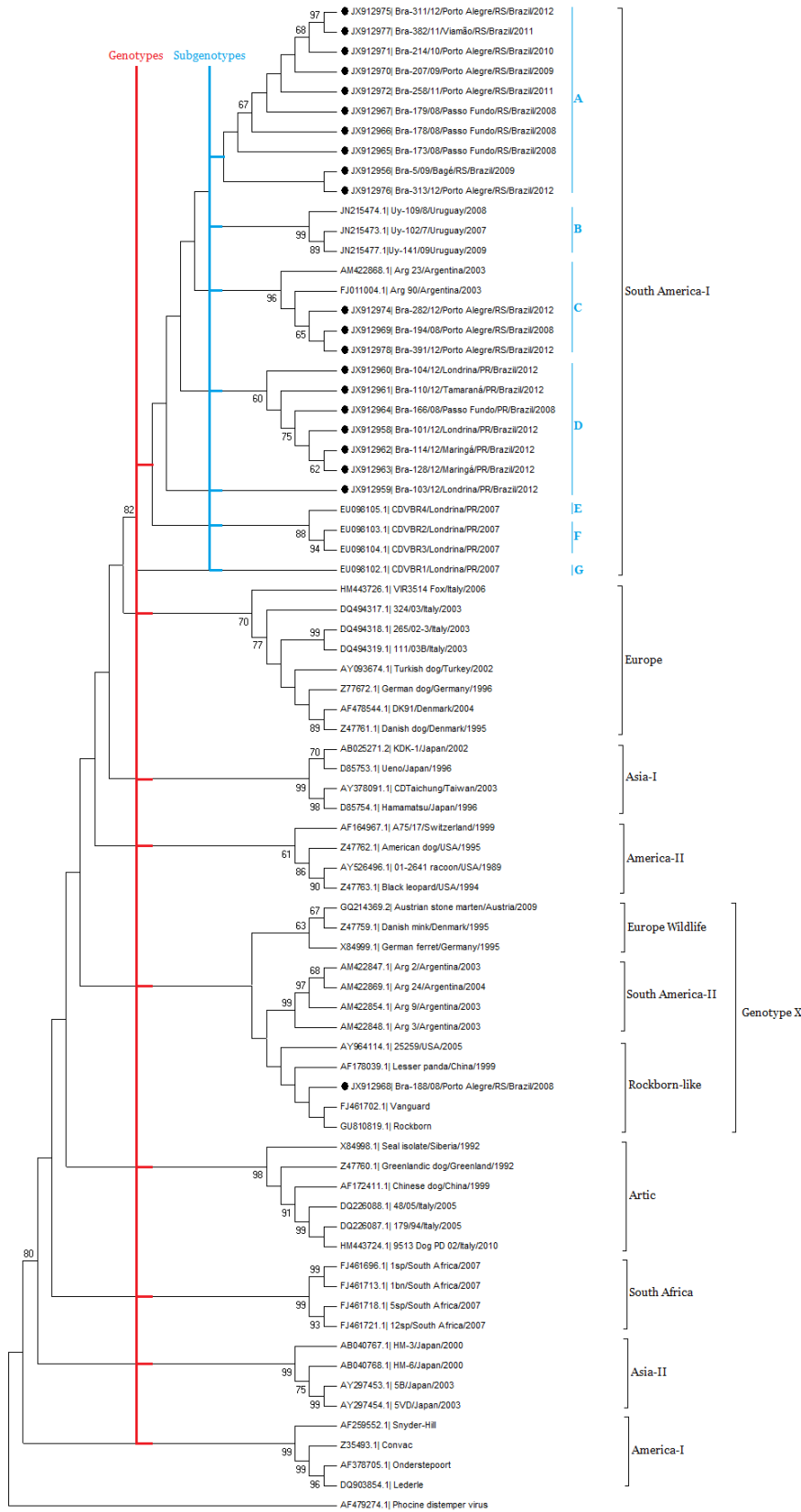


Figura 1 - Modelo esquemático da estrutura do vírus da cinomose canina, demonstrando as seis proteínas estruturais (N – Nucleocapsídeo; P – Fosfoproteína; M – Matriz proteica associada ao envelope; F – Proteína de fusão; H – Hemaglutinina; L – Proteína longa) codificadas pelos seis genes que compõem o RNA viral envoltas pelo envelope lipoprotéico (E). (Fonte: Modificada de Greene e Vandeveldt, 2012).

Figura 2 – Árvore filogenética do gene hemaglutinina do vírus da cinomose canina demonstrando os genótipos e subgenótipos descritos no mundo. As letras de A a G correspondem aos subgenótipos encontrados dentro do genótipo América do Sul. (Fonte: Figura retirada de Budaszewski, 2014).



3. EPIZOOTIOLOGIA

O VCC infecta, naturalmente, mamíferos terrestres e marinhos de várias famílias da ordem Carnívora (Quadro 1). No entanto, infecções em outros mamíferos como macacos (Yoshikawa et al., 1989; Sun et al., 2010), javalis e focas (Kennedy et al., 2000) estão sendo observadas com maior frequência e, geralmente, resultam em epizootias. As epizootias do VCC em animais selvagens são um grave problema global e já foram associadas a altas taxas de mortalidade em leões do Serengeti (Roelke-Parker et al., 1996) e em raposas-das-ilhas na Califórnia (Timm et al., 2009). Infecções em alguns animais silvestres no Brasil também já foram relatadas (Megid et al., 2009; Megid et al., 2010). As causas para essa disseminação viral e a adaptação a diversos tipos de hospedeiros estão associadas à transmissão interespecífica e recombinações virais por alterações moleculares do gene H (Han et al., 2008). Apesar da grande variabilidade de espécies que podem ser infectadas, os cães são os principais reservatórios do vírus e, juntamente com furões, martas e outros animais selvagens, são considerados a fonte de infecção para populações susceptíveis (Harder e Osterhaus, 1997).

Apesar de serem observadas infecções em grandes felinos, não existem evidências de infecções naturais em gatos domésticos. Na década de 70, a infecção experimental com o VCC em gatos domésticos e suínos resultou em soroconversão, mas não em doença clínica (Appel, 1974). Infecções experimentais produzidas com estirpes altamente virulentas resultaram apenas em discreto aumento da temperatura corporal nesses animais (Gaskin, 1974). No entanto existe um temor de que um dia possam ocorrer mutações virais que tornem o vírus adaptado e capaz de infectar e causar sinais clínicos nessa espécie, o que poderia levar a uma nova epizootia.

A CC acomete cães de qualquer idade, sexo ou raça (Krakowka e Koestner, 1976; Tipold et al., 1992). Supõe-se que cães braquicefálicos são menos susceptíveis à infecção e tendem a apresentar menor índice de mortalidade e sequelas comparado aos dolicocefálicos (Greene e Vandeveld, 2012).

Quadro 1 - Carnívoros terrestres susceptíveis ao vírus da cinomose canina

FAMÍLIA	ANIMAIS
Ailuridae	Panda vermelho
Canidae	Cão doméstico, coiote, lobo, raposa, dingo, cão-guaxinim.
Mustelidae	Furão, lontra, ariranha, glutão, texugo
Mephitidae	Gambá
Procyonidae	Quati, jupará, guaxinim.
Ursidae	Urso, panda gigante.
Viverridae	Fossa
Herpestidae	Mangusto, suricato
Felidae (grande porte)	Chita, leão, jaguar, gato-maracajá, jaguatirica, leopardo, puma, lince.

Adaptada de Greene (2012).

4. PATOGENIA

Após infecção pelo contato com aerossol, secreções e excreções, ou pela via transplacentária (Krakowka et al., 1976), o vírus, que é altamente linfotrópico e imunossupressor, liga-se aos receptores CD150 ou SLAM (molécula sinalizadora de ativação de linfócitos) das células linfóides e replica-se em macrófagos teciduais com posterior

disseminação para tonsilas e linfonodos bronquiais nas primeiras 24 horas (Appel, 1969). Após quatro a seis dias de intensa replicação viral local, o vírus se dissemina, pelas vias linfática e sanguínea, para outros tecidos linfoides como baço, medula óssea, linfonodos mesentéricos, células de Kupffer no fígado, tecidos linfoides associados à lâmina própria no intestino e estômago, o que resulta em pico febril e em leucopenia por linfopenia (Appel, 1969; Appel, 1987). A partir desse momento o animal já começa a eliminar e transmitir o vírus nas secreções e excreções (Appel, 1987). Após nove a 14 dias à infecção, ocorre disseminação do vírus para vários sistemas incluindo o respiratório, gastrintérico, urogenital e dermatológico, geralmente, associada a um segundo pico febril (Appel, 1969; Appel et al., 1981). A ligação do vírus ao tecido epitelial é mediada pela expressão do receptor PVRL4, também denominado de nectina-4 ou N4 (Noyce et al., 2013). Finalmente, o VCC invade o SNC, resultando em sinais clínicos graves que podem levar o animal ao óbito.

O curso da doença e a recuperação da infecção estão relacionados à capacidade do animal em produzir anticorpos associados à virulência da estirpe, quantidade do vírus, e estado imunológico do animal (Appel, 1987). Os animais com boa resposta humoral eliminam o vírus rapidamente do organismo sem demonstrar qualquer sinal clínico. Os animais com resposta imune tardia podem permanecer com uma infecção subclínica ou com sinais clínicos discretos até a eliminação completa do vírus da maioria dos tecidos. Nesses animais, o vírus pode persistir por longos períodos na úvea, células neurais e coxins plantares predispondo ao surgimento de sinais neurológicos tardios (Gröne et al., 2004). Já nos animais com resposta imune ineficiente, ou que são submetidos a estirpes altamente virulentas e/ou em grande quantidade, ocorre multiplicação viral associada a sinais clínicos graves, principalmente neurológicos, que são exacerbados por infecções oportunistas levando ao óbito em 90% dos casos (Appel, 1969).

4.1 Linfotropismo e imunossupressão

A infecção pelo vírus da cinomose resulta em leucopenia devido à linfopenia (linfócitos B e T), que se inicia em uma semana e pode persistir por até 10 semanas após a infecção (Krakowka et al., 1980). Experimentos em furões e cães demonstraram infecção inicial em células linfoides do baço, linfonodos e timo assim como em linfócitos T e B circulantes, anterior à invasão epitelial disseminada (Appel, 1969; Von Messling et al., 2006). O linfotropismo ocorre devido à ligação seletiva da proteína H do vírus aos receptores CD150/SLAM das células linfoides (Von Messling et al., 2006). Esse receptor é uma glicoproteína de membrana com sítios de ligação para o antígeno viral do morbilivírus expresso na superfície de células do sistema imune como tímócitos imaturos, linfócitos ativados e monócitos. Após reconhecimento dos receptores pela proteína H ocorre fusão do vírus mediada pela proteína F possibilitando rápida disseminação viral. A replicação viral e destruição dos tecidos linfóides contribuem para a supressão da resposta imune do hospedeiro. No entanto, os mecanismos da indução da imunossupressão pelo vírus não são completamente elucidados e provavelmente são multifatoriais (Beineke et al., 2009). Acredita-se que a citólise linfoide não seja o único fator envolvido na imunossupressão, uma vez que esta persiste por um longo período mesmo após a eliminação do vírus do sistema linforreticular (Krakowka et al., 1980).

A imunossupressão também está associada à diminuição da produção de interleucina-1 pelos macrófagos e monócitos e o aumento da síntese de prostaglandina-E₂ (PGE₂), que é um agente imunossupressor com capacidade de inibir a produção de interleucina-2, interferon- γ e interleucina -12 pelas células Th1 (Krakowka et al., 1987b). Consequentemente ocorre diminuição na apresentação de antígenos pelos monócitos contribuindo para a diminuição da diferenciação de linfócitos B, formação de plasmócitos e produção de imunoglobulinas

(Krakowka et al., 1987b). Adicionalmente, o bloqueio de receptores Fc γ (CD32), expressos em linfócitos B, por propriedades imunomodulatórias da proteína N do vírus resulta em supressão de células não infectadas (Kerdiles et al., 2006).

4.2 Neuropatogenia

A infecção das células neurais é dependente da virulência da estirpe e do estado imunológico do hospedeiro. O VCC pode infectar neurônios, astrócitos, oligodendrócitos, células da micróglia, células endoteliais e células do plexo coroide (Beineke et al., 2009). As diferenças biológicas entre as estirpes do VCC se refletem na localização e intensidade das lesões no SNC, pois são influenciadas pela variação do tropismo viral. Algumas estirpes, como a Snyder Hill, infectam predominantemente neurônios e produzem lesão grave, principalmente na substância cinzenta com pouca desmielinização, enquanto outras estirpes, como as A75/17 e R252, apresentam maior tropismo por células da glia, resultando em desmielinização intensa (Summers et al., 1984a; Greene e Vandeveld, 2012).

O mecanismo exato de entrada do vírus no SNC não está bem esclarecido, mas acredita-se que a neuroinvasão ocorre predominantemente pela via hematogênica e a disseminação pelo FCE (Vandeveld et al., 1985; Krakowka, 1989; Vandeveld e Zurbriggen, 2005) (Figura 3). Monócitos e plaquetas infectadas e/ou o vírus livre atingem o espaço subaracnóide e infectam as células endoteliais, devido à vasculite e a lesão da barreira hematoencefálica (BHE), ou após citólise de células infectadas do plexo coroide (Krakowka et al., 1987a; Krakowka, 1989). Após infecção das células endoteliais, independente da via, o vírus penetra nos astrócitos pelos prolongamentos astrocitários e se multiplica até atingir as outras células neurais. Acredita-se que em resposta a infecção aguda, ocorra aumento no número de linfócitos e consequentemente aumento de receptores SLAM, o que facilita a infiltração e replicação viral no SNC pelos linfócitos infectados (Wenzlow et al., 2007). Até pouco tempo atrás, não se sabia em quais receptores celulares neurais que o vírus se ligava, pois os estudos demonstravam limitada expressão de receptores SLAM e nectina-4 em células do SNC, quando comparado aos tecidos linfóides (Wenzlow et al., 2007; Wyss-Fluehmann et al., 2010) e epitelial (Singethan et al., 2010; Wyss-Fluehmann et al., 2010), respectivamente. No entanto, um estudo recente demonstrou que a infecção das células neurais ocorre pela ligação do vírus a um terceiro tipo de receptor “hitherto” indefinido denominado de GliaR, induzindo a uma infecção não citolítica persistente (Alves et al., 2015).

Um estudo experimental realizado em furões demonstrou que o VCC também pode invadir o SNC pelo nervo olfatório (Rudd et al., 2006). Na mucosa olfatória, os dendritos dos neurônios olfatórios estão em contato íntimo com as células epiteliais respiratórias, possibilitando a transição do vírus entre essas células. Os axônios dos neurônios olfatórios infectados atravessam a placa cribiforme e fazem sinapse com neurônios do bulbo olfatório, permitindo a disseminação do vírus para estruturas profundas do encéfalo, como o lobo piriforme, hipocampo e hipotálamo. Embora essa via de infecção não tenha sido comprovada em cães, a similaridade entre o curso da doença entre furões e cães indica a possibilidade de infecção por essa via nesses animais (Rudd et al., 2006).

Após infecção das células neurais, o vírus ocasiona lesão neurológica, principalmente devido a alterações desmielinizantes (Vandeveld e Zurbriggen, 1995). Mecanismos que envolvem a excitotoxicidade pelo aumento da transmissão glutamatérgica, devido à diminuição da recaptação desse neurotransmissor pelos astrócitos lesados, e lesão direta de neurônios e células da glia, contribuem para as lesões no tecido nervoso (Brunner et al., 2007).

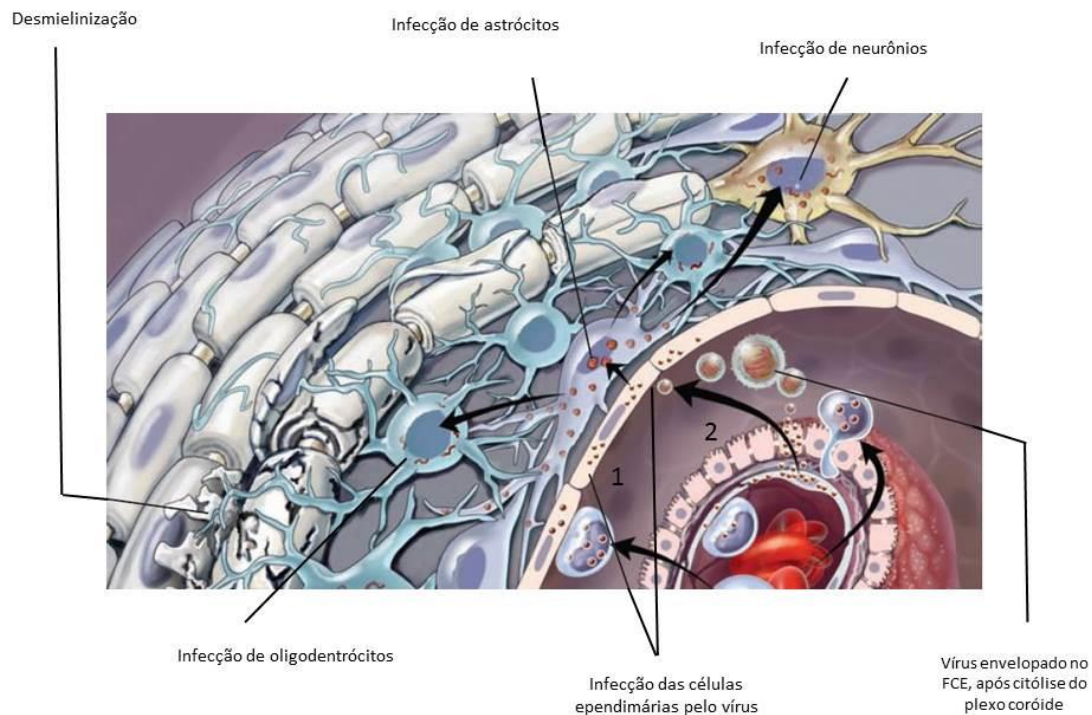


Figura 3 – Esquema demonstrando a infecção do vírus da cinomose canina nas células do sistema nervoso central (SNC). O vírus penetra no SNC infectando as células endoteliais por duas vias: 1) Monócitos infectados atingem o espaço subaracnóide devido a vasculite e a lesão da barreira hematoencefálica e se fundem as células endoteliais; 2) O vírus se dissemina nas células do plexo coróide e após citólise permanecem no espaço subaracnóide até chegarem às células endoteliais. Após infecção das células endoteliais o vírus penetra nos astrócitos pelos prolongamentos astrocitários e se multiplica até atingir os oligodendrócitos e neurônios, resultando em desmielinização e morte neuronal (Fonte: Modificado de Greene e Vandeveld, 2012).

4.3 O vírus da cinomose canina e a desmielinização

As lesões neurológicas ocasionadas pelo VCC estão intimamente relacionadas a alterações de desmielinização no SNC, resultando em leucoencefalites desmielinizantes. Com isso modelos experimentais com o VCC, *in vitro* ou *in vivo*, podem auxiliar no tratamento de doenças desmielinizantes humanas como a esclerose múltipla. O mecanismo pelo qual o VCC causa desmielinização não é muito bem compreendido (Zurbriggen et al., 1998). Estudos patogenéticos consideram que essas lesões desmielinizantes ocorrem de forma aguda e/ou crônica. As lesões agudas ocorrem durante um período de imunossupressão grave na ausência de inflamação em torno de três semanas após infecção (Vandeveld e Zurbriggen, 1995). Já em cães que sobrevivem à infecção aguda, inicia-se um influxo de células inflamatórias que se acumulam ao redor de vasos sanguíneos nas meninges e no parênquima que resultam em desmielinização e progressão da doença.

Na lesão aguda, estudos imunocitoquímicos e de hibridização *in situ* demonstraram que a desmielinização coincide com a replicação viral em células da glia na substância branca.

Diversos estudos tentaram associar a desmielinização à infecção de oligodendrócitos, que são as células produtoras da bainha de mielina no SNC. No entanto, foi demonstrado que a maioria das células infectadas, em torno de 95%, é composta por astrócitos (Mutinelli et al., 1989) e que raramente os oligodendrócitos são infectados (Higgins et al., 1982; Zurbriggen et al., 1987; Blakemore et al., 1989; Schoberberger et al., 2002). Foi ainda observada, em culturas neurais, infecção restrita de oligodendrócitos, em que ocorre transcrição viral, mas não a translação, resultando em uma infecção não citolítica devido à ausência de proteínas virais (Zurbriggen e Yamawaki, 1993). É possível que a transcrição viral nessas células interfira com funções especializadas necessárias para produção da mielina (Vandeveld e Zurbriggen, 2005), mas dificilmente explica a desmielinização difusa da substância branca, já que menos de 10% dos oligodendrócitos são acometidos (Zurbriggen et al., 1998).

Acredita-se que na fase aguda o vírus induz primariamente à lesão axonal e alteração do transporte axonal anterógrado, importante para nutrição das células da glia (Lempp et al., 2014). Com isso, ocorrem alterações metabólicas dos oligodendrócitos que resultam em desmielinização massiva, já que um oligodendrócito é responsável pela produção de mielina de diversos axônios (Vandeveld e Zurbriggen, 2005). É possível também que a lesão de astrócitos, que são as células responsáveis pela manutenção da homeostasia neural, induza a alterações metabólicas nos oligodendrocitos, influenciando na sua capacidade de produzir mielina e resultando em lesões em regiões não infectadas (Vandeveld e Zurbriggen, 2005). Observou-se degeneração de oligodendrócitos em culturas encefálicas, 20 a 30 dias após infecção com o VCC, associadas à diminuição da produção de mielina devido à disfunção secundária de uma enzima específica dessas células (Glaus et al., 1990; Graber et al., 1995; Vandeveld e Zurbriggen, 2005).

A lesão crônica inicia-se de seis a sete semanas após a infecção e é caracterizada por infiltrado perivascular de linfócitos, monócitos e plasmócitos resultando em desmielinização e progressão da lesão no SNC (Vandeveld et al., 1981; Vandeveld et al., 1982). Essas células acumulam-se nas meninges e no parênquima e podem cursar com necrose tecidual. Acredita-se que os anticorpos contra as proteínas virais expressos na superfície das células infectadas interajam com os receptores Fc dos macrófagos, induzindo a liberação de radicais livres de oxigênio e a morte de outras células da glia como os oligodendrócitos (Griot et al., 1989). Especulava-se que as lesões crônicas eram oriundas de uma doença autoimune devido à produção intratecal de anticorpos contra a bainha de mielina (Vandeveld et al., 1986). No entanto, não existe correlação entre os títulos desses anticorpos e o curso da lesão, já que se observou que animais com os maiores títulos desses anticorpos são aqueles que conseguiam se recuperar (Vandeveld et al., 1986). Além disso, estudos comparativos entre encefalites alérgicas experimentais e encefalite devido a CC não corroboram o conceito de doença autoimune na CC (Summers et al., 1984b).

Com isso, acredita-se que a desmielinização na cinomose canina seja um processo bifásico com ação direta do vírus sobre os astrócitos e axônios resultando em disfunção metabólica secundária de oligodendrócitos (Vandeveld et al., 2005). Enquanto que a progressão das lesões desmielinizantes parece ser influenciada por reações imunes, principalmente pela liberação de radicais de oxigênio por macrófagos após ligação ao complexo antígeno-anticorpo, que podem agravar e acelerar a destruição da bainha de mielina e dos oligodendrócitos (Greene e Vandeveld, 2012). Acredita-se também que a progressão da doença está intimamente relacionada com a capacidade de persistência do vírus nas células do SNC (Stettler et al., 1997).

4.4 Persistência viral no SNC

A CC resulta em sinais clínicos neurológicos graves, principalmente nos animais que não conseguem desenvolver uma resposta imune humoral suficiente para eliminar o vírus. Aqueles que conseguem aumentar o nível de anticorpos eliminam o vírus do SNC e recuperam-se, ou apresentam sinais neurológicos progressivos devido à liberação de radicais de oxigênio por macrófagos. A persistência viral de algumas estirpes virais nas células do SNC parece ser o principal determinante para a lesão crônica. Essa é favorecida pela disseminação viral não citolítica associada à ausência de expressão das proteínas virais na membrana celular do hospedeiro e à infecção restrita de oligodendrócitos e neurônios, onde não ocorrem translação e produção de proteína viral (Stettler et al., 1997).

A infecção não citolítica é considerada o principal fator da persistência viral no SNC (Plattet et al., 2005). Ocorre pela transmissão viral célula a célula, basicamente, nos astrócitos, limitando os processos inflamatórios e reconhecimento dos antígenos pelas células imunes locais. Apesar de não existirem evidências diretas, acredita-se que essa disseminação ocorra pela passagem do vírus por microfusões após contato entre as células infectadas e saudáveis, que dependem da funcionalidade das proteínas H e F (Wyss-Fluehmann et al., 2010; Alves et al., 2015).

Outro fator que parece influenciar a persistência viral é a infecção restrita de oligodendrócitos e neurônios que resulta em infecção sem uma estimulação imune, já que as proteínas virais não serão expressas nas membranas das células infectadas. Não existem evidências que a infecção dos oligodendrócitos contribua para o processo de desmielinização, pois menos de 10% dessas células são acometidas. No entanto, nesse tipo de infecção, o vírus pode ser reativado e iniciar a translação resultando em infecção produtiva e novos episódios de inflamação e desmielinização (Zurbriggen et al., 1998).

4.5 O VCC e a apoptose neural

O VCC resulta em depleção do tecido linfóide e lesões neurológicas associadas à desmielinização. Acredita-se que a apoptose seja o tipo de morte celular predominante nos tecidos linfóide e neural em cães infectados com o VCC (Moro et al., 2003a).

A apoptose é um tipo de morte celular ativa que ocorre em condições fisiológicas e patológicas. Possui um papel importante na homeostase de organismos multicelulares e constitui uma etapa fundamental para remodelação de tecidos, substituição e remoção de células que sofreram lesão e eliminação de células cancerígenas (Elmore, 2007). É um processo complexo que envolve a participação de proteases e regulação de fatores anti e pró-apoptóticos (Verhagen e Voux, 1999).

A apoptose é iniciada pela ativação sequencial de caspases desencadeada por duas vias que se interconectam. A via extrínseca envolve ativação da caspase-8 e é iniciada pela ligação de proteínas específicas a receptores transmembranas, como o fator de necrose tumoral (TNF- α) e o faz ligante (Fas-L). Enquanto a via intrínseca é ativada pelo desequilíbrio entre proteínas pró-apoptóticas e anti-apoptóticas da família Bcl-2 na mitocôndria e no citosol, resultando na liberação de citocromo C da mitocôndria. O citocromo C associado ao fator protease ativador da apoptose (Apaf-1) e a pro-caspase-9 formam um complexo denominado de apoptossoma que ativa a caspase-9. Tanto a caspase-8 como a caspase-9 ativam a caspase-3 que, associada a outras caspases efetoras, clivam proteínas celulares durante o processo de morte celular por apoptose (Finucane et al., 1999). Pode ainda ocorrer uma comunicação entre essas duas vias em que a caspase-8 ativa a liberação do fator pró-apoptótico Bid que sinaliza a liberação de citocromo C pela mitocôndria ativando a via intrínseca (Majno e Joris, 1995)

Em tecidos linfoides infectados pelo VCC, observou-se ausência de necrose e resposta inflamatória (Krakowka et al., 1980) e aumento de células em apoptose (Moro et al., 2003a). Guo e Lu (2000) demonstraram que ocorre apoptose *in vitro* em células Vero (células provenientes do rim de macacos) infectadas com o VCC. No cerebelo, Moro e colaboradores (2003b) identificaram células apoptóticas nas substâncias branca e cinzenta de cães naturalmente infectados pelo VCC. Em outro estudo, identificaram-se indícios de apoptose associado ao VCC a partir do aumento da expressão gênica de caspase -3, -8 e -9 e de Bax no cerebelo de cães infectados com o VCC. Concluiu-se que a apoptose, na CC, ocorre pela ativação da caspase-3 tanto pela via intrínseca como pela via extrínseca (Del Puerto et al., 2010). No entanto, não se sabe a real participação das proteínas do VCC na indução da morte programada e nem qual é o principal fator desencadeante (Del Puerto et al., 2010).

5. SINAIS CLÍNICOS

O VCC é pantrópico e a infecção e replicação nos sistemas respiratório, gastrintérico, urogenital e SNC, resultam, geralmente, em doença multissistêmica grave e progressiva (Appel et al., 1981). No entanto, diversos fatores como virulência do vírus, condições ambientais, idade dos animais e resistência individual interferem nas manifestações clínico-neurológicas. Os animais podem ser assintomáticos assim como apresentar uma combinação de sinais clínicos que podem aparecer isoladamente ou em associação.

O período de incubação é de uma a quatro semanas e a replicação do vírus nos primeiros três a seis dias após a infecção resulta em hipertermia que pode ter um segundo pico aos 14 dias (Appel, 1969). O primeiro pico febril cursa com uma anorexia transitória, depressão, conjuntivite serosa, leucopenia e, geralmente, é insidiosa (Appel, 1987). Cães que não produzem títulos adequados de anticorpos passam por um segundo pico febril e como resultado da infecção do tecido epitelial, sinais respiratórios, gastrointestinais e dermatológicos são manifestados (Appel, 1969). Os sinais podem ser exacerbados por infecções bacterianas (Fawi et al., 1971; Headley et al., 1999) e protozoárias (Moretti et al., 2002) secundárias, e incluem corrimento nasal e ocular, tosse, dispneia, diarreia, vômito, anorexia, pústulas abdominais e sinais neurológicos. Hipoplasia do esmalte dentário e hiperqueratose dos coxins e focinho, geralmente associada a manifestações neurológicas, podem ser observados em animais com infecção crônica (Greene e Vandavelde, 2012).

Os sinais neurológicos ocorrem simultaneamente ou isoladamente uma semana a quatro meses após início dos sinais clínicos sistêmicos (Greene e Vandavelde, 2012). Apesar de incomum, podem ser a apresentação clínica inicial seguida dos sinais sistêmicos após uma a duas semanas (Amude et al., 2007b) ou serem a única apresentação clínica (Wright et al., 1974; Amude et al., 2006; Amude et al., 2007c). As manifestações neurológicas são diversas e ainda não foi estabelecida uma correlação clinicopatológica (Higgins et al., 1982; Vandavelde et al., 1982; Summers et al., 1984a; Tipold et al., 1992; Frisk et al., 1999). Estudos *post mortem* em animais com sinais neurológicos focais, identificaram lesões histopatológicas difusas no SNC (Amude et al., 2012). Da mesma forma, foram observadas alterações histopatológicas multifocais em animais com sinais neurológicos focais (Tipold et al., 1992). Apesar da distribuição multifocal das lesões histopatológicas acredita-se que existe uma associação entre a localização da lesão neuroanatômica e a gravidade das alterações histopatológicas (Koutinas et al., 2002). Independente da localização no SNC, o vírus pode lesar as substâncias cinzenta e branca resultando em uma variedade de sinais neurológicos difusos ou focais, agudos ou crônicos e progressivos (Raw et al., 1992; Tipold et al., 1992; Amude et al., 2007b). Os sinais neurológicos mais comuns incluem obnubilação, vocalização, disfunções motoras, sinais

vestibulares, crises epilépticas focais e/ou generalizadas e mioclonia (Tipold et al., 1992; Martella et al., 2008).

A alteração do estado mental ocorre devido à lesão do sistema ativador reticular ascendente (SARA) que possui seus núcleos no tronco encefálico e diencefalo e realiza conexões com o córtex prosencefálico. Dependendo da gravidade das lesões, principalmente no tronco encefálico, ocorrem variações no estado mental como obnubilação, estupor e coma (De Lahunta et al., 2015).

A vocalização é uma alteração comportamental devido à lesão prosencefálica, geralmente em sistema límbico, que pode ser acompanhada de confusão mental e delírio. Em alguns casos pode ser uma manifestação de dor, devido à infecção e inflamação das meninges (De Lahunta et al., 2015).

As disfunções motoras ou paresias/paralisias ocorrem devido à lesão dos núcleos e/ou axônios dos neurônios motores superiores (NMS) e/ou inferiores (NMI). São manifestadas quando o tronco encefálico, medula espinhal ou os nervos periféricos são lesados. São acompanhadas de ataxia vestibular, nas lesões dos núcleos dos NMS no tronco encefálico, ou proprioceptiva, nas lesões dos NMS localizados ao longo da medula espinhal. Lesão dos núcleos dos NMI nas intumescências braquial e lombosacral ou dos nervos periféricos resultam em paresias com diminuição dos reflexos espinhais (De Lahunta et al., 2015)

Os sinais vestibulares, geralmente centrais, são bastante frequentes e indicam uma predileção do vírus pela junção pontino cerebelar (Koutinas et al., 2002; Amude et al., 2007b). Os principais sinais incluem ataxia vestibular, nistagmo, inclinação da cabeça, estrabismo posicional e andar em círculos que, geralmente, são acompanhados de alteração do estado mental, paresia ipsilateral, déficits nas reações posturais e nos nervos cranianos do III ao XII pares. As lesões em regiões cerebelares específicas (pedúnculos cerebelares, núcleos fastigiais e lobo floculonodular) resultam, além de hipermetria, tremor de intenção de cabeça e diminuição da resposta a ameaça, em vestibulopatia paradoxal, cuja inclinação de cabeça e/ou andar em círculo são contralaterais à lesão (Amude et al., 2007b).

As crises epilépticas são caracterizadas por atividade elétrica hiperssincrônica dos neurônios do córtex cerebral e é, portanto, um sinal de doença prosencefálica. São descritas como focais ou generalizadas, dependendo da extensão de acometimento do prosencéfalo. Quando focais, podem ser manifestadas como automatismo orofacial, com ou sem perda da consciência, e não representam um sinal patognomônico da infecção pelo vírus (Amude et al., 2007c).

A mioclonia é a manifestação neurológica mais frequentemente observada na cinomose canina (Tipold et al., 1992; Headley et al., 1999; Silva et al., 2007). É uma forma de mioclônus repetitivo constante decorrente de lesão da substância cinzenta manifestada focalmente ou difusamente com envolvimento de diversos grupos musculares tanto no repouso como no movimento (Koutinas et al., 2002; De Lahunta et al., 2015). Alguns autores hipotizam que ela ocorre devido a uma desordem funcional em núcleos dos NMI, mas não se sabe qual é o papel do VCC nessas síndromes mioclônicas (De Lahunta et al., 2015). Koutinas e colaboradores (2002) identificaram que em 61% dos casos a mioclonia foi decorrente de lesão do NMI. Apesar de ser considerada patognomônica da CC (Breazile et al., 1966), a mioclonia já foi observada, em menor frequência, em outras doenças inflamatórias (Tipold et al., 1996), e esporadicamente em intoxicação por chumbo (O'Brien, 1981). Devem ser diferenciadas de crises epilépticas mioclônicas focais que geralmente são manifestações de mioclônus esporádicos e que, diferentemente da mioclonia, podem ser interrompidas imediatamente com aplicação de benzodiazepínicos.

Cinco síndromes clínicas são descritas na CC: encefalomielite dos cães jovens, encefalomielite multifocal dos cães adultos, encefalite do cão idoso, encefalite pós-vacinal e

encefalomielite desmielinizante crônica recidivante dos cães adultos (Hartley, 1974; Higgins et al., 1989; Braund, 1994; Summers et al., 1995; Nessler et al., 1997; Headley et al., 2009). Clinicamente são diferenciadas pela idade dos animais acometidos, sinais clínicos manifestados, curso da doença, estirpe viral e padrão histopatológico (Summers et al., 1995).

A encefalomielite dos cães jovens é a síndrome clínica mais comum na CC, acometendo animais jovens e em período de janela imunológica, frequentemente associada a sinais sistêmicos (Braund, 1994). Os animais infectados desenvolvem de forma aguda sinais neurológicos simultâneos aos sinais respiratórios, gastrintestinais e hiperqueratose dos coxins. Em alguns casos, os sinais neurológicos podem manifestar-se na ausência de sinais sistêmicos (Amude et al., 2007c). Os sinais neurológicos mais observados estão relacionados à lesão multifocal de substância branca e cinzenta como: crises epiléticas, alterações comportamentais, déficits de nervos cranianos, hipermetria, ataxia cerebelar e paresia (Braund, 1994).

A encefalomielite multifocal dos cães adultos é pouco frequente e tem curso crônico em cães com idade entre quatro a oito anos (Braund, 1994; Amude et al., 2007a). Geralmente são observados sinais neurológicos isolados, inespecíficos e progressivos como paresias, sinais cerebelares e de tronco encefálico (Amude et al., 2007a).

A encefalite do cão idoso é uma manifestação rara, descrita pela primeira vez em 1940 e ocorre em animais de qualquer idade, sendo mais comum em cães acima dos seis anos de idade (Braund, 1994; Summers et al., 1995). Clinicamente é caracterizada por disfunção progressiva do córtex prosencefálico resultando em sinais como obnubilação, andar compulsivo, déficits visuais, andar em círculos, crises epiléticas e alterações comportamentais. Não são observados sinais sistêmicos. Acredita-se que a persistência viral nas células do SNC, possa ser um fator determinante para ocorrência dessa síndrome.

A encefalite pós-vacinal é uma síndrome aguda com alta taxa de mortalidade associada a alterações comportamentais, agressividade, crises epiléticas e cegueira que surgem uma a três semanas após vacinação com vírus vivo modificado (Summers et al., 1995; Nessler et al., 1997). Essa síndrome é atribuída à atenuação inadequada do vírus em determinados lotes de vacinas multivalentes e vacinação de animais imunossuprimidos (Summers et al., 1995).

A encefalomielite desmielinizante crônica recidivante dos cães adultos é rara e resulta em manifestação neurológica progressiva multifocal, com períodos de ausência de sinais clínicos (Higgins et al., 1989).

6. DIAGNÓSTICO

O diagnóstico clínico é desafiador, principalmente quando a mioclonia e outros sinais sistêmicos associados aos sinais neurológicos estão ausentes (Tipold et al., 1992; Koutinas et al., 2002). Em áreas endêmicas a CC deve sempre ser considerada como importante diagnóstico diferencial para cães com disfunções neurológicas, independente do curso, tipo, extensão e natureza da alteração neurológica (Amude et al., 2012). Como a infecção pelo vírus é grave, métodos rápidos e precisos de diagnósticos devem ser utilizados para o diagnóstico precoce. Assim como os sinais clínicos, os exames laboratoriais de rotina são pouco específicos e, muitas vezes não confirmam o diagnóstico. Para confirmação da infecção exames como RT-PCR e imunocromatografia podem ser utilizados, considerando-se a alta especificidade e sensibilidade destes.

6.1 Hematologia

Os resultados hematológicos em animais infectados pelo VCC são inespecíficos e, na maioria das vezes, não confirmam a infecção. O principal achado hematológico é a linfopenia, devido à depleção linfóide ocasionada pelo vírus e anemia normocítica normocrômica com características arregenerativas (Silva et al., 2005). Observou-se em um estudo elevado índice de apoptose em células da medula óssea, o que pode contribuir para a característica arregenerativa da anemia (Almeida et al., 2009). Trombocitopenia é observada em cães jovens e pouco frequente nos animais adultos. Em contrapartida, outros autores relatam alta frequência de trombocitopenia, devido à produção de anticorpos antiplaquetas induzida pelo vírus (Silva et al., 2005). Alterações no padrão hematológico podem indicar coinfecções, principalmente quando associados a leucocitoses com desvio a esquerda. Os corpúsculos de inclusão Sinéglia- Lentz em células linfóides ou hemácias são patognomônicos e observados na fase virêmica da infecção. No entanto, constitui um achado pouco frequente, sendo observado em menos de 20% dos animais (Silva et al., 2005).

6.2 Análise do fluido cérebro-espinhal

A avaliação do FCE é uma das melhores técnicas para identificação de processos infecciosos/inflamatórios no SNC e pode auxiliar no diagnóstico clínico da infecção pelo VCC (Platt e Garosi, 2012). O principal achado é a pleocitose linfocítica com discreta proteinorraquia. Raramente o número total de células ultrapassa a contagem de 50 células/ μ l. O aumento de proteína é associado à lesão da barreira hemato-encefálica (BHE) e a produção local de imunoglobulinas (Gama et al., 2005).

6.3 Sorologia (ELISA)

Os métodos sorológicos são técnicas simples de diagnósticos, mas, quando realizados a partir de amostras do soro, são pouco eficientes para o diagnóstico da CC. Por esse método pode-se identificar anticorpos IgM e IgG. O anticorpo IgM aumenta sua concentração oito dias após o contato com o vírus e permanece na circulação por até três meses (Greene e Vandeveld, 2012). O IgG é um anticorpo que permanece na circulação por anos após o contato com o vírus, e por isso seu aumento pode indicar infecção antiga, devido a longa vida das células de memória T CD4+ e CD8+. Sendo assim, o exame sorológico sanguíneo não é muito útil para identificação da infecção, pois altos títulos de anticorpos podem indicar vacinação recente (Shin et al., 1995; Frisk et al., 1999). Além disso, baixos títulos não indicam apenas ausência de contato com o vírus, pois, devido ao linfotropismo do VCC, pode ocorrer imunossupressão, com ausência de produção dessas imunoglobulinas (Kubo et al., 2008). Com isso, o exame sorológico sérico com titulação pode ser uma ferramenta útil para avaliar a necessidade de vacinação dos animais, mas não para identificar animais que possam estar susceptíveis à infecção (Kapil e Yeary, 2011; Litster et al., 2012). Em contrapartida, o aumento dos níveis de anticorpos no FCE, que são produzidos localmente, não está relacionado a estado vacinal, sendo um teste confiável para confirmar a infecção, quando positivo (Greene e Vandeveld, 2012).

6.4 Imunofluorescência

As técnicas de imunofluorescência, direta ou indireta, auxiliam no diagnóstico definitivo da infecção (Braz, 2009). No procedimento direto o anticorpo anti-cinomose é marcado com o corante isotiocianato de fluoresceína. Já no método indireto, ocorrem duas

etapas, onde na primeira há introdução do anticorpo anti-cinomose não marcado e na segunda um anticorpo anti-imunoglobulina é adicionado (Greene e Vandeveld, 2012). São realizadas com amostras de *swabs* conjuntivais, genitais e do trato respiratório e em esfregaços de FCE, sangue, sedimentos urinários e medula óssea. O antígeno é detectado apenas até três semanas após infecção, antes de desaparecer dos tecidos epiteliais. Como o vírus possui um período de incubação de uma a quatro semanas, aqueles animais que apresentarem os primeiros sinais no final do período de incubação, serão negativos para imunofluorescência, resultando em falso negativo (Jozwik e Frymus, 2005).

6.5 Isolamento viral

O isolamento do VCC é difícil e muitas vezes inviável quando o animal não está na fase aguda da doença. Além disso, algumas técnicas podem demorar até três semanas para que se tenha o diagnóstico. O isolamento pode ser realizado por meio de inoculação de amostras clínicas (secreção nasal, ocular e sangue) em células de linhagem, como as células VERO. Os efeitos citopáticos observados são: lise celular, arredondamento celular, descolamento da monocamada, formação de sincício. Quando os efeitos citopáticos não são observados, as culturas podem ser avaliadas utilizando-se anticorpos fluorescentes (Greene e Vandeveld, 2012). A monocamada pode ser corada com cristal de violeta e os corpúsculos de inclusão intranuclear ou intracitoplasmático podem ser visibilizados (Greene e Vandeveld, 2012).

6.6 Imunocromatografia para pesquisa de antígenos

A imunocromatografia é um teste rápido, sensível, específico utilizado para diagnóstico da infecção com o VCC em amostras de *swabs* conjuntivais, FCE, urina, saliva e sangue. Este teste utiliza um sistema de fase sólida em que os anticorpos específicos na superfície de placas ou tubos reagem contra a amostra teste contendo o vírus, permitindo a análise visual do resultado de forma qualitativa. *Swabs* conjuntivais quando coletados na fase inicial da doença, representam a melhor amostra biológica para o teste de imunocromatografia (Kim et al., 2006; An et al., 2008). No entanto, em animais que possuem sinais neurológicos isolados ou associados, deve-se realizar o teste em amostras do FCE, para diminuir a taxa de falso-negativos (Curti et al., 2012). Para que ocorra coloração da banda teste é necessária uma grande quantidade de antígeno. Com isso o resultado pode ser subjetivo, principalmente, quando bandas muito claras são formadas (An et al., 2008).

6.7 PCR

Diversas técnicas de biologia molecular como RT-PCR, PCR nested e PCR em tempo real são utilizadas para identificar precocemente a infecção pelo VCC na maioria dos tecidos e excreções dos cães (Greene e Vandeveld, 2012). Esses métodos são ferramentas rápidas, sensíveis e específicas (Frisk et al., 1999; Józwik e Frymus, 2005, Amude et al., 2007c; Elia et al., 2015). No entanto, a sensibilidade pode variar de acordo com *primer* utilizado, métodos de extração do RNA e com amostras clínicas testadas (Frisk et al., 1999). Para a maioria dessas técnicas utiliza-se a proteína N como alvo para amplificação, pois é a proteína mais estável entre as estirpes antigênicas (Shin et al., 2004). Frisk e colaboradores (1999) após extração do RNA viral em amostras de soro, sangue total e FCE identificaram o material genético viral pela RT-PCR em 86%, 88% e 88% das amostras, respectivamente (Frisk et al., 1999). Se apenas sinais neurológicos forem manifestados, os índices de positividade para amostras de soro e sangue total podem cair para 20% (Amude et al., 2006). Com isso, para animais que apresentam sinais

neuroológicos, principalmente de forma isolada, não é indicada a utilização dessas amostras para o diagnóstico molecular. Amostras do FCE podem ser negativas, mesmo quando o animal apresenta sinais neurológicos, devido à baixa celularidade desse líquido e pela infecção não citolítica das células neurais (Negrão et al., 2007). Para aumentar a sensibilidade do teste, é ideal coletar e processar pelo menos duas amostras orgânicas (Amude et al., 2006). Quando inviável economicamente, a utilização de amostras de urina para extração do RNA viral, independente dos sinais clínicos do animal, é a melhor opção para o diagnóstico (Amude et al., 2006; Negrão et al., 2007).

O resultado falso-negativo pode também ocorrer pela ausência ou baixo nível de RNA viral na amostra coletada (Negrão et al., 2007). A utilização de outras técnicas como a PCR nested, em que se realiza uma nova amplificação de parte dos produtos da RT-PCR, diminui a possibilidade desses falsos negativos e poderia ser uma opção para amostras do FCE, onde geralmente existe pouco material genético viral (Shin et al., 2004). Os resultados falso-positivos são incomuns e geralmente estão associados à coleta das amostras no período de três semanas após vacinação (Shin et al., 1995; Jozwik e Frímus, 2005).

A PCR em tempo real apresenta diversas vantagens em relação a RT-PCR e a PCR nested para o diagnóstico da infecção com o VCC. É possível ter um resultado em três horas e processar várias amostras simultaneamente, além de quantificar a carga viral das amostras (Elia et al., 2006; Elia et al., 2015). Estudo recente, em que se realizou o acompanhamento dos sinais clínicos associado à quantificação da carga viral em diversas amostras, demonstrou que as amostras de urina e fezes, independente dos sinais clínicos, são as melhores amostras para o isolamento, identificação e quantificação viral (Elia et al., 2015).

6.8 Histopatologia do SNC

As lesões histológicas relacionadas ao VCC são diversas e dependem de fatores relacionados ao vírus e ao hospedeiro, diferenciando-se entre as síndromes neurológicas (Vandeveldt et al., 1981; Appel, 1969). Não há correlação clinicopatológica entre as manifestações neurológicas e as lesões neuroanatômicas (Higgins et al., 1982; Vandeveldt et al., 1982; Summers et al., 1984a; Tipold et al., 1992; Frisk et al., 1999). De uma forma geral, as principais lesões histopatológicas observadas são desmielinização (praticamente em 100% dos casos), necrose com satelitose e neuronofagia, manguitos perivasculares linfoplasmocitário e inclusões intracitoplasmáticas ou intranucleares (corpúsculos de Sinegaglia Lentz) em neurônios e células da glia, principalmente em astrócitos (Silva et al., 2009; Sonne et al., 2009). As lesões são observadas mais frequentemente no cerebelo, seguidas pelo diencéfalo, lobo frontal, ponte, mesencéfalo, medula espinhal lombosacral, medula espinhal toracolombar, lobo temporal, medula espinhal cervico-torácica e lobo piriforme (Silva et al., 2009). Silva e colaboradores (2007) observaram após estudo clinicopatológico com 565 cães diagnosticados com CC, desmielinização e inflamação não supurativa (manguitos perivasculares linfoplasmocitários) em 98,4% dos animais. Além disso, observaram que o encéfalo é 1,4 vezes mais acometido do que a medula espinhal. Os corpúsculos de inclusão intracitoplasmáticas ou intranucleares são visibilizados em diversos tecidos com maior frequência durante 10-14 dias após infecção.

As lesões histopatológicas podem ser observadas de acordo com o curso da doença (hiperaguda, aguda, subaguda, crônica e esclerosante) (Vandeveldt et al., 1985; Schoberberger et al., 2002) ou de acordo com as síndromes neuropatológicas. As síndromes neuropatológicas descritas no Brasil incluem: encefalite dos cães jovens, encefalomielite multifocal dos cães adultos (Amude et al., 2007a), encefalite do cão idoso (Headley et al., 2009) e encefalite necrotizante em filhotes (Amude et al., 2011). Não existe um consenso nesta classificação, e para meios didáticos nessa revisão, as lesões histopatológicas foram subdivididas de acordo com

as síndromes neuropatológicas, que nas suas próprias definições albergam diferenças do curso da doença entre as diferentes síndromes.

Na encefalomielite dos cães jovens, cujas alterações inflamatórias são mínimas, observa-se desmielinização como a principal lesão histopatológica. Além disso, visibiliza-se degeneração de fibras neurais com formação de esferoides, edema e necrose neuronal, astrogliose, microgliose e células gitter (macrófagos espumosos) e em baixa intensidade, infiltrado perivascular (Headley e Graça, 2000). Inclusões intracitoplasmáticas ou intranucleares são observadas com frequência, principalmente em astrócitos. Predominam-se lesões na substância branca dos pedúnculos cerebelares, nervo óptico e medula espinhal (Silva et al., 2009; Sonne et al., 2009).

Na encefalomielite multifocal dos cães adultos, as principais alterações histológicas observadas são relacionadas à desmielinização e a formação de manguitos perivasculares no cerebelo e na medula espinhal. Necrose laminar cortical e da substância branca além de astrogliose intensa, também podem ser observadas. Raramente são observados corpúsculos de inclusão (Amude et al., 2007a).

Na encefalite do cão idoso, as principais alterações histológicas estão restritas ao córtex prosencefálico e consistem predominantemente de extenso infiltrado perivascular, intenso influxo linfoplasmocítico, proliferação glial, necrose neuronal e acúmulo de células gigantes com corpúsculos de inclusão. As células gitter, assim como os corpúsculos de inclusão são raros (Headley et al., 2009).

Foi descrita a encefalite necrotizante em recém-nascidos decorrente da infecção pelo VCC, semelhantes às lesões observadas nas encefalites por herpes vírus. As alterações neuropatológicas restringem-se as substâncias branca e cinzenta do prosencefalo com necrose assimétrica e intenso influxo de monócitos e histiócitos, astrogliose e corpúsculos de inclusão. Infiltrados perivasculares não foram observados (Amude et al., 2011).

7. TRATAMENTO

A CC é uma doença complexa que resulta em diversos sinais clínicos e diferentes evoluções. Os pacientes podem se recuperar completamente da infecção, assim como ir a óbito, dependendo da estirpe viral, idade e estado imunológico do animal (Martella et al., 2008). Apesar do grande número de pesquisas realizadas com o VCC, pouco se evoluiu nas recomendações terapêuticas para a doença. Até por isso, diversos tratamentos são instituídos, de forma empírica, mesmo na ausência de trabalhos científicos que suportem a escolha terapêutica (Greene e Vandeveld, 2012). É de suma importância que a recuperação espontânea observada em cães com sinais neurológicos e/ou sistêmicos não seja considerada como o resultado de um tratamento instituído (Greene e Vandeveld, 2012).

Foi demonstrada ação antiviral *in vitro* da ribavirina (Elia et al., 2008), EICAR (Dal Pozzo et al., 2009), flavanóides (Carvalho et al., 2013), ácidos fenólicos (Carvalho et al., 2013) e interferon-alfa (Carvalho et al., 2014). No entanto, não existem antivirais com eficácia comprovada *in vivo* (Greene e Vandeveld, 2012). A ação antiviral *in vitro* desses fármacos indica que ensaios clínicos e avaliações *in vivo* possam ter resultados promissores e auxiliar no tratamento da CC (Elia et al., 2008).

De uma forma geral, a utilização de medidas suportivas e não específicas auxiliam o animal a debelar a infecção e controlar possíveis coinfeções. Animais com sinais sistêmicos, geralmente relacionados aos sistemas respiratório e gastroentérico, devem ser mantidos em fluidoterapia para reposição de perdas e receber antibióticos de amplo espectro como amoxicilina com clavulanato, principalmente se forem identificados sinais de broncopneumia,

geralmente secundária a infecção pela bactéria *Bordetella bronchiseptica*. Nebulizações associadas a expectorantes auxiliam na eliminação das secreções (Greene e Vandeveld, 2012).

Animais com sinais neurológicos, associados ou não aos sinais sistêmicos, possuem um prognóstico mais desfavorável e muitas vezes não é possível recuperação clínica (Tipold et al., 1996). O tratamento suportivo dependerá dos sinais neurológicos manifestados. Trocas de decúbito e auxílio para esvaziamento vesical devem ser adotadas naqueles que desenvolveram déficits motores (Platt e Garosi, 2012). Antibióticos como clindamicina e sulfametoxizol + trimetoprima são indicados, pois a maioria das coinfeções que resultam na piora do quadro neurológico é ocasionada por protozoários, como o *Neospora caninum* e o *Toxoplasma gondii* (Moretti et al., 2002).

Associada à antibioticoterapia, a suplementação com vitaminas pode auxiliar na recuperação e fortalecimento do sistema imune. A vitamina A, quando administrada em altas doses de 200.000 UI nos primeiros dias ao início dos sinais sistêmicos/neurológicos diminui a taxa de morbidade e mortalidade em crianças infectadas pelo vírus do sarampo (Hussey e Klein, 1990). Rodeheffer e colaboradores (2007) observaram que furões infectados experimentalmente com o VCC, desenvolviam mais sinais sistêmicos quando não recebiam suplementação com vitamina A no início da infecção. Apesar de não existirem trabalhos que comprovem a eficácia da vitamina A em cães com CC, a suplementação é indicada no início da infecção (Greene e Vandeveld, 2012).

As vitaminas do complexo B atuam como coenzimas de diversas reações metabólicas, além de estimularem o apetite do animal e fazerem parte do metabolismo de neurônios e células da glia. As vitaminas C e E atuam como antioxidantes e podem diminuir os danos ocasionados pelos radicais livres de oxigênio liberados pelos macrófagos na infecção crônica (Greene e Vandeveld, 2012).

Animais que manifestam crises epiléticas, devem ser tratados com antiepiléticos. Em cães adultos inicia-se protocolo em monoterapia com o fenobarbital na dose de 3-5 mg/kg a cada 12 horas, com a expectativa em atingir-se a concentração sérica de 30-35 mcg/ml (Platt e Garosi, 2012). A associação com o brometo de potássio é indicado se a frequência de crises permanecer alta. O brometo de potássio pode também ser a primeira opção para filhotes, que não possuem o sistema microsomal hepático desenvolvido, e por isso não conseguem metabolizar o fenobarbital (Platt e Garosi, 2012).

Na tentativa de diminuir-se os efeitos deletérios da inflamação na fase crônica, a utilização de anti-inflamatórios é controversa. Acredita-se que doses anti-inflamatórias de dexametazona possam diminuir o edema resultante do processo inflamatório (Greene e Vandeveld, 2012). No entanto, os corticosteroides possuem efeitos colaterais como: hiperglicemia, imunossupressão e aumento da apoptose neural, que inviabilizam sua utilização em animais com CC, independente do curso da doença. Além disso, em algumas circunstâncias a exposição crônica aos corticosteroides pode resultar em efeito pró-inflamatório no SNC (Sorrrells e Sapolsky, 2007).

A ribavirina, um análogo do nucleosídeo guanosina com atividade antiviral em RNA e DNA, é um fármaco que vem sendo amplamente utilizado no Brasil nas terapias de cães que manifestam sinais neurológicos decorrentes da infecção com o VCC. Sua ação *in vitro* é bem documentada (Elia et al., 2008; Carvalho et al., 2014), mas não existem artigos que embasem sua utilização clínica. Como observado em humanos, o tratamento com ribavirina resulta em efeitos colaterais como a anemia por hemólise (Wu et al., 2005). Esses efeitos colaterais também foram observados por Mangia e colaboradores (2014) que identificaram que a ribavirina na dose de 30mg/kg administrada durante 15 dias consecutivos induziu anemia nos cães. A associação aos corticosteroides piorou consideravelmente o quadro anêmico. Além

disso, esse mesmo grupo de pesquisadores concluiu que não houve alteração significativa no FCE em animais tratados com esse antiviral (Mangia et al., 2012).

A expectativa é de que possam ser realizados ensaios clínicos que comprovem a eficiência *in vivo* dos antivirais e imunomoduladores em cães com manifestações neurológicas decorrentes da infecção pelo VCC e, com isso, diminuir a taxa de morbidade e mortalidade dessa infecção (Elia et al., 2008).

Animais que sobrevivem à infecção neurológica, podem ter sequelas que comprometem a qualidade de vida e sobrevivência. A mioclonia é uma sequela importante que não possui tratamento específico (Platt e Garosi, 2012). Schubert e colaboradores (2013) observaram diminuição dos episódios mioclônicos e melhora da qualidade de vida, após aplicação de toxina botulínica na musculatura acometida. Algumas drogas, indisponíveis no Brasil, como a procainamida, diminuem os episódios de mioclonia (Platt e Garosi, 2012). Há uma expectativa de que o tratamento com células tronco possa auxiliar na recuperação, principalmente motora, desses animais, mas ainda não existem estudos que comprovem seus benefícios (Platt e Garosi, 2012).

Raros casos de remielinização e/ou plasticidade após infecção pelo VCC foram descritos e podem estar associadas às recuperações espontâneas (Higgins et al., 1989). Acredita-se que isto ocorra por oligodendrócitos hipertróficos que persistem nas áreas de lesão, mesmo após a completa destruição da mielina nos casos crônicos (Schobesberger et al., 2002).

8. PREVENÇÃO

A CC é uma doença grave que não possui tratamento específico. Com isso medidas de prevenção são extremamente importantes para o controle da doença. As vacinas vivas modificadas são utilizadas desde a década de 50 e foram as responsáveis pela eliminação da doença em alguns países (Chappuis, 1997). São baseadas em estirpes que foram atenuadas por várias passagens em células do rim de cães (estirpes do tipo Rockborn) (Rockborn, 1958), ovos de galinha (estirpes do tipo Onderstepoort) ou culturas de fibroblastos de galinhas (estirpes do tipo Lederle) (Haig, 1953). As vacinas produzidas com a estirpe Onderstepoort resultam em menores níveis de imunidade, mas não são capazes de resultar encefalite pós-vacinal. Já as vacinas produzidas com a estirpe Rockborn podem resultar em encefalite pós-vacinal (Fariley et al., 2015). Com isso, as vacinas clássicas utilizam estirpes semelhantes às linhagens America-I (Onderstepoort e Lederle) (Martella et al., 2011). Atualmente não se sabe se essas estirpes estão circulantes, já que não detectadas há bastante tempo (Martella et al., 2007).

A vacina contra CC geralmente é administrada em três doses a cada três a quatro semanas entre a seis e 16 semanas de idade em animais que receberam o colostro. A imunidade após recuperação de uma infecção natural ou protocolo vacinal pode durar por até sete anos. Essa proteção é adequada a não ser que o animal seja submetido a estirpes de alta virulência ou em grandes quantidades, ou a períodos de imunossupressão. Com isso, em países em que o desafio é muito alto, recomenda-se que a vacinação seja anual (Greene e Vandeveld, 2012).

Em países em que a doença é bem controlada, a urbanização de animais selvagens como guaxinins e raposas pode ser fonte para reinfeção de cães urbanos e para quadros de epizootias em populações susceptíveis. No Brasil, estima-se que apenas 25% dos cães sejam vacinados o que favorece e permite com que o VCC ainda seja um dos principais agentes de doenças infecciosas e que estes sejam os maiores reservatórios do vírus para os animais silvestres (Headley et al., 2009; Greene e Vandeveld, 2012).

Desde 1980 observa-se a doença em populações de cães vacinados e existe um temor para o ressurgimento de casos de CC em países que eram considerados livres da doença (Appel, 1987; Martella et al., 2008). Estirpes de campo isoladas em diversas regiões geográficas

demonstraram diferenças genéticas no gene hemaglutinina, quando comparado às amostras vacinais (Iwatsuki et al., 1997; Si et al., 2010; Panzera et al., 2012). Informações moleculares das estirpes circulantes no Brasil indicam que as estirpes selvagens pertencem à linhagem América do Sul I, diferentemente das estirpes vacinais que pertencem à linhagem América I (Budaszewski et al., 2014). A variação genética observada entre as linhagens de campo e as estirpes vacinais deve ser considerada como um potencial fator para explicar as falhas vacinais (Panzera et al., 2012).

Modificações recombinantes sintéticas do genoma para aumentar a expressão do gene F levam a atenuação da virulência do VCC em furões e pode ser o futuro para o desenvolvimento de vacinas para cães (Anderson e Von Messling, 2008).

CAPÍTULO 2

CARACTERÍSTICAS EPIZOOTIOLÓGICAS DA INFECÇÃO NATURAL PELO VÍRUS DA CINOMOSE CANINA EM BELO HORIZONTE

RESUMO

O perfil epidemiológico da cinomose canina em Belo Horizonte é desatualizado e não alberga algumas características importantes. Uma análise recente da distribuição do vírus em relação às características do hospedeiro e do meio ambiente associada aos principais sinais clínicos e achados laboratoriais são importantes para se adotar medidas estratégicas para o controle da enfermidade. Objetivou-se assim determinar as características epidemiológicas da infecção pelo vírus da cinomose canina associada à variedade de sinais clínico-neurológicos e aos achados laboratoriais em Belo Horizonte, auxiliando no diagnóstico precoce da infecção e diminuição das taxas de morbidade e mortalidade da doença. A avaliação do perfil epidemiológico de 90 cães revelou que a doença é mais frequente em animais adultos (1-6 anos de idade) e que não receberam vacinas conforme recomendado pelos protocolos. Os sinais clínicos extraneurais e neurais foram variados, com predomínio para manifestações gastrentérica e respiratória e mioclonia e déficit motor, respectivamente. Os valores hematológicos de 44 cães revelaram predomínio de anemia arregenerativa e linfopenia e baixa incidência de corpúsculos de Sinegaglia-Lentz. O exame do fluido cérebro-espinhal de 16 cães demonstrou predomínio de proteinorraquia associada à pleocitose linfocítica. O teste de imunocromatografia para pesquisa de antígeno com amostras do fluido cérebro-espinhal em animais com sinais neurológicos foi eficaz para identificar a doença, diferentemente das amostras do *swab* conjuntival, que não devem ser utilizadas.

Palavras-chave: cinomose canina, perfil epidemiológico, sinais clínico-neurológicos, alterações laboratoriais

INTRODUÇÃO

A cinomose canina (CC) é uma doença ocasionada por um Morbilivirus que resulta em altas taxas de mortalidade e observada há mais de 250 anos desde quando surgiram as primeiras estirpes nos Estados Unidos (Panzera et al., 2015). Com a introdução de vacinas em meados de 1950, vários países, principalmente os desenvolvidos, conseguiram controlar a doença. No entanto, no Brasil a CC continua sendo responsável por altas taxas de morbidade e mortalidade, sendo reconhecida como uma das principais doenças infecciosas em cães (Headley e Graça, 2000). O vírus infecta animais de qualquer idade, sexo e raça e resulta em uma variedade de sinais clínicos e neurológicos que podem ser manifestados isoladamente ou em associação, o que torna o diagnóstico clínico bastante desafiador (Appel, 1972). A maioria dos exames complementares é inespecífica, mas quando associados às características epidemiológicas da doença, contribuem para o diagnóstico clínico.

Os últimos dados epidemiológicos em relação ao VCC da região de Belo Horizonte datam de 1987 em um estudo realizado por Gouveia e colaboradores (1987) que avaliaram a ocorrência do vírus em animais vacinados e sua distribuição por faixa etária. Nesse contexto, um estudo recente para identificação das principais características da infecção é necessário para auxiliar no diagnóstico e controle dessa enfermidade.

A utilização de métodos de diagnósticos rápidos, sensíveis e específicos, agilizam o diagnóstico aumentando a sobrevivência dos animais infectados. A imunocromatografia para testar antígenos é um teste rápido, sensível e específico utilizado para o diagnóstico da infecção com o VCC (An et al., 2008). Apesar de ser realizado, na maioria das vezes pelos clínicos, pela facilidade de coleta, independente dos sinais clínicos do animal, com amostras do *swab* conjuntival, esse se mostrou pouco sensível em animais com sinais neurológicos associados ou não aos sinais sistêmicos (Curti et al., 2012). Em contrapartida, foi altamente sensível e específico quando se utilizou amostras do FCE em animais com sinais neurológicos (Pereira, 2010). Não foram observados estudos que compararam a eficácia desse teste utilizando-se as amostras do *swab* conjuntival e do FCE em cães naturalmente infectados com o VCC com sinais neurológicos associados ou não aos sistêmicos.

Não existe tratamento específico para o vírus e um número cada vez maior de animais devidamente vacinados são infectados (Martella et al., 2008). Com isso as taxas de morbidade e mortalidade são elevadas no nosso território. O Brasil é um país com território muito amplo e com uma grande diversidade climática e sócio-econômica. Com isso, o entendimento das características da infecção pelo VCC em cada região do país é de suma importância para implementação de medidas profiláticas e controle da doença. Assim, objetivou-se realizar um estudo para determinar as características epizootiológicas da infecção pelo VCC associada à variedade de sinais clínico-neurológicos e aos achados laboratoriais na cidade de Belo Horizonte, Minas Gerais, Brasil o que pode auxiliar no diagnóstico precoce da infecção e diminuição das taxas de morbidade e mortalidade.

MATERIAL E MÉTODOS

Esse estudo utilizou as dependências físicas e a infra-estrutura do Hospital Veterinário da Escola de Veterinária da Universidade Federal de Minas Gerais (EV-UFMG) e do Laboratório de Patologia Clínica do Departamento de Clínica e Cirurgia Veterinárias EV-UFMG. O projeto foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da UFMG com o protocolo de número 32/2013 (Anexo 1).

Foi realizado um estudo clínico com cães, naturalmente infectados com o vírus da cinomose canina, atendidos no Hospital Veterinário da Universidade Federal de Minas Gerais

(HV-UFGM) no período de 2012-2014 para caracterização da doença no município de Belo Horizonte. Nesse período foram avaliados pelo autor, centenas de animais com sinais suspeitos da infecção. Foram incluídos no experimento apenas os animais que foram positivos nos testes imunocromatográficos para pesquisa de antígeno no *swab* conjuntival e/ou FCE. Com isso foram selecionados 90 cães com essas características, perfazendo o número experimental para este estudo.

Dados epidemiológicos

Os dados epidemiológicos dos 90 cães foram anotados e comparados em relação às variáveis de sexo (macho ou fêmea), idade [dois a quatro meses (janela imunológica), cinco a 11 meses (jovens), um a seis anos (adultos) ou acima de seis anos (idosos)], época do ano [meses quentes e úmidos (outubro a abril), meses frios e secos (maio a setembro)] e condição vacinal. Animais que receberam a primeira vacinação polivalente a partir dos dois até os quatro meses de idade, completando um protocolo inicial de três vacinas intervaladas a cada 21 dias, que receberam reforço anual, e que foram vacinados em clínicas veterinárias, foram considerados com estado vacinal em dia. Assim como os animais adultos que não foram vacinados quando filhotes, mas que receberam duas doses de vacina intervaladas em 30 dias e que foram revacinados anualmente. Já os animais que não receberam as três doses iniciais e/ou o reforço anual e que não foram vacinados em clínicas veterinárias foram considerados em falha vacinal.

Exame clínico-neurológico

Foi realizada avaliação clínico-neurológica dos 90 animais positivos para cinomose canina conforme modelo dos Anexos 2 e 3.

Avaliação Hematológica

Para a avaliação hematológica, o sangue dos animais positivos foi coletado e armazenado em frasco com EDTA a 10%. Para essa avaliação, 44 animais foram utilizados, representando o número total de animais em que foi permitida a coleta pelos proprietários, já que os mesmos arcaram com os custos desse procedimento. O hemograma foi realizado em contador eletrônico¹ para mensuração da concentração de hemácias, hemoglobina e leucócitos totais. O volume globular (VG) foi determinado utilizando-se centrífuga para microhematócrito² por 10 minutos. Os esfregaços sanguíneos foram realizados em lâminas de vidro³ (26x76mm) e corados com Panótico⁴ rápido para contagem diferencial de leucócitos e plaquetas.

Os animais foram considerados anêmicos quando o VG, quantidade de hemácias e/ou concentração de hemoglobina estavam abaixo dos valores de referência; leucopênicos e com leucocitose quando os valores de leucócitos totais estavam abaixo e acima do valor de referência, respectivamente, e trombocitopênicos quando os valores de plaqueta estavam abaixo dos valores de referência de acordo com Weiss e Wardrop (2010). A anemia foi caracterizada de acordo com a gravidade, com a morfologia das células eritróides e com a responsividade da

¹ Diatron®, Abacus Junior Vet/CELM DA-500-CELM, Cia. Equipadore de Laboratórios Modernos, Barueri-SP, Brasil.

² Micro Spin, Biosan, Belo Horizonte – MG, Brasil.

³ Lâminas para microscopia não lapidada, Exacta, SOS lab, Belo Horizonte-MG, Brasil.

⁴ Panótico rápido LB, Laborclin produtos para laboratório Ltda, Pinhais-PR, Brasil.

medula óssea. Em relação à gravidade, classificou-se em discreta, moderada e intensa quando o VG situou-se entre 30-37%, 20-29% e abaixo de 19%, respectivamente (Weiss e Wardrop, 2010). A classificação de acordo com a morfologia das células eritróides foi realizada com base no volume corpuscular médio (VCM), concentração de hemoglobina corpuscular média (CHCM) e hemoglobina corpuscular média (HCM). Baseado no VCM, a anemia foi classificada como normocítica, macrocítica ou microcítica e no CHCM e HCM como normocrômica ou hipocrômica. Em relação à responsividade da medula óssea, a anemia foi classificada em regenerativa ou arregenerativa de acordo com os sinais de regeneração medular (índices macrocíticos e/ou hipocrômicos associados ao aumento do RDW, anisocitose, policromasia, metarrubricitose e corpúsculos de Howell-Jolly) (Silva et al., 2005). Achados incidentais como *Babesia sp*, *Anaplasma sp* e corpúsculo de inclusão (corpúsculo Sinegaglia-Lentz) nas lâminas de esfregaço foram anotados.

Teste rápido de imunocromatografia

A imunocromatografia para pesquisa de antígenos⁵ com amostras de *swab* conjuntival e/ou FCE foi utilizada para confirmação diagnóstica da infecção pelo VCC. Foram coletadas amostras dos 90 animais. Em todos se realizou o teste com amostras da conjuntiva ocular e em 76 animais, que apresentaram sinais neurológicos, o teste também foi realizado com amostras do FCE. Para coleta de material conjuntival, realizaram-se movimentos delicados de esfregaço na conjuntiva ocular com *swab* estéril embebido em solução salina. O FCE foi coletado como demonstrado no item “avaliação laboratorial do fluido cerebrospinal”. As amostras foram então processadas de acordo com o protocolo do fabricante.

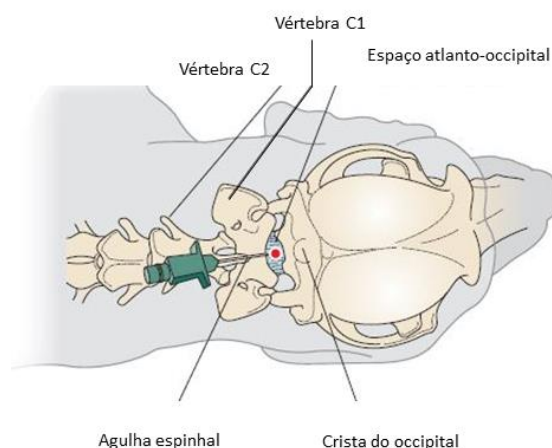


Figura 1 – Esquema ilustrativo demonstrando os pontos de referência para coleta de fluido cerebrospinal no espaço occipito-atlântica em um cão. Modificada de Platt e Garosi, (2012).

A interpretação do teste consistiu da observação da coloração em rosa da linha controle (C) e da linha teste (T). Quando apenas a linha (C) apareceu corada, o teste foi considerado negativo (Figura 2A). Em contrapartida, se ambas as linhas apresentassem a coloração rósea, o teste foi considerado positivo (Figura 2B). Se nenhuma linha aparecesse colorida ou se apenas a

⁵ Cinomose Ag – Alere, Pinheiros/SP, Brasil

linha T aparecesse colorida, o teste era considerado inválido. Alterações na intensidade da cor das linhas foram observadas, mas não interferiram no resultado, já que os testes que apresentaram essa variação também são considerados positivos.

Os animais foram considerados positivos quando uma ou ambas as amostras foram positivas. Além disso, comparou-se a eficácia do teste com os dois tipos de amostras em animais que apresentaram sinais neurológicos.

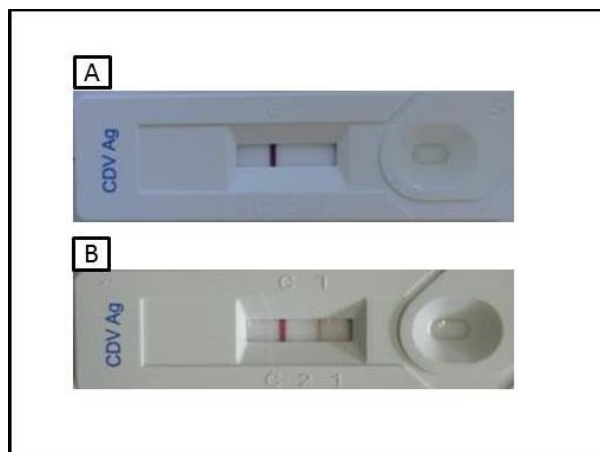


Figura 2 – Fotografias dos testes de imunocromatografia (CDV Ag) realizados com amostras do fluido cérebro-espinhal de cães. Observa-se em A, coloração apenas da banda controle (C), indicando que a amostra avaliada é negativa. Em B, observa-se coloração das bandas controle (C) e teste (T), indicando que a amostra testada é positiva.

Avaliação laboratorial do fluido cérebro-espinhal

O FCE de 16 animais, escolhidos aleatoriamente devido aos custos e logística, dos 76 positivos para CC na pesquisa imunocromatográfica do antígeno do VCC com amostras do FCE, foi coletado, em frasco sem anticoagulante para análise. Para coleta das amostras do FCE os animais foram pré-medicados com acepromazina⁶ (0,05 mg/kg) e diazepam⁷ (0,2 mg/kg), por via intramuscular, cerca de 30 minutos antes da administração do agente anestésico e receberam tricotomia na região occipito-atlântica. Os animais foram, então, anestesiados com propofol⁸ (5,0 mg/kg) pela via intravenosa e entubados para evitar obstrução do fluxo de oxigênio durante a flexão do pescoço, em aproximadamente 90 graus, necessária para coleta, além de manter o animal entubado visando alguma emergência respiratória. Após posicionamento em decúbito lateral, flexão do pescoço e antisepsia da região, utilizou-se uma agulha espinhal ou agulha hipodérmica 25X7mm, dependendo do tamanho do animal, para coleta do FCE de forma asséptica. Os pontos de referência para punção foram à protuberância occipital externa e os processos transversos do atlas (Figura 1). A agulha foi inserida, na região delimitada, lentamente até o acesso ao espaço subaracnóide. Coletou-se o FCE por gotejamento em frascos sem anticoagulante, em quantidade que variou de 0,5 a 3 ml (no máximo 1,0 ml a cada 5,0 kgs de peso corporal) (Platt e Garosi, 2012) e as amostras foram imediatamente processadas.

⁶ Acepram 0,2%, Vetnil, São Paulo-SP, Brasil

⁷ Diazepam 5mg/ml, União Química, Embu-Guaçu-SP, Brasil

⁸ Diprivam 10mg/ml, AstraZeneca do Brasil Ltda, Cotia-SP, Brasil

A avaliação consistiu na análise física (coloração e turbidez), quantitativa (concentração de proteínas, células nucleadas e hemácias) e citológica (distribuição de leucócitos e observação de outros tipos celulares e microorganismos).

A análise física foi realizada analisando-se a coloração e turbidez por observação direta. Para avaliação quantitativa de hemácias e células nucleadas utilizou-se a câmara hemocitométrica. Ambos os lados das câmaras foram preenchidos com FCE não diluído e as células nucleadas e as hemácias foram contadas para obtenção do número total por microlitro. Para avaliação quantitativa de proteína (ou microproteína) utilizou-se espectrofotômetro, seguindo o protocolo dos *kits* comerciais. Para observação da celularidade, foi necessário concentrar as células por citocentrifugação a 800 rpm durante cinco minutos. As amostras da citocentrifuga foram secas ao ar livre por quatro a seis horas e coradas com Panótico rápido. Na objetiva de imersão do microscópio óptico, realizou-se a leitura das lâminas, visando à diferenciação das células nucleadas e observação de microrganismos. Amostras que apresentaram mais que cinco células por μl , foram consideradas com pleocitose (aumento do número de células inflamatórias) e as que apresentaram concentração de linfócitos acima de 50% foram consideradas com pleocitose linfocítica (Platt e Garosi, 2012). Foi anotado o número de amostras com contagem total de células nucleadas acima de 50 células/ μl , que poderiam indicar outros processos inflamatórios e infecciosos. Além disso, o aumento de proteína foi caracterizado quando as amostras apresentavam-se com índices acima de 20mg/dl. A observação de mais de uma hemácia foi suficiente para caracterizar um aumento da concentração de hemácias (Platt e Garosi, 2012).

Análise Estatística

Para as análises de contigência foi utilizado o teste exato de Fischer para variáveis dicotômicas (sexo, época do ano, estado vacinal, classificação da anemia em relação à responsividade da medula óssea e teste de imunocromatografia para antígenos realizado com amostras de *swab* conjuntival e do fluido cérebro-espinhal em animais com sinais neurológicos) ($p < 0,001$) e a distribuição de frequência do qui-quadrado para variáveis com mais de uma resposta (idade, sinais extraneurais, sinais neurológicos, alterações hematológicas, classificação da anemia em relação à gravidade, classificação da anemia em relação à morfologia, alterações do fluido cérebro-espinhal) ($p < 0,05$). Os dados foram analisados pelo pacote estatístico *Graphpad prism 5 for Windows*⁹.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Dados epizootiológicos

Após estudo das características da infecção pelo VCC nos 90 cães positivos (Tabela 1), foi possível estabelecer a distribuição da infecção viral de acordo com as características do hospedeiro e condições ambientais.

Quando se avaliaram os dados referentes ao sexo dos animais naturalmente infectados pelo VCC, 43 (47%) eram machos e 47 (53%) fêmeas. Não houve diferença estatística significativa ($p > 0,05$) nessa distribuição corroborando os achados de Headley e Graça (2000) e Headley e colaboradores (2012). Entretanto, Baumgärtner e colaboradores (1989) e Koutinas e colaboradores (2002) encontraram predominância da infecção em machos, o que segundo Sonne e colaboradores (2009) pode estar relacionado ao maior número de animais desse gênero nos locais onde estes estudos foram realizados.

⁹ *GraphPad Software, La Jolla, CA, USA*

Quando se avaliou os dados referentes à idade observou-se que 10 (11%) animais tinham entre dois a quatro meses de idade, 22 (24%) entre cinco a 11 meses de idade, 41 (45%) entre um a seis anos e 17 (19%) acima dos seis anos. A maior incidência da infecção na faixa etária de um a seis anos, foi estatisticamente significativa, assim como a menor incidência nos animais entre dois a quatro meses ($P < 0,05$). A média das idades foi de 44 meses (três anos e meio). Os grupos foram divididos arbitrariamente, na tentativa de abranger as quatro diferentes fases da vida de um cão possibilitando melhor avaliação da progressão da doença em relação à faixa etária e baseado nos dados da Tabela 2. Os dados tabulados relacionados à incidência da doença em relação à idade são controversos já que não existe um padrão na distribuição da faixa etária nos diversos estudos, o que dificulta a comparação entre as pesquisas (Headley et al., 2012). Com isso as conclusões sobre qual a faixa etária, ou em qual fase da vida do animal, que a infecção é mais frequente, não são claras. Historicamente entende-se que a prevalência natural da cinomose canina é maior em cães imaturos, principalmente no período de janela imunológica (entre dois a quatro meses), onde os animais não produzem seus anticorpos em quantidades adequadas e a imunidade passiva transferida pelo colostro materno está em declínio (Krakowka e Koestner, 1976). Diferentemente do que se estipula, os dados desse trabalho demonstraram maior ocorrência de CC em cães jovens (cinco a 11 meses) e adultos (um a seis anos) semelhante aos resultados de outro estudo (Amude et al., 2007c) e menor incidência na fase de janela imunológica. Há de se considerar que em países, onde alguns desses estudos foram realizados, a maioria dos animais jovens a adultos é vacinado, o que diminui consideravelmente a ocorrência da doença nessa faixa etária, diferente do Brasil, onde existem muitos cães não domiciliados e a porcentagem de animais vacinados é muito menor (Headley et al., 2009; Greene e Vandeveld, 2012; Day et al., 2016). Além disso, o surgimento de novas estirpes circulantes possibilita infecção inclusive de cães vacinados, o que pode aumentar a ocorrência da infecção em animais jovens/adultos observada nos estudos mais recentes (Amude et al., 2006; Dezengrini et al., 2007).

Tabela 1 – Prevalência do vírus da cinomose canina em relação às variáveis sexo, idade, época do ano e estado vacinal em 90 cães infectados naturalmente

Variáveis		N = 90 (100%)
Sexo	Macho	43 (47%) ^a
	Fêmea	47 (53%) ^a
Idade	2-4 meses	10 (11%) ^a
	5-11 meses	22 (24%) ^b
	1-6 anos	41 (45%) ^c
	> 6 anos	17 (19%) ^{ab}
Época do ano	Meses quentes (outubro a abril)	46 (51%) ^a
	Meses frios (maio a setembro)	44 (49%) ^a
Estado Vacinal	Em dia	16 (18%) ^a
	Falha vacinal	74 (82%) ^b

Valores seguidos de letras distintas, na variável analisada, diferem estatisticamente entre si, teste exato de Fischer para variáveis dicotômicas e teste de Qui quadrado para variáveis com mais de uma resposta ($p < 0,001$).

Tabela 2 – Prevalência da cinomose canina em diversos modelos de distribuição em relação à idade dos animais infectados

Gouveia et al. (1987)		Headley&Graça (2000)		Dezengrini et al. (2007)		Silva et al. (2007)		Hass et al. (2008)		Silva et al. (2009)		Sonne et al. (2009)		Martins (2016)*	
Idade (anos)	P (%)	Idade (anos)	P (%)	Idade (anos)	P (%)	Idade (anos)	P (%)	Idade (anos)	P (%)	Idade (anos)	P (%)	Idade (anos)	P (%)	Idade (anos)	P (%)
0-2	2,6	0-1,5	62,8	<1	14,3	0-1	51,4	0-0,5	9,1	<0,5	34,3	0,2-0,5	78,5	2-4 meses	11
2-12	61,1	1,6-3	14,8	1-2	27,3	1-9	46,2	0,6-1	13,6	0,6-1	12,8	0,6-1	11,8	5-11 Meses	24
> 12	31,6	3,1-6	16	2-3	21	>9	2,4	1-5	41,6	1	15,7	1-4	5,8	1-6 anos	45
SE	4,7	>6	6,4	3-5	28			>6	18,9	2	10	4-8	3,9	> 6 anos	19
				>5	38,6			SE	16,7	3-4	8,6				
				SE	41,3					5-6	8,6				
										7-8	7,1				
										>9	2,8				

P (Prevalência)

SE (Sem especificação)

Tabela modificada de HEADLEY et al., 2012

* Dados ainda não publicados

A maioria dos animais 46 (51%) deu entrada no hospital durante o período de meses quentes e úmidos comparada ao período de meses frios e secos 44 (49%), mas não houve diferença estatística significativa ($p>0,05$) entre as duas frequências. Apesar da ocorrência sazonal do VCC não ser bem definida, estudos demonstram maior incidência no período de meses frios (Headley e Graça, 2000). O VCC é pouco resistente ao ambiente, principalmente em temperaturas altas (Appel, 1987; Greene e Vandeveld, 2012). Com isso, esperava-se, que no período de meses frios, os casos de cães com CC fossem mais frequentes, devido ao maior tempo que esse vírus pode ficar ativo no ambiente. Além disso, temperaturas baixas podem resultar em imunossupressão por estresse, o que facilita a infecção, principalmente de neonatos (Headley e Graça, 2000). Acredita-se também que nesse período em que o ar está mais seco, há uma maior possibilidade de dispersão das partículas virais, já que existe pouca umidade para que ocorra a precipitação dessas partículas¹⁰. Outro fator que pode ter contribuído para esses achados é que a região de Belo Horizonte não sofre variações extremas de temperaturas nos períodos de meses frios e quentes, como a região de Santa Maria (Headley e Graça; 2000) e dos países europeus (Martella et al., 2008), onde o inverno é rigoroso e as temperaturas podem atingir picos negativos. É importante considerar também que no final de setembro e início de outubro (transição entre os meses quentes e frios), ocorre a campanha de vacinação antirábica em Belo Horizonte, o que geralmente está associada ao aumento de incidência dos casos de CC, pois a estratégia adotada de postos fixos gera aglomeração de grande número de animais em um mesmo ambiente, facilitando o contato de animais infectados e animais sadios, o que aumenta a taxa de transmissão. Apesar dessas considerações, o presente estudo não verificou diferença estatística nos seus dados de ocorrência.

Observou-se que 74 (82%) animais que foram diagnosticados com CC estavam, segundo nossa classificação, em falha vacinal e 16 (18%) com a vacinação em dia. Houve diferença estatística significativa ($p<0,05$) entre as duas distribuições. De fato, desde a introdução de vacinas em 1950, houve redução significativa do número de cães infectados principalmente nos países desenvolvidos. No entanto, a CC continua sendo uma das principais doenças infecciosas no território brasileiro, mesmo em cães vacinados (Headley et al., 2012). É preocupante a ocorrência da infecção em 18% dos animais que estavam com os protocolos corretos de vacinação. Estudos indicaram que estirpes de campo isoladas em diversas regiões geográficas demonstraram diferenças genéticas no gene hemaglutinina, quando comparado às amostras vacinais (Iwatsuki et al., 1997; Panzera et al., 2012). No Brasil as informações moleculares das estirpes circulantes demonstram que as estirpes de campo pertencem à linhagem América do Sul I, diferentemente das estirpes vacinais que pertencem à linhagem América I (Budaszewski et al., 2014). A variação genética observada entre as linhagens de campo e as estirpes vacinais deve ser considerada como um potencial fator para explicar as falhas vacinais (Panzera et al., 2012).

Exame clínico-neurológico

Todos os animais do presente estudo apresentaram, em algum momento sinais clínicos, na maioria das vezes, inespecíficos e multifocais referentes à proliferação do vírus no sistema respiratório, gastrintérico, dermatológico e/ou neurológico (Tabela 3, Tabela 4). Nesse estudo, dos 90 animais estudados, 71 (79%) apresentaram sinais extraneurais e 76 (84,4%) sinais neurológicos. Destes, 57 (63%) tiveram associação de sinais sistêmicos e neurológicos. O sinal clínico extraneural mais comumente observado com valor estatisticamente significativo ($P<0,05$)

¹⁰ Comunicado pessoal – Marcos Bryan Heinemann

foi secreção ocular/nasal (63%) provavelmente decorrente de uma ceratoconjuntivite seca, ou coinfeções que resultaram em pneumonia intersticial ou broncopneumonia. Além disso, anorexia (52%) e diarreia/vômito (52%) tiveram significância semelhante à secreção nasal e ocular, e são decorrentes da infecção do epitélio gastrointestinal. Os sinais extraneurais menos frequentes foram a hiperqueratose de coxins plantares (7%) e a hipertermia. A primeira geralmente é manifestada quando os animais estão em fase neurológica, pois os queratinócitos são as últimas células, assim como a neuroglia, a serem infectadas pelo vírus (Greene et al., 2012). Nesse estudo não se observou correlação positiva entre animais com sinais neurológicos e a hiperqueratose, visto que dos 76 animais que manifestaram sinais neurológicos, apenas cinco também tiveram hiperqueratose dos coxins. A hipertermia na infecção pelo VCC pode ser bifásica com picos aos cinco e aos 14 dias pós-infecção (Appel, 1969). Os sinais clínicos mais óbvios da CC, e que conduzem o proprietário a levar o animal ao atendimento, são manifestados após a infecção do tecido epitelial que se inicia geralmente no 14º dia pós-infecção (Appel, 1969), o que pode dificultar o registro dessa alteração em levantamentos aleatórios. Da mesma forma, Moro (2001) após infecção experimental com a estirpe Snyder Hill, que é uma cepa com alta neurovirulência, observou hipertermia apenas em um animal. Estudos comprovaram que a indução de hipertermia em camundongos experimentalmente infectados com o vírus do sarampo, foi um importante fator para eliminação do vírus devido ao aumento da produção da proteína Hsp 72. Esta possui diversas funções no metabolismo de outras proteínas modulando a expressão gênica do RNA viral (Carsillo et al., 2006). Nesse sentido, acredita-se que a hipertermia seja um importante aliado contra a persistência do vírus no SNC e que, portanto, seja um sinal clínico pouco frequente em animais com sinais neurológicos.

Tabela 3 – Prevalência dos sinais clínicos extra-neurais observados em 71 cães naturalmente infectados pelo vírus da cinomose canina

Sinal Clínico	n= 71 (100%)
Secreção nasal e ocular	45 (63%) ^a
Anorexia	37 (52%) ^a
Diarreia/Vômito	37 (52%) ^a
Dispneia/Tosse	21 (29%) ^b
Pústulas abdominais	13 (18%) ^b
Hiperqueratose de coxins	5 (7%) ^c
Hipertermia	1 (1%) ^c

Valores seguidos de letras distintas diferem estatisticamente entre si, teste de Qui quadrado com valor de $P < 0,05$.

Os sinais neurológicos foram variados (Tabela 4). Independente da localização no SNC, o vírus pode lesar a substância cinzenta e a substância branca resultando em uma variedade de sinais neurológicos difusos ou focais, agudos ou crônicos e progressivos (Raw et al., 1992; Tipold et al., 1992; Amude et al., 2007a). Os sinais neurológicos observados com maior frequência e com diferença estatística significativa ($p < 0,05$) em relação aos outros sinais foram: déficit motor (72%) e mioclonia (70%), assim como os achados de Tudury e colaboradores (1997); Amaral (2007); Amude e colaboradores (2007a) e Silva e colaboradores (2007). O déficit motor é um sinal inespecífico e envolve a participação de diversos componentes neuro-anatômicos. Como o vírus infecta diversas regiões do sistema nervoso é de se esperar que a

maioria dos animais manifeste a disfunção motora (Tipold et al., 1992; Martella et al., 2008). A mioclonia é uma das manifestações neurológicas mais frequentemente observadas na CC (Tipold et al., 1992; Headley et al., 1999; Silva et al., 2007) assim como foi observado nesse estudo. Não se sabe qual é o papel do vírus nessa manifestação, mas hipotetiza-se que ocorra uma desordem funcional em núcleos dos NMI ou nos núcleos basais no córtex prosencefálico (De Lahunta et al., 2015).

Embora a mioclonia e a combinação de sinais clínicos sistêmicos e neurológicos sejam comuns na CC, não representam sinais patognomônicos, e a ausência desses sinais não exclui uma possível infecção pelo vírus (Amude et al., 2006; Amude et al., 2007c). De acordo com Tipold et al. (1992), o envolvimento sistêmico pode estar ausente em 1/3 dos casos e a mioclonia pode estar ausente em mais de 50% dos casos. Além disso, 50% dos animais podem apresentar apenas sinais neurológicos focais e 25 a 75% podem ser assintomáticos (Tipold et al., 1996).

Tabela 4 – Prevalência dos sinais neurológicos observados em 76 cães naturalmente infectados com o vírus da cinomose canina

Sinal Clínico	TR FCE (+) n=76 (100%)
Déficit Motor	55 (72%) ^a
Mioclonia	53 (70%) ^a
Alteração de estado mental	42 (55%) ^a
Crise epiléptica (Focal ou Generalizada)	26 (34%) ^c
Hiperpatia medular	20 (29%) ^{e,c}
Ataxia	15 (20%) ^{bce}
Estrabismo posicional ventral	11 (14%) ^{be}
Vocalização	9 (12%) ^{bd}
Desvio de cabeça	8 (10%) ^{bd}
Diminuição dos reflexos miotáticos	4 (5%) ^{df}
Nistagmo	3 (4%) ^{df}
Andar em círculos	2 (3%) ^f

TR FCE = Teste rápido de imunocromatografia do fluido cérebro-espinhal

Valores seguidos de letras distintas diferem estatisticamente entre si, teste de Qui quadrado com valor de $P < 0,05$.

Avaliação Hematológica

Analisando-se os dados do hemograma constantes na Tabela 5, pode-se inferir que as alterações hematológicas mais frequentes foram anemia (77%) e linfopenia (68%) ($p < 0,05$). A anemia discreta a moderada observada (Tabela 6) confirma os dados obtidos por Krakowka (1989) e Silva e colaboradores (2005) e pode ser atribuída ao aumento da destruição dos eritrócitos ou a diminuição de sua produção. A destruição é determinada por lesão direta do

vírus sobre o eritrócito ou pela deposição de imunocomplexos na membrana dessas células (Weiss e Wardrop, 2010). A diminuição da produção pode ser resultado da multiplicação do vírus na medula óssea vermelha, já que o mesmo possui afinidade pelos tecidos linfóides (Weiss e Wardrop, 2010). Em um estudo, observou-se elevados índices apoptóticos nas células da medula óssea de cães infectados com o VCC (Almeida et al., 2009). Nesse estudo, na maioria dos casos, os eritrócitos apresentam-se normocíticos e normocrômicos e não houve sinais de regeneração medular, o que pode ser um indício da disseminação viral na medula óssea (Tabela 6). Embora a contagem de reticulócitos seja a melhor forma de avaliação de regeneração eritrocitária (Weiss e Wardrop, 2010), neste experimento não foi realizada contagem de reticulócitos, mas apenas uma avaliação presuntiva de acordo com a morfologia dos eritrócitos no esfregaço sanguíneo e com os valores de VGM e CHCM segundo Silva e colaboradores (2005). A linfopenia é um achado bastante frequente, principalmente em cães jovens, e ocorre pela depleção linfóide induzida pelo vírus (Weiss e Wardrop, 2010). A leucocitose (7%) e a neutrofilia (11%) observadas em alguns animais, geralmente está associada à coinfeções por bactérias ou protozoários. Os corpúsculos de inclusão de Sinaglia-Lentz foram encontrados no sangue periférico em 18% dos animais com cinomose, corroborando a baixa incidência também observada Silva e colaboradores (2005). Apesar de serem patognomônicos para o diagnóstico de CC, os corpúsculos são achados transitórios, observados apenas na fase virêmica da infecção (Gossett et al., 1982). Como observado nesse estudo, em 27% dos animais, a trombocitopenia é considerada um achado infrequente em cães infectados com o VCC (Greene e Vandeveld, 2012). No entanto, um estudo isolado observou alta frequência desse achado, associado à estimulação da liberação de complexos VCC-IgG-plaqueta do fígado para circulação (Silva et al., 2005).

Tabela 5– Alterações hematológicas observadas em 44 cães naturalmente infectados pelo vírus da cinomose canina

Parâmetro	n= 44(100%)
Anemia	32 (77%) ^a
Leucopenia	8 (18%) ^b
<i>Neutropenia</i>	3 (7%) ^{c,e}
<i>Linfopenia</i>	30 (68%) ^a
<i>Monocitopenia</i>	0 ^{e,c}
<i>Eosinopenia</i>	0 ^{e,c}
Leucocitose	3 (7%) ^{c,e}
<i>Neutrofilia</i>	5 (11%) ^{b,c,d}
<i>Linfocitose</i>	0 ^{e,c}
<i>Eosinofilia</i>	0 ^{e,c}
<i>Monocitose</i>	0 ^{e,c}
Trombocitopenia	12 (27%) ^b
Corpúsculo de Lentz	8(18%) ^b
Babesia/Anaplasma	4 (9%) ^{d,c}

Valores seguidos de letras distintas diferem estatisticamente entre si, teste de Qui quadrado com valor de P<0,05.

Tabela 6 – Classificação da anemia em relação à gravidade, morfologia e responsividade da medula óssea em 32 cães naturalmente infectados pelo vírus da cinomose canina

CLASSIFICAÇÃO DA ANEMIA n=32 (100%)		
GRAVIDADE	<i>Discreta</i>	12 (37%) ^a
	<i>Moderada</i>	15 (47%) ^a
	<i>Intensa</i>	5 (16%) ^b
MORFOLOGIA	<i>Normocítica/normocrômica</i>	14 (44%) ^a
	<i>Normocítica/hipocrômica</i>	12 (37%) ^a
	<i>Macroscítica/hipocrômica</i>	2 (6%) ^{b,c}
	<i>Macroscítica/normocrômica</i>	4 (12%) ^b
	<i>Microscítica/hipocrômica</i>	0 ^c
	<i>Microscítica/normocrômica</i>	0 ^c
*RESPONSIVIDADE DA MEDULA ÓSSEA	<i>Arregenerativa</i>	24 (75%) ^b
	<i>Regenerativa</i>	8 (25%) ^a

Valores seguidos de letras distintas diferem estatisticamente entre si, teste de Qui quadrado com valor de P<0,05.

*Valores seguidos de letras distintas para cada categoria diferem estatisticamente entre si, teste exato de Fischer com valor de P<0,001

Teste rápido de imunocromatografia

Após realização do teste de imunocromatografia para pesquisa de antígeno com amostras do FCE e do *swab* conjuntival em animais com sinais neurológicos associados ou não aos sinais sistêmicos, observou-se que os 76 (100%) animais avaliados foram positivos quando se testou as amostras do FCE e apenas 51(67%) quando se testou amostras do *swab* conjuntival (Tabela 7). Os valores foram significativamente diferentes com valor de p <0,0001. Segundo o protocolo do fabricante a sensibilidade e a especificidade do teste são altas, atingindo valores de 98,9% e 97,7%, respectivamente. Pereira (2010) observou sensibilidade de 86% e especificidade de 100% em amostras de FCE em animais com sinais clínicos e/ou neurológicos. Nesse estudo, comparou-se, pela primeira vez, a eficácia do teste realizado com amostras conjuntivais e do FCE em animais com sinais neurológicos associados ou não aos sinais sistêmicos. O elevado índice de falso negativo nas amostras conjuntivais, assim como observado por Curti e colaboradores (2012), ocorre devido ao tempo que o antígeno viral permanece no tecido epitelial e o momento em que o teste é realizado. Estudos com imunofluorescência identificaram que o antígeno é detectado até três semanas após infecção, antes de desaparecer dos tecidos epiteliais. Com isso, como o vírus possui um período de incubação de uma a quatro semanas, aqueles animais que apresentarem os primeiros sinais no final do período de incubação, serão negativos para imunocromatografia para antígenos em amostras do *swab* conjuntival (Jozwik e Frymus, 2005). Apesar dos testes de imunocromatografia para pesquisa de antígenos em amostras do FCE terem sido positivos para todos os animais com sinais neurológicos, é importante ressaltar que em casos muito crônicos podem ocorrer falso-negativos. Alguns estudos demonstraram por técnicas moleculares, que estirpes virais que possuem capacidade de persistir nas células neurais por longos períodos, disseminam-se por vias não citolíticas, resultando em baixa quantidade de partículas virais

livres no FCE, aumentando a chance de falso-negativos (Zurbriggen et al., 1995; Frisk et al., 1999).

Tabela 7– Comparação do teste de imunocromatografia para pesquisa de antígeno realizado com amostras do fluido cérebro-espinhal e de *swab* conjuntival em 76 animais com sinais clínico-neurológicos devido a infecção natural pelo vírus da cinomose canina

Animais com sinais neurológicos	TR FCE+	TR RC+
76	76 (100%) ^a	51 (67%) ^b

TR FCE= Teste rápido de imunocromatografia do fluido cérebro-espinhal

TR RC = Teste rápido de imunocromatografia do *swab* conjuntival

Valores seguidos de letras distintas diferem estatisticamente entre si, teste exato de Fischer com valor de P<0,0001

Avaliação laboratorial do fluido cérebro-espinhal

Na análise do FCE a principal alteração observada foi a proteinorraquia (Tabela 8) (P<0,05), assim como observado por Tudury e colaboradores (1997). O aumento de proteína é um indicador de alteração no SNC e ocorre devido ao aumento da permeabilidade da BHE e/ou da produção intratecal de imunoglobulinas. Outros dois achados importantes observados foram a pleocitose e o aumento da quantidade de hemácias. Neste estudo, 100% dos animais que apresentaram pleocitose tiveram o predomínio de linfócitos nas amostras. Segundo Platt e Garosi (2012) as amostras que apresentam predomínio de linfócitos, acima de 50% das células nucleadas, são caracterizadas como pleocitose linfocítica. A pleocitose linfocítica é uma das características do FCE mais observados em animais com CC (Amude et al., 2006). Além disso, são amostras que geralmente contêm menos que 50 células/μl (Platt e Garosi, 2012), como também observado nesse estudo, em que apenas uma das amostras apresentou contagem total de células superior a esse valor. A presença de hemácias indica contaminação no momento da coleta, ou aumento da permeabilidade da BHE. Em casos de contaminação, a contagem de hemácias, geralmente fica acima de 500 células/μl. Nesse estudo foram observados valores de no máximo 100 células/μl, o que, associado ao aumento de proteína, sugere aumento da permeabilidade da BHE. A análise física (coloração e turbidez), como esperado, não revelou alterações nas amostras. Essas alterações macroscópicas geralmente são observadas quando se tem uma contagem total de células nucleadas (CTCN) superior a 500 células/ μl, o que dificilmente ocorre nos casos de CC, em que se observam pleocitoses discretas a moderadas.

Tabela 8 – Principais alterações do fluido cérebro-espinhal de 16 cães infectados com o vírus da cinomose canina

Alterações	N = 16
Proteinorraquia (>20 mg/dl)	13 (81%) ^b
Pleocitose (> 8 células/μl)	7 (43%) ^a
Linfócitos acima de 50%	7/7 (100%)
Aumento da concentração de hemácias (>0)	7 (56%) ^a
CTCN > 50 células/ μl	1 (6,25%) ^c

Valores seguidos de letras distintas diferem estatisticamente entre si, teste de Qui quadrado com valor de P<0,05.

CTCN (Contagem total de células nucleadas).

CONCLUSÕES

1 - O VCC é mais frequente em cães adultos e em falha vacinal, sem predileção por sexo ou época do ano, na região metropolitana de Belo Horizonte.

2 - Os sinais extraneurais e neurais decorrentes da infecção pelo vírus da cinomose canina são variados sendo mais comumente relacionados à infecção dos tratos respiratórios e gastrintérico e a déficits motores e mioclonia, respectivamente.

3 - O teste de imunocromatografia para antígenos com amostras do FCE é indicado para o diagnóstico da infecção pelo vírus da cinomose canina em animais com sinais neurológicos, diferentemente das amostras de *swab* conjuntival.

4 - As amostras do esfregaço conjuntivais não devem ser utilizadas para o diagnóstico da infecção pelo vírus da cinomose canina em animais com sinais neurológicos, com ou sem sinais sistêmicos.

CAPÍTULO 3

QUANTIFICAÇÃO E CORRELAÇÃO DO GRAU DE APOPTOSE NEURAL E DA CARGA VIRAL NO ENCÉFALO DE CÃES NATURALMENTE INFECTADOS PELO VIRUS DA CINOMOSE CANINA E SUAS RELAÇÕES COM AS MANIFESTAÇÕES NEUROLÓGICAS

RESUMO

A cinomose canina é ocasionada por um vírus pantrópico que resulta em lesão do sistema nervoso central. Apesar disso, ainda faltam estudos moleculares que consigam identificar como ocorre a morte das células neurais e se existe relação dos sinais neurológicos manifestados com as lesões e/ou quantidade de vírus no sistema nervoso central. Objetivou-se quantificar e correlacionar à expressão gênica de proteínas pró-apoptóticas (Caspase-3, Caspase-8 e Bax) e antiapoptóticas (Bcl-2) e a carga viral do vírus da cinomose canina no lobo frontal, hipocampo e cerebelo por PCR em tempo real em 21 cães naturalmente infectados pelo vírus da cinomose canina e suas relações com as manifestações neurológicas. A avaliação da expressão gênica dos fatores apoptóticos demonstrou que o vírus da cinomose canina induz a morte celular programada no hipocampo, tanto pela via intrínseca como extrínseca, e no cerebelo, pela via intrínseca ($p < 0,05$). Observou-se maior carga viral no cerebelo em relação ao lobo frontal e hipocampo. No entanto, não houve diferença estatística na quantificação da carga viral entre as três regiões encefálicas estudadas ($p > 0,05$). Não foi observada correlação significativa entre a expressão gênica dos fatores apoptóticos e a carga viral entre as regiões encefálicas ($p > 0,05$) e nem possível associação aos sinais neurológicos manifestados. Conclui-se que não existe correlação, positiva ou negativa, entre a quantidade de vírus, a expressão gênica dos fatores da apoptose no encéfalo e os sinais neurológicos de cães naturalmente infectados pelo vírus da cinomose canina.

Palavras-chave: cinomose canina, vírus, encéfalo, apoptose, carga viral, sinais neurológicos

INTRODUÇÃO

A cinomose canina (CC) ocasionada por um vírus da família *Paramyxoviridae* e gênero *Morbilivirus*, é uma das doenças infecciosas mais importantes em cães que resulta em altas taxas de morbidade e mortalidade (Greene e Vandeveld, 2012). O vírus é pantrópico resultando em diversas manifestações clínicas sistêmicas e neurológicas. As manifestações neurológicas são relacionadas à neurolocalização das lesões (Koutinas et al., 2002), mas não foi ainda estabelecida uma correlação clinicopatológica entre as manifestações neurológicas e as lesões neuroanatômicas (Higgins et al., 1982; Vandeveld et al., 1982; Summers et al., 1984a; Tipold et al., 1992; Frisk et al., 1999). Estudos *post mortem* em animais com sinais neurológicos focais identificaram lesões histopatológicas difusas no SNC (Amude et al., 2012). Da mesma forma, foram observadas alterações histopatológicas multifocais em animais com sinais neurológicos focais (Tipold et al., 1992).

As lesões neurológicas são associadas principalmente a alterações desmielinizantes e a morte de células neurais por excitotoxicidade (Brunner et al., 2007). Estudos moleculares observaram morte de células neurais por apoptose e aumento da expressão gênica de fatores pró-apoptóticos das vias intrínseca e extrínseca no cerebelo de cães naturalmente infectados (Moro et al., 2003a; Del Puerto et al., 2010). Ainda não existem estudos que compararam as vias de ativação da apoptose em diferentes regiões do encéfalo de cães. Também não há relatos de uma possível correlação entre o grau de apoptose e à quantidade de vírus no encéfalo. Estudos recentes quantificaram a carga viral por meio da PCR em tempo real em amostras biológicas *in vivo* em cães experimentalmente infectados (Sehata et al., 2015) e naturalmente infectados (Elia et al., 2015). No entanto, ainda faltam dados consistentes em relação à distribuição do vírus no encéfalo de cães naturalmente infectados já o único dado pertence ao estudo realizado por Elia e colaboradores (2006) em que foi realizada, por PCR em tempo real, a quantificação do vírus em diversos segmentos encefálicos em um único cão naturalmente infectado pelo vírus da cinomose canina (VCC).

Desta forma, o presente estudo tem por objetivos quantificar a expressão gênica de proteínas antiapoptóticas (Bcl-2) e pró-apoptóticas (Bax, caspase-8, caspase-3) e a carga viral do VCC no lobo frontal, hipocampo e cerebelo por meio da PCR em tempo real em 21 cães naturalmente infectados. Além disso, avaliou-se a correlação entre as variáveis que poderiam informar se a quantidade de vírus em uma determinada região encefálica poderia resultar em aumento de morte celular e se os sinais neurológicos poderiam estar relacionados a estes fatores.

MATERIAL E MÉTODOS

Esse estudo utilizou as dependências físicas e a infra-estrutura do Laboratório de Histopatologia do Departamento de Clínica e Cirurgia Veterinárias da Escola da Veterinária da Universidade Federal de Minas Gerais (EV-UFMG), do Laboratório de Virologia do Departamento de Medicina Veterinária Preventiva EV-UFMG, Laboratório de Biologia Molecular da Escola de Medicina Veterinária/UFMG e do Laboratório do Departamento de Microbiologia e Imunologia e Instituto de Biotecnologia (IBTEC) da Universidade Estadual Paulista (UNESP) de Botucatu. O projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética e Experimentação Animal da UFMG com o protocolo de número 32/2013 (Anexo 1).

Para esse estudo molecular foram utilizados 21 animais positivos para o VCC no teste de imunocromatografia para antígenos com amostras do fluido cerebrospinal que vieram a óbito ou foram eutanasiados devido ao prognóstico desfavorável. A eutanásia foi realizada com aplicação de superdosagem de tiopental¹¹ pela via endovenosa seguida de cloreto de potássio¹²

¹¹ Tiopentax® 1g, Cristália Produtos Químicos Farmacêuticos Ltda, Itapira-SP, Brasil

em volume dependente do porte do animal. A necropsia foi realizada no intervalo de uma hora após o óbito. Amostras de encéfalo (lobo frontal, hipocampo e cerebelo) foram colhidos de forma asséptica em duplicata em tubos de 2ml e acondicionadas no nitrogênio líquido para depois serem transferidas para o freezer – 80° C. Fragmentos dos tecidos foram utilizados para avaliação da ativação das vias da apoptose, quantificando a expressão gênica de Bax, Bcl-2, Caspase-3 e Caspase-8 e para a quantificação da carga viral pela técnica de reação em cadeia da polimerase transcriptase-reversa (RT-PCR) em tempo real. A escolha desses segmentos encefálicos foi baseada em estudos anteriores histopatológicos que identificaram maior número de lesões nesses segmentos (Silva et al., 2009) e no estudo de Elia e colaboradores (2006) que observaram maior concentração viral no lobo frontal de um cão. Com isso criou-se a expectativa que nesses segmentos poderia-se ter maior facilidade em quantificar o grau de apoptose neural e da carga viral. Como controle, foram utilizados quatro animais neurologicamente normais, negativos para CC no teste de imunocromatografia e na quantificação do vírus pelo PCR em tempo real, oriundos do Centro de Controle de Zoonoses (CCZ) eutanasiados por serem sorologicamente positivos para leishmaniose canina.

Avaliação da expressão gênica relativa de Bax, Bcl-2, caspase-3, caspase-8 por RT-PCR em tempo real

Os *primers* referentes aos genes para Bcl-2, Caspase-8, Bax e Caspase-3 (Quadro 1), foram obtidos a partir de estudos anteriores (Del Puerto et al., 2010; Del Puerto et al., 2011). O gene que codifica a proteína ribossomal S26 foi utilizado como controle interno para normalização da expressão do gene alvo. Os *primers*¹³ foram recebidos liofilizados, e em seguida dissolvidos em H₂O estéril-filtrada para alíquotas com uma concentração final de 100 pmol/μl (concentração para estoque), em seguida diluídas para 10 pmol/μl (concentração para utilização nas PCRs). Para alíquotamento dos *primers* foram utilizadas ponteiras com barreira, e todo o manuseio ocorreu em capela de fluxo não utilizada para manuseio de fragmentos de PCR.

Quadro 1 – *Primers* utilizados para reação de PCR em tempo real para amplificação específica do cDNA dos genes alvos relacionados a apoptose

Gene	Iniciadores (sequências de nucleotídeos 5' a 3')
S26CF (Normalizador)	<i>forward</i> : 5'-CGTGCTTCCCAACGTGTACGTGA -3' <i>reverse</i> : 5'-CGATTCCGGACTACCTTGCTGTG-3'
BCL2	<i>forward</i> : 5' -CATGCCAAGAGGGAAACACCAGAA - 3' <i>reverse</i> : 5' -GTGCTTTGCATTCTTGGATGAGGG - 3'
Caspase-8	<i>forward</i> : 5' - ACAAGGGCATCATCTATGGCTCTGA-3' <i>reverse</i> : 5' - CCAGTGAAGTAAGAGGTCAGCTCAT-3'
Bax	<i>forward</i> : 5' -TTCCGAGTGGCAGCTGAGATGTTT -3' <i>reverse</i> : 5' -TGCTGGCAAAGTAGAAGAGGGCAA -3'
Caspase-3	<i>forward</i> : 5 - TTCATTATTCAGGCCTGCCGAGG-3' <i>reverse</i> : 5' -TTCTGACAGGCCATGTCATCCTCA - 3'

Extração do RNA total

¹² Solução de cloreto de potássio 10%-19,1%, Isofarma, Eusébio-CE, Brasil.

¹³ Invitrogen Brasil Ltda, São Paulo/SP/Brasil

O RNA total foi isolado de tecidos do sistema nervoso central (lobo frontal, hipocampo e cerebelo) de animais positivos para cinomose e de animais controle. A extração do RNA foi realizada pelo uso de 750 µl de Trizol¹⁴ para cada 100mg de tecido. O método consistiu de uma etapa inicial de lise e homogeneização tecidual, utilizando-se pistilo de plástico estéril livre de RNAses e DNAses, por cinco minutos à temperatura ambiente para completa dissociação dos complexos nucleoprotéicos. Depois foi adicionado clorofórmio (200 µl), seguido de 15 segundos de homogeneização no vórtex, 15 minutos de incubação à temperatura ambiente, seguido de centrifugação a 12.000g por 15 minutos a 4 °C, para separação em três fases em que a fase aquosa incolor superior continha o RNA. Na terceira etapa, a fase aquosa incolor com o RNA foi transferida para um novo microtubo de 1,5 ml, com adição de 700 µl de isopropanol e incubação à temperatura ambiente por 10 minutos, seguida de centrifugação a 8.000g por 8 minutos a 4 °C para precipitação do *pellet* de RNA. O *pellet* foi lavado com 1,0 ml de etanol a 75%, homogeneizado e centrifugado a 8.000g por 5 minutos a 4 °C. O etanol foi cuidadosamente descartado e os tubos foram colocados para secar em temperatura ambiente, por aproximadamente cinco minutos. Após a secagem o RNA foi solubilizado utilizando-se 45 µl de água DEPC¹⁵ seguido de incubação em banho maria por 10 minutos a 55 °C. Deste RNA, retirou-se uma amostra para quantificação e o restante foi congelado a -80 °C para posterior confecção do DNA complementar (cDNA).

A mensuração do RNA foi realizada em espectrofotômetro de luz ultravioleta por meio da avaliação da absorbância a 260nm e da relação entre as absorbâncias 260/280nm utilizando o aparelho NanoDrop¹⁶.

Síntese do cDNA (Transcrição reversa – RT)

Para a síntese do cDNA pela transcrição reversa (RT), os RNAs quantificados foram separados em 5 grupos (amostras com a concentração de 200 µg/ml, 500 µg/ml, 1.000 µg/ml, 1.500 µg/ml, 2.000 µg/ml) para que se pudesse escolher o volume de RNA que seria colocado na reação para se obter um peso total de 1µg de RNA por amostra. A primeira etapa consistiu no tratamento do RNA com DNAase para eliminar qualquer contaminação genômica com DNA do RNA total. Foi adicionado 1µl de tampão 10x DNAase I Buffer, 1,0 µl da enzima DNAase I, o volume correspondente de RNA para cada concentração e completou-se com água livre de RNAase o volume final de 10 µl. As amostras foram incubadas à temperatura ambiente por 15 minutos e depois foi adicionado 1 µl de EDTA/tubo para inativação da DNAase. Foram, então, incubadas no termociclador à temperatura de 65° graus por 10 minutos. A segunda etapa consistiu na síntese do cDNA a partir do RNA tratado com a DNAase. Para cada amostra, adicionou-se 8 µl de RNA tratado, 10 µl de 2x *RT Reaction Mix* e 2 µl de enzima RT para que se obtivesse um volume da reação final de 20 µl. Os tubos foram gentilmente homogeneizados e incubados no termociclador à temperatura de 25°C por 10 minutos, depois a 50 °C por 30 minutos e finalizada a 85 °C por 5 minutos. As amostras foram então congeladas e armazenadas à temperatura de -20 °C até a realização da PCR em tempo real. Todos os reagentes foram provenientes da InvitrogenTM (SuperScriptTM III First-Strand Synthesis SuperMix for qRT-PCR¹⁷), (Deoxyribonuclease I, Amplicifcation Grade¹⁸).

¹⁴ Quick-Zol – Ludwig biotec, Alvorada/RS/Brasil

¹⁵ Ultra-pure® DEPC-treated water, Gibco, Invitrogen, CA, USA.

¹⁶ Thermo Fisher Scientific, Wilmington, Delaware, USA

¹⁷ SuperScript® III, First-Strand Synthesis Super Mix for qRT-PCR – Invitrogen, São Paulo/SP, Brasil

¹⁸ Deoxyribonuclease I, Amplicifcation Grade – Invitrogen, São Paulo/SP, Brasil

Reação em cadeia da polimerase em tempo real para avaliação da apoptose neural

As amostras de cDNA resultantes da transcrição reversa foram submetidas à PCR em tempo real realizada no equipamento de Sistema de PCR em tempo real ABI PRISM® 7.500 Sequence Detection System (Laboratório de Uso Coletivo 1 do DMVP da Escola de Medicina Veterinária/UFMG), utilizando-se o Platinum® SYBR® Green qPCR SuperMix-UDC¹⁹ que contém os componentes necessários para a PCR em tempo real. Em cada placa avaliou-se de um a dois genes alvo e de um a dois tecidos, sempre com amostras do controle positivo e negativo em duplicata.

As amostras foram aplicadas em placas de 96 poços²⁰, em duplicata, em um volume final de reação de 20µl. Dessa forma foram pipetados, em cada poço, 2 µl de amostra do cDNA (previamente diluída em água livre de RNAase na proporção de 1:3) e 18 µl do Mix contendo 10 µl do Platinum® SYBR® Green qPCR SuperMix-UDC, 0,4 µl de cada *primer* a 10 pmol/µl (senso e anti-senso) e completando o volume com 7,2 µl de H₂O DEPC. Os controles negativos foram incluídos em todas as placas com substituição do cDNA por igual volume de água DEPC. As placas foram seladas com adesivo óptico²¹ e receberam *spin* para trazer todo o volume para o fundo dos poços. Em seguida as placas foram encaixadas no equipamento de PCR em tempo real para iniciar a reação. Durante todo o processo, luvas e ponteiras com barreira foram utilizadas em capela de fluxo para evitar a contaminação das amostras.

As reações de PCR em tempo real ocorreram no seguinte ciclo termal: um ciclo de 50°C/2min, um ciclo de 95°C/10min, 40 ciclos de 95°C/15 seg e 60°C/1 min. Ao término da ciclagem foi realizada a curva de dissociação (*melting*), para a construção das curvas de dissociação, que tem por objetivo determinar a especificidade dos fragmentos amplificados.

O *Software* 7.500 v.2.0.1 *Applied Biosystems* apresentou os resultados em gráfico de fluorescência em relação ao número de ciclos, sendo o ciclo limiar, ou *threshold* (CT), o ciclo em que foi detectada fluorescência acima do limite basal estabelecido. A expressão gênica relativa ou *fold change* (FC) de cada gene alvo (caspase-3, caspase-8, Bax e Bcl-2) foi calculada utilizando-se o método do $2^{-\Delta\Delta CT}$. Assim o delta CT (ΔC_T) foi determinado pela subtração do CT do gene pesquisado pelo CT do gene de referência S26. O delta delta CT ($\Delta\Delta C_T$) foi encontrado pela diferença entre o ΔC_T e a média do ΔC_T do grupo controle. A expressão gênica relativa foi dada pela fórmula: $FC = 2^{-\Delta\Delta CT}$ (Livak e Schmittgen, 2001).

Avaliação da quantificação da carga viral pela PCR em tempo real

Os oligonucleotídeos iniciadores utilizados foram os mesmos descritos por Elia e colaboradores (2006) (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') (posição de nucleotídeo: 905–931 e 966–987). A seleção dos *primers* foi baseada na amplificação do gene N, pois apresenta pouca variação antigênica entre as estirpes (Rima et al., 1995).

Extração do RNA total

¹⁹ SYBR® Green PCR Master Mix, 5-Pack – Invitrogen, São Paulo/SP, Brasil

²⁰ ABI PRISM® 96-Well Ptical Reaction Plate with Barcode– Invitrogen, São Paulo/SP, Brasil

²¹ ABI PRISM® Optical Adhesive Covers - Invitrogen, São Paulo/SP, Brasil

O RNA total foi isolado de tecidos do sistema nervoso central (lobo frontal, hipocampo e cerebelo) de animais positivos para cinomose e de animais controle da mesma forma que foi realizado para a quantificação da apoptose neural.

Síntese do cDNA com primer randômico

Para a síntese do cDNA pela transcrição reversa, os RNAs quantificados foram separados em 5 grupos (amostras com a concentração de 200 µg/ml, 500 µg/ml, 1.000 µg/ml, 1.500 µg/ml, 2.000 µg/ml) para que se pudesse escolher o volume de RNA que seria colocado na reação para se obter um peso total de 0,8µg de RNA por amostra. A primeira etapa consistiu no tratamento do RNA com DNAase para eliminar qualquer contaminação genômica com DNA do RNA total. Foi adicionado 1µl de tampão 10x DNAase I Buffer, 1 µl da enzima DNAase I, o volume correspondente de RNA para cada concentração e completou-se com água livre de RNAase o volume final de 10 µl. As amostras foram incubadas à temperatura ambiente por 15 minutos e depois foi adicionado 1 µl de EDTA/tubo para inativação da DNAase. Foram, então, incubadas no termociclador à temperatura de 65° graus por 10 minutos. A segunda etapa consistiu na síntese do cDNA a partir do RNA tratado com a DNAase. Foi adicionado 2 µl de tampão 10x DNAase I, 1,4 µl de 25mM MgCl₂, 4 µl de 10mM DNTP, 1 µl de inibidores de RNAase, 1 µl de *Multiscribe* RT, 1 µl de *primer* randômico para cada volume de RNA calculado e completou-se com água DEPC até o volume final de 20 µl. Os tubos foram gentilmente homogeneizados e incubados no termociclador à temperatura de 25°C por 10 minutos, depois à 50 °C por 30 minutos e finalizada à 85 °C por 5 minutos. As amostras foram então congeladas e armazenadas à temperatura de -20 °C até a realização da PCR em tempo real. Todos os reagentes foram provenientes da *Life Technologies* (TaqMan® Reverse Transcription Reagents²²) e Invitrogen (Deoxyribonuclease I, Amplicfication Grade²³).

Síntese do padrão para quantificação

Um fragmento de 287 pb obtido pela amplificação do gene N (P-1 senso (5'-ACAGGATTGCTGAGGACCTAT-3') e P-2 antisenso (5'-CAAGATAACCATGTACGGTGC-3')) (posição de nucleotídeo: 769–789 1055–1035), descritos por Frisk e colaboradores (1999) do VCC foi clonado utilizando pGEM-T easy vector²⁴ em célula *Escherichia coli JM109*. Foi realizado o sequenciamento da região para confirmação da sequência. O plasmídeo foi purificado com o kit E.Z.N.A.® Plasmid Mini Kit II e quantificado em espectrofotômetro NanoDrop®ND-1000. A massa molar do plasmídeo contendo o inserto foi estimada utilizando o Oligo calculator (<http://www.basic.northwestern.edu/biotools/oligocalc.html>). O plasmídeo contendo o inserto foi diluído em água ultra pura em escala de dez para gerar a curva padrão.

²² TaqMan® Reverse Transcription Reagents – Life Technologies, São Paulo/SP, Brasil

²³ Deoxyribonuclease I, Amplicfication Grade – Invitrogen, São Paulo/SP, Brasil

²⁴ Promega®, Madison, WI, USA

Reação em cadeia da polimerase em tempo real para a detecção e quantificação do vírus da cinomose

As amostras de cDNA resultantes da transcrição reversa com *primer* randômico foram submetidas à RT-PCR em tempo real realizada no equipamento 7.300 Real Time PCR System (Applied Biosystems) (Laboratório do Departamento de Microbiologia e Imunologia e Instituto de Biotecnologia (IBTEC) da UNESP Botucatu), utilizando-se o kit GoTaq qPCR Master Mix. As amostras foram quantificadas em duplicata por PCR tempo real (qPCR), utilizando a curva padrão em duplicata de plasmídeos contendo $2,87 \times 10^4$ a $2,87 \times 10^8$ cópias de DNA/ μ l. O kit GoTaq qPCR Master Mix (Promega, [A6001](#)) foi utilizado com oligonucleotídeos iniciadores a 600nM, Master Mix 1X, 0,18 μ l de CXR Reference Dye, 4 μ l de cDNA e água ultrapura para o volume final de 20 μ l. Os oligonucleotídeos iniciadores utilizados na reação de qPCR foram 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') (posição de nucleotídeo: 905–931 e 966–987 do gene de Nucleocapsídeo) descritos por Elia e colaboradores (2006). As condições de ciclagem foram: 95°C/5 minutos de desnaturação inicial, 40 ciclos de 95°C/15 segundos e 60°C/60 segundos seguida da curva de dissociação no equipamento 7300 Real Time PCR System (Applied Biosystems). As reações foram analisadas em 7000 System SDS Software versão 1.4.0.27 (Applied Biosystems) e a quantificação absoluta foi estimada por curva padrão (Larianov et al., 2005).

Análise estatística

Para determinar se os dados eram paramétricos, empregou-se o teste de normalidade Shapiro-Wilks e Kolmogorov-Smirnov. Após transformação logarítmica [$x = \text{Log}(y+1)$], as variáveis (expressão gênica de fatores pró e anti-apoptóticos como caspase 3 e 8, Bax e Bcl-2, e a quantificação da carga viral pela PCR em tempo real) foram submetidas à análise de variância (ANOVA) seguida do teste de comparação das médias de Tukey com valor de significância $p < 0,05$. A análise dos resultados da transcrição, obtidos pelo método $2^{-\Delta\Delta CT}$, entre os grupos controle negativo e a amostra estudada para a variável apoptose neural (lobo frontal, cerebelo ou hipocampo) foi avaliada pelo teste t. A associação entre o grau de apoptose neural e a quantificação viral foi avaliada utilizando a correlação de Pearson ($p < 0,05$). Os dados foram analisados pelo pacote estatístico *Graphpad prism 5 for Windows*²⁵.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Avaliação da expressão gênica relativa de Bcl-2, Bax, caspase-3, caspase-8 pela PCR em tempo real

Foi avaliado o comportamento da expressão gênica de fatores antiapoptóticos (Bcl-2) e de pró-apoptóticos (caspase-3, caspase-8, Bax) no lobo frontal, hipocampo e cerebelo de cães naturalmente infectados pelo VCC e controle na tentativa de elucidar os mecanismos moleculares envolvidos na morte de células neurais induzidas pelo vírus.

Na avaliação do fator antiapoptótico Bcl-2, não foi observada diferença estatística ($p > 0,05$) na expressão gênica entre os animais com cinomose e controle (Figura 1A, 1B, 1C), e nem entre as três regiões estudadas entre os controles negativos (Figura 1D) e entre os animais infectados (Figura 1E).

²⁵ *GraphPad Software*, La Jolla, CA, USA

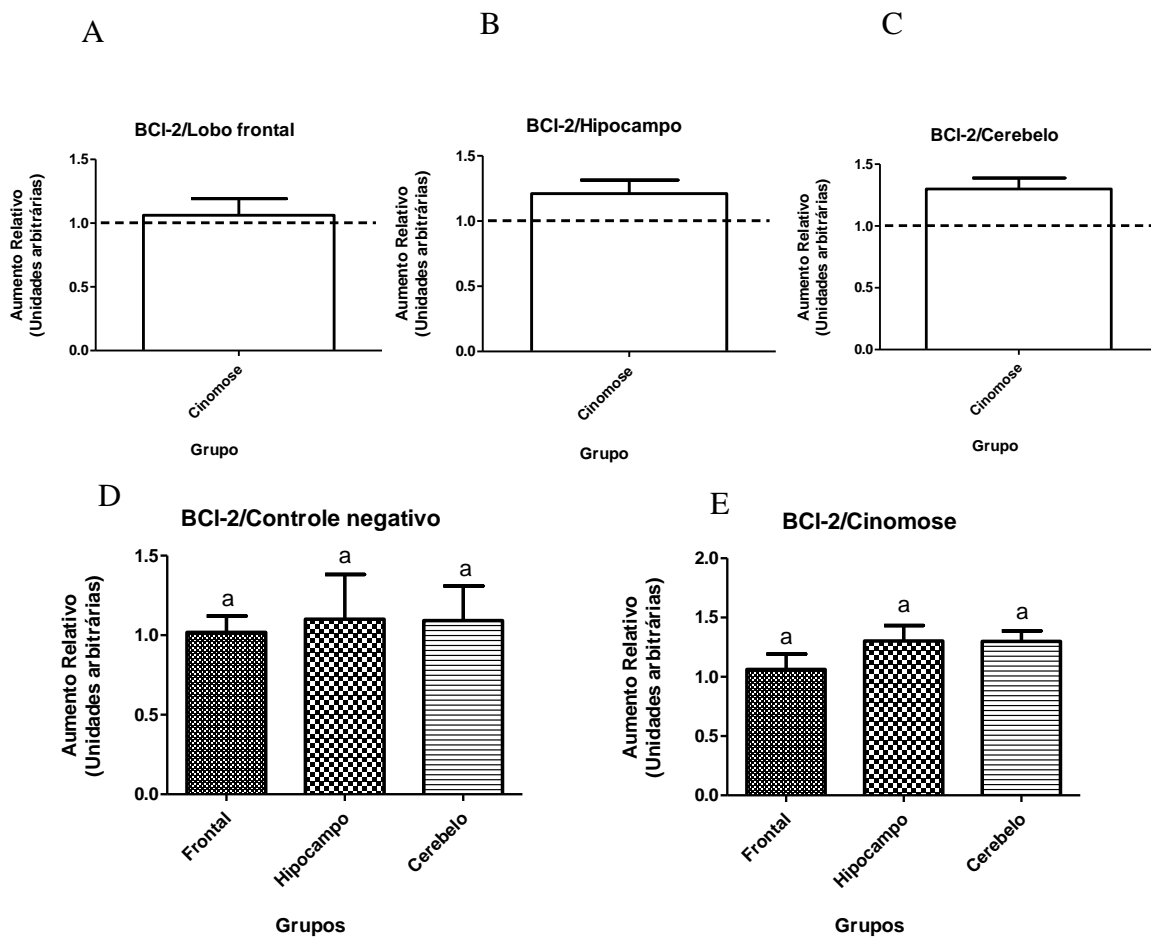


Figura 1 – Mensuração pela PCR em tempo real da expressão de Bcl-2. Comparação da razão dos valores relativos, expressos em médias e erros-padrão, do grupo cinomose em relação ao grupo controle negativo (nível basal=1), no lobo frontal (A), hipocampo (B), cerebelo (C) e entre eles (E) de cães naturalmente infectados com o vírus da cinomose canina e entre os controles negativos (D) ($p > 0,05$). Valores seguidos de letras distintas diferem estatisticamente entre si.

Em seguida, foi realizada a mensuração da expressão gênica dos fatores pro-apoptóticos (caspase-8, Bax, caspase-3). Quando se avaliou a caspase-8, observou-se aumento significativo da expressão gênica apenas no hipocampo ($p < 0,05$) (Figura 2B) comparado ao grupo controle e também às amostras do lobo frontal e cerebelo ($p < 0,05$) (Figura 2E). A avaliação da expressão gênica de Bax demonstrou aumento significativo na região do hipocampo (Figura 3B) e cerebelo (Figura 3C) ($p < 0,05$), nos animais com cinomose em relação ao grupo controle negativo e em relação ao lobo frontal. Quanto à expressão de caspase-3, observou-se aumento significativo no hipocampo ($p < 0,03$) e no cerebelo ($p < 0,05$) (Figura 4B, Figura 4C), nos animais com cinomose em relação ao grupo controle e ao lobo frontal (Figura 4A). Além disso, houve diferença significativa dessas duas regiões comparando-se ao lobo frontal ($p < 0,05$) (Figura 4E).

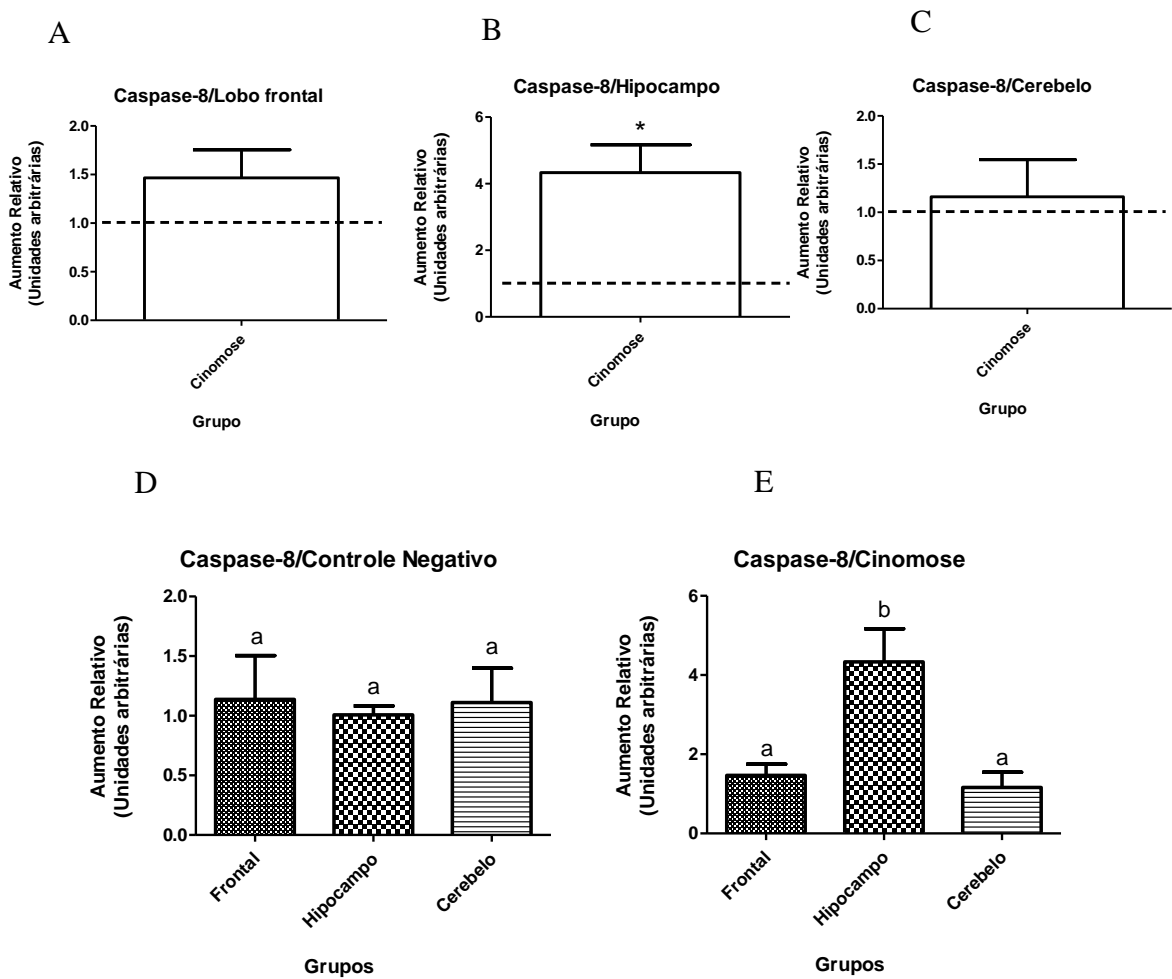


Figura 2 – Mensuração pela PCR em tempo real da expressão de caspase-8. Comparação da razão dos valores relativos, expressos em médias e erros-padrão, do grupo cinomose em relação ao grupo controle negativo (nível basal=1), no lobo frontal (A), hipocampo (B) e cerebelo (C) e entre eles (E) de cães naturalmente infectados com o vírus da cinomose canina e entre os controles negativos (D) ($p < 0,05$). Valores seguidos de letras distintas diferem estatisticamente entre si.

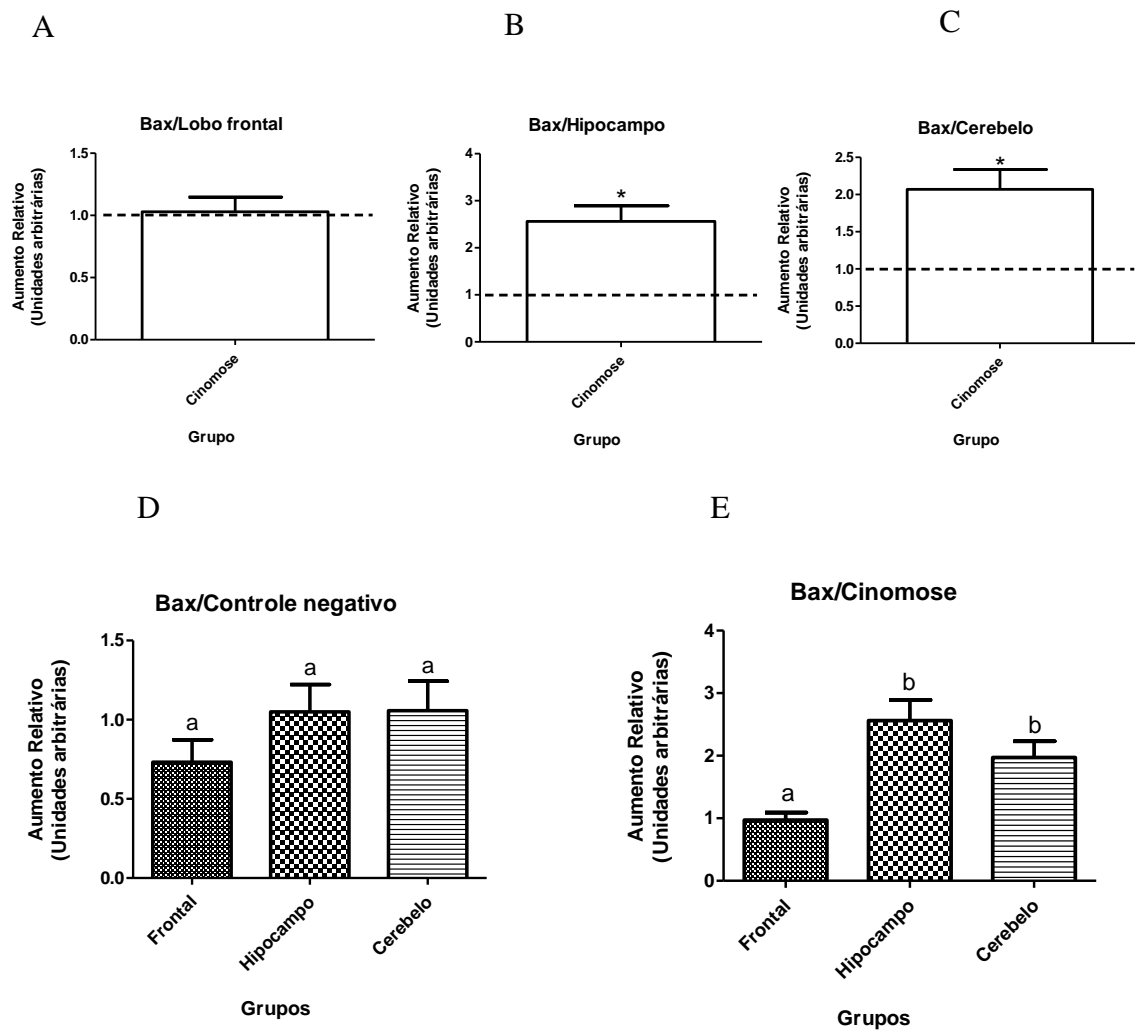


Figura 3 – Mensuração pela PCR em tempo real da expressão de Bax. Comparação da razão dos valores relativos, expressos em médias e erros-padrão, do grupo cinomose em relação ao grupo controle negativo (nível basal=1), no lobo frontal (A), hipocampo (B) e cerebelo (C) e entre eles (E) de cães naturalmente infectados com o vírus da cinomose canina e entre os controles negativos (D) ($p < 0,05$). Valores seguidos de letras distintas diferem estatisticamente entre si.

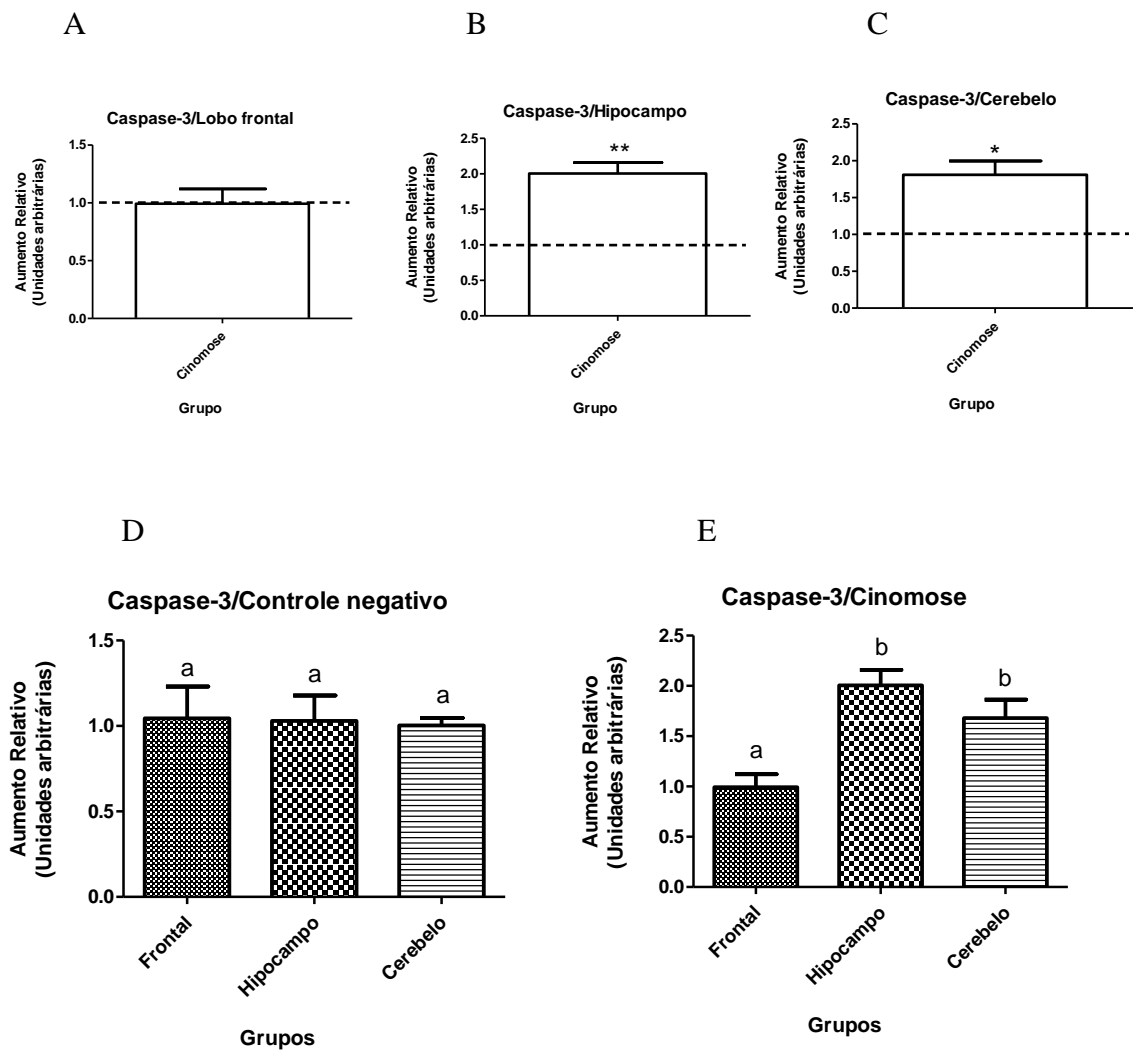


Figura 4 – Mensuração pela PCR em tempo real da expressão de caspase-3. Comparação da razão dos valores relativos, expressos em médias e erros-padrão, do grupo cinomose em relação ao grupo controle negativo (nível basal=1), no lobo frontal (A), hipocampo (B) e cerebelo (C) e entre eles (E) de cães naturalmente infectados com o vírus da cinomose canina e entre os controles negativos (D) (* $p < 0,05$; ** $p < 0,03$). Valores seguidos de letras distintas diferem estatisticamente entre si.

Como foi observado a presença de *Babesia sp* na lâmina com esfregaço sanguíneo em quatro animais do estudo, realizou-se a comparação das médias da expressão gênica dos fatores apoptóticos entre esse cães e os que estavam infectados apenas pelo VCC, para verificar se esse protozoário poderia influenciar nos resultados. Não foram observadas diferenças significativas entre os segmentos estudados entre os cães infectados com o VCC associados ou não a *Babesia sp* (Figura 5). Com isso, pode-se inferir que a presença desse micro-organismo não interferiu nos resultados da expressão gênica dos fatores apoptóticos em cães com CC. Não foram encontrados estudos que avaliaram a expressão gênica dos fatores apoptóticos em animais infectados por *Babesia sp* apesar de sinais neurológicos encefálicos serem relatados em quadros de babesiose canina (Platt e Garosi, 2012).

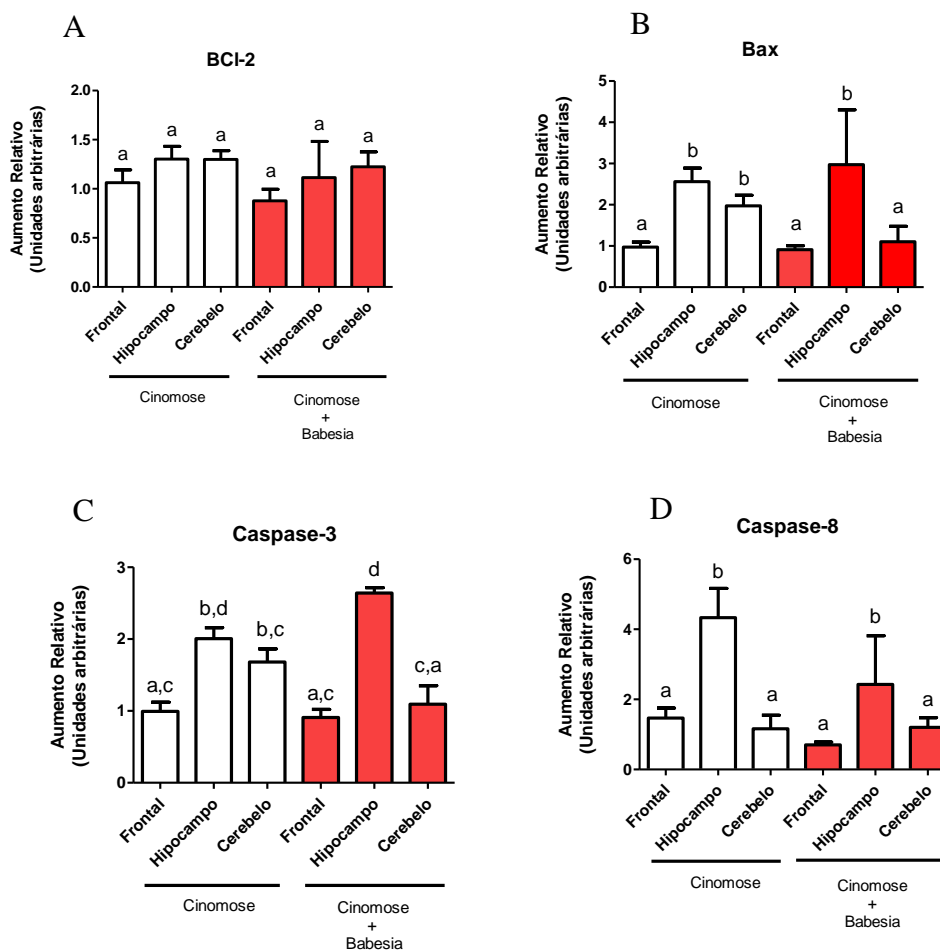


Figura 5 – Mensuração pela PCR em tempo real da expressão dos fatores anti-apoptótico (Bcl-2) (A) e pro-apoptóticos (Bax, caspase-8 e caspase-3) (B;C;D). Comparação da razão dos valores relativos, expressos em médias e erros-padrão, do grupo cinomose em relação ao grupo cinomose+babesia, no lobo frontal, hipocampo e cerebelo. Valores seguidos de letras distintas diferem estatisticamente entre si ($P < 0,05$).

A apoptose é a morte celular programada que ocorre naturalmente como resposta fisiológica do organismo para manutenção da homeostase celular, ou após condições patológicas (Elmore, 2007). No SNC a expressão dos fatores apoptóticos é elevada durante o desenvolvimento embrionário, mas extremamente baixa após o nascimento. No entanto, em diversas condições patológicas, a expressão de proteínas que participam desse processo aumenta consideravelmente (Yuan e Yankner, 2000). Na medicina humana a apoptose no SNC já foi associada a doenças virais como o vírus da imunodeficiência (Li et al., 2005), herpes vírus (Perkins et al., 2003) e citomegalovírus (DeBiasi et al., 2002). Na medicina veterinária observaram-se em estudos *in vitro* e *in vivo* indícios de apoptose no cerebelo de cães com CC (Guo e Lu, 2000; Moro et al., 2003b; Del Puerto et al., 2010). No entanto, ainda pouco se sabe sobre os mecanismos moleculares envolvidos na apoptose mediada pelo VCC e se outras regiões do SNC também podem ser acometidas.

A apoptose de células neurais em animais hípidos é muito baixa (Yuan e Yankner, 2000). No entanto, não foram encontradas informações sobre a expressão das proteínas que participam da apoptose no SNC nesses animais, e nem se existe diferença desta em relação às diferentes regiões neuroanômicas. Com isso, a avaliação da expressão dos fatores anti e pró-apoptóticos nos animais controle negativo foi importante para observar se existe maior ou menor sensibilidade das regiões encefálicas estudadas, que poderia influenciar na avaliação da apoptose nos animais infectados. Os resultados deste estudo demonstraram que não houve diferença significativa entre o lobo frontal, hipocampo e cerebelo em relação à expressão dos fatores anti (Bcl-2) e pró-apoptóticos (caspase-8, Bax, caspase-3) nos animais controle. Com isso, qualquer variação observada na expressão dessas proteínas nas diferentes regiões neuroanômicas avaliadas nos animais infectados pode ser associada à infecção pelo VCC.

A regulação da apoptose, fisiológica ou patológica, no SNC ocorre pela interação das proteínas anti (Bcl-2) e pró-apoptóticas (Bax, Caspase 8, Caspase 3) que ativam as caspases efetoras pelas vias intrínsecas e extrínsecas que se interconectam (Yuan e Yankner, 2000). A caspase-3 é considerada a proteína efetora mais importante para a apoptose, sendo um importante biomarcador para esse evento (Elmore, 2007). Além disso, a avaliação da caspase-8, Bax e Bcl-2, permite verificar qual das duas vias, intrínseca ou extrínseca, é ativada. Del Puerto e colaboradores (2010) observaram, em quatro animais, aumento da expressão gênica de Bax, caspase-3, caspase-8 e caspase-9 no cerebelo de cães naturalmente infectados pelo VCC, concluindo a que nessa região houve ativação das vias intrínsecas e extrínsecas. No entanto, não existem estudos que investigaram o comportamento das expressões gênicas e proteicas de fatores pró e antiapoptóticos em diferentes regiões do encéfalo de cães naturalmente infectados com o VCC e nem que demonstraram se existe diferença entre elas.

Os resultados obtidos no presente estudo sugeriram a ocorrência de apoptose no hipocampo e no cerebelo, mas não no lobo frontal de cães com CC. O aumento da expressão gênica dos fatores pró-apoptóticos (caspase-8, Bax e caspase-3) no hipocampo, quando comparado ao grupo controle, permite afirmar que o VCC induz a apoptose neural tanto pela via extrínseca, devido ao aumento da expressão de caspase-8, como pela via intrínseca, pelo aumento da expressão de Bax. Diferentemente do que foi observado no cerebelo, em que houve aumento da expressão gênica de Bax e caspase-3, sugerindo ativação apenas da via intrínseca. Apesar de esses resultados corroborarem os achados de Del Puerto e colaboradores (2010) em relação à indução de apoptose no cerebelo em cães naturalmente infectados pelo VCC, divergem em relação às vias de ativação da apoptose. É importante salientar que o número amostral nos dois experimentos foi bastante diferente. Enquanto nesse estudo foram avaliados 21 cães, o outro estudo avaliou quatro animais, o que de alguma forma pode gerar resultados divergentes. Além disso, existe a possibilidade dos animais terem sido infectados por estirpes distintas, já que estudos recentes demonstraram a circulação de várias estirpes no território

brasileiro (Budaszewski et al., 2014) e sabe-se que as lesões neurológicas dependem da virulência da estirpe viral (Summers et al., 1984a; Greene e Vandeveld, 2012).

Os resultados desse estudo demonstraram, pela primeira vez, que existe diferença da expressão gênica dos fatores envolvidos na apoptose em diferentes regiões do encéfalo de cães naturalmente infectados pelo VCC. Não se sabe qual é o real motivo, mas a variação da quantidade de vírus em cada uma dessas regiões poderia ser uma explicação plausível o que torna a quantificação da carga viral nessas regiões por PCR em tempo real essencial, para avaliação dessa correlação. Desta forma, como segunda parte desse projeto realizou-se a quantificação da carga viral nesses segmentos encefálicos e correlacionaram-se os resultados.

Vale a pena lembrar que os animais do grupo controle tinham exames positivos para leishmaniose, o que nos permite afirmar preliminarmente a inexistência de estímulos a apoptose encefálica por parte desse protozoário.

Avaliação da quantificação da carga viral por PCR em tempo real no encéfalo e suas relações às manifestações neurológicas

Foi estudada a quantificação da carga viral por PCR em tempo real no lobo frontal, hipocampo e cerebelo de cães naturalmente infectados pelo VCC e tentou-se relacioná-la aos principais sinais neurológicos observados.

Em todos os animais avaliados observou-se alta concentração de RNA viral (cópias/ μ l) que variou de $9,57 \times 10^4$ a $1,19 \times 10^9$ no lobo frontal, $3,9 \times 10^4$ a $1,32 \times 10^9$ no cerebelo e $7,57 \times 10^4$ a $1,11 \times 10^9$ no hipocampo. As médias para cada segmento do SNC foram de $2,6 \times 10^8$ cópias/ μ l para o lobo frontal, $3,2 \times 10^8$ cópias/ μ l para o hipocampo e $4,7 \times 10^8$ cópias/ μ l para o cerebelo. Apesar de não ter ocorrido diferença estatística significativa ($p > 0,05$), observou-se maior carga viral no cerebelo (Figura 6). Elia e colaboradores (2006) quantificaram a carga viral de um animal em diversas regiões do encéfalo e identificaram maior concentração nos lobos frontal e temporal. Os dois estudos demonstraram que o VCC pode ser encontrado por todo o encéfalo possivelmente pela sua disseminação pelo FCE (Vandeveld e Zurbriggen 2005). O tamanho amostral desse estudo permite concluir com mais segurança o padrão de distribuição entre as três regiões encefálicas estudadas.

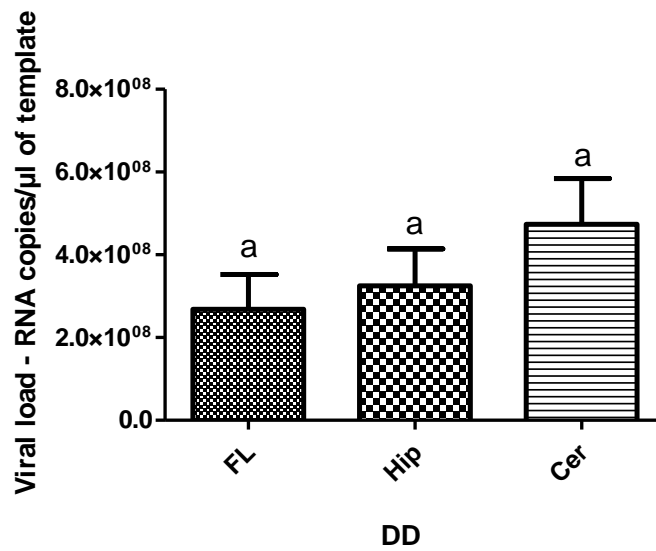


Figura 6 – Mensuração pela PCR em tempo real da carga viral no lobo frontal, hipocampo e cerebelo de cães naturalmente infectados com o vírus da cinomose canina. Comparação da razão dos valores relativos, expressos em médias e erros-padrão entre os segmentos estudados. Valores seguidos de letras distintas diferem estatisticamente entre si ($P < 0,05$).

Quadro 2 – Sinais clínicos neurológicos e sua correlação com a apoptose e carga viral observadas em 21 cães naturalmente infectados pelo vírus da cinomose canina que foram posteriormente submetidos ao exame necroscópico

NE	SINAIS NEUROLÓGICOS									
	AEM	Vocalização	DC	Ataxia	DM	CE	Mioclonia	EPV	HM	DRM
15153	X				X			X		
15513	X				X	X	X	X		X
15519	X				X					
15987	X						X	X		
16205	X					X				
16296	X	X		X	X					
16389	X				X			X	X	
17080					X		X	X	X	
16706	X		X	X	X		X		X	
17097			X	X	X			X		
18668	X		X		X			X		
18678	X		X	X	X			X		
21918						X	X			
21696	X			X					X	
22262										
22759				X	X		X		X	
21641	X									
30806	X			X	X			X		
31336	X		X	X	X		X			
30657	X		X	X	X					
41585	X							X		
	17	1	9	9	16	3	7	10	5	1

NE (Número experimental), AEM (Alteração do estado mental), DC (desvio de cabeça), AC (andar em círculo), DM (déficit motor), CE (crise epiléptica), EPV (estrabismo posicional ventral), HM (hiperpatia medular), DRM (diminuição de reflexo miotático)

Os principais sinais neurológicos observados nos animais submetidos posteriormente à necropsia foram alteração do estado mental e déficit motor que, se associados, geralmente indicam lesão em tronco encefálico (Quadro 2). Não foram observados sinais cerebelares como ataxia cerebelar, tremor de intenção de cabeça e hipermetria. Com isso, apesar do cerebelo ser a região encefálica com maior concentração de carga viral, os principais sinais clínicos neurológicos não remeteram a lesão cerebelar envolvimento cerebelar.

Apesar de criar-se a expectativa de que os sinais neurológicos dependem da distribuição do vírus e da localização das lesões no SNC, não existem estudos que demonstrem essa relação. Koutinas e colaboradores (2002) associaram as manifestações neurológicas à gravidade dos achados histopatológicos, apesar de terem observado distribuição multifocal dessas lesões. Nosso estudo pela primeira vez demonstrou que os sinais neurológicos decorrentes da infecção não estão relacionados à quantidade do vírus em cada uma das regiões neuroanatômicas. O padrão difuso de distribuição do vírus em diversas regiões encefálicas, sem que haja necessariamente manifestação clínica associada, permite sugerir que os sinais neurológicos decorrentes da infecção pelo VCC não estão relacionados apenas com a presença do vírus em determinada região, mas possivelmente com a capacidade desse vírus em gerar lesões neurológicas. Desta forma, acredita-se que a avaliação da correlação entre a quantificação do vírus no encéfalo e o grau de expressão dos fatores apoptóticos será importante para corroborar a ausência de relação entre a quantidade de vírus e os sinais neurológicos manifestados.

Correlação entre a carga viral e a expressão gênica dos fatores apoptóticos

Foi estudada a correlação da carga viral e da expressão gênica dos fatores apoptóticos por PCR em tempo real no lobo frontal, hipocampo e cerebelo de cães naturalmente infectados pelo VCC.

Não houve correlação entre a quantificação viral e a expressão dos fatores apoptóticos considerando-se qualquer região encefálica estudada, indicando que as variáveis são independentes (Tabela 1). Esses dados demonstram pela primeira vez que a carga viral do VCC não interfere na expressão genica dos fatores apoptóticos no SNC de cães infectados. Com isso, a diferença observada na expressão gênica dos fatores apoptóticos entre as diferentes regiões encefálicas não podem ser atribuídas a esse fator. Acredita-se que a identificação e a diferenciação das estirpes virais nessas regiões poderão informar se a virulência das estirpes é o principal fator responsável pelas lesões manifestadas clinicamente e pelo aumento da apoptose.

Tabela 1 – Correlação da quantificação da carga viral do lobo frontal, hipocampo e cerebelo com o grau de apoptose neural dos fatores apoptóticos (Bcl-2, Bax, Caspase-8 e Caspase-3) de acordo com o coeficiente de variação de Pearson de 21 cães naturalmente infectados pelo vírus da cinomose canina.

REGIÃO ENCEFÁLICA QUANTIFICADA	FATOR APOPTÓTICO			
	Bcl-2	Bax	Caspase-8	Caspase-3
Lobo frontal ^a	0,469 ^a (-0,181 a 0,834)	0,024 ^a (-0,614 a 0,644)	0,538 ^a (-0,05 a 0,849)	0,502 ^a (-0,186 a 0,860)
Hipocampo ^b	-0,180 ^b (-0,704 a 0,470)	- 0,297 ^b (-0,729 a 0,303)	-0,358 ^b (-0,825 a 0,401)	0,301 ^b (-0,329 a 0,746)
Cerebelo ^c	-0,072 ^c (-0,620 a 0,523)	0,096 ^c (-0,505 a 0,635)	0,265 ^c (-0,334 a 0,712)	0,400 ^c (-0,262 a 0,806)

Os valores entre parênteses indicam o intervalo de confiança considerando-se a probabilidade do erro tipo I de 0,05
Valores seguidos de letras iguais na mesma linha, não diferem estatisticamente entre si (p>0,05)

CONCLUSÕES

- 1 - Ocorreu apoptose no hipocampo pela ativação das vias intrínsecas e extrínsecas devido ao aumento da expressão gênica de Bax, Caspase-8 e Caspase-3 e no cerebelo pela ativação da via intrínseca, devido ao aumento da expressão gênica de Bax e Caspase-3. Não houve indícios de apoptose no lobo frontal.
- 2 – A presença de *Babesia sp* não interfere nos resultados das expressões gênicas dos fatores apoptóticos nos animais com cinomose canina.
- 3 - O cerebelo é a região encefálica com maior quantidade de carga viral.
- 4 - Os principais sinais clínicos neurológicos observados não são relacionados à carga viral nas regiões encefálicas
- 5 - Não houve correlação, positiva ou negativa, entre a quantidade de vírus e a expressão gênica dos fatores da apoptose no encéfalo de cães naturalmente infectados pelo vírus da cinomose.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

A cinomose canina é uma das principais doenças infecciosas responsável pela morbidade e mortalidade de cães em diversas regiões do mundo. Não existe ainda tratamento específico para a doença, e até por isso, diversas terapias são instituídas sem que haja adequado embasamento científico. Em países endêmicos, como o Brasil, os impactos sócio-econômicos são imensos devido aos altos custos com tratamentos, falhas na imunização vacinal e ao sofrimento dos tutores e dos animais.

O conhecimento das características epidemiológicas em cada região do território brasileiro associado ao estudo da quantificação da carga viral e sua correlação com a expressão gênica de fatores apoptóticos e com os sinais neurológicos auxilia na geração de subsídios que poderão ser utilizados em futuras pesquisas de terapias antivirais *in vivo* e *in vitro* e tratamento de doenças desmielinizantes.

Esse estudo pode ser considerado com uma primeira etapa que demonstrou a ausência de relação entre os sinais neurológicos e morte celular neural com a quantidade de carga viral em três regiões encefálicas distintas. Espera-se que outros estudos possam quantificar a carga viral na região de tronco encefálico, já que os sinais neurológicos observados foram, em sua maioria, relacionados à lesão dessa região, o que poderia contribuir para confirmar os achados desse experimento. Em uma segunda etapa, acredita-se que a identificação e diferenciação das estirpes virais nessas regiões poderão informar se a virulência das estirpes contribui para o aumento da apoptose e para as manifestações clínicas.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ADAMS, J.M.; BROWN, W.J.; SNOW, H.D. et al. Old dog encephalitis and demyelinating diseases in man. *Vet Pathol*, v.12, n.3, p.220-226, 1975.
- ALMEIDA, R.K.; VASCONCELOS, A.C.; CARNEIRO, R.A. et al. Alterações citológicas do sangue periférico e da medula óssea de cães com cinomose. *Arq Bras Med Vet Zootec*, v.61, n.6, p.1255-1260, 2009.
- ALVES, L.; KHOSRAVI, M.; AVILA, M. et al. SLAM- and nectin-4-independent noncytolytic spread of canine distemper virus astrocytes. *J virol*, v.89, n.10, p.5724-5733, 2015.
- AMARAL, H.A. *Deteção do vírus da cinomose pela técnica de RT-PCR em cães com sintomatologia neurológica*. 2007. 72f. Tese (Doutorado em Clínica Médica) - Universidade de São Paulo.
- AMUDE, A.M.; CARVALHO, G.A.; ALFIERI, A.A. et al. Virus isolation and molecular characterization of canine distemper virus from a mature dog with multifocal encephalomyelitis. *Brazilian Journal of Microbiology*, v.38, p.354-356, 2007a.
- AMUDE AM, ALFIERI AA, ALFIERI AF. Clinicopathological findings in dogs with distemper encephalomyelitis presented without characteristic signs of the disease. *Res Vet Sci*.v.82, p.416-422, 2007b.
- AMUDE, A.M.; ALFIERI, A.A.; ALFIERI, A.F. Antemortem diagnosis of CDV infection by RT-PCR in distemper dogs with neurological deficits without the typical clinical presentation. *Vet Res Commun*, v.30, p.679-687, 2006.
- AMUDE, A.M.; ALFIERI, A.A.; ARIAS, M.V.B. et al. Clinical syndromes of nervous distemper in dogs initially presented without conventional evidences of CDV infection, *Semina: Ciência Agrárias*, v.33, n.6, p.2347-2358, 2012.
- AMUDE, A.M.; ALFIERI, A.A.; BALARIN, M.R.S. et al. Cerebrospinal fluid from a 7-month-old dog with seizure-like episodes. *Vet Clin Pathol*, v.35, p.119-122, 2007c.
- AMUDE, A.M.; HEADLEY, S.A.; ALFIERI, A.A. et al. Atypical necrotizing encephalitis associated with systemic canine distemper virus infection in pups. *J Vet Sci*, v.12, n.4, p.409-411, 2011.
- AN, D.J.; KIM, T.Y, SONG, D.S. et al. An immunochromatography assay for rapid antemortem diagnosis of dogs suspected to have canine distemper. *J Virol Methods*, v.147, p.244-249, 2008.
- ANDERSON, D.E.; VON MESSLING, V. Region between the canine distemper virus M and F genes modulates virulence by controlling fusion protein expression. *J Virol*, v.82, p.10510-10518. 2008.
- APPEL, M. Canine distemper virus. In: APPEL, M.J. *Virus infections of vertebrates*. Amsterdam: Elsevier, 1987. v.1, cap.13, p.133-159.

- APPEL, M.J.; SUMMERS, B.A. Pathogenicity of Morbilliviruses for terrestrial carnivores. *Vet Microbiol*, v.44, p.187-191, 1995.
- APPEL, M.J.G. Pathogenesis of canine distemper. *Am.J.Vet.Res*, v.30, p.1167-1182, 1969
- APPEL, M.J.G.; GIBBS, E.P.J.; MARTIN, S.J. et al. Morbillivirus diseases of animals and man. *Comparative diagnosis of viral disease*, v.6, p.235-297, 1981.
- APPEL, M.J.G.; GILLESPIE, J.H. Canine distemper virus. *Virol Monogr.*, v.11, p.1-96, 1972.
- BAUMGÄRTNER, W.; ORVELL, C.; REINACHER, M. Naturally occurring canine distemper virus encephalitis: distribution and expression of viral polypeptides in nervous tissues. *Acta Neuropathol*, v.78, p.504-512, 1989.
- BEINEKE, A.; PUFF, C.; SEEHUSEN, F. et al. Pathogenesis and immunopathology of systemic and nervous canine distemper virus. *Vet Immunol Immunopathol*, v.127, n.1-2, p.1-18, 2009.
- BLAKEMORE, W.F.; SUMMERS, B.A.; APPEL, M.G. Evidence of oligodendrocyte infection and degeneration in canine distemper encephalitis. *Acta Neuropathol*, v. 77, p. 550–553, 1989.
- BLANCOU, J. Dog distemper: imported into Europe from South America? *Hist Med Vet*, v.29, n.2, p.35-41, 2004.
- BRAUND, K. G. Distemper. In: BRAUND, K. G. *Clinical syndromes in veterinary neurology*. 2nd ed. St Louis: Mosby, 1994. p. 115-119.
- BRAZ, G.F. *Padronização e teste da técnica de imunofluorescência direta para o diagnóstico da cinomose canina*. 2009. 43f. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal) - Universidade Federal de Minas Gerais.
- BREAZILE, J.F.; BLAUGH, B.S.; NAIL, N. Experimental study of canine distemper myoclonus. *Am J Vet Res*, v.27, p.1375-1379, 1966.
- BRUNNER, J.M.; PLATTET, P.; MAJCHERCZYK, P. et al. Canine distemper virus infection of primary hippocampal cells induce increase in extracellular glutamate and neurodegeneration. *J Neurochem*, v.103, p.1184-1195, 2007.
- BUDASZEWSKI, R.F., PINTO, L.D., WEBER, M.N., et al. Genotyping of canine distemper virus strains circulating in Brazil from 2008 to 2012. *Virus Res.*, v.180, p.76-83, 2014.
- CALDERON, M.G.; REMORINI, P.; PERIOLO, O. et al. Detection by RT-PCR and genetic characterization of canine distemper vírus from vaccinated and non-vaccinated dogs in Argentina. *Vet Microbiol.*, v.125, p.341-349, 2007.
- CARSILLO, T.; TRAYLOR, Z.; CHOI, C. et al. Hsp72, a host determinant of measles virus neurovirulence. *J Virol*, v.80, n.22, p.11031-11039, 2006.

- CARVALHO, O.V.; SARAIVA, G.L.; FERREIRA, C.G.T. et al. *In vitro* antiviral efficacy of ribavirin and interferon-alpha against canine distemper virus. *Can J Vet Res*, v.78, p.283-289, 2014.
- CHAPPUIS, G. Control of canine distemper. *Vet Microbiol*, v.44, p.351-358, 1995.
- CHAPPUIS, G. La maladie de Carré. *Rec.Méd.Vét*, v.170,p.645-653, 1994.
- CURTI, M.C.; ARIAS, M.V.B.; ZANUTTO, M.S. Avaliação de um *kit* imunoensaio cromatográfico para detecção do antígeno do vírus da cinomose em cães com sinais sistêmicos ou neurológicos da doença. *Semina: Ciências Agrárias*, v.33, n.6, p. 2383-2390, 2012.
- DAL POZZO, F.; GALLIGIONI, V.; VACCARI, F. et al. Antiviral efficacy of EICAR against canine distemper virus (CDV) *in vitro*. *Res Vet Sci*, v.88, p.339-344, 2009.
- DAY, M.J.; HORZINEK, M.C.; SCHULTZ, R.D et al. WSAVA guidelines for the vaccination of dogs and cats. *J Small Anim Pract*, v.51, n.6, p.1-32, 2016.
- DE LAHUNTA, A.; GLASS, E.; KENT, M. *Veterinary Neuroanatomy and Clinical Neurology*, 4ed. St Louis: Saunders Elsevier, 2015. 587p.
- DEBIASI, R.L.; KLEINSCHMIDT-DEMASTERS, B.K.; RICHARDSON-BURNS, S. et al. Central nervous system apoptosis in human herpes simplex virus and cytomegalovirus encephalitis. *J Infect Dis*, v.186, p.1547-1557, 2002.
- DEL PUERTO, H.L.; MARTINS, A.S.; MILSTED, A. et al. Canine distemper vírus induces apoptosis in cervical derived cell lines. *Virology*, n.8, p. 1-7, 2011.
- DEL PUERTO, H.L.; MARTINS, A.S.; MORO, L. et al. Caspase-3/-8/-9, Bax and Bcl-2 expression in the cerebellum, lymph nodes and leukocytes of dogs naturally infected with canine distemper virus. *Genet Mol Res*, v.9, p.151-161, 2010.
- DEZENGRINI, R.; WEIBLEN, R.; FLORES, E.F. Soroprevalência das infecções por parvovírus, adenovírus, coronavírus canino e pelo vírus da cinomose em cães de Santa Maria, Rio Grande do Sul, Brasil. *Ciência Rural*, v.37, n.1, p.183-189, 2007.
- ELIA, G.; BELLOLI, C.; CIRONE, F. et al. *In vitro* efficacy of ribavirin against canine distemper virus. *Antivir Res*, v.77, p.108-113, 2008.
- ELIA, G.; CAMERO, M.; LOSURDO, M. et al. Virological and serological findings in dogs with naturally occurring distemper. *J Virol Methods*, v. 213, p.127-130, 2015.
- ELIA, G.; DECARO, N.; MARTELLA, V. et al. Detection of canine distemper vírus in dogs by real-time RT-PCR. *J Virol Methods*, v.136, p.171-176, 2006.
- ELMORE, S. Apoptosis: a review of programmed cell death. *Toxicol Pathol*, v.35, p.495-516, 2007.

ESPINAL, M.A.; DÍAZ, F.J.; SAENZ-RUIZ, J. Phylogenetic evidence of a new canine distemper virus lineage among domestic dogs in Colombia, South America. *Vet Microbiol*, v.172, p.168-176, 2014.

FARILEY, R.A.; KNESL, O.; PESAVENTO, P.A. et al. Post-vaccinal distemper encephalitis in two border collie cross littermates. *N Z Vet J*, v.63, n.2, p.117-120, 2015.

FAWI, M. T.; TAG EL DIN, M. H.; EL-SANOUSI, S. M. Canine distemper as a predisposing factor for *Nocardia asteroides* infection in the dog. *Vet Rec*, London, v. 88, n. 13, p. 326-328, 1971.

FINUCANE, D.M.; BOSSY-WETZEL, E.; WATERHOUSE, N.J.; COTTER, T.G.; GREEN, D.R. Bax-induced caspase activation and apoptosis via cytochrome c release from mitochondria is inhibitable by Bcl-xL. *J.Biol.Chem*, v.274, n.4, p.2225-2233, 1999.

FRISK, A.L.; KONIG, M.; MORITZ, A. et al. Detection of canine distemper virus nucleoprotein RNA by reverse transcription-PCR using serum, whole blood, and cerebrospinal fluid from dogs with distemper. *J Clin Microbiol*, v.37, p.3643, 1999.

GAMA, F.G.V.; NISHIMORI, C.T.; SOBREIRA, M.R. et al. Caracteres físico-químicos e citológicos do liquor 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 Aerea Mol Biol*, v.40, p.803-806, 1974.

GLAUS, T.; GRIOT, C.; RICHARD, A.; ALTHAUS, U.; HERSCHKOWITZ, N. VANDEVELDE, M. Ultrastructural and biochemical findings in brain cell cultures infected with canine distemper virus. *Acta Neuropathol*, v.80, p.59-67, 1990.

GLEDHILL, A.W. Some veterinary diseases of medical interest. *British Medical*, v.9, n.3, p.237-241, 1953.

GOSSETT, K.A.; MACWILLIAMS, P.S.; FULTON, R.W. Viral inclusions in hematopoietic precursors in a dog with distemper. *J Am Med Assoc*, v.181, p.387-388, 1982.

GOUVEIA, A.M.G.; MAGALHÃES, H.H.; RIBEIRO, A.L. Cinomose canina: ocorrência em animais vacinados e distribuição por faixa etária. *Arq Bras Med Vet Zootec*, v.39, n.4, p.539-545, 1987.

GRABER, H.U.; MÜLLER, C.F.; VANDEVELDE, M. et al. Restricted infection with canine distemper virus leads to down-regulation of myelin gene transcription in cultured oligodendrocytes. *Acta Neuropathol*, v.90, n.3, p.312-318, 1995.

GREENE, C.E; VANDEVELDE, M. Canine distemper. In: GREENE, C.E. Infectious Disease of the Dog and Cat. Saunders Elsevier, 2012, p.25-41.

- GRIOT, C.; BÜRGE, T.; VANDEVELDE, M. et al. Antibody-induced generation of reactive oxygen radicals by brain macrophages in canine distemper encephalitis: a mechanism for bystander demyelination. *Acta Neuropathol*, v.78, p.392-403, 1989.
- GRÖNE, A.; DOHERR, M.G.; ZURBRIGGEN, A. Canine distemper virus infection of canine footpad epidermis. *Vet Dermatol*, v.15, p.159-167, 2004.
- GUO, A.; LU, C.P. Canine distemper virus causes apoptosis of Vero cells. *J Vet Med B*, v.47, p.183-190, 2000.
- HAIG, D.A. Canine distemper-immunization with avianised virus. *Onderstepoort J. Vet. Res*, v.27, p.19-53, 1953.
- HAN, G.Z.; LIU, X.P.; LI, S.S. Cross-species recombination in the haemagglutinin gene of canine distemper virus. *Virus Res*, v.136, p.198-201, 2008.
- HARDER, T.C.; OSTERHAUS, A.D. Canine distemper virus—a morbillivirus in search of a new host. *Trends Microbiol*, v.5, p.120-124, 1997.
- HARTLEY, W.J. A post-vaccinal inclusion body encephalitis in dogs. *Vet Path*, v.11, n.4, p.301-312, 1974.
- HASS, L.; MARTENS, W.; GREISER-WILKE, I. et al. Analysis of the haemagglutinin gene of current wild-type canine distemper virus isolates from Germany, *Virus Res*, v.48, p.165-171, 1997.
- HASS, R.; JOHANN, J.M.; CAETANO, C.F. et al. Níveis de anticorpos contra o vírus da cinomose canina e o parvovírus canino em cães não vacinados e vacinados. *Arq Bras Med Vet Zootec*, v.60, n.1, p.270-274, 2008.
- HEADLEY, S. A.; GRAÇA, D. L.; COSTA, M. M. et al. Canine distemper virus infection with secondary Bordetella bronchiseptica pneumonia in dogs. *Ciência Rural*, v. 29, n. 4, p. 741-743, 1999.
- HEADLEY, S.A.; AMUDE, A.M.; ALFIERI, A.F. et al. Molecular detection of canine distemper virus and the immunohistochemical characterization of the neurologic lesions in naturally occurring old dog encephalitis. *J Vet Diagn Invest*, v.21, n.5, p.588-597, 2009.
- HEADLEY, S.A.; AMUDE, A.M.; ALFIERI, A.F.; et al. Epidemiological features and the neuropathological manifestations of canine distemper virus-induced infections in Brazil: a review. *Semina: Ciências Agrárias*, v.33, n.5, p.1945-1978, 2012.
- HEADLEY, S.A.; GRAÇA, D.L. Canine distemper: Epidemiological findings of 250 cases. *Braz J Res Anim Sci*, v.37, n.2, p.136-140, 2000.
- HIGGINS, R.J.; CHIL, G.; VANDEVELDE, M. Chronic relapsing demyelinating encephalomyelitis associated with persistent spontaneous canine distemper virus infection. *Acta Neuropathol*, v.77, n.4, p.441-444, 1989.

- HIGGINS, R.J.; KRAKOWKA, S.G.; METZLER, A.E. et al. Primary demyelination in experimental canine distemper virus-induced encephalomyelitis in gnotobiotic dogs. *Acta Neuropathol*, v.58, p.1-8, 1982.
- HOWELL, D.G. Immunization of the dog. *Can Vet J*, v.6, n.6, p.127-136, 1965.
- HUSSEY, G.D.; KLEIN, M. A randomized controlled trial of vitamin A in children with severe measles. *N Engl J Med*, v.323, p.160-164, 1990.
- IWATSUKI, K.; MIYASHITA, N.; YOSHIDA, E. et al. Molecular and phylogenetic analyses of the haemagglutinin (H) proteins of field isolates of canine distemper virus from naturally infected dogs. *J. Gen. Virol*, v.78, p.373-380, 1997.
- JOZWIK, A.; FRYMUS, T. Comparison of the immunofluorescence assay with RT-PCR and nested PCR in the diagnosis of canine distemper. *Vet Res Commun*, v. 29, p. 347-359, 2005.
- KAPIL, S.; YEARY, T.J. Canine distemper spillover in domestic dogs from urban wildlife. *Vet Clin Small Anim*, v.41, p.1069-1086, 2011.
- KENNEDY, S.; KUIKEN, T.; JEPSON, P.D. et al. Mass die-off of Caspian seals caused by canine distemper virus, *Emerg Infect Dis*, v.6, p.637-639, 2000.
- KERDILES, Y.M.; CHERIF, B.; MARIE, J.C. et al. Immunomodulatory properties of morbillivirus nucleoproteins. *Viral Immunol*, v.19, n.2, p. 324-334, 2006.
- KIM, D.; JEOUNG, S.Y.; AHN, S.J.; LEE, J.H.; PAK, S.I.; KWON, H.M. Comparison of tissue and fluid samples for the early detection of canine distemper virus in experimentally infected dogs. *J Vet Med Sci*, v.68, 877-879, 2006.
- KOESTNER, A. Animal model of human disease. *Am J Pathol*, v.78, p.361-364, 1975.
- KOUTINAS, A.F.; POLIZOPOULOU, Z.S.; BAUMGAERTNER, W.; et al. Relation of Clinical Signs to Pathological Changes in 19 Cases of Canine Distemper Encephalomyelitis. *J Comp Pathol*, v.126, p. 47-56, 2002.
- KRAKOWKA, S. Canine virus infectivity of various blood fractions for central nervous system vasculature. *J Neuroimmunol*, v.21, p.75-80, 1989.
- KRAKOWKA, S., RINGLER, S. S., LEWIS, M. et al. Immunosuppression by canine distemper virus: modulation of *in vitro* immunoglobulin synthesis, interleukin release and prostaglandin E₂ production. *Vet Immun Immunopath*, v. 15, p. 181-201, 1987b.
- KRAKOWKA, S.; CORK, L.C.; WINKELSTEIN, J.A. et al. Establishment of central nervous system infection by canine distemper virus: breach of the blood-brain barrier and facilitation by antiviral antibody. *Vet Immunol Immunopathol*, v.17, p.471-482, 1987a
- KRAKOWKA, S.; HIGGINS, R.J.; KOESTNER, A. Canine distemper virus: review of structural and functional modulations in lymphoid tissues. *Am J Vet Res*, v.41, p.284-292, 1980.

- KRAKOWKA, S.; KOESTNER, A. Age-related susceptibility to infection with canine distemper virus in gnotobiotic dogs. *J Infect Dis*, v.134, n.6, p.629-632, 1976.
- KUBO, T.; KAGAWA, Y.; TANIYAMA, T., et al. Retrospective serological analysis of spontaneous CDV infection in 192 dogs. *J Vet Med Sci*, v.70, p.475-477, 2008.
- LARIANOV, A.; KRAUSE, A.; MILLER, W. A standard curve based method for relative real time PCR data processing. *BMC bioinformatics*, v.6, p.1-16, 2005.
- LEMP, C.; SPITZBARTH, I.; PUFF, C. et al. New aspects of the pathogenesis of canine distemper leukoencephalitis. *Viruses*, v.6, 2571-2601, 2014.
- LI, W.; GALEY, D.; MATTSON, M.P et al. Molecular and cellular mechanisms of neuronal cell death in HIV dementia. *Neurotox*, v.8, p.119-134, 2005.
- LITSTER, A.L.; PRESSLER, B.; VOLPE, A. et al. Accuracy of a point-of-care ELISA test kit for predicting the presence of protective canine parvovirus and canine distemper virus antibody concentrations in dogs. *Vet J*, v.193, p. 363-366, 2012.
- LIVAK, K.J.; SCHMITTGEN, T.D. Analysis of relative gene expression data using real time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) method. *Methods*, v. 25, p. 402-408, 2001.
- MAJNO, G.; JORIS, I. Apoptosis, oncosis, and necrosis – An overview of cell death. *Am J Pathol*, v.169, n.1, p.3-15, 1995.
- MANGIA, S.H.; MEGID, J.; MARTINHO, A.P.V. et al. Avaliação do perfil líquido de caninos (*Canis lupus familiaris*) naturalmente infectados com o vírus da cinomose antes e após tratamento com ribavirina (Ribaviron C[®]). *R bras Ci Vet*, v.19, n.2, p.61-65, 2012.
- MANGIA, S.H.; MORAES, L.F.; TAKAHIRA, R.K. et al. Efeitos colaterais do uso da ribavirina, prednisona e DMSO em cães naturalmente infectados pelo vírus da cinomose. *Pesq Vet Bras*, v.34, n.5, p.449-454, 2014.
- MARTELLA, V.; BLIXENKRONE-MØLLER, M.; ELIA, G. et al. Lights and shades on an historical vaccine canine distemper virus, the Rockborn strain. *Vaccine*, v.29, p.1222–1227, 2011.
- MARTELLA, V.; BIANCHI, A.; BERTOLETTI, I. et al. Canine distemper epizootic among red foxes, Italy. *Emerg Infect Dis*, v.16, p.2007-2009, 2010.
- MARTELLA, V.; CIRONE, F.; ELIA, G. et al. Heterogeneity within the hemagglutinin genes of canine distemper virus (CDV) strains detected in Italy. *Vet Microbiol*, v.116, p.301–309, 2006.
- MARTELLA, V.; ELIA, G.; LUCENTE, M.S. et al. Genotyping canine distemper virus (CDV) by a hemi-nested multiplex PCR provides a rapid approach for investigation of CDV outbreaks. *Vet Microbiol*, v.16, n.1-2, p.32-42, 2007.

- MARTELLA, V.; ELIA, G.; BUONAVOGLIA, C. Canine Distemper Virus. *Vet Clin Small Anim.*, v.38, p.787-797, 2008.
- MEGID, J.; SOUZA, V.A.F.; TEIXEIRA, C.R. et al. Canine distemper virus in a Crab-eating Fox (*Cerdocyon thous*) in Brazil: case report and phylogentic analyses. *J Wildl Dis*, v.45, n.2, p.527-530, 2009.
- MEGID, J.; TEIXEIRA, C.R.; AMORIN, R.L. et al. First identification of canine distemper virus in Hoary Fox (*Lycalopex vetulus*): pathologic aspects and virus phylogeny. *J Wildl Dis*, v.46, n.1, p.303-305, 2010.
- MOCHIZUKI, M.; HASHIMOTO, M.; HAGIWARA, S. et al. Genotypes of canine distemper virus determined by analysis of the hemagglutinin genes of recent isolates from dogs in Japan. *J Clin Microbiol*, v.37, p.2936–2942, 1999.
- MORETTI, L. D.; UENO, T. E.; RIBEIRO, M. G. et al. Toxoplasmose em cães co-infectados com o vírus da cinomose. *Semina: Ciências Agrárias*, Londrina, v. 23, n. 1, p. 85-91, 2002.
- MORO, L. *Apoptose na patogenia da cinomose canina*. 2001. 192p. Tese (Doutorado em Patologia), Universidade Federal de Minas Gerais.
- MORO, L.; MARTINS, A.S.; ALVES, C. et al. Apoptosis in canine distemper vírus. *Arch Virol.*, v.148, p.153-164, 2003a.
- MORO, L.; MARTINS, A.S.; ALVES, C.M. et al. Apoptosis in the cerebellum of dogs with distemper. *J Vet Med B*, v.50, p.221-225, 2003b.
- MUTINELLI, F.; VANDEVELDE, M.; GRIOT, C. et al. Astrocytic infection in canine distemper virus-induced demyelination. *Acta Neuropathol*, v. 77, p. 333–335, 1989.
- NEGRÃO, F.J.; ALFIERI, A.A.; ALFIERI, A.F. Avaliação da urina e de leucócitos como amostras biológicas para a detecção *ante mortem* do vírus da cinomose canina por RT-PCR em cães naturalmente infectados. *Arq Bras Med Vet Zootec*, v.59, n.1, p.253-257, 2007.
- NESSELER, A.; BAUMGÄRTNER, W.; GAEDKE, K. et al. Abundant expression of viral nucleoprotein mRNA and restricted translation of the corresponding viral protein in inclusion body polyoencephalitis of canine distemper. *J Comp Pathol*, v.116, n.3, p. 291-301, 1997.
- NOYCE, R.S.; DELPEUT, S.; RICHARDSON, C.D. Dog nectin-4 is an epithelial cell receptor for canine distemper virus that facilitates virus entry and syncytia formation. *Virology*, v. 436, p. 210–220, 2013.
- O' BRIEN, D.P. Lead toxicity in a dog. *J Am Anim Hosp Assoc*, v.17, p.845-847, 1981.
- PANZERA, Y.; CALDERÓN, M.G.; SARUTE, N. et al. Evidence of two co-circulating genetic lineages of canine distemper virus in South America. *Virus Res*, v.163, p.401–404, 2012.

- PANZERA, Y.; SARUTE, N.; IRAOLA, G. et al. Molecular phylogeography of canine distemper virus: geographic origin and global spreading. *Mol Phylogenet Evol*, v.92, p.147-154, 2015.
- PLATT, S.; GAROSI, L. *Small Animal Neurological Emergencies*. 1ed. London: Manson Publishing, 2012. 672p.
- PEREIRA, F.B. *Comparação de métodos de diagnóstico para a cinomose canina, com ênfase nas alterações oculares*. 2010. 93p. Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias) – Universidade Federal do Paraná, Curitiba.
- PERKINS, D.; GYURE, K.A.; PEREIRA, E.F. et al. Herpes simplex virus type-1 induced encephalitis has an apoptotic component associated with activation of c-Jun N-terminal kinase. *J.Neurovirol*, v.9, p.101-111, 2003.
- PLATTET, P.; RIVALS, J.P.; ZUBER, B. et al. The fusion protein of wild-type canine distemper virus is a major determinant of persistent infection. *Virology*, v.337, p.312-326, 2005.
- RAW, M.E.; PEARSON, G.H.; BROWN, P.J. et al. Canine distemper infections associated with acute nervous signs in dogs. *Vet Rec*, v.4, p.291-293, 1992.
- RIMA, B.K.; WISHAAPT, R.G.; WELSH, M.J. et al. The evolution of morbillivirus: a comparison of nucleocapsid gene sequences including a porpoise morbillivirus. *Vet Microbiol*, v.44, p.127-134, 1995.
- ROCKBORN, G. Canine distemper virus in tissue culture. *Arch Virol*, v.8, p.485-492, 1958.
- RODEHEFFER, C.; VON MESSLING, V.; MILOT, S. et al. Disease manifestations of canine distemper virus infection in ferrets are modulated by vitamin A status. *J Nutr*, v.137, p.1916-1922, 2007.
- ROELKE-PARKER, M.E.; MUNSON, L.; PACKER, C. et al. A canine distemper virus epidemic in Serengeti lions (*Panthera leo*). *Nature*, v. 379, p. 441–445, 1996.
- RUDD, P. A.; CATTANEO, R.; VON MESSLING, V. Canine distemper virus uses both the anterograde and the hematogenous pathway for neuroinvasion. *J Virol*, v. 80, n. 19, p. 9361-9370, 2006.
- SCHOBEBERGER, M.; ZURBRIGGEN, A.; DOHERR, M.G. et al. Demyelination precedes oligodendrocyte loss in canine distemper virus-induced encephalitis. *Acta Neuropathol*, v.103, n.1, p.11-19, 2002.
- SCHUBERT, T.; CLEMMONS, R.; MILES, S. et al. The use of botulinum toxin for the treatment of generalized myoclonus in a dog. *J Am Anim Hosp Assoc*, v.49, n.2, p.122-127, 2013.
- SEHATA, G.; SATO, H.; ITO, T. et al. Use of quantitative real-time RT-PCR to investigate the correlation between viremia and viral shedding of canine distemper virus, and infection outcomes in experimentally infected dogs. *J Vet Med Sci*, v.77, n.7, p.851-855, 2015

- SHIN, Y.J.; CHO, K.O.; CHO, H.S. et al. Comparison of one-step RT-PCR and a nested PCR for detection of canine distemper virus in clinical samples. *Aust Vet J*, v.82, n.1, p.83-86, 2004.
- SHIN, Y.S.; MORI, T.; OKITA, M et al. Detection of canine distemper virus nucleocapsid protein gene in canine peripheral blood mononuclear cells by RT-PCR. *J Vet Med Sci*, v.57, p.439-445, 1995.
- SI, W.; ZHOU, S.; WANG, Z. et al. A multiplex reverse transcription-nested polymerase chain reaction for detection and differentiation of wild-type and vaccine strains of canine distemper virus. *Virol J*, v.7, p.86-91, 2010.
- SILVA, I. N. G.; GUEDES, M. I. F.; ROCHA, M. F. G. et al. Perfil hematológico e avaliação eletroforética das proteínas séricas de cães com cinomose. *Arq Bras Med Vet Zootec*, v. 57, n. 1, p. 136-139, 2005.
- SILVA, M.C.; FIGHERA, R.A., MAZZANTI, A.; et al. Neuropatologia da cinomose canina: 70 casos (2005-2008). *Pesq Vet Bras*, v.29, n.8, p.643-652, 2009.
- SILVA, M.C.; FIGHERA, R.A.; BRUM, J.S.; et al. Aspectos clinicopatológicos de 620 casos neurológicos de cinomose em cães: Clinicopathological features in 620 neurological cases of canine distemper. *Pesq Vet Bras*, v.27, n.5, p.215-220, 2007.
- SINGETHAN, K.; HILTENSBERGER, G.; KENDL, S. et al. *N*-(3-Cyanophenyl)-2-phenylacetamide, an effective inhibitor of morbillivirus-induced membrane fusion with low cytotoxicity. *J Gen Virol*, v.91, p.2762-2772, 2010.
- SONNE, L.; OLIVEIRA, E.C.; PESCADOR, C.A.; et al. Achados patológicos e imunohistoquímicos em cães infectados naturalmente pelo vírus da cinomose canina. *Pesq Vet Bras*, v.29, n.2, p.143-149, 2009.
- SORRELLS, S.F.; SAPOLSKY, R.M. An inflammatory review of glucocorticoid actions in the CNS, *Brain Beha Immun*, v.21, n.3, p.259-272, 2007.
- STETTLER, M.; BECK, K.; WAGNER, A. et al. Determinants of persistence in canine distemper viruses. *Vet Microbiol*, v.57, p.83-93, 1997.
- SUMMERS, B. A.; CUMMINGS, J. F.; DE LAHUNTA, A. Distemper encephalitis. In: SUMMERS, B. A.; CUMMINGS, J. F.; DE LAHUNTA, A. *Veterinary neuropathology*. St Louis: Mosby, 1995. p. 102-110.
- SUMMERS, B. A.; GREISEN, H. A.; APPEL, M. J. Canine distemper encephalomyelitis: variation with virus strain. *J Comp Pathol*, v. 94, n. 1, p. 65-75, 1984a.
- SUMMERS, B.A.; GREISEN, H.A.; APPEL, M.J.G. CDV and EAE in the dog: comparative patterns of demyelination. *J.Comp.Pathol*, v.94, p.575-589, 1984b.
- SUN, Z.; LI, A.; YE, H. et al. Natural infection with canine distemper virus in hand-feeding Rhesus monkeys in China. *Vet Microbiol*, v.141, p.374-378, 2010.

- TIMM, S.F.; MUNSON, L.; SUMMERS, B.A. et al. A suspected canine distemper epidemic as the cause of a catastrophic decline in Santa Catalina Island foxes (*Urocyon littoralis catalinae*). *J. Wildl. Dis.*, v.45, p.333–343, 2009.
- TIPOLD, A.; JAGGY, A.; ZURBRIGGEN, A. et al. Neurological signs in canine distemper encephalomyelitis –a clinical study, *Eur J Comp Anim Pract*, v.7, p.33-38, 1996.
- TIPOLD, A.; VANDEVELDE, M.; JAGGY, A. Neurologic manifestations of canine distemper virus infection. *J Small Anim Pract*, v. 33, p. 466-470, 1992.
- TUDURY, E.A.; ARIAS, M.V.B.; BRACARENSE, A.P.F.L.; et al. Observações clínicas e laboratoriais em cães com cinomose nervosa. *Ciência rural.*, v.27, n.2, p. 229-235, 1997.
- VANDEVELDE, M.; ZURBRIGGEN, A. Demyelination in canine distemper virus infection: a review. *Acta neuropathol*, v.109, n.1, p.56-68, 2005.
- VANDELVELDE, M.; ZURBRIGEN, A. The neurobiology of canine distemper virus infection. *Veterinary microbiology*, v.44, n.2-4, p.271-280, 1995.
- VANDEVELDE, M.; FANKHAUSER, R.; KRISTENSEN, F. et al. Immunoglobulins in demyelinating lesions in canine distemper encephalitis. An immunohistological study. *Acta Neuropathol*, v. 54, p.31–41, 1981.
- VANDEVELDE, M.; HIGGINS, R.J.; KRISTENSEN, B. et al. Demyelination in experimental canine distemper virus infection: immunological, pathologic, and immunohistological studies. *Acta Neuropathol*, v.56, p.285-293, 1982.
- VANDEVELDE, M.; ZURBRIGGEN, A.; DUMAS, M. et al. Canine distemper virus does not infect oligodendrocytes in vitro. *J Neurol Sci*, v.69, p.133–137, 1985a.
- VANDEVELDE, M.; ZURBRIGGEN, A.; HIGGINS, R.J. et al. Spread and distribution of viral antigen in nervous canine distemper. *Acta Neuropathol*, v.67, p.211–218, 1985.
- VANDEVELDE, M.; ZURBRIGGEN, A.; STECK, A. et al. Studies on the intrathecal humoral immune response in canine distemper encephalitis, *J Neuroimmunol*, v.11, p.41-51, 1986.
- VERHAGEN, A.M.; VOUX, D.L. Molecular mechanisms of apoptosis. *Res Problems Cell Differ*, v. 23, p.10–24, 1999
- VON MESSLING, V.; SVITEK, N.; CATTANEO, R. Receptor (SLAM [CD150]) recognition and the V protein sustain swift lymphocyte-based invasion of mucosal tissue and lymphatic organs by a morbillivirus. *J Virol*, v.80, p.6084-6092, 2006.
- VON MESSLING, V.; ZIMMER, G.; HERRLER, G.; et al. The hemagglutinin of canine distemper virus determines tropism and cytopathogenicity. *J Virol*, v.75, p.6418-6427, 2001.
- WEISS, D.J.; WARDROP, K.J. *Schalm's veterinary hematology*. 6.ed. Iowa: Blackwell Publishing, 2010, 1232p.

WENZLOW, N.; PLATTET, P.; WITTEK, R. et al. Immunohistochemical demonstration of the putative canine distemper virus receptor CD150 in dogs with and without distemper. *Vet Pathol*, v.44, p.943-948, 2007.

WOMA, T.Y.; VAN VUUREN, M.; BOSMAN, A.M. et al. Phylogenetic analysis of the haemagglutinin gene of current wild-type canine distemper viruses from South Africa: lineage Africa. *Vet Microbiol*, v.143, p.126–132, 2010.

WRIGHT, N.G.; CORNWELL, H.J.; THOMPSON, H. et al. Canine distemper: current concepts in laboratory and clinical diagnosis. *Vet Rec*, v.94, n.5, p.86-92, 1974.

WU, J.Z.; LARSON, G.; WALKER, H. et al. Phosphorylation of ribavirin and viramidine by adenosine kinase and cytosolic 5'-Nucleotidase II: implications for ribavirin metabolism in erythrocytes. *Antimicrob Agents Chemother*, v.49, p.2164-2171, 2005.

WYSS-FLUEHMANN, G.; ZURBRIGGEN, A.; VANDEVELDE, M. et al. Canine distemper virus persistence in demyelinating encephalitis by swift intracellular cell-to-cell spread in astrocytes is controlled by the viral attachment protein. *Acta Neuropathol*, v.119, p. 617–630, 2010.

YOSHIKAWA, Y.; OCHIKUBO, F.; MATSUBARA, Y. et al. Natural infection with canine distemper virus in a Japanese monkey (*Macaca fuscata*). *Vet Microbiol*, v.20, p.193-205, 1989.

YUAN, J.; YANKNER, B.A. Apoptosis in the nervous system. *Nature*, v. 407, p.802-809, 2000.

ZURBRIGGEN, A.; GRABER, H.U.; WAGNER, A. et al. Canine distemper virus persistence in the nervous system is associated with non-cytolytic selective virus spread. *J Virol.*, v.69, n.3, p.1678-1686, 1995.

ZURBRIGGEN, A.; SCHMID, I.; GRABER, H.U. et al. Oligodendroglial pathology in canine distemper. *Acta Neuropathol*, v.95, n.1, p.71-77, 1998.

ZURBRIGGEN, A.; VANDEVELDE, M.; DUMAS, M. et al. Oligodendroglial pathology in canine distemper virus infection in vitro. *Acta Neuropathol*, v. 74, p.366–373, 1987.

ZURBRIGGEN, A.; YAMAWAKI, M. Restricted canine distemper virus infection of oligodendrocytes. *Lab Invest*, v.68, p.277-284, 1993.

ANEXOS

ANEXO 1 – CERTIFICADO DA COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA/UFMG)

	<p>UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS</p> <p>CEUA</p> <p>COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS</p>
<p>CERTIFICADO</p> <p>Certificamos que o Protocolo nº. 32 / 2013, relativo ao projeto intitulado "ASPECTOS CLÍNICO-NEUROLÓGICOS DA CINOMOSE CANINA: DIFERENCIAÇÃO DE ESTIRPES E CORRELAÇÃO COM TROPISMO TECIDUAL E APOPTOSE NEURAL", que tem como responsável Eliane Gonçalves de Melo, está de acordo com os Princípios Éticos da Experimentação Animal, adotados pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA/UFMG), tendo sido aprovado na reunião de 12/08/2014. Este certificado expira-se em 12/08/2019.</p>	
<p>CERTIFICATE</p> <p>We hereby certify that the Protocol nº. 32 / 2013, related to the Project entitled "CLINICAL NEUROLOGICAL ASPECTS OF CANINE DISTEMPER VIRUS: STRAINS DIFFERENTIATION AND NEURONAL APOPTOSIS AND CELL TROPISM CORRELATION ", under the supervision of Eliane Gonçalves de Melo, is in agreement with the Ethical Principles in Animal Experimentation, adopted by the Ethics Committee in Animal Experimentation (CEUA/UFMG), and was approved in 12/08/2014. This certificate expires in 12/08/2019.</p>	
<p>Jacqueline Isaura Alvarez Leite Coordenador(a) da CEUA/UFMG Belo Horizonte, 12/08/2014.</p>	
<p>Atenciosamente.</p>	
<p>Sistema CEUA-UFMG https://www.ufmg.br/bioetica/cetea/ceua/</p>	
<p>Universidade Federal de Minas Gerais Avenida Antônio Carlos, 6627 – Campus Pampulha Unidade Administrativa II – 2º Andar, Sala 2005 31270-901 – Belo Horizonte, MG – Brasil Telefone: (31) 3499-4516 – Fax: (31) 3499-4592 www.ufmg.br/bioetica/cetea - cetea@prpq.ufmg.br</p>	

**ANEXO 2 – FICHA CLÍNICA UTILIZADA PARA PREENCHER OS DADOS DOS ANIMAIS COM
CINOMOSE**

FICHA CLÍNICA VETERINÁRIA

IDENTIFICAÇÃO DO ANIMAL

NOME:	FICHA:	PESO:
IDADE:	RAÇA:	ESPECIE:
SEXO:	PROPRIETARIO:	TEL:
VACINAÇÃO:		DESVERMINAÇÃO:

HISTÓRICO:

PARÂMETROS VITAIS

T°C RETAL:	FC:
FR:	PULSO:

ESTADO FÍSICO GERAL:

- Estado Geral	_____
- Mucosas	_____
- Linfonodos	_____
- TPC	_____
- Outros	_____

CAVIDADE ORAL, OLHOS, OUVIDO, CAVIDADE NASAL:

--

--

SISTEMA GENITAL EXTERNO:

SISTEMA DERMATO-CUTÂNEO:

CAVIDADE TORACICA:

CAVIDADE ABDOMINAL:

SISTEMA MUSCULO-ESQUELÉTICO:

SISTEMA NERVOSO: VIDE FICHA NEUROLOGICA

EXAMES COMPLEMENTARES:

DIAGNOSTICO PROVAVEL:

PROGNÓSTICO:

TRATAMENTO:

ANEXO 3 – FICHA NEUROLÓGICA UTILIZADA PARA PREENCHER OS DADOS DOS ANIMAIS COM CINOMOSE

PROJETO DOUTORADO – BERNARDO DE CARO MARTINS

ASPECTOS CLÍNICO-NEUROLÓGICOS DA CINOMOSE CANINA: DIFERENCIAÇÃO DE ESTIRPES E CORRELAÇÃO COM TROPISMO TECIDUAL E APOPTOSE NEURAL

Nome:

Ficha Clínica:

Data __/__/__

EXAME NEUROLÓGICO

HISTÓRICO Ver ficha clínica	EXAME FÍSICO Ver ficha clínica
OBSERVAÇÃO Estado Mental (ex alerta, deprimido, estupor, coma)	
Postura (ex. normal, paraparesia, hemiparesia, tetraparesia, cabeça inclinada, tremor)	
Marcha (ex. ataxia, andar em círculos, dismetria)	Ambulatório Sim Não

REAÇÕES POSTURAIS		
Esquerda		Direita
	<u>Saltitamento</u> Torácico Pélvico	
	<u>Propriocepção</u> Torácico Pélvico	
	Carrinho de mão	
	Hemicaminhada	
	Impulso postural extensor	

OLHOS		
Esquerda		Direita
	Síndrome de Horner	
	Exame de fundo de olho	



NERVOS CRANIANOS						
Esquerda			TESTE (INERVAÇÃO)	Direita		
			Resposta à ameaça			
			Visão			
P	M	G	Tamanho pupilar	P	M	G
			<u>Reflexo pupilar à luz</u> Direto Consensual			
			Estrabismo patológico			
			Estrabismo posicional			
			Nistagmo fisiológico			
			Nistagmo patológico			
			Nistagmo posicional			
			Sensibilidade facial			
			Tônus mandibular			
			Massa do músculo temporal			
			Massa do músculo masseter			
			Reflexo corneano			
			Simetria facial			
			<u>Reflexo palpebral</u> Canto lateral Canto medial			
			Audição (bater palmas)			
			Reflexo de ânsia e deglutição			
			Língua			

PROJETO DOUTORADO – BERNARDO DE CARO MARTINS

PALPAÇÃO MUSCULAR (Membros)					
Esquerda			Direito		
TÔNUS					
I	M	D	HIPOTROFIA	I	M D

PALPAÇÃO MUSCULAR (ex. pescoço, tronco)	
CARACTERÍSTICA (ex. hipotrofia, aumento de volume)	
LOCAL:	GRAU: I M D

HIPERESTESIA ESPINHAL	
LOCAL:	GRAU: I M D

PERCEPÇÃO DE DOR		
Esquerda		Direito
	<u>Superficial</u> Torácico Pélvico	
	<u>Profunda</u> Torácico Pélvico	
	Cauda	

REFLEXOS ESPINHAIS		
Esquerda	Reflexo (nervo) (segmento da medula espinhal)	Direito
	Retirada Torácico	
	Bíceps	
	Tríceps	
	Extensor radial do carpo	
	Patelar	
	Tibial cranial	
	Gastrocnêmio	
	Retirada Pélvico	
	Perineal	

FUNÇÃO URINÁRIA		
Micção voluntária	S	N
Tentativas de micção	S	N
Distensão de bexiga	S	N
Urina residual	S	N
Expressão da bexiga (fácil, possível, difícil)		

LOCALIZAÇÃO DA LESÃO	
SISTEMA NERVOSO CENTRAL	SISTEMA NERVOSO PERIFÉRICO
<u>ENCÉFALO</u> - Prosencéfalo - Tronco encefálico - Vestibular Central - Cerebelo <u>MEDULA ESPINHAL</u> - C1-C5 - C6-T2 - T3-L3 - L4-S3 (L4-L6/L6-S3)	<u>NERVO</u> - Local - Generalizado <u>JUNÇÃO NEUROMUSCULAR</u> - Pré-sináptico - Pós-sináptico - Enzimático <u>MÚSCULO</u> <u>VESTIBULAR PERIFÉRICO</u>
SISTEMA NERVOSO MULTIFOCAL	

DIAGNÓSTICO PROVÁVEL: _____

EXAMES COMPLEMENTARES: _____

PROGNÓSTICO: _____

TRATAMENTO: _____

(Ausente 0; Reduzido +1; Normal +2; Aumentado +3; Clônus +4)

Doutorando Bernardo De Caro Martins
 Profa. Eliane Gonçalves de Melo
 Prof. Marcos Bryan Heinemann
 Prof. Rubens Antônio Carneiro

 Médico Veterinário