

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE VETERINÁRIA
DISCIPLINA DE METODOLOGIA APLICADA A CONCLUSÃO DE CURSO**

**CARACTERIZAÇÃO PATOLÓGICA E IMUNO-HISTOQUÍMICA DE CINMOSE
EM GRAXAINS**

Mônica Slaviero

PORTO ALEGRE

2016/1

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE VETERINÁRIA
DISCIPLINA DE METODOLOGIA APLICADA A CONCLUSÃO DE CURSO**

Caracterização patológica e imuno-histoquímica de cinomose em graxains

Autor: Mônica Slaviero

**Monografia apresentada à
Faculdade de Veterinária como
requisito parcial para obtenção
da Graduação em Medicina
Veterinária**

Orientador (a): Luciana Sonne

PORTO ALEGRE

2016/1

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente à minha orientadora, Luciana Sonne, pela confiança e oportunidade de realização desse trabalho, por todas as correções, por toda ajuda e também pela aprendizagem oferecida durante meu período de estágio no SPV.

Aos meus colegas da patologia, em especial à Luiza, por compartilhar comigo todas as horas de desespero, de correria, de prazos, mas também de congressos, risadas, alegrias e por demonstrar ser uma companheira e uma amiga muito especial.

Às minhas amigas e colegas Jacque e Ju, pela amizade desde o começo dessa jornada, pelas risadas na aula, pelos mates, pelos lanches, pelos estudos milagrosos pré-provas, com certeza as aulas foram melhores na presença delas.

Às amigas Luiza Terra, Bruna e Grazi, que desde o primeiro ano de faculdade estiveram ao meu lado e que, mesmo deixando de ser colegas, continuaram a fazer parte da minha vida. Com certeza, junto da Ju e da Jacque, vocês foram responsáveis por fazer esses anos mais felizes.

À minha irmã, por toda a ajuda oferecida durante esses anos, por sempre acreditar em mim e por sempre me aturar nos momentos difíceis.

E claro, aos meus pais, Inês e Omar, por terem aberto mão de muitas coisas para que esse sonho se tornasse possível, por sempre apoiarem as minhas escolhas, por todo o incentivo recebido durante esse longo caminho da graduação e por sempre acreditarem em mim.

RESUMO

A cinomose é uma doença viral de ampla distribuição e que pode acometer inúmeras espécies da ordem Carnívora. Possui apresentação multissistêmica e frequentemente acomete o sistema nervoso central, causando encefalite. O graxaim-do-mato (*Cerdocyon thous*) e o graxaim-do-campo (*Lycalopex gymnocercus*) são canídeos amplamente encontrados no Rio Grande do Sul e que possuem grande susceptibilidade à doença. Através de um estudo retrospectivo de 2013 a 2015 e prospectivo até maio de 2016 caracterizou-se os achados patológicos de graxains infectados naturalmente pelo vírus da cinomose, diagnosticados pelo Setor de Patologia Veterinária da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (SPV-UFRGS). Para a identificação do antígeno viral realizou-se a técnica imuno-histoquímica pelo método estreptavidina-biotina ligada à fosfatase. Durante o período foram realizadas no SPV-UFRGS 16 necropsias de *C. thous* e duas necropsias de *L. gymnocercus*. Destas, em quatro casos estabeleceu-se o diagnóstico de cinomose por meio de exame histopatológico. Dados referentes à espécie, sexo, idade aproximada e sinais clínicos foram coletados e analisados. Três animais pertenciam à espécie *C. thous* e um *L. gymnocercus*. Os graxains jovens foram mais acometidos e não houve diferença entre sexos. Os sinais clínicos relatados foram predominantemente neurológicos e correspondiam à mioclonia, paresia, opistótono e nistagmo. Os principais achados macroscópicos foram secreção ocular, pulmões não colabados e avermelhados e linfonodos mesentéricos aumentados. Histologicamente a principal lesão encontrada foi desmielinização em cerebelo, caracterizada por vacuolização em substância branca, além de áreas de malacia associadas a grande quantidade de macrófagos espumosos (células de Gitter), astrócitos gemistocíticos e ocasionais corpúsculos de inclusão intranucleares e intracitoplasmáticos eosinofílicos em astrócitos. Nos testes imuno-histoquímicos evidenciou-se marcação positiva para cinomose em cortes de cerebelo, principalmente em astrócitos, células da micróglia e neurônios. O teste imuno-histoquímico mostrou-se um método eficiente para a detecção do antígeno viral em amostras conservadas em parafina.

Palavras-Chave: cinomose, encefalite, *Cerdocyon thous*, *Lycalopex gymnocercus*, histopatologia, imuno-histoquímica

ABSTRACT

Distemper is a viral disease of wide distribution and can infect many species of the Carnivora order. It has multi system presentation and frequently infect the central nervous system, causing encephalitis. The crab-eating fox (*Cerdocyon thous*) and the pampas fox (*Lycalopex gymnocercus*) are canids widely found in Rio Grande do Sul and that have high susceptibility to the disease. Through a retrospective study from 2013 to 2015 and prospective until May 2016, were analyzed the pathological findings of crab-eating foxes and pampas fox naturally infected by the distemper virus diagnosed by the Veterinary Pathology Sector of the Federal University of Rio Grande do Sul (SPV-UFRGS). To identify the viral antigen, it was performed the immunohistochemistry technique with the streptavidin-biotin method linked to phosphatase. Within the period 16 necropsies of *C. thous* were conducted at SPV-UFRGS and two necropsies of *L. gymnocercus*. Of these, in four cases it was established the diagnosis of distemper by histopathology exam. Data regarding the species, gender, approximate age and clinical signs were collected and analyzed. Three animals belonged to the *C. thous* species and one *L. gymnocercus*. Young crab-eating foxes were most affected and there was no difference between gender. The reported clinical signs were predominantly neurological and corresponded to myoclonus, paresis, opisthotonos and nystagmus. The main macroscopic findings were eye secretion, lungs not collapsed and reddish and enlarged mesenteric lymphnodes. Histologically the main lesion found was demyelination in cerebellum, featured by white matter vacuolization, beyond malacic areas associated with large amount of gitter cells, gemistocytic astrocytes and occasional intranuclear inclusion bodies and intracytoplasmic eosinophilic in astrocytes. In immunohistochemistry exam it was evidenced positive staining for distemper in cerebellar cuts, mainly in astrocytes, microglia cells, and neurons. The immunohistochemistry exam proved to be an efficient method for the detection of the viral antigen in samples preserved in paraffin.

Keyword: distemper, encephalitis, *Cerdocyon thous*, *Lycalopex gymnocercus*, histopathology, immunohistochemistry

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Frequência de espécie, idade, sexo e procedência dos graxains diagnosticados com cinomose pelo Setor de Patologia Veterinária - Universidade Federal do Rio Grande do Sul (SPV-UFRGS).....	21
---	----

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1. Infecção pelo vírus da cinomose em graxains:** cerebelo, áreas de vacuolização. HE, obj. 4x.....23
- Figura 2. Infecção pelo vírus da cinomose em graxains:** cerebelo, malacia associada a grande quantidade de macrófagos espumosos (células de Gitter). HE, obj. 20x24
- Figura 3. Infecção pelo vírus da cinomose em graxains:** cerebelo, manguitos perivasculares linfoplasmocitários. HE, obj. 40x.....24
- Figura 4. Infecção pelo vírus da cinomose em graxains:** cerebelo, corpúsculo de inclusão intranuclear em astrócito. HE, obj. 40x25
- Figura 5. Infecção pelo vírus da cinomose em graxains:** cerebelo, marcação positiva do antígeno viral. Imuno-histoquímica anti-cinomose. Cromógeno Permanent Red, obj. 10x26
- Figura 6. Infecção pelo vírus da cinomose em graxains:** cerebelo, marcação do antígeno viral evidenciada no citoplasma de astrócitos. Imuno-histoquímica anti-cinomose. Cromógeno Permanent Red, obj. 20x26
- Figura 7. Infecção pelo vírus da cinomose em graxains:** cerebelo, corpúsculo intranuclear em astrócitos e citoplasma de astrócitos com marcação positiva do antígeno. Imuno-histoquímica anti-cinomose. Cromógeno Permanent Red, obj. 40x27

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	9
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	10
2.1 Cinomose	10
2.1.1 Etiologia	10
2.1.2 Epidemiologia	11
2.1.3 Patogênese	12
2.1.4 Sinais Clínicos	13
2.1.5 Achados Patológicos	14
2.1.6 Diagnóstico	16
2.1.7 Tratamento e Controle	18
3 MATERIAL E MÉTODOS	19
3.1 Procedimentos Gerais	19
3.2 Necropsias e Análises Histopatológicas	19
3.3 Técnica de Imuno-histoquímica	19
4 RESULTADOS	21
4.1 Gerais	21
4.2 Macroscopia	22
4.3 Microscopia	22
4.4 Imuno-histoquímica	25
5 DISCUSSÃO	27
6 CONCLUSÕES	31
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	32

1 INTRODUÇÃO

A cinomose canina é uma doença viral de distribuição mundial que acomete inúmeras espécies da ordem Carnivora, sendo os canídeos muito importantes na epidemiologia da doença (APPEL; SUMMERS, 1995; GOMES, 2007). O graxaim-do-mato (*Cerdocyon thous*) e o graxaim-do-campo (*Lycalopex gymnocercus*) são canídeos amplamente encontrados no Rio Grande do Sul e que possuem grande susceptibilidade à doença (JORGE; JORGE, 2014). A importância da cinomose se deve principalmente ao fato de possuir uma apresentação multissistêmica, muitas vezes com acometimento do sistema nervoso central, e poder acarretar altas taxas de mortalidade, constituindo uma ameaça à conservação dessas espécies (ACOSTA-JAMETT, 2011).

O contato entre canídeos domésticos e selvagens em habitats urbanos e periurbanos aumenta a probabilidade de transmissão de doenças entre ambos, dentre elas a cinomose (FRÖLICH *et al.*, 2000). A cinomose caracteriza-se por atingir principalmente os sistemas respiratório, gastrointestinal e nervoso central, podendo ter uma evolução aguda ou subaguda (APPEL; SUMMERS, 1995). O contágio ocorre por meio de aerossóis, contato direto ou fômites (APPEL; SUMMERS, 1995; ARNS *et al.*, 2012). O vírus atinge inicialmente o trato respiratório superior, onde é encontrado em macrófagos dos linfonodos brônquicos e tonsilas no primeiro dia de infecção (APPEL, 1969).

O diagnóstico da infecção é realizado através dos sinais clínicos, achados macroscópicos e histopatológicos. Também, técnicas como isolamento viral, imunofluorescência direta (IFD), reação de polimerase em cadeia (PCR) e imuno-histoquímica (IHQ) são amplamente utilizadas no diagnóstico complementar da cinomose (APPEL; SUMMERS, 1995).

O objetivo deste trabalho foi caracterizar os achados macroscópicos, histopatológicos e imuno-histoquímicos da infecção natural por cinomose em *C. thous* e *L. gymnocercus* necropsiados pelo Setor de Patologia Veterinária da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (SPV-UFRGS).

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Cinomose

A cinomose é uma doença viral aguda ou subaguda, de distribuição mundial, altamente contagiosa em canídeos selvagens e domésticos, e que pode afetar o sistema respiratório, gastrointestinal, tegumentar e sistema nervoso central (SNC) (APPEL; SUMMERS, 1995; DEEM, 2000). A mortalidade decorrente de infecção por cinomose em canídeos selvagens relatada por diversos estudos (DAVIDSON *et al.*, 1992; CREEL; CREEL, 1998; MCINNES *et al.*, 1992) permite classificá-la como uma das mais preocupantes enfermidades para a conservação das populações de vida livre e de cativeiro. A susceptibilidade é bastante variável entre as diferentes espécies (JORGE; JORGE, 2014).

O vírus da cinomose possui uma ampla variedade de hospedeiros. Além dos canídeos, também pode acometer espécies das Famílias Ailuridae (panda vermelho), Mustelidae (furão, vison), Hyaenidae (hiena), Procyonidae (quati, panda), Ursidae (urso), Viveridae (mangusto) e Felidae (felinos selvagens incluindo leões, tigres e leopardos), além da ordem Pinnipedia (foca, leão-marinho) (WILLIAMS, 1988; DAVIDSON *et al.*, 1992; APPEL; SUMMERS, 1995; ROELKE-PARKER *et al.*, 1996; DEEM *et al.*, 2000; VAN DE BILDT *et al.*, 2002; ARNS *et al.*, 2012), o que acaba por dificultar o controle desse vírus (ARNS *et al.*, 2012).

2.1.1 Etiologia

O vírus da cinomose é formado por uma fita simples de RNA (QUINN *et al.*, 2005; GREENE; VANDEVELDE, 2012). Foi isolado primeiramente por Carré em 1905 e atualmente pertence à família Paramyxoviridae e ao gênero *Morbillivirus* (APPEL; SUMMERS, 1995). Outros morbilivírus incluem o vírus do sarampo, o vírus da peste bovina, vírus da peste dos pequenos ruminantes, vírus do sarampo das focas, morbilivírus equino e morbilivírus do golfinho e do boto (SWANGO, 1997; DEEM, 2000; ZACHARY, 2009).

Paramixovírus caracterizam-se por infectar aves e mamíferos. Após transmissão por contato direto, ocorre a replicação primária no trato respiratório superior (QUINN *et al.*, 2005). A infecção por esses vírus é citolítica e há fusão entre células com formação de sincícios (MARTELLA; ELIA; BUONAVOGLIA, 2008). A replicação ocorre no citoplasma da célula, porém pode ter formação tanto de inclusões acidófilas intracitoplasmáticas quanto nucleares (ARNS *et al.*, 2012).

As partículas virais do vírus da cinomose canina variam quanto ao tamanho e à forma, mas usualmente são esféricas e têm tamanho entre 150 e 250 nm (SWANGO, 1997; GREENE; VANDEVELDE, 2012). O nucleocapsídeo viral possui simetria helicoidal, envoltório de lipoproteína (5 a 8 nm de espessura) e espículas de 9 a 13 nm de comprimento (ZEE, 2003). O capsídeo viral é composto por seis polipeptídios principais, sendo o polipeptídeo H uma proteína de ligação responsável pela adsorção do vírus a sítios de receptores de células susceptíveis e o glicopeptídeo F, uma proteína responsável pela fusão de células infectadas pelo vírus (ZEE, 2003; GREENE; VANDEVELDE, 2012).

O vírus da cinomose possui caráter pantrópico, havendo uma maior afinidade pelos tecidos linfoides e epiteliais (pulmão, trato gastrointestinal, trato urinário e pele), SNC e olho (QUINN *et al.*, 2005; ZACHARY, 2009).

O vírus possui apenas um tipo antigênico, mas há cepas com diferentes patogenidades (ZEE, 2003; GREENE; VANDEVELDE, 2012). Algumas cepas do vírus são levemente virulentas e comumente causam infecções inaparentes, enquanto outras causam doença aguda com elevada frequência de encefalite e mortalidade. Outras causam doença debilitante com mortalidade elevada, mas sem encefalite. Porém, todas as linhagens terão efeitos imunodepressivos (SWANGO, 1997).

O vírus da cinomose é sensível ao calor, à dessecação, aos solventes lipídicos, aos detergentes não iônicos e aos desinfetantes (SWANGO, 1997; QUINN *et al.*, 2005). É inativado por luz natural, luz ultravioleta e aquecimento a 60°C por 30 minutos. Pode sobreviver em tecidos por 48 h a 25°C e por 14 dias a 5°C (ZEE, 2003). Procedimentos rotineiros de limpeza e desinfecção nas superfícies e objetos de clínicas veterinárias são eficazes na destruição do vírus (SWANGO, 1997). O vírus sobrevive por meses em ambientes com temperaturas mais baixas (ARNS *et al.*, 2012).

2.1.2 Epidemiologia

A infecção pelo vírus da cinomose é enzoótica no mundo inteiro, com maior frequência em cães jovens não vacinados (ARNS *et al.*, 2012). No Brasil, apesar da ampla gama de hospedeiros, os cães domésticos atuam como os principais reservatórios do vírus da cinomose e atuam como uma importante fonte de transmissão para os animais selvagens de vida livre, principalmente em áreas periurbanas onde não há vacinação dos cães (DEEM, 2000; ZEE, 2003; MEGID *et al.*, 2009; GREENE; VANDEVELDE, 2012).

O contágio do vírus ocorre principalmente por meio de aerossóis a partir de exsudato do trato respiratório (APPEL; SUMMERS, 1995; DEEM, 2000; GOMES, 2007; ZACHARY, 2009), mas também ocorre por gotículas infectantes provenientes de secreções dos animais infectados, inclusive urina (SWANGO, 1997; ARNS *et al.*, 2012; GREENE; VANDEVELDE, 2012). Embora geralmente o vírus não resista muito no ambiente, ele pode sobreviver mais em baixas temperaturas e pode ser transmitido por contato direto ou por fômites (DEEM, 2000). A transmissão transplacentária já foi relatada em cães domésticos, entretanto em espécies selvagens a epidemiologia da transmissão vertical ainda é desconhecida (DEEM, 2000).

O período de incubação pode variar de uma até quatro semanas, ou mais (MARTELLA; ELIA; BUONAVOGLIA, 2008). Após a infecção os animais excretam o vírus nos fluídos corporais, especialmente secreções respiratórias, secreções lacrimais, fezes e urina por períodos prolongados, mesmo na ausência de sinais clínicos (APPEL; SUMMERS, 1995; DEEM, 2000; ARNS *et al.*, 2012). Nos cães domésticos, 25 a 75% dos infectados são assintomáticos, mas eliminam o vírus regularmente por períodos variáveis. Entretanto, para as espécies selvagens, esse dado é desconhecido (GOMES, 2007).

O vírus da cinomose afeta animais de todas as idades, mas filhotes são mais susceptíveis quando os anticorpos maternos declinam (APPEL; SUMMERS, 1995), o que ocorre normalmente entre três e seis meses de idade. São os animais susceptíveis que são responsáveis por manter o vírus nas populações (GREENE; VANDEVELDE, 2012).

Animais que se recuperam completamente da infecção pelo vírus da cinomose se tornam imunes por anos e provavelmente para vida toda. Esses animais não excretam vírus e não se tornam persistentemente infectados (APPEL; SUMMERS, 1995).

2.1.3 Patogênese

A patogênese pelo vírus da cinomose em animais domésticos já está muito bem determinada, e ocorre de forma muito similar em espécies selvagens (DEEM, 2000).

Na infecção natural pelo vírus da cinomose, o vírus penetra no epitélio do trato respiratório superior por meio de aerossóis (GREENE; VANDEVELDE, 2012). Aproximadamente 24 horas após a entrada do vírus, ocorre infecção dos macrófagos e o vírus se espalha via linfática até tonsilas, linfonodos retrofaríngeos e linfonodos bronquiais (DEEM, 2000; QUINN, 2005). A replicação do vírus ocorre nas tonsilas e nos linfonodos

bronquiais dois a quatro dias pós-infecção. Em aproximadamente quatro a seis dias o vírus replica em folículos linfoides do baço, linfonodos mesentéricos, células de Kupffer no fígado, lâmina própria do estômago e intestino delgado (DEEM, 2000; GREENE; VANDEVELDE, 2012). A replicação viral em tecidos linfoides leva à leucopenia, resultando em imunodepressão e permitindo o desenvolvimento de viremia secundária (QUINN, 2005). A leucopenia é inicialmente uma linfopenia, originada pelo dano do vírus aos linfócitos, afetando tanto linfócitos T como B (GREENE; VANDEVELDE, 2012). A disseminação ocorre então via sanguínea dentro de oito a nove dias pós-infecção (DEEM, 2000). A extensão da disseminação a tecidos e órgãos é determinada pela rapidez e pela efetividade da resposta imunológica. Se o animal desenvolve uma imunidade satisfatória, há completa recuperação da infecção (MARTELLA; ELIA; BUONAVOGLIA, 2008). Na ausência de uma resposta efetiva, ocorre disseminação e replicação do vírus no sistema respiratório, gastrointestinal, urinário, além de SNC e pele (QUINN *et al.*, 2005).

Aproximadamente uma semana após a entrada do vírus nas vias aéreas superiores, inicia-se o processo de encefalomielite da cinomose. O vírus dissemina-se para as substâncias branca e cinzenta do SNC e para células epiteliais e macrófagos do plexo coroide pelo tráfego leucocítico, disseminando-se também para o fluido cérebro-espinhal, o qual se espalha localmente infectando astrócitos e micróglia (ZACHARY, 2009).

2.1.4 Sinais Clínicos

Os sinais clínicos em animais infectados pelo vírus da cinomose podem sofrer grande variação, dependendo da espécie, idade, cepa viral, condições ambientais e estados geral e imunológico do hospedeiro (DEEM, 2000; QUINN *et al.*, 2005; GOMES, 2007; FERREYRA *et al.*, 2009).

Canídeos selvagens possuem susceptibilidade variável ao vírus da cinomose canina, mas apresentam sinais clínicos muito semelhantes aos descritos nos animais domésticos (DEEM, 2000).

Na fase aguda os sinais clínicos estão relacionados principalmente à afecção nos sistemas respiratório e gastrointestinal e incluem tosse, diarreia, vômito, anorexia, perda de peso e severa desidratação (SWANGO, 1997; DEEM, 2000; LÓPEZ, 2009). Também podem ser observados corrimentos oculonasais mucopurulentos e pneumonia decorrente de infecção bacteriana secundária (SWANGO, 1997). Ocorre uma resposta pirética bifásica à infecção,

embora a elevação inicial da temperatura possa não ser observada (SWANGO, 1997; QUINN *et al.*, 2005). Poderá ocorrer exantema cutâneo com formação de pústulas, principalmente em região abdominal, além de hiperqueratose dos coxins (SWANGO, 1997; GREENE; VANDEVELDE, 2012). Manifestações oculares como conjuntivite, coriorretinite, lesões do nervo óptico e ceratoconjuntivite seca podem estar presentes, sendo que esta última pode resultar em úlcera e perfuração da córnea (CLERC; LAFORGE, 1997). Coriorretinite, lesões do nervo óptico e lesões do trato óptico resultam do neurotropismo do vírus da cinomose (CLERC; LAFORGE, 1997).

A doença aguda, que pode persistir por poucas semanas, pode ser seguida de recuperação e imunidade duradoura ou de desenvolvimento de sinais neurológicos, os quais normalmente iniciam uma a três semanas após fase aguda (DEEM, 2000; GREENE; VANDEVELDE, 2012). Entretanto, também podem ocorrer durante a fase aguda ou meses depois após apresentação da doença (APPEL; SUMMERS, 1995; SWANGO, 1997). As manifestações neurológicas dependem da distribuição do vírus no SNC e podem incluir mudanças de comportamento, vocalização, hiperestesia, ataxia, convulsões, paraparesia ou tetraparesia, rigidez cervical, mioclonia, tremores, paralisia, andar em círculos e cegueira (APPEL; SUMMERS, 1995; SWANGO, 1997; DEEM, 2000; FERREYRA, 2009; ZACHARY, 2009). Animais que desenvolvem distúrbios neurológicos apresentam um prognóstico mais grave (QUINN *et al.*, 2005; GREENE; VANDEVELDE, 2012).

Infecções bacterianas secundárias são complicações comuns devido à imunodepressão causada pela leucopenia (DEEM, 2000), e frequentemente são responsáveis por muitos dos sinais clínicos associados à cinomose (SWANGO, 1997). *Bordetella bronchiseptica* é comumente encontrada em cães com cinomose (SWANGO, 1997; LÓPEZ, 2009). Além das infecções bacterianas secundárias, é comum em animais com cinomose aumento das infecções por toxoplasmose, coccidiose, enterite viral e infecções por *Mycoplasma* sp. (SWANGO, 1997).

2.1.5 Achados Patológicos

2.1.5.1 *Macroscopia*

As lesões patológicas causadas pela infecção pelo vírus da cinomose são muito semelhantes em canídeos selvagens e cães domésticos (DEEM, 2000). Os animais com

cinomose podem apresentar secreções oculonasais inicialmente serosas evoluindo posteriormente para mucopurulentas (GREENE; VANDEVELDE, 2012). Os pulmões apresentam pneumonia intersticial difusa, caracterizados macroscopicamente como não colapsados, edematosos, com impressão das costelas e coloração avermelhada a cinza-pálida, (LÓPEZ, 2009). Pode ocorrer diarreia, hematoquezia e gastroenterite (OKITA *et al.*, 1997) em decorrência de uma enterite catarral ou hemorrágica (LAN *et al.*, 2006). Hipoplasia segmentar do esmalte dentário pode estar presente quando o animal é infectado pelo vírus da cinomose antes da erupção dos dentes permanentes, ou seja, antes dos seis meses de idade (GELBERG, 2009). Durante o período virêmico o vírus se dissemina para os coxins plantares e se multiplica nos queratinócitos, causando hiperqueratose e paraqueratose, e como consequência há um engrossamento do tecido dessas regiões (DEEM, 2000; ZEE, 2003; GREENE; VANDEVELDE, 2012). Dermatite vesicular e pustular podem estar eventualmente associadas à infecção pelo vírus da cinomose (GREENE; VANDEVELDE, 2012).

2.1.5.2 *Microscopia*

Corpúsculos de inclusão eosinofílicos intracitoplasmáticos e/ou intranucleares são característicos na infecção pelo vírus da cinomose. Os corpúsculos de inclusão medem entre 1-5 µm de diâmetro e são usualmente encontrados em células epiteliais da pele, brônquios, trato intestinal, trato urinário, ductos biliares, glândulas salivares, glândulas adrenais, linfonodos, baço e SNC (GREENE; VANDEVELDE, 2012). Aparecem inicialmente no epitélio bronquiolar, mas são mais predominantes no epitélio do estômago, pelve renal e bexiga urinária, o que torna esses tecidos boas escolhas para exame com fins diagnósticos (LÓPEZ, 2007).

No plano nasal e coxins plantares pode ser observado hiperqueratose e paraqueratose como consequência da multiplicação viral nos queratinócitos (DEEM, 2000; ZEE, 2003).

No pulmão é frequente a ocorrência de pneumonia intersticial, podendo também estar presente áreas de congestão, hemorragia, edema pulmonar e atelectasia (MEGID, 2009; LÓPEZ, 2009). Ainda, áreas multifocais de células inflamatórias mononucleares associadas com proliferação de pneumócitos podem ocorrer, resultando no espessamento de septos alveolares (GREENE; VANDEVELDE, 2012). Pode ser observada uma marcada depleção de linfócitos na polpa branca do baço e em outros órgãos linfóides (VAN MOLL *et al.*, 1995; GREENE; VANDEVELDE, 2012).

No SNC, as lesões histopatológicas ocorrem tanto na substância branca quanto na substância cinzenta (FENNER, 1997), afetando principalmente cerebelo, pedúnculos cerebelares, nervos ópticos, medula oblonga, medula espinhal e meninges (LECOUTEUR; CHILD, 1997; ZACHARY, 2009). A desmielinização é a lesão do SNC mais proeminente em animais infectados pelo vírus da cinomose canina (MARTELLA; ELIA; BUONAVOGLIA, 2008). Ela ocorre provavelmente por ação direta do vírus sobre as células da glia ou por efeito dos mecanismos imunológicos, porém o mecanismo ainda não está completamente esclarecido (LECOUTEUR; CHILD, 1997). Além da desmielinização, áreas de malacia contendo células de gitter, astrocitose e astrogliose podem ser observadas (MEGID *et al.*, 2009; ZACHARY, 2009). Pode haver ainda gliose, infiltração de células mononucleares, intumescência e descamação de células meningeais, gigantes e neuronais e manguitos perivascularares (SWANGO, 1997; ZEE, 2003). Os corpúsculos de inclusão podem ser encontrados principalmente nos astrócitos, mas também em neurônios e células endoteliais (ZACHARY, 2009).

2.1.6 Diagnóstico

Tanto em cães como em carnívoros de zoológico ou de vida livre o diagnóstico da cinomose é muitas vezes difícil de ser realizado, e se baseia inicialmente no histórico e nos sinais clínicos presentes (APPEL; SUMMERS, 1995). Uma doença febril, com sinais respiratórios (rinite, tosse e pneumonia), corrimentos oculonasais mucopurulentos, diarreia, hiperqueratose dos coxins plantares e sinais neurológicos, é altamente indicativo de cinomose (SWANGO, 1997; QUINN *et al.*, 2005). Diversos testes laboratoriais podem ser utilizados no auxílio do diagnóstico da cinomose canina (MARTELLA; ELIA; BUONAVOGLIA, 2008).

Na hematologia pode ser observado linfopenia, trombocitopenia, anemia regenerativa, diminuição de albumina e aumento das concentrações de α - e γ -globulina (SWANGO, 1997; DEEM, 2000). Em esfregaços sanguíneos corpúsculos de inclusão intracitoplasmáticos e por vezes nucleares podem ser detectados principalmente em linfócitos na fase inicial da doença (GREENE; VANDEVELDE, 2012).

Imunofluorescência de células epiteliais da conjuntiva e membranas mucosas a partir de esfregaços pode ser utilizado para detecção do antígeno (GREENE; VANDEVELDE, 2012), mas o ideal é que esse teste seja realizado nos primeiros dias dos sinais agudos da cinomose ou em no máximo três semanas pós-infecção, pois é o período em que o vírus ainda

está presente nas células epiteliais. Em casos mais subagudos ou crônicos o teste tem resultado negativo (SWANGO, 1997; MARTELLA; ELIA; BUONAVOGLIA, 2008).

A sorologia muitas vezes não tem significado diagnóstico, pois uma alta titulação de anticorpos pode ser tanto decorrente de infecção como de animais previamente vacinados. Como diagnóstico *post-mortem* também é difícil, pois os animais que morrem podem ter ou não anticorpos mensuráveis (APPEL; SUMMERS, 1995).

O isolamento viral não é muito utilizado para o diagnóstico, pois o vírus da cinomose necessita de adaptação aos cultivos celulares por várias passagens, e portanto esse processo é muito fastidioso (ARNS *et al.*, 2012).

Exames radiográficos do pulmão também podem ser utilizados para auxiliar o diagnóstico, onde pode ser detectado inicialmente uma pneumonia intersticial ou, quando já houver infecção bacteriana secundária, uma broncopneumonia (GREENE; VANDEVELDE, 2012).

Técnicas moleculares como a RT-PCR e *nested* RT-PCR são sensíveis e específicas, e atualmente vêm sendo frequentemente utilizadas para a detecção do genoma viral (MARTELLA; ELIA; BUONAVOGLIA, 2008). Podem ser utilizadas amostras biológicas que incluem secreções oculares, nasais, urina e fezes (ARNS *et al.*, 2012), além de tecidos como cérebro, pulmão, bexiga e linfonodo no caso do diagnóstico *post-mortem* (DEEM, 2000; ARNS *et al.*, 2012).

A técnica de imuno-histoquímica pode ser utilizada para a detecção do antígeno a partir de fragmentos teciduais obtidos em biópsias ou necropsias (KRISTENSEN; VANDEVELDE, 1978; AXTHELM; KRAKOWKA, 1986; SONNE *et al.*, 2009). Para um diagnóstico *ante-mortem*, tecidos da mucosa nasal, coxins plantares e pele da região da nuca tem sido preconizados (HAINES *et al.*, 1999). Em cães que morreram de cinomose, tecidos de baço, tonsilas, linfonodos, estômago, pulmão, duodeno, bexiga e encéfalo podem ser coletados para um diagnóstico *post-mortem* (GREENE; VANDEVELDE, 2012).

Nos animais selvagens, é importante que a cinomose seja diferenciada de outras doenças que cursem com manifestações clínicas respiratórias, neurológicas e/ou gastrointestinal semelhantes, como a raiva, panleucopenia felina, toxoplasmose, parvovirose canina, enterite bacteriana e intoxicação por chumbo (DEEM, 2000).

2.1.7 Tratamento e Controle

O tratamento da cinomose é basicamente de suporte. São indicados antibióticos de amplo espectro para evitar infecções bacterianas secundárias, fluidoterapia e soluções eletrolíticas para reestabelecer o equilíbrio hidro-eletrolítico, além de complementos nutricionais para melhorar a condição geral do animal (SWANGO, 1997; ZEE, 2003). Anticonvulsivantes podem ser utilizados para o alívio sintomático dos distúrbios nervosos. Mesmo com cuidados intensivos de suporte, nem todos os animais terão recuperação total (ZEE, 2003).

A vacinação de cães domésticos com cepas atenuadas do vírus da cinomose em formulações mono ou polivalentes é a estratégia mais utilizada no combate à cinomose (ARNS *et al.*, 2012). Também é uma importante medida de controle em carnívoros selvagens, uma vez que os cães domésticos atuam como os principais reservatórios do vírus para os animais de vida livre (ACOSTA-JAMETT, 2011).

Em casos de surtos da doença, devido à natureza lábil do vírus, o controle pode ser realizado pelo isolamento dos animais e limpeza e desinfecção do local (MARTELLA; ELIA; BUONAVOGLIA, 2008; QUINN *et al.*, 2005).

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Procedimentos Gerais

Realizou-se um estudo retrospectivo entre o período de 2013 e 2015 e um estudo prospectivo até maio de 2016 referentes às necropsias de graxains realizadas pelo Setor de Patologia Veterinária da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (SPV-UFRGS). Os animais submetidos ao exame de necropsia eram todos de vida livre e foram encaminhados por reservas ambientais ou clínicas veterinárias da região metropolitana de Porto Alegre.

No estudo retrospectivo, os livros de diagnóstico do SPV-UFRGS foram revisados e os casos de necropsias de graxains analisados em relação ao histórico e lesões anatomopatológicas para a seleção de casos de infecção natural pelo vírus da cinomose. As alterações macroscópicas desses casos foram revisadas através do arquivo documentado de necropsia do SPV-UFRGS. As lâminas histológicas foram coradas novamente pela técnica de hematoxilina–eosina (H&E) e revisadas quanto às descrições das lesões. O estudo prospectivo foi realizado a partir dos novos casos remetidos ao SPV-UFRGS para a realização de necropsia. Em ambos estudos dados referentes à espécie, sexo, idade aproximada, procedência e sinais clínicos foram coletados e posteriormente analisados.

3.2 Necropsias e Análises Histopatológicas

Durante a necropsia dos animais realizou-se a documentação fotográfica e escrita de todas as alterações macroscópicas encontradas, além da coleta sistemática de fragmentos teciduais. Os fragmentos foram armazenados em solução de formalina 10% por 48h, sendo posteriormente emblocados em parafina, cortados em micrótomo rotatório na espessura de três micrômetros e corados pela técnica de hematoxilina-eosina (H&E). Após, as lâminas histológicas foram analisadas em microscópio óptico, onde foram descritas as lesões encontradas.

3.3 Técnica de Imuno-histoquímica

Para a realização da imuno-histoquímica (IHQ) selecionaram-se cortes histológicos de cérebro e cerebelo. Os tecidos emblocados em parafina foram cortados em micrótomo na

espessura de três micrômetros e aplicados à lâminas positivadas. Como controle positivo utilizou-se cortes de estômago de um canino infectado pelo vírus da cinomose.

As amostras foram submetidas à técnica de IHQ pelo método estreptavidina-biotina ligada à fosfatase. Os cortes foram desparafinados em solução de xilol por duas vezes durante 20 minutos cada, e após foram colocados em soluções decrescentes de álcool (100%, 96%, 80%, e 70%) por dois minutos cada. As lâminas foram então lavadas com água destilada. Para a recuperação antigênica as lâminas foram colocadas em tampão citrato (pH 6) e aquecidas por 3 ciclos de 5 minutos cada em forno micro-ondas com potência máxima, e depois esfriadas. Para o bloqueio das reações inespecíficas utilizou-se leite desnatado 5%, por 15 minutos. Após lavagem com água destilada, utilizou-se anticorpo primário monoclonal anti-cinomose (VMRD) na diluição de 1/400 em solução salina tamponada com fosfato (PBS), permanecendo *overnight* a 4°C. Após nova lavagem, foram acrescentadas gotas amarelas (LSAB + AP Link), o anticorpo secundário, por 20 minutos em temperatura ambiente. Utilizaram-se então, após lavagem com água destilada, gotas vermelhas (LSAB + AP Link), a streptavidina, por 20 minutos em temperatura ambiente. Lavou-se novamente com água destilada e então as lâminas foram cobertas com o cromógeno Permanent Red (DAKO) por 15 minutos no mínimo para a revelação. Realizou-se nova lavagem com água destilada e as lâminas foram contra coradas com hematoxilina Mayer. Após secagem em temperatura ambiente, as lâminas foram colocadas em xilol e montadas em resina sintética (Entellan Merck).

4 RESULTADOS

4.1 Gerais

No período de janeiro de 2013 a maio de 2016 realizaram-se no Setor de Patologia Veterinária da UFRGS (SPV-UFRGS) 18 necropsias de graxains, sendo 16 de graxaim-domato (*Cerdocyon thous*) e duas de graxaim-do-campo (*Lycalopex gymnocercus*). Destes, 13 animais foram encontrados atropelados em margens de rodovias do estado e não foram encontradas alterações no exame histopatológico, provavelmente decorrente do avançado estado de autólise das carcaças. Dos animais que se encontravam em bom estado de conservação (5/18), em quatro casos estabeleceu-se o diagnóstico de cinomose por meio de exame histopatológico, os quais foram selecionados para o presente estudo.

Em relação à espécie, três animais pertenciam à espécie *C. thous* e um à espécie *L. gymnocercus*. Como os animais eram de vida livre, não foi possível obter a idade exata dos animais, mas uma idade aproximada foi estabelecida a partir do tamanho e do grau de desgaste dos dentes. Os dados referentes à espécie, idade, sexo e procedência encontram-se na Tabela 1.

Tabela 1: Frequência de espécie, idade, sexo e procedência dos graxains diagnosticados com cinomose pelo Setor de Patologia Veterinária - Universidade Federal do Rio Grande do Sul (SPV-UFRGS).

	Espécie	Idade	Sexo	Procedência
Graxaim 1	<i>Cerdocyon thous</i>	jovem	fêmea	Canoas - RS
Graxaim 2	<i>Cerdocyon thous</i>	adulto	macho	Viamão - RS
Graxaim 3	<i>Cerdocyon thous</i>	jovem	macho	Gravataí - RS
Graxaim 4	<i>Lycalopex gymnocercus</i>	jovem	fêmea	Imbé - RS

Os quatro animais foram encontrados manifestando sinais neurológicos e foram encaminhados para centros veterinários da cidade de Porto Alegre e região metropolitana, onde receberam atendimento clínico antes de virem a óbito. Os sinais clínicos relatados foram mioclonia (3/4), opistótono (2/4), secreção ocular discreta (2/4), paresia em membros

anteriores (1/4) e nistagmo (1/4). Em um dos animais o médico veterinário havia coletado sangue e foi realizado um hemograma, onde se observou linfopenia.

4.2 Macroscopia

Ao exame de necropsia observou-se que os animais apresentavam condição corporal que variava de boa (1/4) a caquética (3/4). Os achados macroscópicos encontrados no exame externo caracterizaram-se por mucosas orais e conjuntivais pálidas (4/4), enoftalmia decorrente de desidratação de moderada (2/4) a acentuada (2/4), além de ectoparasitas (4/4), principalmente de acentuada quantidade de carrapatos e discreta quantidade de pulgas. Também se observou secreção ocular discreta em dois graxains.

À cavidade torácica os pulmões apresentavam-se não colabados e avermelhados (2/4), e em um graxaim evidenciou-se uma área focalmente extensa de consolidação em região de lobos diafragmáticos. Os linfonodos mesentéricos apresentavam-se aumentados (4/4), além dos cervicais (2/4), e dos ilíacos, traqueobrônquicos e gástricos (1/4). O baço estava discretamente aumentado de tamanho e com discreta hiperplasia de polpa branca (2/4).

Na abertura dos intestinos de um dos animais encontrou-se conteúdo de coloração avermelhada e discreta quantidade de *Ascaris* sp. Observou-se ainda em outro graxaim acentuada infestação por parasitas compatíveis com *Dipylidium* sp.

Adicionalmente, em um dos animais observou-se moderada congestão em vasos das leptomeninges.

4.3 Microscopia

Nos quatro graxains os principais achados microscópicos relacionados à infecção por cinomose foram encontrados no sistema nervoso central, principalmente em cerebelo, onde se identificaram lesões compatíveis com um quadro de encefalite. Observou-se no cerebelo desmielinização, caracterizada por vacuolização moderada a acentuada em substância branca (4/4) (**Figura 1**), além de áreas de malacia associadas a grande quantidade de macrófagos espumosos (células de Gitter) (2/4) (**Figura 2**), astrócitos gemistocíticos (4/4) e ocasionais manguitos perivasculares linfoplasmocitários (2/4) (**Figura 3**), além de algumas áreas multifocais de gliose (2/4). Raros corpúsculos de inclusão intranucleares e intracitoplasmáticos eosinofílicos em astrócitos foram observados (2/4) (**Figura 4**). Um dos

graxains apresentava ainda discretas áreas de hemorragia no cerebelo. Meningite mononuclear multifocal discreta foi observada em um dos animais, tanto no cerebelo quanto no cérebro.

Na substância branca da medula espinhal de um graxaim observaram-se áreas multifocais de vacuolização, hemorragia multifocal discreta em substância cinzenta e manguitos perivascularres linfoplasmocitários. Visualizou-se ainda rarefação linfoide em linfonodos (2/2) e moderada hiperplasia linfoide no baço (2/2).

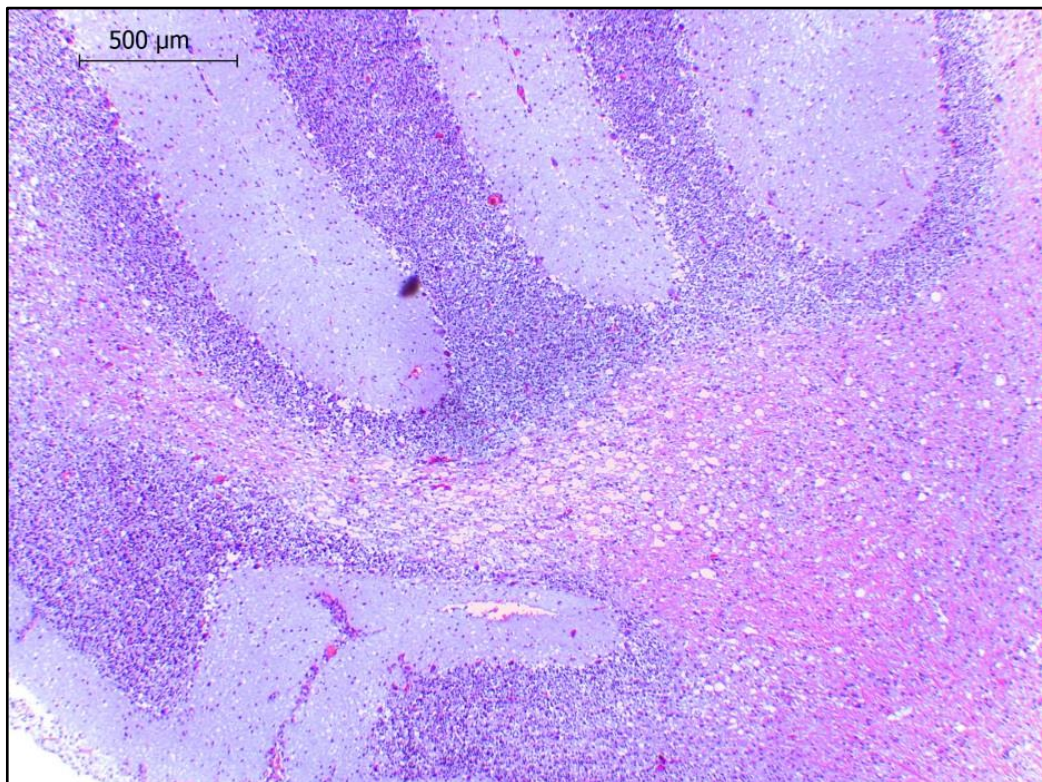


Figura 1. Infecção pelo vírus da cinomose em graxains: cerebelo, áreas de vacuolização. HE, obj. 4x

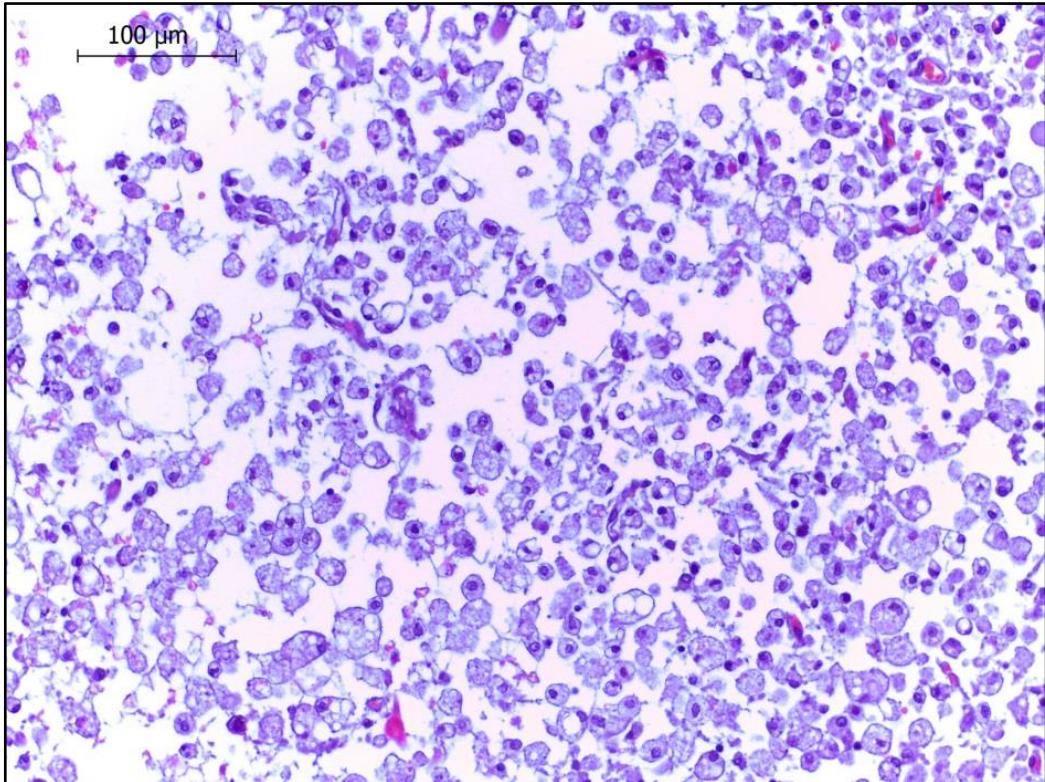


Figura 2. Infecção pelo vírus da cinomose em graxains: cerebelo, malacia associada a grande quantidade de macrófagos espumosos (células de Gitter). HE, obj. 20x

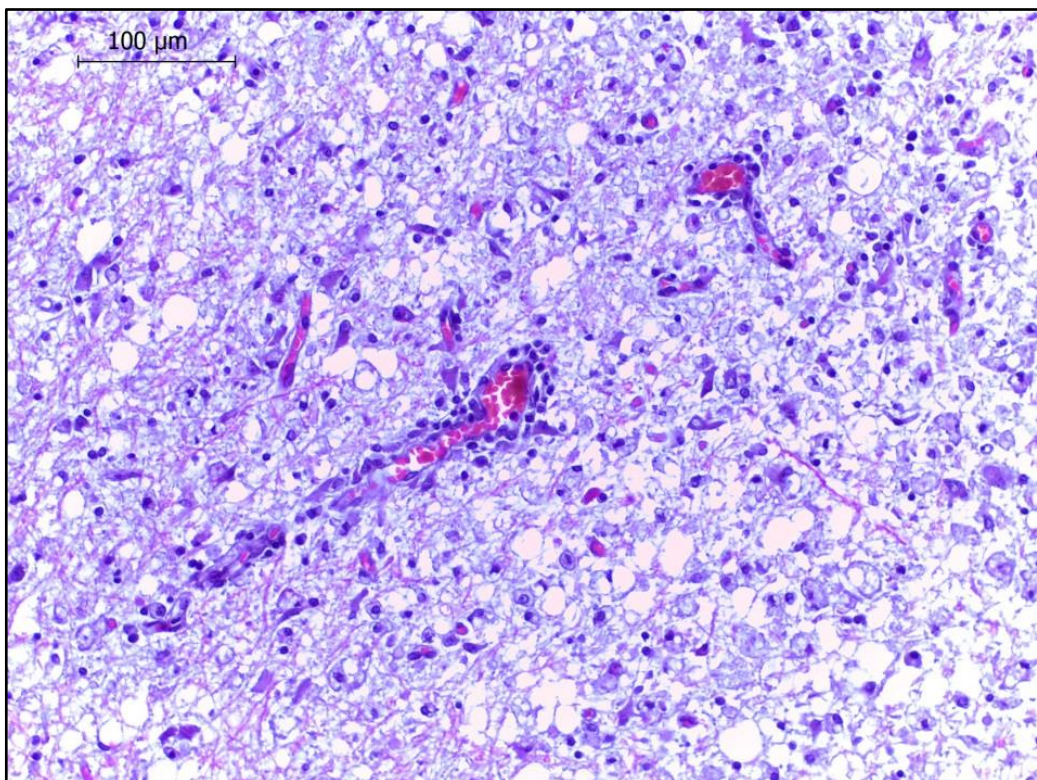


Figura 3. Infecção pelo vírus da cinomose em graxains: cerebelo, manguitos perivascularres linfoplasmocitários. HE, obj. 20x

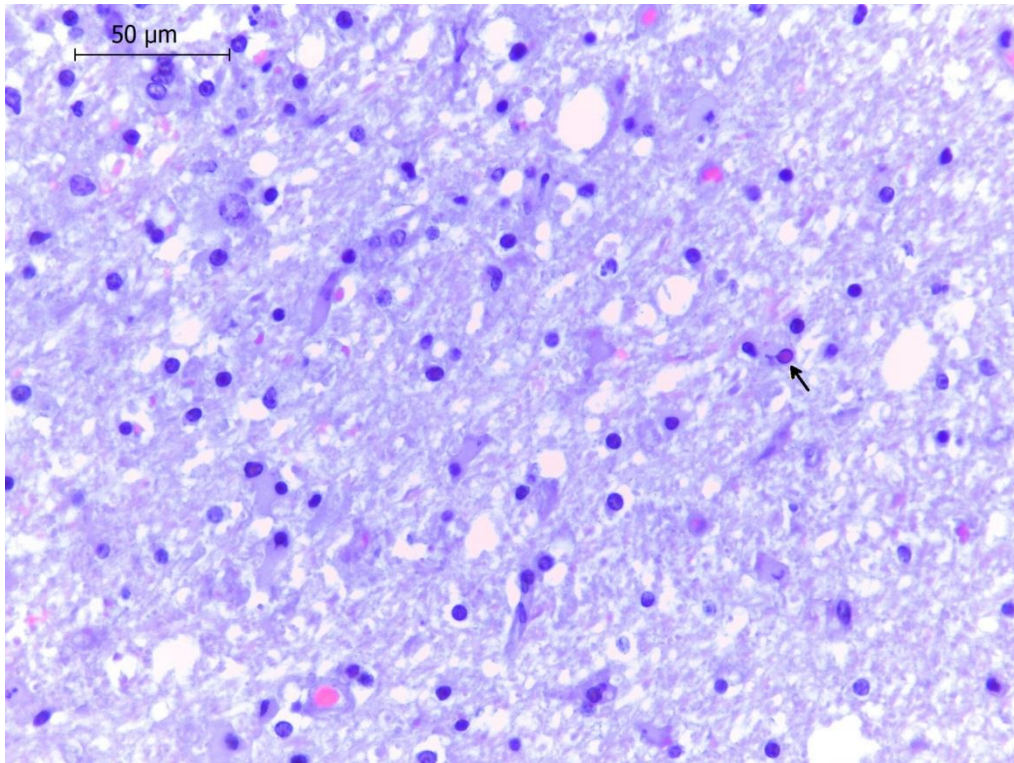


Figura 4. Infecção pelo vírus da cinomose em graxains: cerebello, corpúsculo de inclusão intranuclear em astrócitos (seta). HE, obj. 40x

4.4 Imuno-histoquímica

Em todos os casos houve marcação do antígeno viral de forma acentuada quando comparada ao controle positivo. O antígeno viral foi visualizado no cérebro e no cerebello, tanto em região de substância branca quanto de substância cinzenta (**Figura 5**). Entretanto, a marcação foi mais fraca nas áreas em que se observava acentuada vacuolização. A marcação positiva para cinomose ficou evidenciada principalmente em astrócitos, neurônios e células da micróglia (**Figura 6**). Adicionalmente, a marcação do antígeno foi detectada próxima à área de manguitos perivasculares, quando estes estavam presentes. Corpúsculos de inclusão viral em astrócitos, principalmente intranucleares, também foram marcados pela técnica de imuno-histoquímica (**Figura 7**). Em um graxaim não se observou alterações microscópicas características de cinomose no cérebro, porém o antígeno viral foi visualizado por meio da técnica imuno-histoquímica.

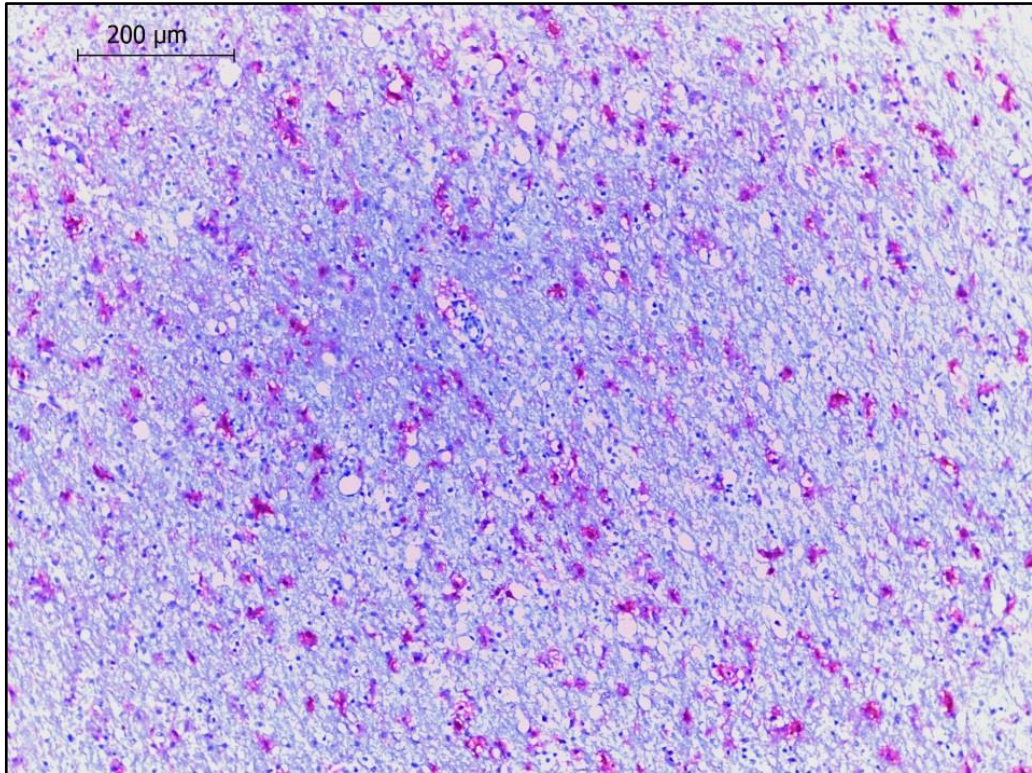


Figura 5. Infecção pelo vírus da cinomose em graxains: cerebelo, marcação positiva do antígeno viral. Imuno-histoquímica anti-cinomose. Cromógeno Permanent Red, obj. 10x

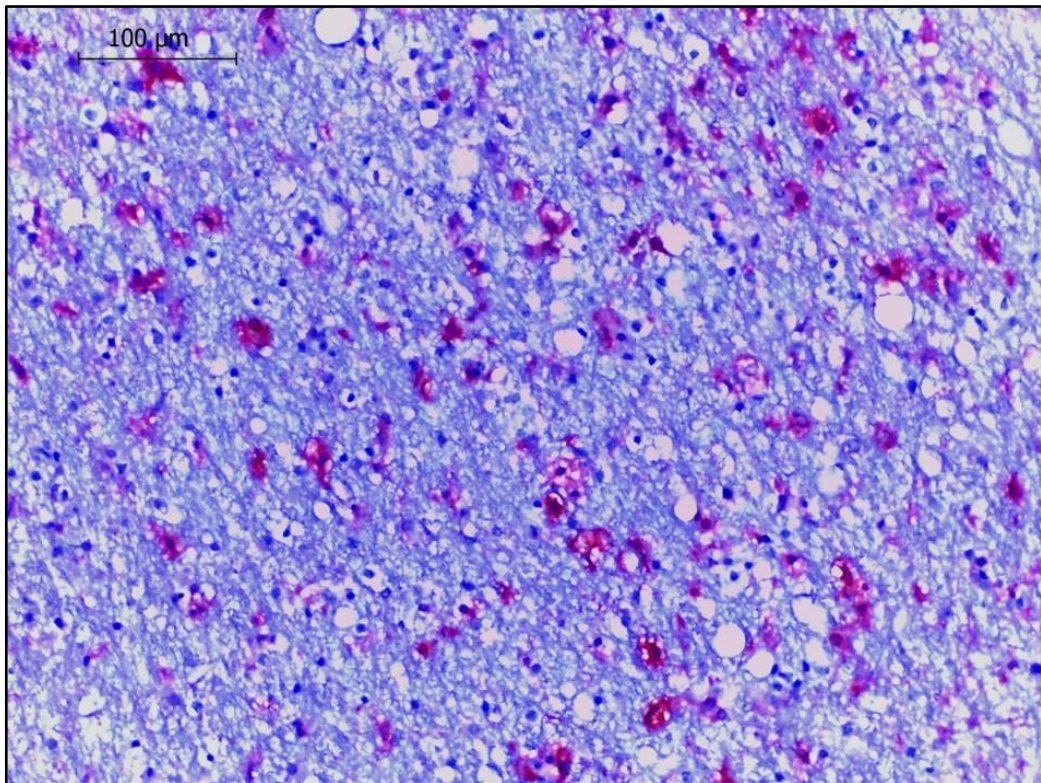


Figura 6. Infecção pelo vírus da cinomose em graxains: cerebelo, marcação do antígeno viral evidenciada no citoplasma de astrócitos. Imuno-histoquímica anti-cinomose. Cromógeno Permanent Red, obj. 20x

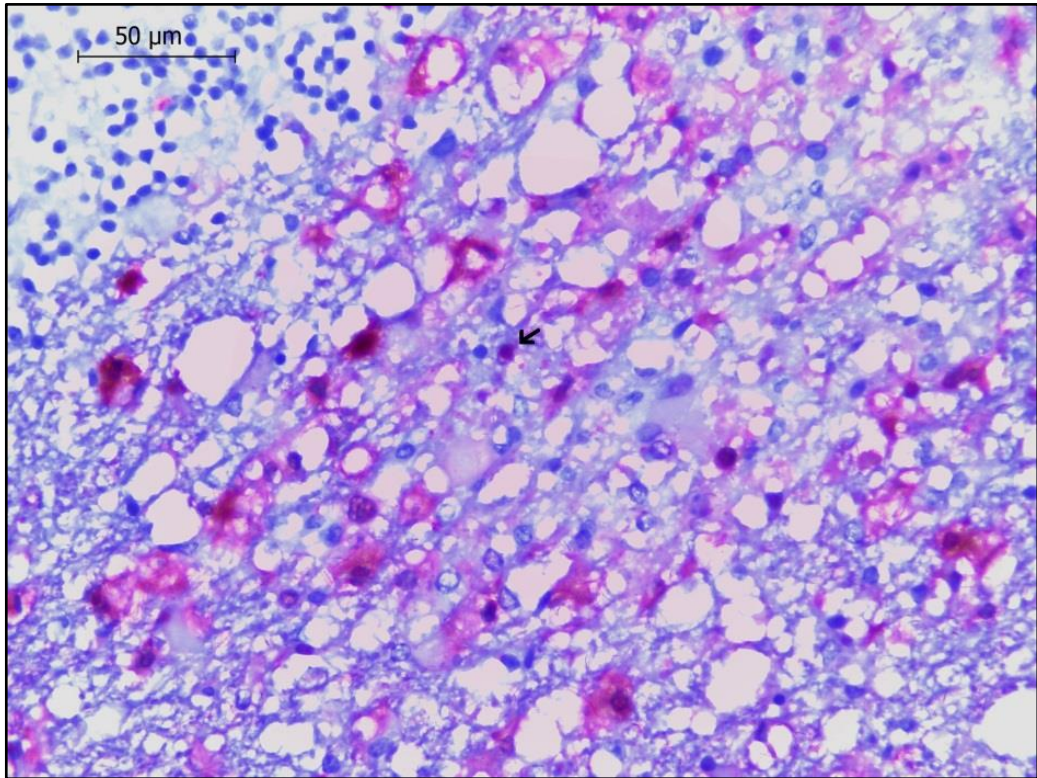


Figura 7. Infecção pelo vírus da cinomose em graxains: cerebelo, corpúsculo intranuclear em astrócitos com marcação positiva do antígeno. Imuno-histoquímica anti-cinomose. Cromógeno Permanent Red, obj. 40x

5 DISCUSSÃO

O diagnóstico de cinomose nos graxains do presente estudo baseou-se nos achados patológicos associados à identificação do agente através da imuno-histoquímica. Em todos os casos houve acometimento do sistema nervoso central (SNC), onde se identificaram alterações clínico-patológicas compatíveis com encefalite causada pelo vírus da cinomose, semelhante aos resultados encontrados por DAOUST *et al.* (2009).

Os graxains selecionados para este trabalho eram todos provenientes de áreas urbanas ou periurbanas. O aumento do processo de urbanização aumenta potencialmente o contato entre carnívoros selvagens e domésticos, facilitando a transmissão de cinomose entre eles, principalmente considerando que essas espécies são filogeneticamente semelhantes entre si (CLEAVELAND *et al.*, 2000). Frölich *et al.* (2000), demonstrou uma maior prevalência de anticorpos anti-cinomose em carnívoros selvagens que habitavam áreas urbanas e periurbanas, ou seja, onde havia uma maior concentração de cães domésticos, quando comparado aos animais que habitavam o meio rural. Isso demonstra que há uma relação entre ocorrência de cinomose em carnívoros selvagens e presença de cães domésticos infectados em áreas vizinhas. Estudos anteriores também já demonstraram por meio de análise filogenética que o vírus da cinomose encontrado em carnívoros selvagens é geneticamente relacionado ao vírus encontrado em animais domésticos (CLEAVELAND *et al.*, 2000; FRÖLICH *et al.*, 2000; TIMM *et al.*, 2000; MEGID *et al.*, 2009).

Dos quatro graxains desse estudo, três foram classificados como jovens, o que corrobora com estudos realizados em cães, onde já foi demonstrado uma maior ocorrência de cinomose em animais jovens (SONNE, 2009; GREENE; VANDEVELDE, 2012). Também, Tipold *et al.* (1992) e Silva *et al.* (2009) observaram em seus estudos que mais da metade dos casos de cinomose com manifestação neurológica ocorreram em animais jovens, de até um ano de idade. Segundo Krakowka & Kostner (1976), importantes fatores que contribuem para a maior prevalência de cinomose em cães jovens é a imaturidade do sistema imunológico e ausência de vacinação, o que também pode se aplicar aos graxains desse estudo.

Os sinais clínicos relatados nesse estudo estão relacionados principalmente ao acometimento do SNC, como mioclonia, paresia, opistótono e nistagmo. Resultados semelhantes foram descritos por Megid *et al.* (2009) e Ferreyra *et al.* (2009). Os sinais neurológicos são consequência da desmielinização, decorrente da replicação do vírus no SNC (TIPOLD *et al.*, 1992). A variação dos sinais clínicos apresentada nos animais desse estudo provavelmente é reflexo da diferente distribuição do vírus no SNC (TIPOLD *et al.*, 1992).

Em dois casos também foi relatada a presença de secreção ocular, sinal clínico comumente observado em cães domésticos com cinomose e que também já foi descrito em outros carnívoros selvagens (MEGID *et al.*, 2010; ORIGGI *et al.*, 2012).

Adicionalmente, em um dos graxains verificou-se linfopenia. A linfopenia resulta do dano do vírus aos linfócitos, causado pela replicação viral em tecidos linfoides, levando à imunodepressão (QUINN, 2005; GREENE; VANDEVELDE, 2012).

As alterações macroscópicas encontradas nesse estudo, como secreção ocular, pulmões não colabados e avermelhados e aumento de linfonodos, foram semelhantes às descritas na literatura (SONNE *et al.*, 2009; BEINEKE *et al.*, 2009; ORIGGI *et al.*, 2012). Embora autores descrevam a ocorrência de enterite e conteúdo intestinal de coloração avermelhada em animais com cinomose (LAN *et al.*, 2006; BEINEKE *et al.*, 2009), a verminose pode ter sido a responsável pelo conteúdo intestinal avermelhado encontrado em um dos graxains.

Lesões macroscópicas no SNC não são frequentemente encontradas, embora a literatura cite que possa ocorrer dilatação ventricular, edema cerebral e congestão das meninges, além de necrose (GREENE; VANDEVELDE, 2012). Nesse trabalho observou-se em um dos animais moderada congestão dos vasos das leptomeninges.

Os achados histológicos, especialmente no SNC, indicam um curso agudo da doença em populações altamente susceptíveis de carnívoros selvagens. Os achados neuropatológicos encontrados associados à presença acentuada do antígeno viral é um indicativo de infecção recente no SNC, assim como descrito por Van Moll *et al.* (1995) em mustelídeos. Em todos os casos identificaram-se microscopicamente lesões compatíveis com um quadro de encefalite não supurativa, onde a principal lesão encontrada foi desmielinização, caracterizada pela vacuolização de substância branca e cinzenta, resultado este também relatado por outros autores (VAN MOLL *et al.*, 1995; DEEM *et al.*, 2000; MEGID *et al.*, 2009; DAOUST *et al.*, 2009; ORIGGI *et al.*, 2012). Silva *et al.*, (2009) e Origgi *et al.* (2012) relataram que as lesões desmielinizantes foram identificadas de forma mais frequente no cerebelo, assim como no presente estudo, onde foi observado principalmente em substância branca. A desmielinização ocorre provavelmente pela replicação do vírus em neurônios e células gliais (TIPOLD *et al.*, 1992) ou por efeito de mecanismos imunológicos (LECOUTEUR; CHILD, 1997). Anticorpos anti-cinomose podem estimular macrófagos com secreção de radicais livres de oxigênio, os quais são altamente tóxicos para os oligodendrócitos, as células produtoras de mielina (GRIOT *et al.*, 1990).

Também se observou no cerebelo áreas de malacia associadas a grande quantidade de macrófagos espumosos (células de Gitter), astrócitos gemistocíticos e raros corpúsculos de inclusão intranucleares e intracitoplasmáticos eosinofílicos em astrócitos, além de ocasionais manguitos perivasculares linfoplasmocitários e raras áreas multifocais de gliose, semelhante ao que foi descrito por Van Moll *et al.* (1995) e Megid *et al.* (2009). Ainda segundo Van Moll *et al.* (1995), a rara ocorrência de corpúsculo de inclusão no encéfalo é um indicativo do curso agudo da doença.

As lesões associadas ao vírus da cinomose no SNC encontrados nesse trabalho, associadas às alterações clínicas, são semelhantes a encefalomielite que ocorre em cães jovens. A encefalomielite dos cães jovens é a forma mais comum da doença e constitui-se em doença neurológica aguda geralmente concomitante ou precedida por manifestação clínica sistêmica (AMUDE *et al.*, 2006). Nessa fase da doença, a principal lesão observada é a desmielinização e as alterações inflamatórias são mínimas, provavelmente devido à imunossupressão causada pelo vírus (GREENE; VANDEVELDE, 2012), assim como foi identificado nos graxains desse estudo. Outro fator que influencia no tipo de lesão no SNC é a cepa viral. Algumas cepas apresentam tropismo pelos neurônios, outras têm tropismo pelos astrócitos e oligodendrócitos e causam desmielinização (KOUTINAS *et al.*, 2002).

Observou-se ainda em dois casos rarefação linfóide em linfonodos, alteração essa também descrita por outros autores (SONNE *et al.*, 2009; GREENE; VANDEVELDE, 2012). Ela ocorre pela depleção generalizada de linfócitos que ocorre na fase aguda da doença (BEINEKE *et al.*, 2009).

O antígeno viral pode ser identificado pela técnica imuno-histoquímica principalmente em cerebelo e menos frequentemente no cérebro dos graxains analisados. Resultados semelhantes foram encontrados por Van Moll *et al.* (1995) e Sonne *et al.* (2009), onde a marcação foi observada principalmente em astrócitos e neurônios, além de células da micróglia e endotélio vascular. Corpúsculos de inclusão viral em astrócitos, principalmente intranucleares, também ficaram evidenciados pela marcação imuno-histoquímica, facilitando o diagnóstico de cinomose.

Em casos crônicos de cinomose o antígeno encontra-se ausente ou presente de forma escassa apenas em áreas de lesões (ALLDINGER *et al.*, 2000). O contrário foi observado nesse estudo, onde houve uma acentuada marcação imuno-histoquímica em todos os casos, inclusive em um graxaim que não possuía alterações microscópicas, demonstrando um curso mais agudo da doença. Além disso, estes animais apresentam uma grande susceptibilidade ao vírus, provavelmente levando a uma maior replicação viral nos tecidos.

6 CONCLUSÕES

Os achados patológicos associados à identificação do agente através da técnica de imuno-histoquímica demonstraram ser eficazes para a realização do diagnóstico de cinomose em graxains.

Em todos os casos houve acometimento do sistema nervoso central (SNC), onde se identificou alterações clínico-patológicas compatíveis com encefalite causada pelo vírus da cinomose.

As principais alterações macroscópicas observadas foram secreção ocular, pulmões não colabados e linfonodos mesentéricos aumentados. Também se observou em um dos casos moderada congestão dos vasos das leptomeninges, embora a literatura cite que lesões macroscópicas no SNC não sejam frequentemente encontradas.

A principal lesão microscópica encontrada no sistema nervoso central foi desmielinização de substância branca principalmente em cerebelo.

Corpúsculos de inclusão intranucleares e/ou intracitoplasmáticos são importantes para o diagnóstico de cinomose, porém eles foram mais facilmente detectados pela técnica imuno-histoquímica quando comparado à histopatologia.

A imuno-histoquímica em cerebelo e cérebro demonstrou ser um bom método auxiliar no diagnóstico *post-mortem* de cinomose, permitindo facilmente a visualização do antígeno, inclusive em casos onde as alterações microscópicas não são evidentes.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ACOSTA-JAMETT, G. *et al.* Urban domestic dog populations as a source of canine distemper virus for wild carnivores in the Coquimbo region of Chile. **Veterinary Microbiology**, v. 152, n. 3, p. 247-257, 2011.
- ALLDINGER, S. *et al.* Up-regulation of the hyalluronate receptor CD44 in canine distemper demyellinated plaques. **Acta Neutropathologica**, v. 99, p. 138-146, 2000.
- AMUDE, A. M. *et al.* Encefalomielite pelo vírus da cinomose canina em cães sem sinais sistêmicos da doença-estudos preliminares em três casos. **Clínica Veterinária**, v. 60, p. 60-66, 2006.
- APPEL, M. J. G.; SUMMERS, B.A. Pathogenicity of morbilliviruses for terrestrial carnivores. **Veterinary Microbiology**, v. 44, n. 2, p. 187-191, 1995.
- APPEL, M. J. G. Pathogenesis of canine distemper. **American Journal of Veterinary Research**, v.30, n.7, p. 1167-1182, 1969.
- ARNS, C.W. *et al.* Paramyxoviridae. In: FLORES, E.F. **Virologia Veterinária – virologia geral e doenças víricas**. 2ª ed.; Santa Maria: Ed. da UFSM, 2012. cap 27, p. 761-793.
- AXTHELM, M. K.; KRAKOWKA, S. Immunocytochemical methods for demonstrating canine distemper virus antigen in aldehyde-fixed paraffin-embedded tissue. **J. Journal of Virological Methods**, v.13, p. 215–229, 1986.
- BEINEKE, A. *et al.* Pathogenesis and immunopathology of systemic and nervous canine distemper. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 127, n. 1, p. 1-18, 2009.
- CLEAVELAND, S. *et al.* Serological and demographic evidence for domestic dogs as a source of canine distemper virus infection for Serengeti wildlife. **Veterinary Microbiology**, v.72, p. 217–227, 2000.
- CLERC, B.; LAFORGE, H. Manifestações oculares das afecções sistêmicas. In: ETTINGER, S. J.; FELDMAN, E.C. **Tratado de Medicina Interna Veterinária**. 4ª ed., São Paulo: Manole Ltda, 1997, v. 1., cap. 78, p.747-760.
- CREEL, S; CREEL, N.M. Six ecological factors that may limit African wild dogs, *Lycaon pictus*. **Animal Conservation**, v.1, p.1-9, 1998.
- DAVIDSON, W. R. *et al.* Diseases diagnosed in gray foxes (*Urocyon cinereoargenteus*) from the southeastern United States. **Journal of Wildlife Diseases**, v. 28, n. 1, p. 28-33, 1992.
- DEEM, S. L. *et al.* Canine distemper in terrestrial carnivores: a review. **Journal of Zoo and Wildlife Medicine**, v. 31, n. 4, p. 441-451, 2000.

- FENNER, W.R. Moléstias do cérebro. In: ETTINGER, S. J.; FELDMAN, E.C. **Tratado de Medicina Interna Veterinária**. 4ª ed., São Paulo: Manole Ltda, v. 1., cap. 82, p.819-889. 1997.
- FERREYRA, H. *et al.* Canine distemper infection in crab-eating fox (*Cerdocyon thous*) from Argentina. **Journal of Wildlife Diseases**, v. 45, n. 4, p. 1158-1162, 2009.
- FRÖLICH, K., *et al.* Epizootiological investigations of canine distemper virus in freeranging carnivores from Germany. **Veterinary Microbiology**, v.74, p. 283–292, 2000.
- GELBERG, H. B. Sistema Digestório. In: MCGAVIN, M. D.; ZACHARY, J. F. **Bases da Patologia em Veterinária**. 4ª ed., Rio de Janeiro: Elsevier, cap. 7, p.301-391. 2009.
- GOMES, M. S. Carnívora – Canidae (Lobo-guará, Cachorro-do-mato, Raposa-do-campo). In: CUBAS, Z.S.; SILVA, J.C.R.; CATÃO-DIAS, J.L. **Tratado de Animais Selvagens**. 1ª ed.; São Paulo: Roca; 2007. cap. 30, p. 492-504.
- GREENE, C.E.; VANDEVELDE, M. Canine Distemper. In: GREENE, C.E. **Infectious Diseases of the Dog and Cat**. 4ª ed, Elsevier, St. Louis, Missouri, 2012, cap.3, p.25-42.
- GRIOT C, *et al.* Selective degeneration of oligodendrocytes mediated by reactive oxygen species. **Free Radical Research Communications**, v. 11, p. 181-193, 1990.
- HAINES, D. M. *et al.* Immunohistochemical detection of canine distemper virus in haired skin, nasal mucosa, and footpad epithelium: a method for antemortem diagnosis of infection. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v. 11, n. 5, p. 396-399, 1999.
- HÜBNER, S. O., *et al.* Exposure of pampas fox (*Pseudalopex gymnocercus*) and crab-eating fox (*Cerdocyon thous*) from the Southern region of Brazil to Canine distemper virus (CDV), Canine parvovirus (CPV) and Canine coronavirus (CCoV). **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 53, n. 3, p. 593-597, 2010.
- JORGE, R.S.P.; JORGE M.L.S.P. Carnívora (Cachorro-do-mato, Cachorro-vinagre Lobo-guará e Raposa-do-campo). In: CUBAS, Z.S.; SILVA, J.C.R.; CATÃO-DIAS, J.L. **Tratado de Animais Selvagens**. 2ª ed.; São Paulo: Roca; 2014, cap. 36, p. 764-778.
- KOUTINAS, A. F. *et al.* Relation of clinical signs to pathological changes in 19 cases of canine distemper encephalomyelitis. **Journal of Comparative Pathology**, v. 126, n. 1, p. 47-56, 2002.
- KRAKOWKA S.; KOESTNER A. Age-related susceptibility to infection with canine distemper virus in gnotobiotic dogs. **Journal Infections Disease**, v.134, p.629- 632, 1976.
- KRISTENSEN, B.; VANDEVELDE, M. Immunofluorescence studies of canine distemper encephalitis on paraffin-embedded tissue. **American Journal Veterinary Research**, v.39, p. 1017-1021,1978.
- LAN, N. T. *et al.* Comparative analyses of canine distemper viral isolates from clinical cases of canine distemper in vaccinated dogs. **Veterinary Microbiology**, v. 115, n. 1, p. 32-42, 2006.

LECOUTEUR, R. A.; CHILD, G. Afecções da medula espinal. In: ETTINGER, S. J.; FELDMAN, E.C. **Tratado de Medicina Interna Veterinária**. 4ª ed., São Paulo: Manole Ltda, 1997, v. 1., cap. 83, p.890-980.

LÓPEZ, A. Sistema Respiratório. In: MCGAVIN, M. D.; ZACHARY, J. F. **Bases da Patologia em Veterinária**. 4ª ed., Rio de Janeiro: Elsevier, 2009, cap. 9, p.463-558.

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

MCINNES, E.F.; BURROUGHS, R.E.; DUNCAN, N.M. Possible vaccine-induced canine distemper in a South American bush dog (*Speothos venaticus*). **Journal of Wildlife Diseases**, v.28, p.614-617, 1992.

MEGID, J. *et al.* Canine distemper virus in a crab-eating fox (*Cerdocyon thous*) in Brazil: case report and phylogenetic analyses. **Journal of Wildlife Diseases**, v.45, n.2, p. 527-530, 2009.

MEGID, J. *et al.* First identification of canine distemper virus in hoary fox (*Lycalopex vetulus*): pathologic aspects and virus phylogeny. **Journal of Wildlife Diseases**, v. 46, n. 1, p. 303-305, 2010.

OKITA, M. *et al.* Histopathological features of canine distemper recently observed in Japan. **Journal of Comparative Pathology**, v. 116, n. 4, p. 403-408, 1997.

ORIGGI, F.C. *et al.* Emergence of a Canine Distemper Virus Strain with Modified Molecular Signature and Enhanced Neuronal Tropism Leading to High Mortality in Wild Carnivores. **Veterinary Pathology**, v. 49, n.6, p. 913-929, 2012.

QUINN, P. J. *et al.* *Paramyxoviridae*. In: _____. **Microbiologia Veterinária e Doenças Infeciosas**. Porto Alegre: Artmed, 2005, cap. 65, p. 372-379.

REGO, A. *et al.* Cinomose em canídeos e mustelídeos silvestres brasileiros: relato de caso. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, v. 34, n. 3, p. 156-8, 1997.

ROELKE-PARKER, M. E. *et al.* A canine distemper virus epidemic in Serengeti lions (*Panthera leo*). **Nature**, v. 379, n. 6564, p. 441-445, 1996.

SILVA, M. C. *et al.* Neuropatologia da cinomose canina: 70 casos (2005-2008). **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 29, n. 8, p. 643-652, 2009.

SONNE, L. *et al.* Achados patológicos e imuno-histoquímicos em cães infectados naturalmente pelo vírus da cinomose canina. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 29, n. 2, p. 143-149, 2009.

SWANGO, L. J. Moléstias virais caninas. In: ETTINGER, S. J.; FELDMAN, E.C. **Tratado de Medicina Interna Veterinária**. 4ª ed., São Paulo: Manole Ltda, 1997, v. 1, cap. 69, p.573-588.

TIMM, S. F., *et al.* Investigation into the decline of island foxes on Santa Catalina Island. **Institute for Wildlife Studies**, Avalon, California, USA, 2000.

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

VAN DE BILDT, M. *et al.* Distemper outbreak and its effect on African wild dog conservation. **Emerging Infectious Diseases** (Print), v. 8, n. 2, p. 211-213, 2002.

VAN MOLL, P. *et al.* Distemper in wild carnivores: an epidemiological, histological and immunocytochemical study. **Veterinary Microbiology**, v. 44, n. 2, p. 193-199, 1995.

WILLIAMS, Elizabeth S. *et al.* Canine distemper in black-footed ferrets (*Mustela nigripes*) from Wyoming. **Journal of Wildlife Diseases**, v. 24, n. 3, p. 385-398, 1988.

ZACHARY, J. F. Sistema Nervoso. In: MCGAVIN, M. D.; ZACHARY, J. F. **Bases da Patologia em Veterinária**. 4^a ed., Rio de Janeiro: Elsevier, 2009, cap. 14, p.833-971.

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