ANDRESSA FERRARI ARÉVALO

**Susceptibilidade de hamsters frente à infecção pelo herpesvirus
equino tipo 1 causando encefalite e doença respiratória**

São Paulo

2015

ANDRESSA FERRARI ARÉVALO

**Susceptibilidade de hamsters frente à infecção pelo herpesvirus
equino tipo 1 causando encefalite e doença respiratória**

Dissertação apresentada ao Programa de
Pós-Graduação em Patologia
Experimental e Comparada da Faculdade
de Medicina Veterinária e Zootecnia da
Universidade de São Paulo para obtenção
do título de Mestre em Ciências

Departamento:

Patologia

Área de concentração:

Patologia Experimental e Comparada

Orientador:

Prof. Dr. Paulo César Maiorka

São Paulo

2015

Autorizo a reprodução parcial ou total desta obra, para fins acadêmicos, desde que citada a fonte.

DADOS INTERNACIONAIS DE CATALOGAÇÃO-NA-PUBLICAÇÃO

(Biblioteca Virginie Buff D'Ápice da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo)

T.3171
FMVZ

Arévalo, Andressa Ferrari
Susceptibilidade de hamsters frente à infecção pelo herpesvirus equino tipo 1 causando encefalite e doença respiratória / Andressa Ferrari Arévalo. -- 2015.
106 f. : il.

Dissertação (Mestrado) - Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia. Departamento Patologia, São Paulo, 2015.

Programa de Pós-Graduação: Patologia Experimental e Comparada.

Área de concentração: Patologia Experimental e Comparada.

Orientador: Prof. Dr. Paulo César Maiorka.

1. Herpesvírus equino tipo 1. 2. Hamster. 3. Susceptibilidade ao EHV-1. 4. Infecção intranasal. 5. Lavado broncoalveolar. I. Título.

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA

Comissão de Ética no Uso de Animais

CERTIFICADO

Certificamos que o Projeto intitulado "Avaliação da susceptibilidade do modelo experimental em hamsters frente à infecção pelo herpesvírus equino tipo 1", protocolado sob o nº 3101/2013, utilizando 60 (sessenta) hamsters, sob a responsabilidade do(a) Prof. Dr. Paulo Cesar Maiorka, foi aprovado em reunião de 16/10/2013 e está de acordo com os princípios éticos de experimentação animal da Comissão de Ética no Uso de Animais da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo.

We certify that the Research "Evaluation of the experimental model's susceptibility in hamsters infected by equine herpesvirus type 1", protocol number 3101/2013, utilizing 60 (sixty) hamsters, under the responsibility Prof. Dr. Paulo Cesar Maiorka, was approved in the meeting of day 16/10/2013 and agree with Ethical Principles in Animal Research adopted by Ethic Committee in the Use of Animals of the School of Veterinary Medicine and Animal Science of University of São Paulo.

São Paulo, 17 de outubro de 2013.

Alice Maria Melville Paiva Della Libera
Vice-Presidente no exercício

FOLHA DE AVALIAÇÃO

Nome: Arévalo, Andressa Ferrari

Título: Susceptibilidade de hamsters frente à infecção pelo herpesvirus equino tipo 1 causando encefalite e doença respiratória

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Patologia Experimental e Comparada da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestre em Ciências

Data: ____ / ____ / ____

Banca Examinadora

Prof.Dr.: _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof.Dr.: _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof.Dr.: _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

*A Deus por ter me guiado até a
oportunidade do mestrado e por ter me
capacitado durante toda essa jornada.*

*Aos meus pais que me incentivaram e
me apoiaram de todas as formas
possíveis durante essa jornada, sempre
acreditando no meu potencial e nos
resultados do meu esforço.*

*Aos doutores e médicos veterinários
Cláudia M. C. Morí e Enio Morí por
depositarem confiança e credibilidade
em meu desempenho profissional e na
aprendizagem.*

*A eles dedico este trabalho como forma
de representar minha imensa gratidão.*

AGRADECIMENTOS

Primeiramente a Deus por cuidar de mim em todo momento e em cada detalhe, mesmo eu não merecendo tanto amor e graça.

Aos meus pais que tanto amo, **Cecília Maurren** e **Waldir**, por terem me amparado nos momentos difíceis, celebrado comigo nos momentos de conquistas, me aconselhado quando tive dúvidas ou quando estava desanimada, e, por terem abraçado minha causa como se fosse deles.

Aos meus amados três irmãos **Andréa**, **Maressa** e **Ítalo** que, apesar da distância física, sempre estiveram presentes no amor, na preocupação e no cuidado.

Ao **Prof. Dr. Paulo César Maiorka** pelo privilégio de receber sua orientação, ensino e acompanhamento durante o programa de mestrado.

À querida **Profa. Dra. Cláudia Madalena Cabrera Mori**, minha segunda orientadora, pelo acompanhamento do presente trabalho, por me ensinar com excelência diversas técnicas em cada etapa prática e teórica do meu trabalho, sendo responsável por grande parte de todo o processo de amadurecimento que obtive no programa de mestrado me dando apoio, motivação, credibilidade, confiança e sempre me corrigindo quando necessário, além de toda a atenção e amizade.

Ao **Dr. Enio Mori** que, juntamente com a **Profa. Dra Cláudia Madalena Cabrera Mori**, me incentivou e me auxiliou nos estudos para apresentações de congresso e semanas científicas, além de auxílio na elaboração do trabalho durante o programa, e, pela confiança ao entregar o projeto em minhas mãos.

Aos professores de pós-graduação do Departamento de Patologia da FMVZ-USP por separarem parte de seu tempo preparando e ministrando aulas me dando assim a oportunidade de aprender mais com suas experiências e conhecimentos, em especial aos professores **Paulo César Maiorka**, **Claudia Madalena Cabrera Mori**, **Enio Mori**, **Lilian Rose Marques de Sá**, **Cristina de Oliveira Massoco Salles Gomes**, **Antonio José Piantino Ferreira**, **Maria Lucia Zaidan Dagli**, **Bruno Cogliati**, **José Luiz Catão Dias**, **Frederico Azevedo da Costa Pinto**, **Jorge**

Camilo Florio, e, ao excelentíssimo **Prof. Dr. João Palermo Neto** que tive a imensa satisfação e alegria em participar de sua disciplina onde transmitiu todo seu amor e sabedoria pela docência a cada um dos alunos.

Aos coordenadores e supervisores do Programa de Aprendizagem em Docência em patologia animal pelo acompanhamento, ensino e apoio durante todo o semestre letivo, em especial aos professores **Paulo César Maiorka, Bruno Cogliati, Lilian Rose Marques de Sá, Frederico Azevedo da Costa Pinto, José Luiz Catão Dias e Eliana Reiko Matushima**; e, aos técnicos de necropsia **Olívia, Edson e Raimundo** pela atenção, auxílio e carisma durante esse período.

Ao **Prof. Dr Bruno Cogliati** por abrir as portas do Laboratório de Patologia Morfológica e Molecular (LAPMOL) para realização do PCR convencional na fase final do experimento, e, à **Teresa**, funcionária do LAPMOL, pelo auxílio durante o procedimento juntamente com **Dennis Albert Zanatto**.

A todos os funcionários do Departamento de Patologia da FMVZ-USP que colaboraram com a elaboração prática do meu trabalho me dando atenção e auxílio necessários, em especial à **Adriana Margarido, Milena F. de Oliveira, Vagner Gonçalves e Herculano** pela amizade e carisma; e, aos funcionários do Laboratório de Histologia **Luciano Antas Bugalho e Cláudio Arroyo** pela supervisão e auxílio na confecção das lâminas histológicas e por todo conhecimento e cuidado transmitido.

Ao querido **Dennis Albert Zanatto**, responsável técnico de laboratório no Departamento de Patologia da FMVZ-USP, por todo auxílio e companheirismo exercidos durante o período de concretização do meu projeto, sempre me incentivando a superar os desafios e a ser mais perceptiva, surgindo assim, em meio à rotina profissional, um forte laço de amizade.

Aos funcionários do biotério do Departamento de Patologia da FMVZ-USP, em especial **Idalina, Nelsinho, Mauro e Luciana** pelo apoio no cuidado dos hamsters presentes no biotério, e, no preparo e limpeza de gaiolas utilizadas, além de toda atenção e carisma oferecidos.

À querida **Dra. Samantha Miyashiro** pelo treinamento no laboratório de análises clínicas do Hospital Veterinário da FMVZ-USP, além de auxílio à elaboração de tabelas e gráficos relacionados aos resultados dessa parte do experimento e toda a atenção e paciência oferecidas.

Aos funcionários da biblioteca da FMVZ-USP, em especial a **Elza Faquim** pelo auxílio na revisão do presente trabalho dando toda a atenção necessária.

A todos os funcionários do Laboratório de Raiva e Encefalites do Instituto Biológico em especial às doutoras **Elenice Maria Sequetin Cunha, Maria do Carmo Custódio de Souza Hunold Lara e Eliana Cassaro Villalobos** por nos cederem os isolados de HVE-1 do Instituto Biológico, e, pela oportunidade de realização de parte dos experimentos no laboratório, além de ensinar com excelência as técnicas necessárias.

A todos os meus colegas do Departamento de Patologia da FMVZ-USP pela amizade e momentos de descontração proporcionados, em especial aos meus amigos e colegas **Paloma Tonietti, Thais Helena Gamon, Leonardo Mesquita e Vera Lisa Generosa da Silva Paiva** pelo auxílio nas etapas práticas do trabalho, e, por compartilharem dos momentos bons e ruins, sempre me motivando, além de me proporcionarem bons momentos de alegria.

Aos meus queridos professores e doutores **José Guilherme Xavier e Silvia Regina KleeB** por me ensinarem com excelência as bases da análise anatomopatológica durante meu voluntariado no hospital veterinário da UMESP, me dando total apoio quando optei por tentar ingressar no programa de mestrado na FMVZ-USP.

À **Capes (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior)** pela concessão da bolsa de mestrado pelo período de dois anos.

À **Fapesp (Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo)** pela concessão do auxílio à Pesquisa n°.

À **FMVZ-USP** por todas as oportunidades oferecidas aos estudantes.

Finalmente, a todos que de alguma forma colaboraram para que esse trabalho fosse concluído com êxito e para que eu amadurecesse no decorrer dessa jornada.

*“A perseverança pode vencer
qualquer dificuldade”*

Provérbios 25:15 – Bíblia versão NTLH

RESUMO

AREVALO, A. F. **Susceptibilidade de hamsters frente à infecção pelo herpesvirus equino tipo 1 causando encefalite e doença respiratória.** [Susceptibility of hamsters to equine herpesvirus type 1 infection causing encephalitis and respiratory disease]. 2015. 106 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2015.

Este trabalho teve por objetivo avaliar as alterações respiratórias e neurológicas resultantes da infecção por via intranasal das diferentes estirpes nacionais do herpesvírus equino tipo 1 (EHV-1) em hamsters comparando sua susceptibilidade com estudos sobre infecção do EHV-1 em camundongos e equinos. Para isso, hamsters sírios machos, três semanas de idade, foram infectados por via intranasal com as estirpes do EHV-1 obtidas a partir de fetos abortados e potro neonato infectados (A4/72, A9/92, A3/97 e Iso/72). Os animais foram pesados e examinados diariamente em busca de sinais clínicos e neurológicos. Conforme os sintomas neurológicos apareceram, grupos de cinco hamsters foram eutanasiados por *overdose* de isoflurano na primeira etapa do projeto, e, de cetamina/xilazina por via intraperitoneal na segunda etapa. Na necropsia, sistema nervoso central (SNC), pulmão, fígado, baço e timo foram coletados para isolamento viral em cultura de células E-dermal e para análise histopatológica. Na segunda etapa do projeto, a lavagem broncoalveolar (LBA) com 3 ml de PBS por hamsters foi realizada para determinar a resposta inflamatória pulmonar através da contagem total e diferencial de leucócitos. Similar aos experimentos com camundongos, hamsters desafiados com as estirpes virais A4/72 e A9/92 apresentaram manifestações clínicas severas no terceiro dia pós-inoculação (dpi), tais como perda de peso aguda, dispnéia, desidratação, decúbito e morte. Observou-se também sinais neurológicos como hiperexcitabilidade, paralisia, espasmos, perda de propriocepção, andar em círculos e convulsões. Ao contrário dos camundongos, que não desenvolveram a doença; hamsters inoculados com as estirpes virais A3/97 e Iso/72 manifestaram sintomas respiratórios e neurológicos agudos entre quarto e quinto dpi, sendo as alterações respiratórias as mais evidentes, principalmente hemoptise e conjuntivite. O isolamento do vírus a partir do SNC foi positivo em todos os animais infectados; no entanto, todas as amostras de pulmões foram positivas apenas nos grupos infectado

pelas estirpes virais A9/92 e A4/72. Todas as estirpes do EHV-1 foram isoladas a partir do baço, no entanto, a partir do timo foram isoladas apenas as estirpes A9/92 e A4/72, e, de fígado somente a estirpe viral Iso/72 não foi isolada. No LBA, a contagem total de leucócitos não demonstrou diferenças de valores significativas entre os grupos experimentais, sendo apenas evidente a presença de eritrócitos, macrófagos e neutrófilos na maioria dos esfregaços dos hamsters infectados. Porém, na contagem diferencial de leucócitos observou-se um aumento significativo de neutrófilo com consequente diminuição significativa de macrófagos nos hamsters infectados pelas estirpes virais A3/97, Iso/72 e A4/72 quando comparados ao grupo controle. Os hamsters infectados pela estirpe viral A9/92 mantiveram valores próximos aos do grupo controle. Ao avaliar microscopicamente o SNC, fígado e pulmão dos hamsters infectados foi observado infiltrado inflamatório, necrose e manguito perivascular em SNC; leucocitose e necrose no parênquima hepático com discreta pericolangite e proliferação de ducto biliar; e em pulmão observou inflamação, necrose, edema e hemorragia em bronquíolos e alvéolos. Concluindo, os resultados apontaram o hamster como a espécie mais susceptível à infecção pelo EHV-1 servindo como um modelo experimental complementar para estudos de doenças respiratória e neurológica provocadas por este agente em equinos.

Palavras-chave: Herpesvírus equino tipo 1. Hamster. Susceptibilidade ao EHV-1. Infecção intranasal. Lavado broncoalveolar.

ABSTRACT

AREVALO, A. F. **Susceptibility of hamsters to equine herpesvirus type 1 infection causing encephalitis and respiratory disease.** [Susceptibilidade de hamsters frente à infecção pelo herpesvirus equino tipo 1 causando encefalite e doença respiratória]. 2015. 106 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2015.

This study aimed to evaluate the respiratory and neurological disorders resulting from intranasal infection with different national strains of equine herpesvirus type 1 (EHV-1) in hamsters comparing their susceptibility to studies about EHV-1 infection in mice and horses. Therefore, male Syrian hamsters, three weeks of age, were infected via intranasal with EHV-1 strains obtained from aborted fetuses and neonatal foal infected (A4/72, A9/92, A3/97 and Iso/72). The animals were weighed and examined daily for clinical search and neurological signs. As neurological symptoms appeared five hamsters groups were euthanized by isoflurane overdose in the first stage of the project, and ketamine/xylazine via intraperitoneal in the second stage. At necropsy, central nervous system (CNS), lung, liver, spleen and thymus were collected for virus isolation in E-dermal cell culture and histopathological analysis. In the second stage of the project, bronchoalveolar lavage (BAL) with 3 ml of PBS per hamsters was performed to determine the pulmonary inflammatory response through the total and differential leukocyte count. Similar to the experiments with mice, hamsters challenged with viral strains A4/72 and A9/92 had severe clinical manifestations in the third day post-inoculation (dpi), such as acute weight loss, dyspnea, dehydration, recumbency, and death. It was also observed neurological signs such as hyperexcitability, paralysis, spasms, loss of proprioception, circling and convulsions. Unlike mice, which did not develop disease; hamsters inoculated with viral strains A3/97 and Iso/72 showed acute respiratory and neurological symptoms between fourth and fifth dpi, and the most evident respiratory distress was hemoptysis and conjunctivitis. The virus isolation from CNS was positive in all infected animals; however, all lung samples were positive only in groups infected by A9/92 and A4/72 viral strains. All EHV-1 strains were recovered from spleen, however, only A9/92 and A4/72 viral strains were recovered from thymus, but only Iso/72 viral strain was not

recovered from liver. BAL total leukocyte count showed no significant differences in values between the experimental groups but the presence of erythrocytes, macrophages and neutrophils were evident in most smears of infected hamsters. However, in the leukocyte differential count it was observed a significant increase in neutrophils with consequent significant reduction of macrophages in hamsters infected by viral strains A3/97, Iso/72 and A9/92 when compared with the control group. Hamsters infected with the A9/92 viral strain maintained values similar to the control group. When evaluating microscopically the CNS, liver and lungs of infected hamsters it was observed inflammatory infiltrate, necrosis and perivascular cuff in CNS; leukocytosis and necrosis in the liver parenchyma with discrete pericholangitis and bile duct proliferation; and inflammation, necrosis, edema and hemorrhage in the bronchioles and alveoli. Concluding, the results showed the hamster as the most susceptible species to EHV-1 infection serving as a complementary experimental model for studies of respiratory and neurological diseases caused by this agent in horses.

Keywords: Equine herpesvirus type 1. Hamster. Susceptibility to EHV-1. Intranasal route of infection. Bronchoalveolar lavage.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 -	Modelo de diagrama ilustrando (a) os trajetos propostos para o estabelecimento da latência (linhas sólidas) do EHV-1 em gânglio trigeminal (linhas verdes) ou linfócitos (linhas rosas), e (b) potenciais rotas realizadas após reativação do vírus latente (linhas tracejadas) presente em qualquer um desses locais anatômicos.....	23
Figura 2 –	Processo da patogenia do EHV-1 após exposição primária do equino ao agente	25
Figura 3 –	Distribuição geográfica mundial do EHV-1 no primeiro e no segundo semestre de 2014.....	28
Figura 4 -	Sistema de rack ventilada com ventilação individual para cada mini-isolador de polisulfona com cama de maravalha de pinus autoclavada – São Paulo – 2015	41
Figura 5 -	Inoculação por via intranasal com 50µl da suspensão viral do EHV-1 das estirpes A4/72, A9/92, A3/97, ISO/72 ou EMEM. O procedimento foi realizado com o hamster anestesiado dentro de cabine de segurança biológica classe II – São Paulo - 2013	43
Figura 6 -	Técnica de LBA utilizada em hamsters do grupo controle e dos grupos de hamsters infectados pelo EHV-1, após eutanásia – São Paulo – 2014.....	49
Figura 7 -	Demonstração da técnica utilizada para confeccionar as lâminas do LBA, após centrifugação das amostras - São Paulo - 2014	50
Figura 8 -	Fotos representativas dos hamsters infectados pelas estirpes Iso/72 e A3/97 que apresentaram a conjuntivite (esq.) e a hemoptise (dir.) como sintomas mais evidentes – São Paulo – 2013	54
Figura 9 –	Fotos representativas de alterações macroscópicas pulmonares padrão observados no momento da necropsia de hamsters infectados pelas estirpes A4/72 e A9/92 do EHV-1 à esquerda, e, de hamsters infectados pelas estirpes A3/97 e Iso/72 do EHV-1 à direita – São Paulo - 2013.....	58
Figura 10 -	Fotos representativas de alterações macroscópicas gastrointestinais observados no momento da necropsia de hamsters infectados pelas estirpes A4/72 e A9/92 do EHV-1 à	

esquerda, e, de hamsters infectados pelas estirpes A3/97 e Iso/72 do EHV-1 à direita – São Paulo - 2013.....	59
Figura 11 – Fotomicrografia representativa de ECP observado nas estirpes A3/97 e Iso/72 do EHV-1 – São Paulo - 2015.....	61
Figura 12 – Fotomicrografias representativas das principais lesões de parênquima hepático de hamsters do grupo controle e de hamsters infectados pelas estirpes A3/97, Iso/72, A9/92 e A4/72 do EHV-1 – São Paulo - 2015.....	64
Figura 13 – Fotomicrografias representativas das principais lesões encontradas em pulmão de hamsters do grupo controle e de hamsters infectados pelas estirpes A3/97, Iso/72, A9/92 e A4/72 do EHV-1 – São Paulo - 2015.....	66
Figura 14 – Fotomicrografias representativas das principais alterações microscópicas observadas em SNC de hamsters infectados pelas diferentes estirpes do EHV-1 – São Paulo - 2015	68
Figura 15 – Fotomicrografias representativas das principais alterações observadas em SNC de hamsters infectados pelas diferentes estirpes do EHV-1 – São Paulo - 2015.....	70
Figura 16 - Fotomicrografias representativas das principais lesões vasculares observadas em fígado de hamsters infectados pelas estirpes Iso/72, A9/92 e A4/72 do EHV-1 e a presença de vacúolos observados no fígado de todos os hamsters do grupo controle e dos grupos infectados pelas diferentes estirpes do EHV-1 – São Paulo - 2015	72
Figura 17 - Fotomicrografias representativas de esfregaço do LBA de hamsters infectados pelas estirpes A3/97, Iso/72, A9/92 e A4/72 do EHV-1 e hamsters não infectados, corados pelo método de Rosenfeld – São Paulo – 2015.....	75

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 -	Análise de sintomas observados durante período pós-inoculação intranasal do EHV-1	57
Tabela 2 -	Isolamento viral em cultivo de células E-dermal das amostras de Sistema Nervoso Central (SNC), pulmões, fígado, timo e baço de hamsters infectados com as estirpes A3/97, Iso/72, A9/92 e A4/72 do EHV-1	60
Tabela 3 -	Média e desvio padrão da contagem de leucócitos total e diferencial no lavado broncoalveolar de hamsters do grupo controle e dos grupos experimentais inoculados por via intranasal com o EHV-1. Entre parênteses encontram-se os valores mínimos e máximos observados em cada grupo.....	74

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1 -	Comparação de peso entre os grupos inoculados e o grupo controle desde o dia da inoculação até o momento de eutanásia entre 3º e 4º dpi – São Paulo – 2014	54
Gráfico 2 –	Representação da análise estatística comparando a variação média de peso por dpi dos grupos de animais infectados com o grupo controle até o momento da eutanásia, entre 3º e 4º dpi – São Paulo - 2015	56
Gráfico 3 –	Comparação da concentração total de leucócitos do LBA entre hamsters infectados pelas estirpes A3/97, Iso/72, A9/92 e A4/72 do EHV-1 e hamsters não infectados – São Paulo - 2015	76
Gráfico 4 -	Comparação da porcentagem de linfócitos do LBA entre hamsters infectados pelas estirpes A3/97, Iso/72, A9/92 e A4/72 do EHV-1 e hamsters não infectados – São Paulo - 2015	77
Gráfico 5 -	Comparação da porcentagem de neutrófilos do LBA entre hamsters infectados pelas estirpes A3/97, Iso/72, A9/92 e A4/72 do EHV-1 e hamsters não infectados – São Paulo - 2015	78
Gráfico 6 -	Comparação da porcentagem de macrófagos do LBA entre hamsters infectados pelas estirpes A3/97, Iso/72, A9/92 e A4/72 do EHV-1 e hamsters não infectados – São Paulo - 2015	79

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	19
1. 1	REVISÃO DE LITERATURA	22
1.1.1	Herpesvírus equino tipo 1	22
1.1.2	Histórico de estudo do EHV-1 em camundongos e hamsters	29
2.	OBJETIVOS.....	37
2.1	OBJETIVO GERAL	38
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	38
3	MATERIAIS E MÉTODOS	39
3.1	VÍRUS	40
3.2	ANIMAIS	40
3.3	INOCULAÇÃO INTRANASAL DO EHV-1	42
3.4	ISOLAMENTO E IDENTIFICAÇÃO VIRAL	43
3.4.1	Reação em cadeia da polimerase	44
3.5	EXAME HISTOPATOLÓGICO	47
3.6	EXAME CITOLÓGICO DO LAVADO BRONCOALVEOLAR	48
3.7	ANÁLISE ESTATÍSTICA	51
4	RESULTADOS	52
4.1	SINAIS CLÍNICOS E ALTERAÇÕES ANATOMOPATOLÓGICAS	53
4.2	ISOLAMENTO E IDENTIFICAÇÃO VIRAL	59
4.2.1	Reação em cadeia da polimerase	62
4.3	EXAME HISTOPATOLÓGICO	62
4.4	EXAME CITOLÓGICO DO LAVADO BRONCOALVEOLAR	73
5	DISCUSSÃO	80
6	CONCLUSÕES	93
	REFERÊNCIAS	95

INTRODUÇÃO

1 INTRODUÇÃO

O herpesvírus equino tipo 1 (EHV-1) é um importante patógeno de distribuição cosmopolita capaz de ocasionar perdas significativas sob o ponto de vista econômico aos plantéis, fato que torna esse agente uma ameaça potencial à criação mundial de equinos. O EHV-1 tem sido identificado como causador de diferentes formas de doença em cavalos, das quais as mais comuns são: a rinopneumonite, caracterizada por manifestações respiratórias no trato superior em animais jovens; o abortamento a vírus, responsável pelo abortamento em éguas no terço final da gestação (entre o 8º e o 11º meses), mortalidade perinatal em potros e a mieloencefalopatia herpética equina (EHM), caracterizada por manifestações neurológicas em cavalos adultos (MORI, 2005).

Acredita-se que quase todas as estirpes do EHV-1 podem induzir o aborto em éguas prenhes e apenas algumas estirpes têm o potencial de causar a EHM (NUGENT et al., 2006). A EHM é menos comum do que as outras formas de doença determinadas pelo EHV-1; entretanto, recentemente surtos de manifestações neurológicas têm sido relatados com maior frequência na América do Norte e Europa, resultando na classificação do EHV-1 como causador de doença potencialmente emergente pelo Ministério da Agricultura dos EUA (VANDEKERCKHOVE et al., 2010).

Desde a década de 50, modelos experimentais em roedores, incluindo o hamster Sírio e os camundongos, têm sido utilizados para o isolamento viral e, posteriormente, para estudos sobre a patogenia da infecção causada pelo EHV-1. Inicialmente, o agente viral foi replicado com êxito somente em hamsters neonatos inoculados por via intraperitoneal com suspensões de fragmentos dos órgãos de fetos equinos abortados, fato esse evidenciado pela observação de corpúsculos de inclusão intranucleares acidofílicos nas células hepáticas desses animais (DOLL; RICHARDS; WALLACE, 1953).

No Brasil, Nilsson e Correa (1966) isolaram pela primeira vez o vírus do aborto eqüino em hamsters lactentes, a partir do fígado de feto equino abortado. O modelo de infecção pelo EHV-1 em hamster também foi utilizado para o estudo de

agentes antivirais (ROLLINSON; WHITE, 1983) e da resposta imune contra o vírus (STOKES et al., 1989; TSUJIMURA et al., 2006).

O modelo murino tem sido amplamente utilizado para o estudo da infecção respiratória, abortamento e doença neurológica causada pelo EHV-1. A disponibilidade de diversas linhagens de camundongos susceptíveis a infecção pelo EHV-1, as semelhanças entre a resposta imune do camundongo e do cavalo e a quantidade de informação disponível sobre características genéticas e biológicas das linhagens de camundongos isogênicos, fez dessa espécie um atrativo modelo animal para a investigação da patogênese e dos mecanismos imunológicos responsáveis pela eliminação do vírus (AWAN; CHONG; FIELD, 1990; GALOSI et al., 2004; MORI, 2012; MORI et al., 2012).

Mori et al. (2012) demonstraram que a inoculação intranasal em camundongos com estirpes neuropatogênicas do EHV-1 resulta em infecção aguda dos pulmões, seguida pela disseminação do vírus para os órgãos viscerais e cérebro causando meningoencefalite fatal.

Paralelamente, vários estudos realizados em camundongos e hamsters inoculados com o EHV-9 foram importantes para evidenciar o surgimento de alterações neurológicas agudas associadas com lesões histopatológicas observadas no SNC desses animais, auxiliando no esclarecimento de aspectos relacionados à patogenia da doença, uma vez que esse vírus possui 95% de similaridade com EHV-1 no sequenciamento de DNA, além de causar manifestações clínicas muito semelhantes (FUKUSHI et al., 1997, 2000; EL-HABASHI et al., 2011; EL-NAHASS et al., 2011).

Hamsters desafiados por via intranasal com o EHV-9 desenvolveram sinais clínicos e neurológicos no 3º dia pós-inoculação (dpi), tais como, acentuada perda de peso, postura arqueada, salivação, hiperexcitabilidade e convulsões. As lesões histopatológicas no SNC consistiram de degeneração dos neurônios, gliose, manguito perivascular e infiltrado inflamatório linfocítico nas meninges (EL-HABASHI et al., 2011; YU et al., 2012).

Tsujimura et al. (2006) demonstraram em estudo de infecção experimental do EHV-1 em hamsters e em camundongos que o hamster seria o modelo animal mais sensível para a avaliação da etiopatogenia da encefalite causada pelo EHV-1.

1. 1 REVISÃO DE LITERATURA

1.1.1 Herpesvírus equino tipo 1

O herpesvírus equino tipo 1 (EHV-1) é um vírus esférico composto por um núcleo formado de uma fita dupla de DNA, um capsídeo icosaédrico, um tegumento e um envelope formado por uma bicamada lipídica da família, e, sua classificação taxonômica segue como pertencente a ordem *Herpesvirales*, família *Herpesviridae*, subfamília *Alphaherpesvirinae* e gênero *Varicellovirus* (KING et al., 2011).

O hospedeiro definitivo do EHV-1 é principalmente o equino, no entanto, esse agente viral também é capaz de infectar outras espécies animais, por exemplo, urso-negros e gazelas, provocando doença neurológica, abortos e morte de neonatos (WOHLSEIN et al., 2011).

A transmissão desse vírus é realizada através de contato direto com secreção nasal de equino infectado por EHV-1, fomites ou aerossóis contaminados, contato direto com feto abortado ou através da placenta (BURROWS, 1970¹ apud ALLEN et al., 2004, p. 837).

A princípio, o EHV-1 estabelece uma infecção do tipo latente de longo período em uma alta porcentagem de animais¹ e durante esse tempo o hospedeiro infectado é normalmente assintomático, embora provoque o aborto em éguas prenhes (ALLEN et al., 2004; ALLEN, 2006). Durante esse período o EHV-1 localiza-se nos tecidos linfóides, em leucócitos de circulação periférica (WELCH et al., 1992; CARVALHO et al., 2000) e no gânglio do nervo trigêmeo (SLATER et al., 1994; BORCHERS; WOLFINGER; LUDWIG, 1999). A reativação dos vírus latentes resulta em excreção viral (Figura 1) por um período de tempo limitado levando à ocorrência da transmissão do patógeno entre os equinos (SMITH et al., 2010).

---

¹ BURROW, R. The general virology of the herpesvirus group. In: BRYANS, J. T.; GERBER, H. (Ed.). **Equine infectious diseases II**. Basel: Karger, 1970. p. 1-12.

Figura 1 - Modelo de diagrama ilustrando (a) os trajetos propostos para o estabelecimento da latência (linhas sólidas) do EHV-1 em gânglio trigeminal (linhas verdes) ou linfócitos (linhas rosas), e (b) potenciais rotas realizadas após reativação do vírus latente (linhas tracejadas) presente em qualquer um desses locais anatômicos

FONTE: (ALLEN et al., 2004)

A patogenia do EHV-1 envolve a replicação dentro das células epiteliais no local inicial da exposição ao vírus, o epitélio respiratório, seguida pelo transporte axonal anterógrado através do núcleo dos nervos sensoriais que inervam a área da infecção cutânea primária, ou através dos neurônios receptores olfativos que encaminham o vírus para o bulbo olfatório e hipocampo, existindo a possibilidade de realizar o percurso no sentido retrógrado, ou, através do gânglio trigeminal. A transmissão do vírus também ocorre diretamente do bulbo olfatório para córtex frontal (FRAMPTON et al., 2005; MORI et al., 2005). Outro percurso também realizado pelo EHV-1 é através do transporte intraleucocitário (Figura 2) uma vez que as estirpes neuropatogênicas possuem tropismo por células endoteliais e infectam leucócitos mononucleares locais que vão para circulação periférica provocando viremia e infectando endotélio de vísceras prosseguindo para infiltração inflamatória no parênquima, e, seguem em direção a vasculatura do SNC onde ocorre transmissão viral do leucócito infectado ao endotélio cerebral (FIELD; AWAN; DE LA FUENTE, 1991; KYDD; HANNANT; MUMFORD, 1996; GOEHRING et al., 2011).

O diagnóstico *ante-mortem* da infecção por EHV-1 em equino é dado através da análise dos sintomas e sinais clínicos junto com testes laboratoriais de isolamento viral e PCR a partir da secreção nasal, isolamento viral e imunofluorescência a partir dos leucócitos de sangue heparinizado, e, sorologia a partir de soro sanguíneo (CRANDELL; DRYSDALE; STEIN, 1979; SLATER; GIBSON; FIELD, 1993; MORI, 2005; MORI et al., 2005; GOEHRING et al., 2006). Com relação ao diagnóstico *post-mortem* de equinos adultos, de potros natimortos e fetos abortados realiza-se análise necroscópica e histológica, além do isolamento e identificação viral a partir de amostras de SNC, pulmão, fígado, baço e timo (DIMOCK; EDWARDS; BRUNER, 1947; LITTLE; THORSEN, 1976; RIMSTAD; EVENSEN, 1993; MOREIRA et al., 1998).

Figura 2 – Processo da patogenia do EHV-1 após exposição primária do equino ao agente

FONTE: Pusterla e Hussey (2014)

Os principais sinais clínicos apresentados pelos equinos podem envolver corrimento nasal seroso a muco-purulento, secreção ocular serosa a muco-purulenta, eventual tosse, linfadenopatia, febre, na doença respiratória provocada pelo EHV-1; aborto geralmente no terço final da gestação ou morte de neonatos na doença do sistema reprodutor; e na doença neurológica os equinos podem apresentar febre, fraqueza, disfunção da vesícula urinária, síndrome da cauda equina, ataxia, disfunção proprioceptiva, convulsão, decúbito e morte (MORI et al., 2003; COSTA et al., 2008; DÉRCOLI et al., 2008; GOEHRING et al., 2010; GRYSPEERDT et al., 2010; WALTER et al., 2013).

Durante avaliação macroscópica de uma necropsia pode ser observada congestão de encéfalo e hemorragia em medula nos casos de doença neurológica; edema, hiperemia e hemorragia multifocal em pulmão em alguns casos de doença respiratória; fígado congesto com aumento de tamanho, e, congestão de alças intestinais tanto em equino adulto como em feto equino abortado (WESTERFIELD; DIMOCK, 1946; THOMSON et al., 1979; STIERSTORFER et al., 2002; MENDES et al., 2008).

As alterações histopatológicas normalmente encontradas no SNC, quando em quadro de doença neurológica provocada pelo EHV-1, são hemorragia perivascular e multifocal, áreas necróticas caracterizadas pela presença de axônios tumefeitos, e, infiltrado intralesional composto por neutrófilos e macrófagos espumosos; tumefação e hiperplasia endotelial, picnose, células endoteliais multinucleadas, eventual edema intramural, marcante edema perivascular, e infiltração perivascular moderada de linfócitos, macrófagos, neutrófilos e raros eosinófilos; e, lesões em medula espinhal são caracterizadas por hemorragia e necrose multifocais (CHARLTON et al., 1976; COSTA et al., 2009; HEERKENS, 2009; MORI et al., 2011).

As alterações microscópicas normalmente visualizadas nos demais órgão consistem de necrose de coagulação focal em baço, principalmente em polpa branca, marcante presença de corpúsculos de inclusão intranucleares e intracitoplasmáticos eosinofílicos nos hepatócitos localizados em torno das áreas de necrose no fígado e tumefação de hepatócitos (TURAN et al., 2012; WALTER et al., 2013); em pulmão visualiza-se infiltração inflamatória mista em parênquima pulmonar, descamação de bronquíolos, corpos de inclusão intranuclear eosinofílicos em células de epitélio bronquiolar, e, áreas de necrose, além de leve espessamento de septo alveolar (SMITH et al., 2000a).

O tratamento para infecção por EHV-1 é mais direcionado para doenças neurológicas, que são muito mais severas que o quadro respiratório, fazendo o uso de antipiréticos para diminuir a febre; anti-inflamatório não-esteroidal para tratar o processo inflamatório da vasculite em SNC; antibióticos para tratar e/ou prevenir infecção secundária em vesícula urinária, sistema respiratório e demais órgãos susceptíveis; uso de anti-herpéticos; fluidoterapia para manutenção da hidratação do animal, além, de alimentar o animal; e fazer uso de laxantes para normalizar a motilidade intestinal (PUSTERLA et al., 2009).

Sabe-se que o EHV-1 é um agente de distribuição cosmopolita, portanto, a Organização Mundial de Sanidade Animal (OIE) tem registrado casos isolados, surtos, epidemia e pandemia relacionados a esse agente viral. Os dados mais recentes registrados pela OIE ocorreram no primeiro e no segundo semestre de 2014 (Figura 3). No Brasil, entre 2005 e 2015, foram notificados casos clínicos de EHV-1 nos estados de São Paulo, Paraná e Paraíba em agosto de 2014, sendo apenas uma notificação por estado. A infecção por EHV-1 também se encontra na lista de doenças notificáveis de 2015.

Figura 3 – Distribuição geográfica mundial do EHV-1 no primeiro e no segundo semestre de 2014

Fonte: <http://www.oie.int/>

Legenda – Sem informação (branco), Nunca relatado (verde claro), Não foi relatado nesse período (verde escuro), Infecção/Epidemia (vermelho escuro), Doença clínica (rosa), Doença limitada a uma ou mais zonas (azul), Infecção/Surto limitado a uma ou mais zonas (cinza), Suspeita da doença não confirmada em uma ou mais zonas (marrom).

1.1.2 Histórico de estudo do EHV-1 em camundongos e hamsters

O primeiro relato de inoculação experimental data de 1932 quando um estudo foi realizado com éguas prenhes, utilizando materiais filtrados oriundos de fetos abortados em diversos surtos de aborto equino com resultados de alterações patológicas nos fetos sugestivas de um agente etiológico viral. Desde então, tentativas de reproduzir a doença em cobaias e camundongos recém-nascidos foram realizadas, porém, todas foram inconclusivas. No entanto, em 1942 ao utilizar hamsters recém-nascidos como modelo animal para a infecção experimental, comprovou-se com análise histopatológica que a infecção em fetos abortados foi reproduzida por essa espécie baseado principalmente nos corpúsculo de inclusão intranucleares presentes em hepatócitos e em células de parênquima pulmonar (ANDERSON; GOODPASTURE, 1942).

No início da década de 50, outro experimento realizado com esse mesmo agente etiológico, o vírus do aborto equino, utilizou a inoculação de suspensões de fragmentos dos órgãos de fetos equinos abortados por via intraperitoneal em hamster neonato e novamente o sucesso foi obtido ao fazer comparação das lesões histopatológicas de fígado e pulmão entre o modelo animal e os fetos equinos abortados (DOLL; RICHARDS; WALLACE, 1953).

Em meados da década de 60, o vírus do aborto equino foi isolado pela primeira vez no Brasil a partir da inoculação intraperitoneal em hamsters lactentes de suspensões de fragmentos dos órgãos de um feto equino de seis meses abortado no estado de São Paulo em 1965. A confirmação da presença do agente viral teve base nos achados clínicos e histopatológicos comparados com dados de literatura, e, exclusão de possível ação de agentes etiológicos bacterianos (NILSSON; CORREA, 1966).

Dentro de nove anos, após o isolamento no Brasil, muitos relatos de doença neurológica em equinos relacionada a esse vírus começaram a ocorrer pelo mundo, e, no final desse período, pesquisadores nos EUA optaram por inocular o vírus do aborto equino por via intracraniana em camundongos de diversas idades, baseados em outros estudos realizados com herpesvírus simplex tipo 1. Esses animais foram capazes de reproduzir a encefalite, no entanto, quanto mais avançada a idade, mais

resistente à doença os camundongos se tornavam, de forma que o vírus provocou morte somente em camundongos neonatos. O mecanismo exato que explica a susceptibilidade dos camundongos neonatos e adultos ao vírus continuou incerto (PLUMMER et al., 1973).

Em 1989, na Inglaterra, o hamster se mostrou eficiente para uso como modelo animal para estudos de resposta imune de indivíduos contra o vírus do aborto equino, que nessa altura já havia recebido a nomenclatura de herpesvírus equino tipo 1. A pesquisa envolveu a inoculação de hamsters adultos com anticorpos monoclonais específicos das glicoproteínas 13, 14 e 17/18 de um vírus subtipo 1 um dia antes dos hamsters serem desafiados pelo EHV-1, o que preveniu a infecção por esse agente, e, um dia depois diminuindo a carga viral no organismo dos hamsters (STOKES et al., 1989).

No ano seguinte, outros pesquisadores realizaram teste de tratamento e prevenção contra o EHV-1 em camundongos que foram capazes de reproduzir a doença do hospedeiro original através da inoculação do vírus por via intranasal. Assim como realizado em hamsters no trabalho citado anteriormente, esses pesquisadores aplicaram um tratamento quimioterápico sobre os camundongos desafiados pelo EHV-1 um dia antes da inoculação viral, o que diminuiu a replicação viral em pulmão e também impediu a viremia, e, um dia depois da inoculação viral, o que alterou a infecção de severa para moderada. Com base nesses resultados, o uso da quimioterapia sobre o hospedeiro original começou a ser um assunto em discussão (AWAN; CHONG; FIELD, 1990).

Três anos depois, o uso do modelo murino em modelo experimental de infecção por EHV-1 possibilitou o estudo da comparação entre uma infecção provocada por uma estirpe íntegra do EHV-1 e uma infecção provocada por uma estirpe mutante deficiente, denominada PR1, com deleção de 879 pares de base na timidina quinase. Nos resultados observou-se que a estirpe mutante do EHV-1 não produziu viremia, apesar de ter apresentado uma titulação alta de vírus em pulmão e conchas nasais, e, produziu um quadro de infecção mais curto que o observado nos camundongos infectados pela estirpe viral íntegra do EHV-1, surgindo assim, a ideia de utilizar a PR1 como vacina em equinos (SLATER; GIBSON; FIELD, 1993).

No mesmo ano, no Japão, um experimento de infecção do EHV-1 com inoculação do vírus por via intranasal também em camundongos mostrou que a linhagem BALB/cA é capaz de se recuperar de uma infecção aguda provocada pelo

EHV-1 produzindo anticorpos contra esse agente. No entanto a linhagem atímica do BALB/cA não mostrou essa capacidade. O vírus utilizado nesse caso foi proveniente de fetos equinos abortados (INAZU et al., 1993).

Em 1995, na Holanda, pesquisadores determinaram um índice de segurança para analisar a patogenicidade do EHV-1 em camundongos através da relação do cálculo de peso após infecção experimental do EHV-1 do 1º ao 6º dpi com a dose viral utilizada. Isso permitiu correlacionar a patogenicidade do EHV-1 em camundongo aos dados sobre patogenicidade em equinos. Outro fato apontado nessa pesquisa é que se deve sempre utilizar a mesma dose em todos os animais, principalmente em estudos de comparação de estirpe viral do EHV-1 porque quanto maior a dose maior a resposta do animal frente à infecção pelo agente viral (VAN WOENSEL et al., 1995).

Dois anos depois, pesquisadores japoneses descobriram uma nova estirpe viral proveniente de uma gazela que morreu por infecção provocada por esse agente. Essa estirpe viral, nessa época denominada herpesvírus de gazela tipo 1, se mostrou semelhante ao EHV-1 tanto no teste sorológico como no sequenciamento de uma região específica de nucleotídeos, no entanto, outros testes realizado demonstraram que ambos não eram o mesmo vírus. Após testes em camundongos, eles observaram que as linhagens CD-1 e BALB/c eram susceptíveis a esse vírus manifestando sintomas neurológicos severos e morte. A partir de então foram iniciados estudos desse agente viral com uso de camundongos para o modelo de infecção experimental (FUKUSHI et al., 1997).

No ano de 1998, foi realizada na Austrália a primeira infecção experimental da estirpe HSV25A do EHV-1 em camundongos por via intranasal e foi observado na fase aguda da doença alguns sinais e sintomas clínicos relacionados ao sistema respiratório como a taquipneia e a conjuntivite; presença de leucocitose por neutrofilia e linfocitose; e, além disso, anticorpos contra o EHV-1 que foram detectados no 7º dpi quando havia se passado 24 horas após o desaparecimento dos sintomas clínicos nos camundongos (WALKER et al., 1998). Nesse mesmo ano, outros pesquisadores australianos prosseguiram para estudo de uma possível vacina através do uso de glicoproteínas recombinantes expressadas pelo Baculovirus ligadas ao EHV-1 com o uso do camundongo no modelo de infecção experimental, e, obtiveram ótimos resultados de comparação entre o grupo infectado vacinado e o grupo infectado não vacinado (PACKIARAJAH et al., 1998).

Ainda em 1998, na Alemanha um estudo sobre a patogênese e a resposta imune *in situ* de camundongos desafiados com a infecção pela estirpe Ab4 do EHV-1 demonstrou que esse modelo animal é capaz de reproduzir o percurso realizado pelo vírus no equino através do bulbo olfatório e do gânglio trigeminal nas primeiras horas após a inoculação do vírus, no entanto, não houve presença de anticorpos específicos para agir contra esse agente viral (BARTELS et al., 2001).

Três anos após a descoberta de um vírus quase idêntico ao EHV-1 obtido a partir da morte de gazelas infectadas por esse agente, pesquisadores do Japão decidiram realizar o modelo de infecção experimental desse vírus, nessa época já identificado como herpesvírus equino tipo 9, em equinos, observando a ocorrência de viremia e também produção de anticorpos contra o EHV-9. Esses resultados foram sugestivos de que o EHV-9 é patogênico também em equinos (TANIGUCHI et al., 2000).

Ainda no ano de 2000, os pesquisadores japoneses iniciaram estudos da susceptibilidade do hamster frente à infecção pelo EHV-9 por diferentes vias de inoculação, e, com base nas manifestações clínicas, alterações histológicas de pulmão e cérebro, além da visualização de corpúsculos de inclusão intranucleares acidofílicos em neurônios degenerados no caso de hamsters inoculados com EHV-9 pela via intranasal, eles concluíram que o hamster seria um ótimo modelo animal para estudos da patogênese e virulência desse novo vírus recém-descoberto (FUKUSHI et al., 2000).

Durante esse período nos EUA foi realizado um trabalho de pesquisa com camundongo avaliando a resposta inflamatória pulmonar principalmente através de lavado broncoalveolar, citometria de fluxo e análise histopatológica de animais infectados pelo EHV-1 e outros inoculados por estirpe atenuada do EHV-1, e, a partir desse estudo, foi possível concluir que há componentes presentes no genoma do EHV-1 que induzem uma resposta de mediadores pró-inflamatórios envolvidos na patogenicidade do agente (SMITH et al., 2000b).

Em 2002 no Japão um trabalho demonstrou que uma estirpe viral do EHV-1 que teve várias passagens no cérebro de um camundongo se tornou capaz de provocar, após inoculação intraperitoneal em camundongos, lesões em SNC e infecção de células neuronais, além de realizar o processo de viremia, infectar macrófagos de baço e pulmão, infectar adipócitos presentes no omento, e, infectar o

endotélio; essa patogenia o vírus não apresentava anteriormente (HASEBE et al., 2002).

Dois anos depois na Argentina, após tentativa de criar um modelo respiratório e um modelo de aborto em camundongos utilizando uma estirpe do EHV-1 isolada a partir de feto equino abortado, os pesquisadores envolvidos observaram que essa estirpe era de baixa-virulência no camundongo uma vez que eles apenas apresentaram apatia e pelos eriçados como sinais clínicos e logo se recuperaram no 3º dpi, sem apresentar sinal neurológico algum, além de ganhar peso constantemente, e, as fêmeas prenhes não abortaram nas diferentes fases da gestação, e, as alterações histológicas de pulmão foram leves. Eles concluíram que mais estudos sobre o genoma dessa estirpe do EHV-1 seriam necessários (GALOSI et al., 2004).

Ainda em 2004 nos EUA, pesquisadores demonstraram através de estudos com estirpes geneticamente alteradas do EHV-1 em camundongo da linhagem CBA que essa linhagem do camundongo é um excelente modelo animal para estudo da doença neurológica provocada pelo EHV-1 em equinos, uma vez que ela foi capaz de reproduzir o padrão de processo inflamatório e lesões observados em SNC do hospedeiro natural (FRAMPTON et al., 2004).

Em 2005 no Brasil, foi realizada pela primeira vez a infecção experimental de camundongos utilizando a via de inoculação intranasal com a estirpe viral A4/72 do EHV-1 presente no país. Os camundongos apresentaram sintomas neurológicos e eventualmente conjuntivite. Esse trabalho abriu portas para pesquisas com as outras estirpes virais brasileiras do EHV-1 (MORI, 2005).

No entanto, em 2006 no Japão, um trabalho demonstrou que a estirpe 89c25p do EHV-1 foi neurovirulenta em hamsters, mas não em camundongos BALB/c. Apesar dessa diferença de susceptibilidade, o modelo murino também auxiliou na pesquisa devido à possível observação da capacidade da estirpe viral atenuada do EHV-1 de induzir a produção de anticorpos nos camundongos infectados (TSUJIMURA et al., 2006).

Três anos depois, na Alemanha, pesquisa de infecção experimental em camundongos BALB/c, por via intranasal de inoculação, demonstrou a disseminação do vírus no SNC através do bulbo olfatório. Outro fato importante é que no modelo murino o vírus se comporta com neurotropismo no SNC, e, possui endoteliotropismo nas vísceras, por exemplo, no pulmão (GOSZTONYI; BORCHERS; LUDWIG, 2009).

Em 2010, um estudo realizado no Japão de infecção experimental em camundongos CBA, com oito estirpes do EHV-1 presentes no país, demonstrou diferenças na patogenicidade de cada uma das estirpes nesse modelo animal, levando a conclusão de que as estirpes virais japonesas apresentam baixa patogenicidade nessa linhagem de camundongo (YU et al., 2010).

Ainda nesse ano, foi realizado um trabalho que desafiou hamsters à infecção pelo EHV-9 pela via de inoculação intranasal para avaliar a neupatogenicidade e o percurso realizado por esse vírus. Os resultados demonstraram que nas primeiras 24 horas após a inoculação do vírus, o agente se replicou no epitélio nasal e nos nervos sensoriais locais. Após 48 horas o vírus já estava infectando o bulbo olfatório e os nervos olfatórios também (EL-HABASHI et al., 2010).

No ano de 2011, no Japão, foram feitos estudos comparando o comportamento do EHV-9 pelas diferentes vias de inoculação viral em hamsters. Na via intraperitoneal de inoculação o vírus foi capaz de se replicar nos nervos abdominais, em porções de medula espinhal, plexo mientérico e, por fim, o cérebro sugerindo um novo percurso de disseminação do vírus através da infecção de macrófagos abdominais que infectariam o plexo mientérico prosseguindo para o cérebro pelos nervos periféricos locais e pela medula espinhal. Assim como na via intraperitoneal de inoculação, as vias oral e ocular também apresentaram lesões no cérebro demonstrando a capacidade do vírus de caminhar até o cérebro através de nervos periféricos no local inicial de infecção além dos nervos olfatórios, no entanto, somente a via nasal teve a presença do EHV-9 em bulbo olfatório (EL-HABASHI et al., 2011; EL-NAHASS et al., 2011).

No ano seguinte, os pesquisadores japoneses fizeram uma comparação da via de inoculação oral do EHV-9 e seus efeitos entre hamsters e camundongos CD-1. Ao final do experimento todos os hamsters, em grau de severidade variado, demonstraram sinais de encefalite e mielite, porém, os camundongos não demonstraram. Apesar de não demonstrar sintomas clínicos, os camundongos desenvolveram inflamação ulcerativa e erosiva na parede de estômago. O EHV-9 foi encontrado em diversos órgãos nos hamsters sendo eles as submucosas oral e lingual, gânglio trigeminal, plexo mientérico, fígado, coração, pulmão, cérebro, medula espinhal e no sangue. A teoria formada do percurso realizado por esse vírus foi a de que ele infectou primeiro o gânglio trigeminal e depois disseminou para outros órgãos (EL-NAHASS et al., 2012).

No mesmo ano, também no Japão, hamsters utilizados como modelo animal em experimento com EHV-1 possibilitaram a observação da característica de um dos mais importantes constituintes do tegumento do EHV-1, o EUL47. A partir da remoção desse componente do vírus e após o uso do mesmo para infectar os hamsters, concluiu-se que o EUL47 tem um papel muito importante na infectividade, morfologia e replicação do EHV-1, de forma que o EHV-1 sem EUL47 se tornou menos virulento em hamsters (YU et al., 2012).

Ainda no ano de 2012, no Brasil foram realizados estudos de infecção experimental com as estirpes brasileiras A4/72, A9/92, e A3/97 do EHV-1 em camundongos utilizando a via de inoculação intranasal. Esse modelo animal permitiu observar nesses estudos que os linfócitos T CD8⁺ exercem um papel fundamental no agravamento das lesões em cérebro, além do fato de os camundongos terem reproduzido lesões histopatológicas similares ao hospedeiro natural (MORI, 2012; MORI et al., 2012).

Em 2013, na Argentina, foi realizado um estudo comparando a estirpe argentina AR8 do EHV-1 com a estirpe japonesa HH1 do EHV-1. Esse estudo observou que ambas as estirpes virais reproduziram lesões semelhantes no camundongo BALB/c, porém, com diferença no tempo de ocorrência dos sintomas e isolamento viral levando à conclusão de que as diversas estirpes do EHV-1 existentes agem de forma semelhante quando utilizado o mesmo padrão de via de inoculação e dose infectante (ZANUZZI et al., 2014).

No mesmo ano, no Japão, através de infecção experimental em camundongos pelo EHV-9, comparou-se a susceptibilidade entre as linhagens BALB/c e BALB/c-nu/nu (atímico) ao agente viral. Os resultados demonstraram que a linhagem BALB/c-nu/nu foi a mais susceptível, no entanto, somente pelo fato de que esses animais levaram mais tempo para se recuperar da infecção pelo EHV-9, e, porque esses animais já apresentaram imunorreatividade nas primeiras 36 horas após a inoculação. Não houve diferença de peso entre as duas linhagens, além do fato de ambas não terem apresentado sintomas clínicos (EL-NAHASS et al., 2014).

Corroborando com estudos realizados anteriormente, um trabalho de infecção pelo EHV-9 em hamsters, por via de inoculação ocular, foi realizado no Japão. Assim como observado em outras vias de inoculação, exceto a intranasal, demonstrou que o EHV-9 além de utilizar o gânglio trigeminal como via de disseminação, ele também

é capaz de usar nervos da face, o oculomotor e o abducente (EL-HABASHI et al., 2013).

Em 2014 um estudo realizado no Brasil relatou que a marcação por imunohistoquímica das estirpes brasileiras A3/97 e Iso/72 do EHV-1, com o anticorpo VMRD, em cérebro de hamsters infectados por essas estirpes virais apresentou menos fundo do que a realizada em camundongos infectados também por essas estirpes virais, restringindo as marcações principalmente em neurônios e células da glia em bulbo olfatório de hamsters infectados pela estirpe viral A3/97, e, em diencéfalo caudal e septo estriado de hamsters infectados pelas estirpes virais Iso/72 (SILVA, 2014).

Por fim, o estudo mais recente publicado no ano de 2015 realizado no Japão demonstrou que a susceptibilidade dos hamsters frente à infecção ao EHV-1 pode estar relacionada ao fato de que esses animais não necessitam da proteína VP22 presente no tegumento do EHV-1 para que o vírus seja patogênico nesse modelo animal (OKADA et al., 2015).

OBJETIVOS

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

O presente projeto tem como objetivo avaliar as alterações respiratórias e neurológicas decorrentes da infecção experimental pelo EHV-1 em hamsters, comparando a sensibilidade desse modelo animal com estudos realizados em camundongos. Para tanto, pretende-se investigar a patogenicidade de diferentes isolados do EHV-1.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- 1) Investigar a susceptibilidade do hamster sírio (*Mesocricetus auratus*) ao EHV-1 em modelo experimental de infecção pelas estirpes virais A4/72, A9/92, A3/97 e Iso/72, utilizando inoculação intranasal do vírus.
- 2) Avaliar a patogenicidade de cada estirpe viral do EHV-1 no hamster observando lesões em cérebro, pulmão e fígado através da técnica histológica convencional com a coloração de hematoxilina e eosina.
- 3) Isolar e identificar as estirpes A4/72, A9/92, A3/97 e Iso/72 do EHV-1 a partir de amostras de SNC, pulmão, fígado, timo e baço através da técnica de isolamento viral e da reação em cadeia da polimerase convencional.
- 4) Analisar a resposta inflamatória pulmonar dos hamsters frente à infecção pelas diferentes estirpes do EHV-1 através de contagem total e diferencial de leucócitos provenientes do lavado broncoalveolar.

MATERIAIS E MÉTODOS

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 VÍRUS

Foram utilizadas quatro estirpes do EHV-1, sendo três estirpes virais (A4/72, Iso/72 e A3/97) obtidas a partir de fetos equinos abortados, e, a estirpe viral A9/92 obtida de um caso de mortalidade perinatal no Brasil (REINER et al., 1972; CUNHA et al., 1993; CARVALHO et al., 2000; Dados não publicados, Laboratório de Raiva e Encefalites, IB, 2010). As estirpes virais A3/97 e Iso/72 foram cultivadas em células E-dermal (CCL-57, ATCC - fibroblastos oriundos da derme de equino) e as estirpes virais A4/72 e A9/92 foram adaptadas em cultura de células VERO (rim de macaco), porém, todas foram mantidas em meio essencial de Eagle (EMEM), e, foram provenientes do Instituto Biológico de São Paulo, São Paulo – SP. A estirpe viral A4/72 foi submetida a vinte e uma passagens *in vitro*, sendo considerada uma estirpe viral com elevado número de passagem em cultivo celular. As estirpes virais A9/92, A3/97 e Iso/72 foram submetidas a seis, cinco e duas passagens, respectivamente, sendo consequentemente classificadas como estirpes virais de baixa passagem. O título de desafio utilizado foi de 10^4 DICT₅₀ (dose infectante em 50% da cultura de tecidos).

3.2 ANIMAIS

Foram utilizados sessenta e quatro hamsters Sírios (*Mesocricetus auratus*), machos, com três semanas de idade, pesando entre 45 e 55 gramas, provenientes do Biotério do Departamento de Patologia da FMVZ/USP.

As condições climáticas e do ambiente foram controladas com temperatura entre 22 e 24°C, umidade relativa do ar entre 40 e 60%, e, fotoperíodo de 12 horas de claro e 12 horas de escuro.

Os alojamentos dos hamsters infectados e controles foram separados, em grupos de 5 animais, em mini-isoladores de polisulfona medindo 20x32x21 cm (42 cm²), com um sistema de rack ventilada com ventilação individual para cada gaiola e filtros hepa na entrada e saída do ar (Figura 4).

A cama utilizada foi a de maravalha de pinus autoclavada, trocada semanalmente. A oferta de água filtrada e autoclavada e ração comercial peletizada (Nuvilab CR1, Nuvital Nutrientes SA., Curitiba, PR) foi ad libitum durante todo o experimento.

As condições de alojamento e manejo dos animais foram de acordo com as normas éticas internacionais, em especial àquelas do National Research Council (NRC) 2010 e o uso de animais aprovado pela comissão de ética no uso de animais (CEUA – FMVZ/USP) sob o número de protocolo 3101/2013.

Figura 4 - Sistema de rack ventilada com ventilação individual para cada mini-isolador de polisulfona com cama de maravalha de pinus autoclavada – São Paulo – 2015

Fonte: Arévalo, A. F. (2015)

3.3 INOCULAÇÃO INTRANASAL DO EHV-1

Os animais foram distribuídos em quatro grupos experimentais e um grupo controle, conforme especificado no quadro 1. Os grupos experimentais infectados com as estirpes A4/72, A9/92, A3/97 e Iso/72 do EHV-1 eram compostos por treze hamsters cada, com exceção do grupo de hamsters infectados pela estirpe viral Iso/72 que era composto por doze animais.

A inoculação foi realizada por via intranasal (Figura 5), sob anestesia inalatória com sevoflurano, com um volume de 50µl de meio EMEM contendo a suspensão de vírus com as diferentes estirpes do EHV-1. Os treze animais do grupo controle foram tratados de forma idêntica aos experimentais e receberam 50µl de meio EMEM por via intranasal. Os hamsters foram avaliados a cada 24 horas até o aparecimento dos sintomas.

Quadro 1 - Delineamento experimental contendo os grupos de hamsters Sírios inoculados por via intranasal com 50µl de suspensão de vírus com as estirpes A4/72, A9/92, A3/97, Iso/72 do EHV-1, na dose infectante de 10^4 DICT50, e o grupo controle inoculado com 50µl de meio EMEM

Grupos inoculados com o EHV-1	Número de hamsters utilizados por grupo	
	Isolamento viral e histopatologia	Citologia do LBA e histopatologia
A4/72	5	8
A9/92	5	8
A3/97	5	8
Iso/72	5	7
Grupo controle	5	8

Figura 5 - Inoculação por via intranasal com 50µl da suspensão viral do EHV-1 das estirpes A4/72, A9/92, A3/97, ISO/72 ou EMEM. O procedimento foi realizado com o hamster anestesiado dentro de cabine de segurança biológica classe II – São Paulo - 2013

Fonte: Arevalo, A. F. (2013)

Os sintomas como apatia, pelos arrepiados, postura arqueada, alterações respiratórias e neurológicas e o peso corpóreo de cada animal foi registrado diariamente. Os animais que apresentaram sintomas graves de encefalite viral, tais como paralisia espástica e convulsões, foram submetidos à eutanásia pela administração de *overdose* de anestésico.

Na primeira etapa do projeto realizou-se eutanásia pela administração de *overdose* de sevoflurano por via inalatória apenas. Após realização da eutanásia foram observadas alterações em cada órgão do animal, com foco em SNC, pulmão, fígado e órgãos linfoides. Esses órgãos foram coletados e processados para realização de isolamento viral e análise histopatológica.

3.4 ISOLAMENTO E IDENTIFICAÇÃO VIRAL

Para confirmar a presença do agente etiológico, o isolamento viral foi realizado em cultivo celular a partir de amostras de tecido dos pulmões, SNC, fígado,

timo e baço, coletados durante a necropsia de cinco hamsters por grupo, conforme descrito por Lara et al. (2008).

As amostras de tecido foram cortadas em fragmentos de 1 mm³ e imediatamente armazenadas a -80°C.

Homogeneizados de tecidos congelados foram preparados por maceração com uso de almofariz e pistilos de cerâmica, e, posteriormente diluídos a 20% peso/volume em EMEM. Os tecidos macerados e diluídos foram transferidos para tubos de centrifugação de 15 ml tipo Falcon. Esses procedimentos foram realizados em cabine de segurança biológica classe II.

Após centrifugação a 1200×g por 10 minutos (centrífuga refrigerada Jouan MR 1822 – Thermo Scientific, São Paulo, SP), o sobrenadante foi coletado e armazenado em microtubos graduados de 2ml. A partir dessa solução, um volume de 300µl foi inoculado em monocamadas de células E-Dermal que depois foram mantidas em estufa de CO₂ a 37°C por 1 hora.

No final do período de adesão, as monocamadas de células foram lavadas, re-alimentadas com 2 mL de EMEM e incubadas a 37°C em uma atmosfera de 5% de CO₂ (Incubadora de CO₂ Forma Scientific 3158 equipada com jaqueta de água – Thermo Scientific, São Paulo, SP).

Os cultivos celulares foram examinados diariamente por sete dias, procurando sinais de efeito citopático (ECP) característico do herpesvírus, ou seja, células arredondadas, aumento da refração, desprendimento de células, presença de agregados citoplasmáticos semelhantes a cachos de uva e formação de sincícios.

3.4.1 Reação em cadeia da polimerase

No intuito de comprovar a ausência das estirpes virais do EHV-1 nos órgãos macerados que foram negativos para o isolamento viral, optou-se por identificar o vírus pela reação em cadeia da polimerase (PCR) convencional. Para isso, coletou-se 750µl de suspensão de cada amostra de isolamento viral negativa, e, utilizou-se 750µl suspensão de amostras fortemente positivas no isolamento viral como controle

positivo para o PCR. Essas amostras foram mantidas sob refrigeração a -20°C para realização da extração do DNA viral.

A primeira etapa realizada na extração do DNA foi a de lise celular adicionando-se 100 µl de tampão de lise tipo 1 e suspendeu-se as células completamente através da homogeneização com a pipeta seguida de homogeneização com Vortex durante 15 segundos (Vortex-genie 2 – Scientific Industries, Nova York, E.U.A.) Adicionou-se 10µl de proteinase K (20 mg/ml) a cada amostra e homogenizou-se novamente no Vortex durante 15 segundos. Depois, as amostras foram incubadas por 15 minutos a 56°C seguido de 2 minutos a 70°C no banho-maria. Após retirar as amostras do banho-maria, elas foram centrifugadas durante 10 segundos a 2000×g (Centrífuga refrigerada universal 320 R – Hettich, Votuporanga, SP).

A segunda etapa realizada foi a remoção de RNA das amostras adicionando-se 5µl de RNase A (20 mg/ml) em cada uma sendo incubadas posteriormente por 15 minutos em temperatura ambiente.

A terceira etapa realizada foi a purificação das amostras adicionando-se 500 µL de tampão de lise tipo 4. Depois, as amostras foram incubadas por 10 minutos à temperatura ambiente. Em seguida, as amostras foram centrifugadas durante 10 segundos a 11000×g. Para cada amostra a ser purificada, preparou-se um recipiente específico para o procedimento colocando-se uma mini coluna para tecido e células dentro de um tubo de coleta. Aplicou-se 700µL de cada amostra centrifugada para cada coluna separada. Centrifugou-se as mini colunas durante 1 minuto a 11000×g. O fluido que passou para o tubo de coleta de cada amostra foi descartado.

A quarta etapa realizada foi a de lavagem das amostras aplicando-se 500 µL de tampão de lise tipo 4 a mini coluna de cada amostra e centrifugou-se por 1 minuto a 11000×g. Em seguida, esvaziou-se os tubos de coleta, aplicou-se 500 µL de tampão de lavagem tipo 6 nas mini colunas e centrifugou-se por 3 minutos a 11000×g. Descartou-se novamente o fluído presente nos tubos de coleta.

A quinta e última etapa do procedimento de extração do DNA foi a de eluição transferindo todas as mini colunas para novos microtubos de 1,5 ml livre de DNase fornecidos pelo fabricante do quite utilizado (Illustra tissue & cells genomic Prep Mini Spin Kit - GE Healthcare, Brasil). Em seguida, adicionou-se 200 µl de tampão de eluição tipo 5 pré-aquecido a 70°C diretamente sobre o centro de cada mini coluna. Depois as mini colunas foram incubadas por 1 minuto à temperatura ambiente.

Posteriormente, centrifugou-se as mini colunas durante 1 minuto a 11000×g para coleta do DNA genômico purificado. A quantidade final de cada amostra foi de 200 µl armazenados sob refrigeração a -20°C para realização da identificação do DNA viral pela PCR convencional.

A identificação dos isolados pela PCR foi realizada com uso de um par de primers específicos (senso 5'AAGAGGAGCACGTGTTGGAT-3' e anti-senso 5'AGTAGGTCAGGCCGATGCTT-3') derivados da sequência da glicoproteína H (gH) da estirpe HVS25A do EHV-1, que amplificam um fragmento de DNA com 287 pares de bases (pb) (VARRASSO et al., 2001).

A reação de amplificação foi realizada em uma mistura de 25 µL contendo 3 µl de amostra de DNA, 2,0 µM de cada primer, 200 µM de cada desoxinucleotídeo (dNTP), 0,5 unidades de Taq DNA polimerase PCR Buffer (LifeTechnologies, Brasil), tampão de PCR 1× (20 mM de Tris HCl, pH 8.4; 50 mM de KCl), 1,5 mM de MgCl₂ e 15,375 µl de água ultra-pura QS.

Para efetuar a amplificação utilizou-se um termociclador (Eppendorf Mastercycler pro - Eppendorf AG, Hamburg, Alemanha) nas seguintes condições: o fragmento de DNA foi inicialmente desnaturado a 95°C por 5 minutos, seguido por 35 ciclos com 30 segundos de desnaturação a 95°C, 30 segundos de anelamento dos primers a 60°C e 1 minuto de extensão a 72°C. Finalmente, a reação foi concluída com uma etapa de extensão final por 5 minutos a 72°C. Os produtos amplificados da PCR foram analisados por eletroforese horizontal (100 Volts por 40 minutos – Horizon® 11.14, Biometra GmbH, Göttingen, Alemanha) em gel de agarose 1,5% corado pelo corante de ácidos nucleicos Blue green loading dye 1 (2 µL de corante para 10 µL de amostra) e visualizados sob luz ultravioleta no fotodocumentador (ChemiDoc™ MP Image Systems – Bio-Rad Laboratórios Brasil Ltda, São Paulo, SP)

Todo o processo de análise por eletroforese horizontal em gel de agarose foi realizado no Laboratório de Patologia Morfológica e Molecular do Departamento de Patologia da FMVZ/USP.

3.5 EXAME HISTOPATOLÓGICO

Fragmentos dos órgãos internos (encéfalo, fígado, pulmão, baço, e timo) de cinco hamsters por grupo foram colhidos e fixados em formol a 10% por 48 horas.

Durante a etapa de coleta para isolamento viral e histopatologia, apenas metade do SNC foi coletado através da secção no plano sagital mediano. Quando realizado o LBA, o SNC foi coletado por inteiro, em seguida, fragmentado em 6 partes por meio da secção coronal.

Posteriormente, fragmentos de aproximadamente 6mm³ dos tecidos fixados em formol foram processados pela desidratação em soluções alcoólicas com concentrações crescentes até o álcool absoluto, diafanização em banhos de xilol, banhos de parafina líquida (Processador automático de tecidos Leica TP 1020 – Leica Biosystems, São Paulo, SP).

Para etapa final do processamento foi realizado inclusão manual dos fragmentos em moldes utilizando parafina fundida (Inclusor manual de tecido Leica EG 1160 – Leica Biosystems, São Paulo, SP). Após resfriamento, os blocos formados foram submetidos à microtomia, sendo produzidas fitas de 5µm de espessura (Micrótomo Leica RM 2245 - Leica Biosystems, São Paulo, SP).

As fitas provenientes dos blocos foram transferidas para banho-maria contendo água a uma temperatura de 40°C onde foram mantidas para sua distensão (Banho histológico digital Leica BHD 1701 - Leica Biosystems, São Paulo, SP).

Logo depois essas fitas foram recuperadas com uso das lâminas de vidro e fixadas nas lâminas através da permanência de 2 horas na estufa a 80°C. Depois as amostras foram reidratadas e coradas por hematoxilina e eosina (HE).

No procedimento de coloração por HE foram realizadas três passagens em xilol dos tecidos fixados nas lâminas de vidro, 10 minutos cada uma. Em seguida proporcionou-se uma reidratação dos tecidos por meio de passagens, com duração de três minutos cada, em soluções alcoólicas com concentrações decrescentes até o álcool 70%.

Logo após três minutos de lavagem em água corrente, realizou-se uma passagem de 7 minutos em hematoxilina, lavou-se o excesso de corante em água corrente e depois foi feita uma rápida passagem em álcool ácido seguida de mais uma lavagem.

O passo seguinte foi deixar as lâminas por 2 minutos na eosina seguida de desidratação em soluções alcoólicas com concentrações crescentes até o álcool absoluto (2-3 minutos cada), 3 minutos de imersão em álcool com xilol e 3 minutos de imersão em xilol diafanizador. Depois as lâminas foram transferidas para outra cuba com xilol para montagem.

Por último, realizou-se a montagem das lâminas com resina para fixar a lâminula sobre o tecido corado na lâmina de vidro.

Todo o procedimento descrito foi realizado segundo protocolo padronizado do Laboratório de Histologia do Departamento de Patologia da FMVZ/USP.

3.6 EXAME CITOLÓGICO DO LAVADO BRONCOALVEOLAR

De acordo com o aparecimento dos sintomas cinco hamsters de cada grupo foram submetidos à eutanásia pela administração de *overdose* de anestésico com uso da associação de xilazina e quetamina por via intraperitoneal, uma vez que anestésico inalatório pode provocar alterações no parênquima pulmonar (EÖRY et al., 2013).

Após eutanásia, foi realizada uma incisão mento-pubiana nos hamsters com rebatimento de pele e musculatura, divulsão com muito cuidado de tecidos adjacentes à traqueia com uso somente de duas pinças anatômicas para não perfurar a cartilagem traqueal até visualização e isolamento do órgão, e, perfuração do diafragma para eliminar a pressão negativa.

Em seguida, uma pinça anatômica de ponta curva foi utilizada com intuito de separar a traqueia dos demais tecidos, deixando espaço para passagem de um fio cirúrgico. Depois de passar o fio, removeu-se a pinça, e, só então, introduziu-se a agulha romba na traqueia, firmando-a com dois nós apertados do fio cirúrgico sobre o órgão, próximo da região de tireoide.

Os pulmões dos hamsters foram lavados duas vezes, através da inserção de uma agulha descartável 22G (0,7 x 25 mm) na traqueia, com prévia remoção do bisel por lixação, acoplada a uma seringa estéril com capacidade de 3 mL para obter o fluido do lavado broncoalveolar (LBA).

Na primeira lavagem utilizou-se alíquotas de 2 mL de tampão fosfato salina (PBS) contendo 0,01UI/ml de heparina sódica e na segunda lavagem alíquotas de 1 mL (Figura 6). Cada alíquota recuperada foi caracterizada segundo sua coloração e turbidez observadas durante a coleta.

Feito a coleta do LBA, as amostras foram acondicionadas em tubos vacutainers secos e mantidas dentro de caixa de isopor com gelo picado até que fossem enviadas ao laboratório logo após o término da coleta de todos os animais.

Em seguida, as amostras foram homogeneizadas manualmente e a contagem total de células do LBA foi realizada em câmara de Neubauer com alíquotas *in natura* do fluído de LBA. As amostras que continham muitas hemácias ou grande número de leucócitos eram diluídas com líquido de Thoma (diluidor de leucócitos preparado no Laboratório Clínico do HOVET – FMVZ/USP) na proporção 1:1, ou seja, 20µl de amostra para 20µl de diluidor.

A etapa seguinte foi centrifugar as amostras a uma velocidade de 40×g por cinco minutos, utilizando-se uma centrífuga para vacutainer (Centrífuga 5702 Eppendorfe - Eppendorf do Brasil Ltda, São Paulo - SP).

Figura 6 - Técnica de LBA utilizada em hamsters do grupo controle e dos grupos de hamsters infectados pelo EHV-1, após eutanásia – São Paulo – 2014

Fonte: Arévalo, A. F. (2013)

Notas: Imagem à esquerda mostrando a introdução de PBS nos pulmões do hamster. Imagem à direita mostrando a recuperação do PBS introduzido com a presença do surfactante (seta) indicando que a coleta foi realizada corretamente.

A partir de 20µL de suspensão celular dessas amostras realizou-se os esfregaços dos materiais em lâminas de vidro (Figura 7). Primeiro colocou-se uma alíquota da amostra a aproximadamente 1,0 cm da extremidade fosca da lâmina de vidro fixa. Apoiando a lâmina de vidro extensora sobre a lâmina fixa formou-se um

ângulo de 45° seguido de um ligeiro movimento para trás até que a lâmina extensora encostasse-se à gota da amostra do LBA permitindo que a gota se difundisse uniformemente ao longo de toda a borda por capilaridade. Logo depois, movimentou-se a lâmina extensora delicadamente para frente de modo que ela carregasse a gota, estendendo-a numa camada delgada e uniforme.

Figura 7 - Demonstração da técnica utilizada para confeccionar as lâminas do LBA, após centrifugação das amostras - São Paulo - 2014

Fonte: <http://www.biomedicinabrasil.com/>

Posteriormente, as lâminas foram coradas pelo método de Rosenfeld, segundo o protocolo do Laboratório Clínico do Departamento de Clínica Médica da FMVZ/USP.

Primeiramente, as lâminas foram posicionadas no suporte específico para coloração e cobriu-se todas as lâminas com 1ml de corante Rosenfeld, uma de cada vez, através do uso de pipetador automático para pipetas de 1 a 100 ml, e aguardou-se o corante agir por 3 minutos.

Em seguida adicionou-se 2 ml de água destilada em cada lâmina e realizou-se a homogeneização através do uso de um bastão de vidro. Após 13 minutos de espera, lavou-se as lâminas com água destilada.

Depois de coradas, as lâminas foram fixadas ao ar e avaliadas ao microscópio ótico (Nikon Alphaphot-2 YS2-H - Nikon do Brasil Ltda., São Paulo, SP) com aumento de 400x, e, empregando-se critérios morfológicos, os resultados da contagem diferencial de leucócitos foram expressos em porcentagem. (Contador

manual - Laboratório de Farmacologia e Toxicologia do Departamento de Patologia FMVZ/USP).

Ao observar variações importantes em animais de um mesmo grupo, viu-se a necessidade de aumentar o número de hamsters por grupo de estirpe inoculada. Portanto, foram adicionados três hamsters por grupo de estirpe viral totalizando oito hamsters por grupo.

Os mesmos procedimentos de LBA e análises citológicas foram empregados nesses animais.

3.7 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Frente à natureza dos resultados obtidos, foi necessário o uso dos seguintes testes estatísticos:

- Análise paramétrica de variância de duas vias (two-way ANOVA) seguida do teste de comparações múltiplas de Sidak empregado para verificar possíveis diferenças entre os pesos avaliados dos quatro grupos de hamsters infectados pelas estirpes do EHV-1 e os pesos avaliados do grupo controle de hamsters desde o dia da inoculação até o dia em que foi realizado eutanásia.

- Análise não paramétrica de Kruskal Wallis seguida do teste de comparações múltiplas de Dunn para comparação de resultados obtidos na contagem total e diferencial de leucócitos no LBA realizado após eutanásia do grupo controle de hamsters e dos quatro grupos de hamsters infectados pelas estirpes do EHV-1.

Em todas as análises a probabilidade de $p < 0,05$ foi considerada capaz de mostrar diferenças significantes.

Os resultados foram analisados no software Graph Pad Prism nas versões 5.0 e 6.0 para Windows 7/8/Vista/XP/2000/NT.

RESULTADOS

4 RESULTADOS

4.1 SINAIS CLÍNICOS E ALTERAÇÕES ANATOMOPATOLÓGICAS

Após avaliação de sintomas e pesagem dos animais de cada grupo até o dia de realização da eutanásia observou-se que os hamsters desafiados com A4/72 e A9/92 apresentaram manifestações clínicas severas no 3º d.p.i., tais como: severa perda de peso (Gráfico 1), pelos arrepiados, apatia, dispnéia, severa desidratação, decúbito e morte. Observaram-se sinais neurológicos também como hiperexcitabilidade, paralisia espástica, perda da propriocepção, andar em círculos, convulsões, ataxia e sialorréia.

Ambos os grupos de hamsters infectados pelas estirpes virais A3/97 e Iso/72 apresentaram sintomas clínicos e neurológicos severos somente entre 4º e 5º dpi, sendo as alterações respiratórias as mais evidentes, por exemplo, a hemoptise (Figura 8). Observou-se também presença de secreção mucopurulenta em mucosa ocular, principalmente nos hamsters infectados pela estirpe viral Iso/72, sugestivo de conjuntivite. Os hamsters infectados por essas estirpes apresentaram desidratação leve.

Gráfico 1 - Comparação de peso entre os grupos inoculados e o grupo controle desde o dia da inoculação até o momento de eutanásia entre 3º e 4º dpi – São Paulo – 2014

Fonte: Arevalo, A. F. (2015)

Figura 8 - Fotos representativas dos hamsters infectados pelas estirpes Iso/72 e A3/97 que apresentaram a conjuntivite (esq.) e a hemoptise (dir.) como sintomas mais evidentes – São Paulo – 2013

Fonte: Arévalo, A. F. (2013)

Embora os hamsters infectados pela estirpe viral Iso/72 tenham mantido o peso entre 3º e 4º dpi com uma média de ganho de peso de 1,4g, os hamsters infectados pela estirpe viral Iso/72 que resistiram até o 5º dpi demonstraram uma perda de peso acentuada de aproximadamente 5,9g entre 4º e 5º dpi. Os hamsters infectados pela estirpe viral A3/97 só apresentaram perda de peso entre 3º e 4º dpi com uma média de aproximadamente 2,0g. E os hamsters infectados pelas estirpes virais A9/92 e A4/72 demonstraram um emagrecimento agudo logo no início entre 1º e 2º dpi com média de perda de peso entre 2,3g e 4,3g e também entre 2º e 3º dpi com média de perda de peso entre 4,0g e 5,8g.

No grupo controle, não foram observados sintomas clínicos e nem alteração de comportamento, além de manterem uma média de ganho de peso aproximada de 2,3g por dia.

Estatisticamente os hamsters infectados com as estirpes virais A3/97 e Iso/72 não demonstraram perda significativa de peso entre 3º e 4º dpi quando comparados com o grupo controle. Os hamsters infectados com as estirpes A4/72 e A9/92 apresentaram perda de peso significativa ($p < 0,001$) quando comparados com o grupo controle e com aqueles infectados com as estirpes A3/97 e Iso/72 do EHV-1 entre 2º e 3º dpi (Gráfico 2). Os hamsters infectados pela estirpe viral Iso/72 que persistiram até o 5º dpi, quando comparados ao grupo controle, demonstraram uma perda de peso significativa ($p < 0,001$)

Gráfico 2 – Representação da análise estatística comparando a variação média de peso por dpi dos grupos de animais infectados com o grupo controle até o momento da eutanásia, entre 3º e 4º dpi – São Paulo - 2015

Fonte: Arévalo, A. F. (2015)

* $p < 0,001$ versus controle

** $p < 0,001$ versus controle, A3/97 e Iso/72

Outros sintomas também foram observados durante o período anterior ao dia da eutanásia. Os hamsters infectados pelo vírus Iso/72 demonstraram alguns sintomas respiratórios e neurológicos no 2º d.p.i., como espirros e tremores (Tabela 1). E os grupos de hamsters infectados pelas estirpes A9/92 e A4/72 também apresentaram alguns sinais clínicos e neurológicos após 48 horas da inoculação como sonolência muito intensa, apatia e postura um pouco arqueada. Quando estimulados, uns começavam a andar em círculos e outros tinham convulsões mioclônicas com curta duração. Além dos sintomas citados, os hamsters infectados pela estirpe viral A4/72 apresentaram alterações respiratórias.

Tabela 1 - Análise de sintomas observados durante período pós-inoculação intranasal do EHV-1

SINTOMAS	A3/97				Iso/72					A9/92			A4/72		
Período pós inoculação	24h	48h	72h	96h	24h	48h	72h	96h	120h	24h	48h	72h	24h	48h	72h
Apatia	0	0	0	2	0	1	0	2	3	0	3	3	0	3	3
Pelos arrepiados	0	0	0	2	0	0	0	2	1	0	1	1	0	0	1
Postura arqueada	0	0	0	1	0	0	0	1	2	0	2	1	0	1	1
Sintomas respiratórios	0	0	0	1	1	0	0	2	2	0	0	2	0	1	1
Sintomas neurológicos	0	0	0	2	0	1	0	2	1	0	2	3	0	2	3

Legenda - Sem sintomas aparentes: 0;

Apatia: 1. leve, 2. moderada (movimenta-se pela gaiola), 3. intensa (permanece encolhido nos cantos da gaiola a maior parte do tempo);

Pelos arrepiados: 1. ao redor do pescoço, 2. ao redor do pescoço e dorso, 3. por todo o corpo;

Postura arqueada: 1. ao sentar, 2. coluna vertebral proeminente ao sentar e caminhar;

Sintomas respiratórios: 1. taquipnéia e dispnéia leves, espirros frequentes; 2. taquipnéia e dispnéia intensas;

Sintomas neurológicos: 1. hiperexcitabilidade, tremor 2. andar em círculos, convulsões tipo clônica, 3. andar em, círculos e convulsões tipo tônico-clônicas

Com relação às alterações anatomopatológicas observadas, os principais órgãos que demonstraram alterações marcantes foram dos tratos respiratório e gastrointestinal. Nos demais órgãos não foram observadas alterações macroscópicas importantes, com exceção de SNC de alguns hamsters infectados pela estirpe A9/92 do EHV-1 que apresentaram congestão e hemorragia difusas de meninge, e, observação de vesícula urinária repleta de urina em todos os grupos de hamsters infectados pelas diferentes estirpes do EHV-1.

Nos hamsters infectados pelas estirpes virais A3/97 e Iso/72, após abertura de cavidade abdominal, o estômago foi encontrado parcialmente congestionado e distendido contendo quantidade variável de alimento digerido. Observou-se também aumento de placas de Peyer. Em seguida, ao abrir cavidade torácica, notou-se o pulmão com hemorragia e edema severos de distribuição difusa (Figura 9).

Figura 9 – Fotos representativas de alterações macroscópicas pulmonares padrão observados no momento da necropsia de hamsters infectados pelas estirpes A4/72 e A9/92 do EHV-1 à esquerda, e, de hamsters infectados pelas estirpes A3/97 e Iso/72 do EHV-1 à direita – São Paulo - 2013

Fonte: Arévalo, A. F. (2013)

No pulmão de hamsters infectados pelas estirpes virais A9/92 e A4/72 observou-se hemorragia petequial e hemorragia multifocal com dimensões maiores. No grupo de hamsters infectados pela estirpe A4/72 do EHV-1, visualizou-se alças intestinais muito congestionadas com aumento importante das placas de Peyer (Figura 10).

Figura 10 - Fotos representativas de alterações macroscópicas gastrointestinais observados no momento da necropsia de hamsters infectados pelas estirpes A4/72 e A9/92 do EHV-1 à esquerda, e, de hamsters infectados pelas estirpes A3/97 e Iso/72 do EHV-1 à direita – São Paulo - 2013

Fonte: Arévalo, A. F. (2013)

À esquerda visualização de alças intestinais bastante congestionadas com placas de Peyer evidenciadas (seta amarela), algumas com aumento de tamanho chegando a medir aproximadamente 0,4 cm de comprimento (cabeça de seta). À direita visualização de dilatação e congestão gástrica, e, placa de Peyer evidenciada (seta preta). Nas duas imagens observa-se a vesícula urinária repleta de urina.

4.2 ISOLAMENTO E IDENTIFICAÇÃO VIRAL

O vírus foi isolado de forma consistente a partir de SNC e vísceras (ou seja, pulmão, fígado, timo e baço) da maioria dos hamsters com sinais neurológicos entre 3º e 4º dpi inoculados com as estirpes nacionais do EHV-1 (Tabela 2). Nos hamsters inoculados com as estirpes virais A3/97 e Iso/72 que apresentaram sinais neurológicos no 4º dpi houve isolamento viral em apenas uma amostra de pulmão de um hamster infectado pela estirpe viral Iso/72, após repetir as provas de isolamento.

Tabela 2 - Isolamento viral em cultivo de células E-dermal das amostras de Sistema Nervoso Central (SNC), pulmões, fígado, timo e baço de hamsters infectados com as estirpes A3/97, Iso/72, A9/92 e A4/72 do EHV-1

Estirpes	SNC	Pulmão	Fígado	Baço	Timo	Dia da Coleta
A3/97	5/5	0/5	4/5	2/5	0/5	4 ^o dpi
Iso/72	5/5	*1/5	0/5	4/5	0/5	4 ^o dpi
A9/92	5/5	5/5	5/5	5/5	1/5	3 ^o dpi
A4/72	5/5	5/5	2/5	3/5	3/5	3 ^o dpi

Fonte: Arevalo, A. F. (2014)

* Amostra positiva somente na segunda realização do isolamento viral

Observou-se ECP com presença de células arredondas ocupando 100% do tapete celular no período entre 48 e 72 horas após a inoculação, em células E-dermal da suspensão dos órgãos macerados (fígado, timo e baço) infectados por A3/97 e Iso/72. As amostras de SNC dessas estirpes apresentaram EC característico de EHV-1 (Figura 11), com a formação de sincícios, agregação de células semelhante a cachos de uva, presença de células arredondadas e gigantes e desprendimento celular. Houve identificação de ECP em apenas uma amostra de pulmão infectado pela estirpe viral Iso/72 após repetição do isolamento viral.

Figura 11 – Fotomicrografia representativa de ECP observado nas estirpes A3/97 e Iso/72 do EHV-1 – São Paulo - 2015

Fonte: Arévalo, A. F. (2015)

Nas amostras infectadas por A9/92, as suspensões de pulmão e SNC apresentaram após 24 horas da inoculação ECP discreto constituído por células arredondadas, pequenas e dispersas por todo o tapete celular com a presença de algumas células gigantes e agregação celular semelhante a cacho de uva, com duração de 48 horas. Depois desse período ocorreu morte celular total. As amostras positivas de fígado, baço e timo apresentaram ECP discreta entre 48 e 72 horas após inoculação.

Nas suspensões infectadas por A4/72 observou-se ECP discreta, 24 horas após inoculação, somente nas amostras de SNC. Passadas 48 a 72 horas da inoculação houve ECP nas amostras de pulmão, fígado, timo e baço.

Ao comparar os resultados finais com as manifestações clínicas apresentadas pelos hamsters infectados, optou-se por repetir o procedimento somente com as amostras de pulmão infectados pelas estirpes A3/97 e Iso/72 do EHV-1. Após repetir o isolamento viral com essas amostras, apenas uma amostra de pulmão de hamster infectado pela estirpe viral Iso/72 apresentou ECP característico do EHV-1.

4.2.1 Reação em cadeia da polimerase

Depois de avaliar os resultados da PCR através do fotodocumentador, observou-se que dentre as amostras negativas do primeiro isolamento viral, apenas uma apresentou a banda específica do EHV-1 similar ao controle positivo da estirpe Iso/72 do EHV-1. Os controles positivos das estirpes virais A9/92 e A4/72 não amplificaram. A amostra que resultou positiva entre as amostras negativas no isolamento viral foi a que apresentou ECP característico do EHV-1 na segunda tentativa de isolamento viral das amostras de pulmões infectados pelas estirpes A3/97 e Iso/72 do EHV-1. Dentre as demais amostras algumas não amplificaram o DNA e outras apresentaram bandas inespecíficas.

4.3 EXAME HISTOPATOLÓGICO

Na análise microscópica do grupo controle não houve demonstração de nenhuma lesão ou alteração significativa no SNC. Já nos pulmões, foram observados vasos sanguíneos congestos e dilatados, espessamento de parede alveolar e hemorragia multifocal leve nos hamsters eutanasiados por *overdose* de sevoflurano.

No fígado observou-se uma distribuição difusa de intensidade moderada de vacúolos redondos, com limite nítido e tamanho variável no interior dos hepatócitos (esteatose microvesicular hepática); uma distribuição difusa de células com citoplasma pálido contendo vacúolos não delimitados, sugestivo de degeneração hidrópica ou degeneração balonosa.

Na análise microscópica do grupo infectado pela estirpe viral A3/97, observou-se no SNC em região de bulbo olfatório a perda de arquitetura tecidual multifocal leve (necrose liquefativa), principalmente em camada mitral, vacuolização difusa moderada (desmielinização) em camada de células granulares, extensões leves de células mononucleares nos espaços de Virchow (manguito perivascular mononuclear), hemorragia multifocal leve em camada mitral, infiltração mononuclear

leve nas camadas glomerular e mitral, e, desorganização celular focal moderada na camada de células granulares ainda íntegras.

O hipocampo apresentou desorganização celular multifocal leve, perda celular focal leve e infiltração mononuclear leve.

Na região da base de encéfalo foram observados necrose liquefativa multifocal leve, infiltrado mononuclear severo nas meninges pia-máter e aracnoide (meningite) e infiltração mononuclear multifocal leve no parênquima, hemorragia e manguito perivascular mononuclear multifocais leves, edema perivascular discreto, e, neurônios sendo fagocitados (neuronofagia) em porção mais cranial da base do encéfalo.

Outras alterações observadas em SNC foram hemorragia discreta em plexo coroide, infiltrado mononuclear leve nos ventrículos cerebrais (ventriculite) e necrose liquefativa focal moderada em epitálamo, e, aumento de padrão vascular em córtex cerebral, além de eventual presença de trombose hialina.

Nos pulmões dos hamsters infectados pela estirpe A3/97 do EHV-1 foram visualizados necrose descamação alveolar e bronquiolar multifocal acentuada com infiltrado predominantemente neutrofílico; necrose de parede de vasos sanguíneos; presença moderada de material amorfo e eosinofílico no interior de alvéolos (edema); hemácias na luz de alguns alvéolos, bronquíolos e em interstício (hemorragia); presença de malhas de fibrina caracterizadas por filamentos eosinofílicos em interstício.

No fígado observou-se infiltrado leve de neutrófilos e células de Kupffer em região de ducto biliar (pericolangite) com proliferação discreta das células do ducto biliar; hepatócitos de citoplasma eosinofílico apresentando cariólise (necrose coagulativa), além de fragmentos citoplasmáticos e hepatócitos tumefeitos com distribuição multifocal e de intensidade moderada em região centrolobular; esteatose microvesicular multifocal leve também em região centrolobular (Figura 12).

As demais alterações observadas em fígados incluem veias centrolobulares e microvasos dilatados, repletos de hemácias com extravasamento discreto de hemácias para o interstício (congestão).

Figura 12 – Fotomicrografias representativas das principais lesões de parênquima hepático de hamsters do grupo controle e de hamsters infectados pelas estirpes A3/97, Iso/72, A9/92 e A4/72 do EHV-1 – São Paulo - 2015

Fonte: Arévalo, A. F. (2015)

- a. Degeneração hidrópica observada no grupo controle de hamsters.
  - b. Necrose de coagulação e tumefação celular leve. Leucocitose (seta). Cariólise (cabeça de seta).
  - c. Proliferação do ducto biliar e vaso congestionado.
  - d. Discreta pericolangite. Ducto biliar (DB).
- Aumento 400x. Escala 20 micrômetros.

Na análise microscópica do grupo infectado pela estirpe viral Iso/72, no SNC observou-se em região de bulbo olfatório necrose liquefativa focalmente extensa e leve nas camadas mitral e das células granulares com infiltrado inflamatório misto nas camadas glomerular e mitral, presença de alguns neurônios de citoplasma fortemente eosinofílico com núcleo picnótico ou cariolítico (degeneração neuronal), desorganização celular multifocal moderada em camada de células granulares, meningite acentuada com infiltrado mononuclear, e, manguito perivascular mononuclear multifocal moderado.

No hipocampo visualizou-se necrose liquefativa multifocal acentuada com hemorragia moderada, presença de hemorragia em tecido íntegro, e, aumento do padrão vascular marcado pela hipertrofia endotelial e proliferação vascular.

Na base do encéfalo observou-se necrose liquefativa multifocal leve, meningite discreta com infiltrado inflamatório misto, e, manguito perivascular mononuclear multifocal discreto.

Alguns indivíduos apresentaram, além das alterações acima descritas, hemorragia leve em submeninge; trombose hialina; dilatação ventricular discreta; infiltrado mononuclear discreto em plexo coroide (coroidite); ventriculite leve com infiltrado mononuclear; e, necrose liquefativa multifocal leve em córtex pré-frontal.

Nos pulmões dos hamsters infectados pela estirpe Iso/72 do EHV-1 foram encontrados necrose multifocal de parede de bronquíolo com debris celulares na luz bronquiolar, septos alveolares com deposição de fibrina, infiltração neutrofílica e necrose multifocais acentuadas; edema e hemorragia moderados em luz alveolar com infiltrado inflamatório misto acentuado, sendo marcante a presença de macrófagos reativos; eventuais células multinucleadas e congestão (Figura 13).

Figura 13 – Fotomicrografias representativas das principais lesões encontradas em pulmão de hamsters do grupo controle e de hamsters infectados pelas estirpes A3/97, Iso/72, A9/92 e A4/72 do EHV-1 – São Paulo - 2015

Fonte: Arévalo, A. F. (2015)

- a. Espessamento de septos alveolares e vasos sanguíneos congestionados.
  - b. Esfoliação e necrose de parede bronquiolar com presença de neutrófilos.
  - c. Esfoliação de parede de bronquíolo com edema e hemácias em luz bronquiolar, além de evidente visualização de macrófago alveolar em meios ao epitélio cúbico simples.
  - d. Edema, hemácias no interior dos sacos alveolares; esfoliação e necrose da parede alveolar, presença de hemorragia e neutrófilos nos septos alveolares
  - e. Infiltrado mononuclear em luz e septo alveolar com destaque para macrófagos alveolares (cabeça de setas). Padrão encontrado somente nos hamsters infectados pela estirpe viral A9/92 do EHV-1.
  - f. Deposição de fibrina observada em septos alveolares e interalveolares.
- Aumento 400x. Escala 20 micrômetros.

No fígado, as alterações observadas foram pericolangite e proliferação das células do ducto biliar multifocais leves; tumefação celular e esteatose multifocais leves em região centrolobular; congestão de veias centrolobulares e microvasos, e, hemorragia focal severa.

Na análise microscópica do grupo infectado pela estirpe viral A9/92, em SNC, o bulbo olfatório apresentou necrose liquefativa multifocal acentuada com desmielinização em camada glomerular, desorganização celular em região de tecido ainda íntegro na camada de células granulares, meningite moderada com infiltrado mononuclear, presença de manguito perivascular mononuclear e infiltração mononuclear moderada nas camadas glomerular e mitral.

No hipocampo observou-se necrose liquefativa multifocal acentuada com hemorragia e vacuolização, desorganização celular nas regiões de tecido ainda íntegro, manguito perivascular mononuclear, edema perivascular, infiltração mononuclear e aumento do padrão vascular.

Na base do encéfalo visualizou-se necrose liquefativa multifocal acentuada com presença de hemorragia e discreta infiltração mononuclear; edema perivascular e aumento do padrão vascular.

Outras alterações em SNC foram eventualmente observadas como a região entre porção caudal da ponte cerebral e início de medula cervical com presença de necrose liquefativa e hemorragia multifocal (Figura 14); visualização de desmielinização de neurônios motores e necrose liquefativa multifocal em substância branca, tálamo e no epitálamo; porção caudal de epitálamo bem congesta; compressão de cerebelo, periventriculite e infiltração inflamatória no endotélio (vasculite), e, trombose hialina.

Figura 14 — Fotomicrografias representativas das principais alterações microscópicas observadas em SNC de hamsters infectados pelas diferentes estirpes do EHV-1 – São Paulo - 2015

Fonte: Arévalo, A. F. (2015)

a. Necrose de liquefação multifocal, mais extensa em canto superior esquerdo da imagem, em córtex cerebral observada em todos os grupos de hamsters infectados.

b. Desorganização celular multifocal moderada observada em hamsters infectados pelas estirpes A3/97 e Iso/72 do EHV-1. Presença de foco de hemorragia leve no centro da camada de células granulares.

c. Meningite moderada observada em todos os grupos de hamsters infectados.

d. Hemorragia multifocal leve com necrose de liquefação multifocal em medula espinhal de hamster infectados pela estirpe viral A9/92 do EHV-1.

Aumento 40x. Escala 200 micrômetros.

Na análise dos pulmões visualizou-se necrose multifocal acentuada de parede de alvéolos, necrose de liquefação moderada de parede de bronquíolos, hemorragia e edema moderados em luz alveolar, descamação leve de parede bronquiolar, congestão vascular acentuada, hemorragia multifocal acentuada nos septos interalveolares com infiltrado inflamatório predominantemente mononuclear. Todas as lesões tinham distribuição multifocal em alguns hamsters e focal em outros.

Na análise do fígado observou-se pericolangite com proliferação das células do ducto biliar multifocal discreta; tumefação celular de hepatócitos focalmente extensa e moderada em região subcapsular e multifocal em região centrolobular; esteatose multifocal discreta em regiões subcapsular e centrolobular; hemorragia moderada multifocal, e, eventual visualização de vasculite.

Na análise microscópica do grupo infectado pela estirpe viral A4/72, no SNC observou-se em região de bulbo olfatório necrose de liquefação difusa acentuada atingindo todas as camadas chegando à perda total dos neurônios, desmielinização difusa acentuada, hemorragia leve multifocal, meningite leve com infiltrado predominantemente mononuclear, infiltração inflamatória mista no parênquima de córtex frontal, hemorragia multifocal, e, manguitos perivasculares mononucleares (Figura 15).

Figura 15 – Fotomicrografias representativas das principais alterações observadas em SNC de hamsters infectados pelas diferentes estirpes do EHV-1 – São Paulo - 2015

Fonte: Arévalo, A. F. (2015)

- a.** Manguito perivascular observado em todos os hamsters infectados pelo EHV-1, com presença de edema perivascular.
  - b.** Neuronofagia com degeneração neuronal observada principalmente em hamsters infectados pela estirpe viral A3/97 do EHV-1.
  - c.** Infiltração inflamatória mista moderada em plexo coroide observada principalmente em hamsters infectados pelas estirpes virais A4/72 e Iso/72 do EHV-1.
  - d.** Formação de trombo hialino, além da presença de manguito perivascular.
- Aumento 400x. Escala 20 micrômetros.

O hipocampo apresentou necrose liquefativa difusa acentuada com infiltração inflamatória mista, vacuolização, manguito perivascular mononuclear e padrão vascular aumentado.

Na base do encéfalo observou-se necrose liquefativa focalmente extensa acentuada, infiltrado inflamatório misto multifocal discreto e hemorragia focal leve; meningite moderada com infiltrado predominantemente mononuclear e manguito perivascular mononuclear leve.

Outras regiões do SNC também apresentaram lesões. Foram observados periventriculite focalmente extensa leve com infiltrado mononuclear; ventriculite difusa com infiltração inflamatória mista; hemorragia e infiltração inflamatória mista multifocal em córtex frontal; presença de coroidite moderada com infiltrado inflamatório misto; infiltrado inflamatório misto e manguito perivascular mononuclear em porção caudal de epitálamo. Eventualmente observou-se trombose hialina.

Alguns hamsters desse grupo de infectados apresentaram alterações distintas no SNC como compressão e dilatação de corpo caloso; necrose de epitálamo (corpúsculo na extremidade da parede de vaso sanguíneo); e, presença de vasculite com infiltrado neutrofílico na parede de vaso sanguíneo.

Na análise dos pulmões observou-se necrose moderada multifocal de parede de alvéolos e bronquíolo com infiltração polimorfonuclear, espessamento moderado de parede alveolar, presença leve de debris celular na luz de bronquíolo, hemorragia e edema multifocais moderados em luz alveolar, e, congestão vascular.

Na análise do fígado observou-se necrose de coagulação com distribuição multifocal em região subcapsular; tumefação celular de hepatócitos multifocal moderada, hemorragia multifocal moderada em regiões centrolobular e periportal; presença de microabscessos e esteatose multifocal discreta em região centrolobular; congestão de veias centrolobulares e microvasos (Figura 16).

Figura 16 - Fotomicrografias representativas das principais lesões vasculares observadas em fígado de hamsters infectados pelas estirpes Iso/72, A9/92 e A4/72 do EHV-1 e a presença de vacúolos observados no fígado de todos os hamsters do grupo controle e dos grupos infectados pelas diferentes estirpes do EHV-1 – São Paulo - 2015

Fonte: Arévalo, A. F. (2015)

- a.** Vasculite leve observada no grupode hamsters infectados pela estirpe A9/92. Neutrófilo (seta de duas cabeças). Célula de Kupffer (cabeça de seta)
- b.** Hemorragia observada nos grupos de hamsters infectados pelas estirpes A9/92, A4/72 e Iso/72 do EHV-1.
- c.** Presença de vacúolos intracitoplasmáticos observados no fígado de todos os hamsters avaliados. Aumento 400x. Escala 20 micrômetros.

4.4 EXAME CITOLÓGICO DO LAVADO BRONCOALVEOLAR

Durante o procedimento de LBA recuperou-se em média 90% dos 3 ml de PBS introduzidos no pulmão dos hamsters infectados pelas diferentes estirpes virais do EHV-1 e 93% dos 3 ml de PBS introduzidos em hamsters não-infectados.

As alíquotas recuperadas do LBA de hamsters não infectados eram incolores e límpidas com presença de substância surfactante, e, as alíquotas recuperadas do LBA de hamsters dos grupos infectados variaram de incolores turvas a rosas turvas e vermelhas claras turvas, todas com substância surfactante.

Em relação à citologia do LBA dos hamsters inoculados com as estirpes virais A4/72, A9/92, A3/97 e Iso/72 do EHV-1 observou-se macrófagos com citoplasma vacuolizado e cromatina frouxa, alguns deles contendo grânulos intracitoplasmáticos. Macrófagos binucleados e eritrofagocitose foram observados em todos os grupos.

Também foram observadas na citologia de hamsters infectados células com citoplasma levemente basofílico, não vacuolizado com núcleos arredondados e de cromatina basofílica densa (macrófagos não ativados).

Além de macrófagos alveolares, a citologia dos hamsters infectados apresentou células polimorfonucleares (neutrófilos), variando de 0 a 68% entre as diferentes estirpes do EHV-1 (Tabela 3). Em menor número visualizou-se células com citoplasma escasso e cromatina muito densa, fortemente basofílica (linfócitos) variando de 0 a 16%; e, a maioria continha quantidade leve a intensa de eritrócitos.

Tabela 3 - Média e desvio padrão da contagem de leucócitos total e diferencial no lavado broncoalveolar de hamsters do grupo controle e dos grupos experimentais inoculados por via intranasal com o EHV-1. Entre parênteses encontram-se os valores mínimos e máximos observados em cada grupo

Estirpes virais	Dia após inoculação	Contagem Diferencial (%)			Contagem Total x10 ³ células/mL
		Macrófago	Neutrófilo	Linfócito	
Controle	3º e 4º dpi	98 ± 3 (90-100)	0,3 ± 0,5 (0-1)	2 ± 4 (0-10)	108 ± 21 (92-145)
A3/97	4º dpi	72 ± 16 (43-86)	21 ± 12 (11-59)	8 ± 7 (0-16)	120 ± 25 (93-152)
A9/92	3º dpi	95 ± 4 (87-100)	2 ± 2 (0-5)	1 ± 2 (0-6)	155 ± 25 (75-128)
ISO/72	4º e 5º dpi	60 ± 24 (31-94)	38 ± 24 (6-68)	2 ± 2 (0-4)	182 ± 83 (55-278)
A4/72	3º dpi	77 ± 15 (62-99)	21 ± 15 (0-37)	2 ± 3 (0-7)	99 ± 32 (53-130)

Nos hamsters infectados pelas estirpes virais A3/97, ISO/72 e A4/72 observou-se um aumento de neutrófilos acompanhado de diminuição de macrófagos alveolares. Porém, nos hamsters infectados pela estirpe A9/92 a presença de neutrófilos foi eventualmente visualizada.

Nos hamsters do grupo controle observou-se apenas macrófagos alveolares de citoplasma vacuolizado com cromatina densa e basofílica (Figura 17), alguns contendo grânulos intracitoplasmáticos; raros linfócitos e eritrócitos. Eventualmente foram observados macrófagos binucleados e macrófagos não ativados.

Estatisticamente não houve variação significativa na contagem total de leucócitos entre o grupo controle e o grupo de hamsters infectados pelas diferentes estirpes do EHV-1. Na comparação entre os grupos de hamsters infectados pelas estirpes A3/97, Iso/72, A9/92 e A4/72 do EHV-1 também não houve variação significativa na contagem total de leucócitos (Gráfico 3).

Figura 17 - Fotomicrografias representativas de esfregaço do LBA de hamsters infectados pelas estirpes A3/97, Iso/72, A9/92 e A4/72 do EHV-1 e hamsters não infectados, corados pelo método de Rosenfeld – São Paulo – 2015

Fonte: Arévalo, A. F. (2015)

- a. Citologia do LBA do grupo de hamsters controle.
- b. Citologia do LBA do grupo de hamsters infectados pela estirpe viral A3/97
- c. Citologia do LBA do grupo de hamsters infectados pela estirpe viral Iso/72.
- d. Citologia do LBA do grupo de hamsters infectados pela estirpe viral A4/72.
- e. Citologia do LBA do grupo de hamsters infectados pela estirpe viral A9/92.
- f. Eritrofagia observada no LBA de hamsters infectados (seta vermelha). Eritrócitos ao fundo no LBA de hamsters infectados. 400x. Escala 20 micrômetros.

Gráfico 3 – Comparação da concentração total de leucócitos do LBA entre hamsters infectados pelas estirpes A3/97, Iso/72, A9/92 e A4/72 do EHV-1 e hamsters não infectados – São Paulo - 2015

Fonte: Arévalo, A. F. (2015)

Com relação à contagem diferencial de leucócitos, as análises estatísticas não demonstraram variações significativas nas porcentagens de macrófago e neutrófilos dos hamsters infectados pela estirpe A9/92 do EHV-1 quando comparadas ao grupo controle e aos grupos de hamsters infectados pelas demais estirpes A3/97, Iso/72 e A4/72 do EHV-1. As porcentagens de linfócitos dos hamsters infectados pelas estirpes do EHV-1 quando comparadas à porcentagem do grupo controle também não foram significativas (Gráfico 4).

Gráfico 4 - Comparação da porcentagem de linfócitos do LBA entre hamsters infectados pelas estirpes A3/97, Iso/72, A9/92 e A4/72 do EHV-1 e hamsters não infectados – São Paulo - 2015

Fonte: Arévalo, A. F.

Na comparação das porcentagens de macrófagos e neutrófilos dos hamsters infectados pelas estirpes A3/97, Iso/72 e A4/72 com os hamsters do grupo controle, estatisticamente o aumento de neutrófilos foi significativo ($p < 0,001$) (Gráfico 5) e a diminuição de macrófagos também foi significativa ($p < 0,002$) (Gráfico 6).

Gráfico 5 - Comparação da porcentagem de neutrófilos do LBA entre hamsters infectados pelas estirpes A3/97, Iso/72, A9/92 e A4/72 do EHV-1 e hamsters não infectados – São Paulo - 2015

Fonte: Arévalo, A. F. (2015)

* $p < 0,001$ versus controle

Gráfico 6 - Comparação da porcentagem de macrófagos do LBA entre hamsters infectados pelas estirpes A3/97, Iso/72, A9/92 e A4/72 do EHV-1 e hamsters não infectados – São Paulo - 2015

Fonte: Arévalo, A. F. (2015)

* $p < 0,002$ versus controle

DISCUSSÃO

5 DISCUSSÃO

Com o propósito de avaliar a sensibilidade do hamster como modelo de estudo da infecção causada pelo EHV-1, os resultados obtidos nesse trabalho foram comparados com dados da literatura sobre a infecção experimental do EHV-1 por diferentes vias de infecção em camundongos e equinos, principalmente a via intranasal de infecção.

Os primeiros relatos de literatura descreveram a utilização de hamsters lactentes para o isolamento do EHV-1; no entanto, esse modelo apresentava como principal problema a prática de canibalismo pela mãe após manuseio e inoculação dos filhotes. Por esse motivo, fez-se a escolha do uso de hamsters recém-desmamados, além do fato de que nessa faixa etária as manifestações clínicas apresentadas por eles são mais evidentes (ANDERSON; GOODPASTURE, 1942; NILSSON; CORREA, 1966).

A via intranasal de inoculação foi utilizada porque estudos observaram que quando comparada com as vias ocular, oral, intraperitoneal e intravenosa, ela é a que melhor reproduz a cinética da infecção em sítio inicial, semelhante ao que ocorre no cavalo, hospedeiro natural do EHV-1 (EL-HABASHI et al., 2010, 2011, 2013; EL-NAHASS et al., 2011, 2012).

Os grupos de hamsters infectados pela estirpe viral A3/97 e Iso/72 apresentaram no 4º dpi quadro respiratório agudo e severo, com presença de hemoptise e conjuntivite mucopurulenta com alguns sintomas neurológicos. Apesar dos hamsters infectados pela estirpe Iso/72 do EHV-1 terem apresentado no 4º dpi sintomas semelhantes aos dos hamsters infectados pela estirpe viral A3/97, alguns animais desse grupo que sobreviveram até o 5º dpi apresentaram os mesmo sintomas de forma mais severa com acentuada perda de peso quando comparado aos hamsters infectados pelas estirpes A4/72, A9/92 e A3/97 do EHV-1. Em apenas 24 horas, entre 4º e 5º dpi, os hamsters infectados pela estirpe viral Iso/72 perderam aproximadamente 10% de seu peso corpóreo, enquanto que os hamsters infectados pelas estirpes virais A4/72 e A9/92 perderam entre 5% e 8% de seu peso corpóreo

entre 2º e 3º dpi, e, os hamsters infectados pela estirpe viral A3/97 perderam aproximadamente apenas 4% de seu peso corpóreo entre 3º e 4º dpi.

No experimento relatado de camundongos infectados pela estirpe A3/97 do EHV-1 por via intranasal não houve manifestações sintomatológicas, com exceção da linhagem BALB/c *nude* que apresentou conjuntivite entre 3º e 4º dpi. Porém, os hamsters desafiados com as estirpes A3/97 apresentaram sinais clínicos no 4º dpi. Já os hamsters inoculados com as estirpes A4/72 e A9/92 manifestaram no 3º dpi sinais clínicos semelhantes aos relatados em camundongos infectados por essas estirpes virais como anorexia, perda severa de peso, desidratação, andar em círculos, postura arqueada, convulsões, ataxia e hiperexcitabilidade em resposta aos estímulos sonoros (MORI, 2005, 2012).

Em outros estudos de infecção experimental do EHV-1 em camundongos BALB/c também relataram a observação de perda de peso acentuada, postura arqueada, pelos eriçados, dispneia, e, ocasionalmente conjuntivite mucopurulenta durante aproximadamente uma semana e, posteriormente, os autores observaram recuperação da doença a partir do 10º dpi (AWAN; CHONG; FIELD, 1990; INAZU et al., 1993; WALKER et al., 1998; BARTELS et al., 2001).

A conjuntivite mucopurulenta reproduzida nos camundongos e nos hamsters foi um dos sintomas observados tanto na infecção experimental em equinos adultos que também apresentaram secreção nasal (CRANDELL; DRYSDALE; STEIN, 1979; SMITH et al., 2000a; MORI et al., 2003, 2009; GOEHRING et al., 2006), quanto em potros livres de patógenos (SLATER; GIBSON; FIELD, 1993). Sintomas neurológicos como a ataxia e a convulsão, que também foram reproduzidos tanto pelo modelo murino (FRAMPTON et al., 2004) quanto pelos hamsters (TSUJIMURA et al., 2006), também foram sintomas neurológicos observados em surtos e casos isolados de infecção em equinos por EHV-1 ocorridos no Canadá, no Brasil e nos Estados Unidos que apresentaram diagnóstico de mieloencefalopatia herpética equina em equinos (THOMSON et al., 1979; DÉRCOLI et al., 2008; COSTA et al., 2009; HEERKENS, 2009) e também em infecção experimental do EHV-1 em equinos (GOEHRING et al., 2010).

Em estudos realizados sobre infecção experimental do EHV-9 por via intranasal e por via oral em camundongos BALB/c, BALB/c *nude* e camundongo ICR – não isogênicos não foram observados sinais clínicos e nem alterações macroscópicas na necropsia desses animais (EL-NAHASS et al., 2012, 2013). No

entanto, a inoculação por via intranasal e por via oral desse mesmo vírus em hamsters, provocou sinais neurológicos como depressão e movimentos descoordenados levando-os a óbito entre 4º e 6º dpi. Também não foram observadas alterações macroscópicas durante a necropsia dos hamsters (FUKUSHI et al., 2000; EL-HABASHI et al., 2010; EL-NAHASS et al., 2012).

Semelhante ao observado nesses estudos de infecção experimental com EHV-9 em camundongos e hamsters, houve uma diferença evidente de susceptibilidade entre camundongos e hamsters a algumas estirpes brasileiras do EHV-1. Os hamsters infectados pelas estirpes virais A3/97 e Iso/72 do EHV-1 apresentaram apatia e descoordenação motora, além de sinais de doença respiratória como a taquipneia e a hemoptise, indo a óbito entre 4º e 5º dpi. Já os camundongos infectados pela estirpe viral A3/97 do EHV-1 não manifestaram sinais e sintomas clínicos (MORI, 2012)

Ao avaliar os dados obtidos durante a necropsia, notou-se que as alterações macroscópicas como edema e hemorragia pulmonar, congestão e hemorragia de meninges em SNC visualizadas na necropsia de camundongos infectados pelas estirpes A4/72 e A9/92 do EHV-1 (MORI, 2012) também foram observadas na necropsia dos hamsters infectados por essas estirpes, entretanto, somente nos hamsters infectados pela estirpe viral A9/92 foi observada a eventual presença de hemorragia e congestão difusa em meninges no SNC.

O padrão de lesão pulmonar encontrados nos hamsters infectados pelas estirpes virais A4/72 e A9/92 foi o de broncopneumonia, enquanto que nos hamsters infectados pelas estirpes virais A3/97 e Iso/72 foi encontrado um padrão de pneumonia intersticial. Provavelmente isso se deve ao fato de as estirpes virais A9/92 e A4/72 possuírem um comportamento mais neurotrópico (MORI, 2012), dessa forma, restringindo a extensão da lesão em pulmão. Já as estirpes A3/97 e Iso/72 devem possuir um comportamento menos neurotrópico e mais endoteliotrópico em vísceras, nesse caso, produzindo lesões mais extensas em pulmão (GOSZTONYI; BORCHERS; LUDWIG, 2009), e, provavelmente, associado a um comportamento mais epiteliotrópico. Pusterla e Hussey (2014) afirmaram em meio a revisão de diversos estudos com o EHV-1 que há variação de patogenicidade entre as diferentes estirpes do EHV-1, e, segundo Nugent et al. (2006) há estirpes do EHV-1 que devido a uma mutação genética pontual são mais propensas a provocar doença neurológica.

Diferentemente do experimento relatado de camundongos infectados pelas estirpes A4/72 e A9/92 do EHV-1 que apresentaram alterações em órgãos linfoides, especificamente aumento de linfonodos mesentéricos e cervicais, esplenomegalia e atrofia do timo (MORI, 2012), os hamsters infectados pela estirpe viral A4/72 demonstraram somente aumento das placas de Peyer, além de congestão das alças intestinais, e, os hamsters infectados pela estirpe viral A9/92 não apresentaram alterações nesses órgãos.

Os camundongos infectados pelas estirpes A3/97 não apresentaram alterações macroscópicas em nenhum órgão (MORI, 2012), diferentemente dos hamsters infectados por essa estirpe viral e dos hamsters infectados pela estirpe viral Iso/72 do EHV-1 que apresentaram pneumonia intersticial, e, também apresentaram dilatação gástrica e evidênciação de placas de Peyer. No entanto, Smith et al., (2000b) relatou em sua pesquisa que camundongos infectados pela estirpe RacL11 do EHV-1 apresentaram um comprometimento de mais de 90% do pulmão com lesões do tipo inflamatórias, assim como os hamsters desafiados pela infecção das estirpes A3/97 e Iso/72 no presente trabalho.

Assim como observado na infecção experimental da estirpe A3/97 do EHV-1 por via intranasal em camundongos, na infecção experimental do EHV-9 por via oral em camundongos não foram observadas alterações macroscópicas em nenhum órgão durante análise da necropsia. E hamsters infectados por EHV-9 pelas diferentes vias (oral, nasal, ocular, peritoneal e intravenosa), apesar de infectados, não apresentaram lesões macroscópicas durante a necropsia, diferente do observado na necropsia de hamsters infectados pelo EHV-1 do presente trabalho (EL-HABASHI et al., 2010; EL-NAHASS et al., 2012, 2013).

Além disso, os hamsters infectados pelas estirpes brasileiras do EHV-1 foram capazes de reproduzir lesões tanto do SNC quanto dos pulmões similares às lesões observadas em necropsia de equinos também infectados pelas estirpes brasileiras do EHV-1, por exemplo, a congestão de encéfalo em equinos que manifestaram um quadro clínico neurológico (DÉRCOLI et al., 2008), e, a pneumonia intersticial em potros que manifestaram um quadro de apatia, desidratação, decúbito e morte (MENDES et al., 2008). A linfadenopatia observada nos camundongos infectados pelas estirpes brasileiras do EHV-1 foi consistente com estudos de infecção experimental do EHV-1 em pôneis que também foram observados linfonodos aumentados *in vivo*, principalmente os linfonodos mandibulares (SMITH et al.,

2000a; GOEHRING et al., 2010; GRYSPEERDT et al., 2010). Já o aumento de linfonodos mesentéricos foi observado em fetos abortados e em potros natimortos infectados pelo EHV-1 que, além disso, apresentaram congestão de algumas regiões do intestino delgado (WESTERFIELD; DIMOCK, 1946), também observado em hamsters infectados pela estirpe A4/72 do EHV-1.

A dilatação gástrica de alguns hamsters infectados pelas estirpes A3/97 e Iso/72 está relacionado ao fato de que a porção aglandular do estômago de hamsters normalmente realiza processo fermentativo durante a digestão (MORI; CHELINI; COUTO, 2009), no entanto, se a motilidade intestinal é afetada, ocorre o acúmulo de gases devido a fermentação constante, e, assim como explicado por Pusterla et al. (2009), o EHV-1 é capaz de afetar a motilidade intestinal no equino o que sugere provável ação do agente sobre a motilidade desses hamsters.

Stierstorfer et al. (2002) relatou a presença de hemorragia petequial em trato respiratório frontal em dois de cinco equinos infectados pelo EHV-1 e que foram necropsiados no Instituto de Patologia Veterinária de Berlin, e, os outros três equinos apresentaram o parênquima pulmonar hiperemico e edemaciado. A hemorragia petequial foi visualizada em pulmão na necropsia de alguns hamsters infectados pelas estirpes virais A9/92 e A4/72 do EHV-1, e às vezes, variou para padrão de hemorragia equimótica coincidindo com achados de necropsia em pulmão de potros natimortos infectados pelo EHV-1 (WESTERFIELD; DIMOCK, 1946).

Apesar de alterações macroscópicas não terem sido observadas em fígado de camundongos e hamsters estudados nos trabalhos já citados, em fetos abortados de equinos e em neonatos equinos que foram a óbito foi observado um aumento de tamanho e congestão no fígado (MENDES et al., 2008; TURAN et al., 2012).

Costa et al. (2008) relataram que durante a necropsia de um equino infectado pelo EHV-1 observaram a presença de lesões petequiais ou hemorrágicas em porção glandular de estômago. Hamsters infectados pelas estirpes A3/97 e Iso/72 do EHV-1 no presente trabalho também apresentaram lesões em estômago, porém, não hemorrágica, mas de congestão e hiperemia, além de dilatação gástrica.

Ao avaliar os resultados obtidos no isolamento viral, observou-se efeito citopático característico do EHV-1 em todos os grupos de órgãos internos (SNC, pulmão, fígado, timo e baço) do 3º dpi de hamsters infectados pelas estirpes virais A9/92 e A4/72. Já nos hamsters infectados pela estirpe viral Iso/72 foi observado efeito citopático em SNC, em baço e em uma amostra de pulmão do 4º dpi. E em

hamsters infectados pela estirpe viral A3/97, foi observado efeito citopático em amostras de SNC, fígado e baço do 4º dpi. Não houve isolamento viral a partir de pulmão do 4º dpi infectado pela estirpe A3/97 do EHV-1.

O isolamento viral a partir de diferentes órgãos provenientes do mesmo animal demonstrou a capacidade das quatro estirpes do EHV-1 de realizar viremia ou através do transporte intraleucocitário via circulação linfática e/ou via circulação sanguínea pela influência do tropismo do EHV-1 por células endoteliais e linfócitos mononucleares (FIELD; AWAN; DE LA FUENTE, 1991; WELCH et al., 1992; CARVALHO et al., 2000; ALLEN, 2006; NUGENT et al., 2006; VANDEKERCKHOVE et al., 2010; GOEHRING et al., 2011).

As amostras de pulmão dos animais dos grupos infectados com as estirpes A3/97 e Iso/72 que foram negativas no 4º dpi no isolamento viral não corresponderam ao quadro clínico e às lesões pulmonares observadas nos hamsters infectados por essas estirpes. Uma provável justificativa, nesse caso, é que o vírus completou o seu ciclo de replicação nos pulmões e migrou para outros tecidos (MORI et al., 2012) deixando apenas as lesões provocadas pelo processo de replicação viral e uma carga viral muito baixa no trato respiratório para ser identificada no isolamento viral. Além disso, algumas pesquisas realizadas com camundongos foram consistentes com essa teoria porque demonstraram que o isolamento viral de algumas estirpes do EHV-1 em pulmão, dependendo da estirpe viral e da dose infectante utilizada, só foi possível entre 2º e 3º dpi, e, depois entre 4º e 5º dpi o vírus já não foi mais isolado a partir do pulmão ocorrendo o chamado "*viral clearance*" (INAZU et al., 1993; SLATER; GIBSON; FIELD, 1993; VAN WOENSEL et al., 1995; WALKER et al., 1998; GALOSI et al., 2004). Esses relatos podem justificar o EHV-1 ter sido isolado em pulmões de hamsters infectados pelas estirpes A9/92 e A4/72 do EHV-1, uma vez que esses foram coletados no 3º dpi; e, não ter sido detectado no isolamento viral e nem no PCR em pulmões de hamsters infectados pelas estirpes A3/97 e Iso/72 do EHV-1 que foram coletados no 4º dpi.

Em outro estudo experimental de infecção do EHV-1 em hamster houve isolamento viral a partir dos pulmões obtidos no 4º dpi, porém, de apenas um hamster do grupo experimental utilizado (STOKES et al., 1989), assim como ocorreu com hamsters infectados pela estirpe Iso/72 no presente trabalho.

O isolamento viral do EHV-1 realizado em estudos com infecção experimental do agente viral em camundongos foi positivo em SNC, pulmão, fígado e baço entre

2º e 3º dpi (AWAN; CHONG; FIELD, 1990; MORI et al., 2012; ZANUZZI et al., 2014). E em equinos o EHV-1 também foi isolado a partir de SNC, pulmão, fígado e baço provenientes de fetos abortados (DIMOCK; EDWARDS; BRUNER, 1947; MORI et al., 2011; TURAN et al., 2012; WALTER et al., 2013). No entanto, em equinos adultos que se recuperaram da infecção pelo EHV-1, o vírus não foi isolado a partir de nenhum órgão (SLATER et al., 1994).

Durante a análise de microscopia ótica observou-se o comportamento neurotrópico com alta neurovirulência das estirpes virais A9/92 e A4/72 do EHV-1 já que no SNC observou-se além de infiltrado inflamatório mononuclear, presença de necrose liquefativa e hemorragia acentuada em diversas regiões como córtex frontal, hipocampo e principalmente em bulbo olfatório que chegou a ser totalmente tomado pela necrose liquefativa. Outro fato importante observado é que no grupo de hamsters infectados pela estirpe viral A9/92 foi observada presença de necrose liquefativa e hemorragia multifocais leves em porção inicial de medula cervical, acidentalmente coletada durante a necropsia, coincidindo com lesão microscópica encontrada em medula espinhal de equino infectado pelo EHV-1 (CHARLTON et al., 1976; STIERSTORFER et al., 2002; HEERKENS, 2009) reproduzindo um padrão de mieloencefalite. Esse achado demonstra que seria importante dar continuidade ao estudo, pesquisando possíveis lesões em medula espinhal de hamsters infectados pelo EHV-1.

Ao contrário do comportamento de alta neurovirulência das estirpes virais A9/92 e A4/72 do EHV-1, as estirpes virais A3/97 e Iso/72 do EHV-1 demonstraram um comportamento neurotrópico com baixa neurovirulência, uma vez que no SNC de hamsters infectados por essas estirpes, observou-se lesões similares às lesões provocadas pelas estirpes virais A9/92 e A4/72, entretanto, de intensidade muito mais leve, sendo mais evidente a presença de meningite, desorganização celular em bulbo olfatório, necrose multifocal em hipocampo, e, processo inflamatório leve.

Ao comparar o presente estudo ao modelo experimental de infecção das estirpes nacionais do EHV-1 por via intranasal em camundongos (MORI, 2012), os hamsters reproduziram as mesmas lesões encontradas em SNC de camundongos infectados pelas estirpes virais A9/92 e A4/72 como manguito perivascular, degeneração neuronal, neuronofagia, necrose e meningite. Ao contrário da neuropatogenicidade observada em hamsters infectados pelas estirpes virais A3/97, essa estirpe viral não foi neuropatogênica em camundongos.

Uma lesão em comum que todos os grupos de hamsters desse trabalho infectados pelas diferentes estirpes virais do EHV-1 apresentaram em SNC na mesma intensidade e distribuição foi o manguito perivascular mononuclear, lesão também observada em estudos de lesões histopatológicas em SNC provocadas pelo EHV-1 em camundongos, além de meningite, meningoencefalite, necrose, degeneração neuronal, neuronofagia, eventuais corpúsculos de inclusão intranuclear em células subepiteliais, infiltrado inflamatório em bulbo olfatório e hemorragia (PLUMMER et al., 1973; FUKUSHI et al., 1997; FRAMPTON et al., 2004; GOSZTONYI; BORCHERS; LUDWIG, 2009; YU et al., 2010).

As lesões histológicas citadas anteriormente em SNC de hamsters e camundongos infectados pelo EHV-1 foram consistentes com lesões de SNC observadas em equinos adultos que foram a óbito apresentando sinais neurológicos, principalmente o manguito perivascular mononuclear, uma vez que essa lesão é a mais evidente e mais frequentemente visualizada no SNC de equinos e demais espécies infectadas, demonstrando ser uma lesão padrão provocada pelo EHV-1 (COSTA et al., 2009; HEERKENS, 2009; MORI et al., 2011; WOHLSEIN et al., 2011).

Na análise microscópica de pulmões, as mesmas lesões provocadas pelas estirpes virais A3/97 e Iso/72 do EHV-1 como necrose de parede alveolar e de parede bronquiolar e hemorragia, também foram observadas nos pulmões infectados pelas estirpes virais A9/92 e A4/72 do EHV-1, porém, com distribuição variando de focal para multifocal, demonstrando o forte tropismo dessas estirpes virais pelo sistema nervoso central resultando em um processo lesional menos expansivo no parênquima pulmonar. A distribuição de lesões em pulmões de hamsters infectados pelas estirpes virais A3/97 e Iso/72 foi muito mais expansiva e agressiva atingindo aproximadamente três quartos da área pulmonar demonstrando um forte tropismo dessas estirpes virais por vísceras resultando em um processo acentuado da doença respiratória.

Em estudos de infecção experimental de diferentes estirpes do EHV-1 realizada em camundongos foi observada a infiltração de células inflamatórias predominantemente mononucleares em meio aos alvéolos, a descamação de epitélio bronquiolar, corpos de inclusão intranuclear eosinofílicos em células de epitélio bronquiolar e áreas de necrose alveolar e bronquiolar, existindo a variação de intensidade das lesões de acordo com o título utilizado (FIELD; AWAN, 1990;

VAN WOENSEL et al., 1995; PACKIARAJAH et al., 1998; GALOSI et al., 2004; YU et al., 2010; MORI, 2012). Comparando esses dados de estudos em camundongos com resultados do presente trabalho, notou-se que as alterações microscópicas observadas no pulmão de ambos os modelos experimentais foram consistentes com lesões pulmonares microscópicas de equinos infectados por EHV-1 (WESTERFIELD; DIMOCK, 1946; RIMSTAD; EVENSEN, 1993; SMITH et al., 2000a).

No fígado de todos os grupos de hamsters infectados foram observadas alterações degenerativas, necrose e infiltrado inflamatório, principalmente em região centrolobular, além de pericolangite leve, variando na intensidade das lesões entre os grupos de estirpes do EHV-1 sendo muito semelhante ao observado em hamsters infectados pela estirpe Rac-H do EHV-1 isolada a partir de um caso de aborto na Polônia (ROLLINSON; WHITE, 1983). Lesões similares a essas, com exceção da pericolangite, foram observadas em fígados de equinos (WESTERFIELD; DIMOCK, 1946; RIMSTAD; EVENSEN, 1993; MOREIRA et al., 1998; TURAN et al., 2012; WALTER et al., 2013). Já em camundongos infectados pelo EHV-1 não houve observação de alteração histológica em fígado (HASEBE et al., 2002; MORI, 2012; ZANUZZI et al., 2014).

Outros estudos de infecção experimental do EHV-1 em hamster também descreveram lesões similares ao do presente trabalho como infiltrado mononuclear em meninge, manguito perivascular, degeneração neuronal e neuronofagia em SNC; congestão e tumefação de hepatócitos em fígado; e, pneumonia intersticial em pulmão (YU et al., 2012; SILVA, 2014).

Em estudos de infecção experimental do EHV-9 em hamster as lesões descritas acima em SNC e em pulmão também foram observadas, além de necrose em parênquima de SNC, e, a distribuição das lesões no SNC (bulbo olfatório, córtex e hipocampo) e grau de severidade foram muito similares com SNC de hamsters infectados pelas estirpes A4/72 e A9/92 do EHV-1 no presente trabalho (FUKUSHI et al., 2000; EL-HABASHI et al., 2010, 2011). Já em camundongos infectados pelo EHV-9 essas lesões severas em fígado, pulmão e SNC foram observadas apenas 6 dias após inoculação viral ao contrário do hamster que apresentaram o mesmo grau de severidade logo entre 3º e 4º dpi (EL-NAHASS et al., 2012, 2013).

No grupo controle de hamsters não infectados pelas estirpes virais do EHV-1 que foram eutanaziados por anestésico inalatório observou-se alterações

microscópicas como espessamento moderado de parede alveolar, vasos sanguíneos congestos e dilatados, e hemorragia multifocal leve em pulmão. Um estudo realizado sobre efeitos de anestesia inalatória em pulmão de camundongos BALB/c e que foram eutanasiados por exsanguinação apontou alterações como o espessamento de septos interalveolares em camundongos anestesiados por isoflurano (EÖRY et al., 2013). As alterações de espessamento de parede alveolar e congestão de vasos sanguíneos também foram observadas em um estudo experimental da ação de anestesia inalatória com sevoflurano em parênquima pulmonar de camundongos suíços normais (AMARAL, 2011). A alteração microscópica de degeneração hidrópica severa encontrada em fígado do grupo controle de hamsters não infectados também foi visualizada em fígado de ratos anestesiados por duas horas com sevoflurano em estudo experimental da ação de desflurano e sevoflurano sobre fígado de ratos em diferentes faixas etárias (ARSLAN et al., 2010). Como a dose e o tempo de exposição do sevoflurano utilizado para eutanaziar os hamsters na primeira etapa do trabalho foi muito maior que a observada nesses estudos, as lesões provocadas pelo anestésico inalatório em pulmão e fígado no grupo controle de hamsters não infectados consequentemente foram mais severas.

A avaliação da resposta inflamatória pulmonar frente à infecção pelo EHV-1 em hamsters através da citologia do LBA foi realizada entre 3º e 5º dpi devido à infecção ser mais aguda e fatal nesse modelo experimental que a infecção experimental observada no hospedeiro definitivo adulto, o equídeo (MORI et al., 2003, 2009; MORI, 2005).

Durante o procedimento da coleta de LBA houve grande dificuldade na recuperação do LBA no grupo de hamsters infectados pela estirpe viral Iso/72 devido à grande quantidade de produção muco provocada pela infecção dificultando o retorno do PBS à seringa. Por esse motivo, esse grupo de hamsters infectados teve um número menor de indivíduos utilizados.

Na contagem total de leucócitos notou-se nos hamsters infectados pelas estirpes virais A3/97, Iso/72 e A4/72 um aumento de leucócitos, discreto a moderado, quando comparado ao grupo controle e ao A9/92 que manteve uma contagem próxima a do grupo controle. O fato dos valores obtidos nas contagens total e diferencial de leucócitos do LBA nos hamsters infectados pela estirpe viral A9/92 serem semelhantes ao do grupo de hamsters controle reflete mais uma vez seu comportamento fortemente neurotrópico. Provavelmente seu primeiro sítio de

replicação foi o epitélio nasal, prosseguindo para bulbo olfatório através do transporte axonal retrógrado nos neurônios receptores olfativos locais (MORI et al., 2005), ao invés de prosseguir para o trato respiratório inferior provocando uma doença pulmonar de resposta inflamatória crônica.

Os resultados da contagem total de leucócitos foram similares ao que Mori et al. (2003) observou em seu experimento de LBA *in vivo* com cinco equinos, com realização de LBA no 2º, 9º, 16º, 23º e 30º dpi, quando a concentração total de leucócitos do LBA de animais infectados pela estirpe viral A4/72 aumentou no 23º d.p.i em comparação com os valores dos mesmo animais em período pré-inoculação. Esses equinos apresentaram um aumento progressivo de neutrófilos somente até o 16º dpi quando ocorreu queda na porcentagem de macrófagos com aumento de linfócitos. E, semelhantemente ao descrito também em outro estudo com cavalos utilizados em infecção experimental do EHV-1 (KYDD; HANNANT; MUMFORD, 1996), os grupos de hamsters infectados obtiveram no LBA um aumento no número de neutrófilos acompanhado de um decréscimo de macrófagos correspondente à fase aguda da doença respiratória provocada pelo agente no 2º dpi da infecção em equinos. Já em estudo de resposta inflamatória pulmonar em camundongos frente à infecção pelo EHV-1 (SMITH, P., et al., 2000), notou-se que assim como no equino (MORI et al., 2003; MORI, 2005), macrófagos e linfócitos estavam em maior porcentagem seguidos por leve aumento na porcentagem de neutrófilos, ao contrário dos hamsters que quase não apresentaram aumento na porcentagem de linfócitos demonstrando ser um processo inflamatório mais agudo em pulmão nesse modelo animal.

Ao observar os resultados obtidos como um todo e os dados da literatura, os hamsters demonstraram a vantagem de serem mais susceptíveis à infecção pelas diferentes estirpes do EHV-1 que o modelo murino, e que o próprio equino, além de mostrar a capacidade de reproduzir quadros respiratórios e neurológicos em um único indivíduo, processo de viremia e todos os eventos mórbidos observados no hospedeiro original, o equino (DOLL; RICHARDS; WALLACE, 1953; LITTLE; THORSEN, 1976; MORI, 2005). Outro fato importante é que os hamsters também se mostraram mais susceptíveis à infecção por EHV-9 do que camundongos e o próprio equino (TANIGUCHI et al., 2000; EL-NAHASS et al., 2012, 2013).

Em comparação com estudos *in vitro*, há controvérsias uma vez que a presença das glicoproteínas I e E do EHV-1 colaboram para que ocorra infecção

desse agente em hamsters e em cultura celular não há influência dessas glicoproteínas para que o EHV-1 se replique (TSUJIMURA et al., 2006). Já a proteína VP22 do EHV-1, é essencial para que o vírus se replique em cultura celular, e, em hamsters já não exerce influência, uma vez que mesmo com a deleção dessa proteína do EHV-1, o vírus ainda exerce virulência sobre os hamsters (OKADA et al., 2015).

No entanto, o hamster segue em desvantagem em relação ao camundongo no fato de que esse modelo animal possui a resposta inflamatória mais semelhante ao do equino (KYDD; HANNANT; MUMFORD, 1996; SMITH et al., 2000a; MORI et al., 2003) e uma grande quantidade de dados históricos e científicos disponíveis para ser abordado, tanto com relação a sua origem quanto em pesquisas. Ao se tratar de hamsters sabe-se muito pouco e existem poucas bases científicas sobre essa espécie.

CONCLUSÕES

6 CONCLUSÕES

Após analisar os resultados obtidos nesse trabalho é possível concluir que:

- 1) Os sintomas e sinais clínicos, além das lesões macroscópicas e histológicas observadas durante o experimento indicaram que o hamster é a espécie mais susceptível frente à infecção causada pelo EHV-1, quando comparada ao modelo murino e ao equino, possibilitando estudos com mais estirpes do EHV-1.
- 2) O hamster foi capaz de reproduzir simultaneamente tanto a doença neurológica quando a doença respiratória provocadas pelo EHV-1 em equídeos, de forma mais severa demonstrando a alta patogenicidade do EHV-1 sobre esse modelo animal.
- 3) O isolamento viral realizado a partir do SNC, pulmão, fígado, timo e baço de hamster foi possível, embora o vírus não tenha sido recuperado de algumas amostras e identificado no PCR.
- 4) A resposta inflamatória pulmonar dos hamsters frente à infecção pelas estirpes A3/97, Iso/72 e A4/72 do EHV-1 foi similar à fase aguda da doença respiratória no equino com aumento de neutrófilos e diminuição de macrófagos, porém, mantendo sempre a porcentagem de macrófagos maior que a de neutrófilos e sua importância no combate ao vírus. Já a estirpe viral A9/92 se mostrou altamente neurotrópica não desenvolvendo resposta inflamatória aguda em pulmão.

REFERÊNCIAS

REFERÊNCIAS

- ALLEN, G. P. Antemortem detection of latent infection with neuropathogenic strains of equine herpesvirus-1 in horses. **American Journal of Veterinary Research**, v. 67, n. 8, p. 1401–1405, ago. 2006. Disponível em: <<http://avmajournals.avma.org/doi/abs/10.2460/ajvr.67.8.1401>>. Acesso em: 16 mar. 2014.
- ALLEN, G. P.; KYDD, J. H.; SLATER, J. D.; SMITH, K. C. Equid herpesvirus 1 (EHV-1) and -4 (EHV-4) infections. In: COETZER, J. A. W.; TUSTIN, R. C. (Ed.). **Infectious Diseases of Livestock**. [s.l: s.n.], 2004, p. 829–859.
- AMARAL, A. F. **Estudo comparativo entre halotano e sevoflurano no parênquima pulmonar de camundongos suíços normais**. Disponível em: <<http://uenf.br/pos-graduacao/ciencia-animal/files/2013/08/Dissertação-Alexandra-Faria-do-Amaral.pdf>>. Acesso em: 10 dez. 2014.
- ANDERSON, K.; GOODPASTURE, E. W. Infection of newborn syrian hamsters with the virus of mare abortion (Dimock and Edwards)*. **The American Journal of Pathology**, 1942.
- ARSLAN, M.; OZKOSE, Z.; AKYOL, G.; BARIT, G. The age- and gender-dependent effects of desflurane and sevoflurane on rat liver. **Experimental and Toxicologic Pathology**, v. 62, n. 1, p. 35–43, jan. 2010. Disponível em: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0940299309000037>>. Acesso em: 17 jan. 2015.
- AWAN, A. R.; CHONG, Y. C.; FIELD, H. J. The pathogenesis of equine herpesvirus type 1 in the mouse: a new model for studying host responses to the infection. **The Journal of General Virology**, v. 71, n. 5, p. 1131–1140, maio 1990.
- BARTELS, T.; STEINBACH, F.; HAHN, G.; LUDWIG, H.; BORCHERS, K. In situ study on the pathogenesis and immune reaction of equine herpesvirus type 1 (EHV-1) infections in mice. **Immunology**, v. 93, n. 3, p. 329–334, 25 dez. 2001. Disponível em: <<http://doi.wiley.com/10.1046/j.1365-2567.1998.00451.x>>. Acesso em: 8 out. 2014.
- BORCHERS, K.; WOLFINGER, U.; LUDWIG, H. Latency-associated transcripts of equine herpesvirus type 4 in trigeminal ganglia of naturally infected horses. **Journal of General Virology**, v. 80, n. 8, p. 2165–2171, 1999.
- CARVALHO, R.; OLIVEIRA, A. M.; SOUZA, A. M.; PASSOS, L. M.; MARTINS, A. S. Prevalence of equine herpesvirus type 1 latency detected by polymerase chain reaction. **Archives of Virology**, v. 145, n. 9, p. 1773–1787, 2000.
- CHARLTON, K. M.; MITCHELL, D.; GIRARD, A.; CORNER, a H. Meningoencephalomyelitis in horses associated with equine herpesvirus 1 infection. **Veterinary Pathology**, v. 13, n. 1, p. 59–68, 1976.

COSTA, E. A.; CESAR, A.; QUARESMA, M. R.; SILVA, M. X.; AMARAL, J. P. Epidemiological and clinical aspects of equine herpesvirus encephalitis infection in horses that died with neurological signs from Minas Gerais state, Brazil. **Brazilian Journal of Veterinarian Research and Animal Science**, v. 46, n. 4, p. 262–272, 2009. Disponível em: <<http://www.revistas.usp.br/bjvras/article/view/26774>>. Acesso em: 29 jun. 2014.

COSTA, E. A.; LIMA, G. B. L.; CASTRO, R. T.; FURTINI, R.; PORTILHO, R. V.; RESENDE, M. Meningoencephalitis in a horse associated with equine herpesvirus 1. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 60, n. 6, p. 1580–1583, dez. 2008. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0102-09352008000600044&lng=en&nrm=iso&tlng=en>. Acesso em: 29 jun. 2014.

CRANDELL, R. A.; DRYSDALE, S.; STEIN, T. L. A comparative study of bovine herpesvirus 1247 and equine herpesvirus 1 in ponies. **Canadian Journal of Comparative Medicine. Revue Canadienne de Médecine Comparée**, v. 43, n. 1, p. 94–7, 1979.

CUNHA, E. M. S.; PEIXOTO, Z. M. P.; KROEFF, S. S.; QUEIROZ, L. H.; KOTAIT, I. Isolamento e identificação do herpesvírus equino tipo 1 (EHV -1): confirmação do diagnóstico clínico. In: REUNIÃO ANUAL DO INSTITUTO BIOLÓGICO, 6, 1993, São Paulo. **Anais...** São Paulo: 1993.

DÉRCOLI, T. E. .; LARA, M. C. C. S. H.; MARIA, P. H. M. R.; CUNHA, E. M. S.; VILLALOBOS, E. M. C.; NASSAR, A. F. C.; AMORIM, R. L. .; FERREIRA, C. L. .; FILHO, J. P. O. .; BRAGA, P. R. C. .; BORGES, A. S. Mieloencefalite eqüina por herpesvírus tipo 1. In: CONFERÊNCIA ANUAL DA ABRAVEQ, 9.; CONGRESSO INTERNACIONAL DE VETERINARIA FEI/CBH, 4., 2008, São Paulo. **Anais...** São Paulo: 2008.

DIMOCK, W. W.; EDWARDS, P. R.; BRUNER, D. W. Infections observed in equine fetuses and foals. **The Cornell Veterinarian**, v. 37, n. 2, p. 88–99, 1947.

DOLL, E. R.; RICHARDS, M. G.; WALLACE, M. E. Adaptation of equine abortion virus to sucking syrian hamsters. **The Cornell Veterinarian**, v. 43, n. 4, p. 551–558, 1953.

EL-HABASHI, N.; EL-NAHASS, E.-S.; FUKUSHI, H.; HIBI, D.; SAKAI, H.; SASSEVILLE, V.; YANAI, T. Experimental intranasal infection of equine herpesvirus 9 (EHV-9) in suckling hamsters: kinetics of viral transmission and inflammation in the nasal cavity and brain. **Journal of Neurovirology**, v. 16, n. 3, p. 242–248, maio 2010. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20500017>>. Acesso em: 27 ago. 2013.

EL-HABASHI, N.; KATO, Y.; EL-NAHASS, E.; FUKUSHI, H.; HIRATA, A.; SAKAI, H.; KIMURA, J.; YANAI, T. An ocular infection model using suckling hamsters inoculated with equine herpesvirus 9 (EHV-9): kinetics of the virus and time-course pathogenesis of EHV-9-induced encephalitis via the eyes. **Veterinary Pathology**, v. 50, n. 1, p. 56–64, 1 jan. 2013. Disponível em:

<<http://vet.sagepub.com/lookup/doi/10.1177/0300985812442691>>. Acesso em: 27 ago. 2014.

EL-HABASHI, N.; MURAKAMI, M.; EL-NAHASS, E.; HIBI, D.; SAKAI, H.; FUKUSHI, H.; SASSEVILLE, V.; YANAI, T. Study on the infectivity of equine herpesvirus 9 (EHV-9) by different routes of inoculation in hamsters. **Veterinary Pathology**, v. 48, n. 3, p. 558–564, 1 maio 2011. Disponível em:

<<http://vet.sagepub.com/lookup/doi/10.1177/0300985810375053>>. Acesso em: 27 ago. 2013.

EL-NAHASS, E.; EL-DAKHLY, K. M.; EL-HABASHI, N.; ANWAR, S. I.; SAKAI, H.; HIRATA, A.; OKADA, A.; ABO-SAKAYA, R.; FUKUSHI, H.; YANAI, T. Susceptibility of BALB/c-nu/nu mice and BALB/c mice to equine herpesvirus 9 infection. **Veterinary Pathology**, v. 51, n. 3, p. 581–590, 1 maio 2014. Disponível em:

<<http://vet.sagepub.com/lookup/doi/10.1177/0300985813493932>>. Acesso em: 27 ago. 2013.

EL-NAHASS, E.; EL-HABASHI, N.; ABDELAZIZ, A. A.; NAYEL, M.; KASEM, S.; FUKUSHI, H.; TUJI, H.; HIRATA, A.; SAKAI, H.; YANAI, T. Kinetics and pathogenicity of oral infection by equine herpesvirus-9 in mice and suckling hamsters. **Journal of Comparative Pathology**, v. 146, n. 2-3, p. 211–222, fev. 2012. Disponível em:

<<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0021997511000879>>. Acesso em: 27 ago. 2013.

EL-NAHASS, E.; EL-HABASHI, N.; NAYEL, M.; KASEM, S.; FUKUSHI, H.; SUZUKI, Y.; HIRATA, A.; SAKAI, H.; YANAI, T. Kinetics and pathogenicity of equine herpesvirus-9 infection following intraperitoneal inoculation in hamsters. **Journal of Comparative Pathology**, v. 145, n. 2-3, p. 271–281, 2011. Disponível em:

<<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21459386>>. Acesso em: 27 ago. 2013.

EÖRY, M. I.; ZANUZZI, N. C.; FUENTEALBA, N. A.; SGUAZZA, G. H.; GIMENO, E. J.; GALOSI, C. M.; BARBEITO, C. G. Effects of Different Anesthetics in the Murine Model of EHV-1 Infection. **Veterinary Pathology**, v. 50, n. 5, p. 849–856, 4 fev. 2013. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1177/0300985813476062>>. Acesso em: 16 jan. 2015.

FIELD, H. J.; AWAN, A. R. Effective chemotherapy of equine herpesvirus 1 by phosphonylmethoxyalkyl derivatives of adenine demonstrated in a novel murine model for the disease. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 34, n. 5, p. 709–717, 1 maio 1990. Disponível em:

<<http://aac.asm.org/cgi/doi/10.1128/AAC.34.5.709>>. Acesso em: 13 ago. 2014.

FIELD, H. J.; AWAN, A. R.; DE LA FUENTE, R. Isolation of equine herpesvirus-1 mutants in the presence of (S)-9-(3-hydroxy-2-phosphonylmethoxypropyl)adenine: demonstration of resistance in vitro and in vivo. **Antiviral Research**, v. 16, n. 1, p. 29–39, jul. 1991. Disponível em: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/016635429190056W>>. Acesso em: 13 ago. 2014.

FRAMPTON, A. R.; GOINS, W. F.; NAKANO, K.; BURTON, E. A.; GLORIOSO, J. C. HSV trafficking and development of gene therapy vectors with applications in the nervous system. **Gene Therapy**, v. 12, n. 11, p. 891–901, jun. 2005. Disponível em: <http://www.nature.com/doi/10.1038/sj.gt.3302545>>. Acesso em: 13 ago. 2014.

FRAMPTON, A. R.; SMITH, P. M.; ZHANG, Y.; GRAFTON, W. D.; MATSUMURA, T.; OSTERRIEDER, N.; O'CALLAGHAN, D. J. Meningoencephalitis in mice infected with an equine herpesvirus 1 strain KyA recombinant expressing glycoprotein I and glycoprotein E. **Virus Genes**, v. 29, n. 1, p. 9–17, ago. 2004. Disponível em: <http://link.springer.com/10.1023/B:VIRU.0000032785.19420.14>>. Acesso em: 23 jan. 2014.

FUKUSHI, H.; TANIGUCHI, A.; YASUDA, K.; YANAI, T.; MASEGI, T.; YAMAGUCHI, T.; HIRAI, K. A hamster model of equine herpesvirus 9 induced encephalitis. **Journal of Neurovirology**, v. 6, n. 4, p. 314–319, jan. 2000. Disponível em: <http://informahealthcare.com/doi/abs/10.3109/13550280009030757>>. Acesso em: 27 ago. 2013.

FUKUSHI, H.; TOMITA, T.; TANIGUCHI, A.; OCHIAI, Y.; KIRISAWA, R.; MATSUMURA, T.; YANAI, T.; MASEGI, T.; YAMAGUCHI, T.; HIRAI, K. Gazelle herpesvirus 1: a new neurotropic herpesvirus immunologically related to equine herpesvirus 1. **Virology**, v. 227, n. 1, p. 34–44, 6 jan. 1997. Disponível em: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0042682296982963>>. Acesso em: 27 ago. 2013.

GALOSI, C. M.; BARBEITO, C. G.; VILA ROZA, M. V.; CID DE LA PAZ, V.; AYALA, M. A.; CORVA, S. G.; ETCHEVERRIGARAY, M. E.; GIMENO, E. J. Argentine strain of equine herpesvirus 1 isolated from an aborted foetus shows low virulence in mouse respiratory and abortion models. **Veterinary Microbiology**, v. 103, n. 1-2, p. 1–12, 5 out. 2004. Disponível em: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S037811350400272X>>. Acesso em: 25 out. 2014.

GOEHRING, L. S.; HUSSEY, G. S.; ASHTON, L. V.; SCHENKEL, A. R.; LUNN, D. P. Infection of central nervous system endothelial cells by cell-associated EHV-1. **Veterinary Microbiology**, v. 148, n. 2-4, p. 389–395, 24 mar. 2011. Disponível em: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0378113510004177>>. Acesso em: 25 out. 2014.

GOEHRING, L. S.; VAN MAANEN, C.; BERENDSEN, M.; CULLINANE, A.; DE GROOT, R. J.; ROTTIER, P. J. M.; WESSELINGH, J. J. C. M.; VAN OLDRUITENBORGH-OOSTERBAAN, S. M. M. Experimental infection with neuropathogenic equid herpesvirus type 1 (EHV-1) in adult horses. **The Veterinary Journal**, v. 186, n. 2, p. 180–187, nov. 2010. Disponível em: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1090023309003189>>. Acesso em: 25 out. 2014.

GOEHRING, L. S.; VAN WINDEN, S. C.; VAN MAANEN, C.; VAN OLDRUITENBORGH-OOSTERBAAN, M. M. S. Equine herpesvirus type 1-associated myeloencephalopathy in The Netherlands: a four-year retrospective study (1999-2003). **Journal of Veterinary Internal Medicine / American College of Veterinary Internal Medicine**, v. 20, n. 3, p. 601–607, 2006. Disponível em: <[http://doi.wiley.com/10.1892/0891-6640\(2006\)20\[601:EHTAMI\]2.0.CO;2](http://doi.wiley.com/10.1892/0891-6640(2006)20[601:EHTAMI]2.0.CO;2)>. Acesso em: 25 out. 2014.

GOSZTONYI, G.; BORCHERS, K.; LUDWIG, H. Pathogenesis of equine herpesvirus-1 infection in the mouse model. **Acta Pathologica, Microbiologica, et Immunologica Scandinavica**, v. 117, n. 1, p. 10–21, jan. 2009. Disponível em: <<http://doi.wiley.com/10.1111/j.1600-0463.2008.00008.x>>. Acesso em: 24 out. 2014.

GRYSPEERDT, A. C.; VANDEKERCKHOVE, A. P.; GARRÉ, B.; BARBÉ, F.; VAN DE WALLE, G. R.; NAUWYNCK, H. J. Differences in replication kinetics and cell tropism between neurovirulent and non-neurovirulent EHV1 strains during the acute phase of infection in horses. **Veterinary Microbiology**, v. 142, n. 3-4, p. 242–253, maio 2010. Disponível em: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0378113509005355>>. Acesso em: 24 jan. 2014.

HASEBE, R.; KIMURA, T.; SATO, E.; OKAZAKI, K.; OCHIAI, K.; WADA, R.; UMEMURA, T. Equine herpesvirus-1-induced encephalomyelitis in mice: a comparative study of neuroadapted virus and its parental strain. **Journal of Comparative Pathology**, v. 127, n. 2-3, p. 118–125, out. 2002. Disponível em: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0021997502905694>>. Acesso em: 28 jan. 2014.

HEERKENS, T. M. J. Equine herpesvirus-1, non-neurogenic pathotype, in a 9-year-old American Saddlebred with neurological signs. **Canadian Veterinary Journal**, v. 50, n. 3, p. 297–300, 2009.

INAZU, M.; TSUHA, O.; KIRISAWA, R.; KAWAKAMI, Y.; IWAI, H. Equid herpesvirus 1 infection in mice. **The Journal of veterinary medical science / the Japanese Society of Veterinary Science**, v. 55, n. 1, p. 119–121, 1993.

KING, A. M. Q.; ADAMS, M. J.; CARSTENS, E. B.; LEFKOWITZ, E. The viruses. In: **Virus taxonomy: ninth report of the international committee on taxonomy of Vivuses**. San Diego, Califórnia: Elsevier Ltd, 2011. p. 99–107.

KYDD, J. H.; HANNANT, D.; MUMFORD, J. A. Residence and recruitment of leucocytes to the equine lung after EHV-1 infection. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 52, n. 1-2, p. 15–26, jun. 1996. Disponível em: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/0165242795055339>>. Acesso em: 28 jan. 2014.

LARA, M. C. C. S.; CUNHA, E. M. S.; VILLALOBOS, E. M. C.; NASSAR, A. F. C.; ASANO, K. M.; FERNANDES, W R; RICHTZENHAIN, L. J.; BRANDÃO, P. E.; MORI, E. First isolation of equine herpesvirus type 1 from a horse with neurological disease in Brazil. **Arquivos do Instituto Biológico**, v. 75, n. 2, p. 221–224, 2008. Disponível em: <www.biologico.sp.gov.br/docs/arq/v75_2/lara.pdf>. Acesso em: 28 jan. 2014.

LITTLE, P. B.; THORSEN, J. Disseminated necrotizing myeloencephalitis: a herpes-associated neurological disease of horses. **Veterinary Pathology**, v. 13, n. 3, p. 161–171, 1976. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/180652>>. Acesso em: 28 jan. 2014.

MENDES, L. C. N.; BOVINO, F.; TEODORO, PIERO H M. ARAÚJO, MARCELO A.; ROZZA, DANIELA B.; CADIOLI, F. A. .; FEITOSA, F. L. F.; PEIRÓ, J. R. .; MORI, E.; SANTOS, C. R.; MAIORKA, p c. Infecção de potros neonatos por hve-1 – relato de dois casos. In: CONFERÊNCIA ANUAL DA ABRAVEQ, 9.; CONGRESSO INTERNACIONAL DE VETERINARIA FEI/CBH, 4., 2008, São Paulo. **Anais...** São Paulo: 2008. Disponível em: <www.itarget.com.br/newclients/abreveq2012/down/2012/Aquivo84.pdf>.

MOREIRA, N.; KRÜGER, E. R.; WARTH, J. F. G.; BIESSDORF, S. M.; GOULARTE, M. M. M.; WEISS, R. R. Aspectos etiológicos e epidemiológicos do aborto equino. **Archives of Veterinary Science**, v. 3, n. 1, p. 25–30, 1998. Disponível em: <<http://ojs.c3sl.ufpr.br/ojs/index.php/veterinary/article/view/3735>>. Acesso em: 28 jan. 2014.

MORI, C. M. C. **Avaliação da etiopatogenia da encefalite causada pelo herpesvírus equino tipo 1 utilizando um modelo murino de neuroinfecção.** 2012. 125 p. Tese (Doutorado) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2012.

MORI, C. M. C.; CHELINI, M. O. M.; COUTO, S. E. R. Hamster. In: LAPCHIK, V. B. V.; MATTARAIA, V. G. M.; KO, G. M. (Ed.). **Cuidados e Manejo de Animais de Laboratório**. 1. ed. São Paulo: Atheneu, 2009. p. 207–222.

MORI, C. M. C.; MORI, E.; FAVARO, L. . L.; SANTOS, C. R.; LARA, M. C. C. S. H.; VILLALOBOS, E. M. C.; CUNHA, E. M. S.; BRANDAO, P. E.; RICHTZENHAIN, L. J.; MAIORKA, P. C. Equid herpesvirus type-1 exhibits neurotropism and neurovirulence in a mouse model. **Journal of Comparative Pathology**, v. 146, n. 2-3, p. 202–210, fev. 2012. Disponível em: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S002199751100065X>>. Acesso em: 28 jan. 2014.

MORI, E. **Infecção experimental em cavalos pelo herpesvírus eqüino tipo 1: aspectos clínicos e detecção do agente pela reação em cadeia pela polimerase.** 2005. 159 p. Tese (Doutorado) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2005.

MORI, E.; BORGES, A. S.; DELFIOL, D. J. Z.; OLIVEIRA FILHO, J. P.; GONÇALVES, R. C.; CAGNINI, D. Q.; LARA, M. C. C. S. H.; CUNHA, E. M. S.; VILLALOBOS, E. M. C.; NASSAR, A. F. C.; CASTRO, A. M. M. G.; BRANDAO, P. E.; RICHTZENHAIN, L. J. First detection of the equine herpesvirus 1 neuropathogenic variant in Brazil. **Revue Scientifique et Technique (International Office of Epizootics)**, v. 30, n. 3, p. 949–54, dez. 2011. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22435205>>. Acesso em: 28 jan. 2014.

MORI, E.; MORI, C. M. C.; DELLA LIBERA, A. M. M. P.; LARA, M. C. C. S. H.; FERNANDES, W. R. Evaluation of alveolar macrophage function after experimental infection with equine herpesvirus-1 in horses. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 55, n. 3, p. 271–278, jun. 2003. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0102-09352003000300005&lng=en&nrm=iso&tlng=en>. Acesso em: 29 jan. 2015.

MORI, E.; MORI, C. M. C.; MASSIRONI, S. M. G.; CUNHA, E. M. S.; VILLALOBOS, E. M. C.; LARA, M. C. C. S. H.; FERNANDES, W. R. Detection of equid herpesvirus 1 DNA by polymerase chain reaction after experimental inoculation of horses with a brazilian A4/72 strain. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, v. 46, n. 4, p. 253–261, 2009. Disponível em: <<http://www.revistas.usp.br/bjvras/article/view/26773>>. Acesso em: 12 out. 2014.

MORI, I.; NISHIYAMA, Y.; YOKOCHI, T.; KIMURA, Y. Olfactory transmission of neurotropic viruses. **Journal of Neurovirology**, v. 11, n. 2, p. 129–137, jan. 2005. Disponível em: <<http://link.springer.com/10.1080/13550280590922793>>. Acesso em: 27 ago. 2013.

NILSSON, M. R.; CORREA, W. M. Isolamento do vírus do aborto equino no Estado de São Paulo. **Arquivos do Instituto Biológico**, v. 33, n. 2, p. 23-25, 1966.

NUGENT, J.; BIRCH-MACHIN, I.; SMITH, K. C.; MUMFORD, J. A.; SWANN, Z.; NEWTON, J. R.; BOWDEN, R. J.; ALLEN, G. P.; DAVIS-POYNTER, N. Analysis of equid herpesvirus 1 strain variation reveals a point mutation of the DNA polymerase strongly associated with neuropathogenic versus nonneuropathogenic disease outbreaks. **Journal of Virology**, v. 80, n. 8, p. 4047–4060, 15 abr. 2006. Disponível em: <<http://jvi.asm.org/cgi/doi/10.1128/JVI.80.8.4047-4060.2006>>. Acesso em: 29 jan. 2015.

OKADA, A.; IZUM, S.; OHYA, K.; FUKUSHI, H. Equine herpesvirus type 1 tegument protein VP22 is not essential for pathogenicity in a hamster model but is required for efficient viral growth in cultured cells. **Journal of Veterinary Medical Science**, 2015. Disponível em: <https://www.jstage.jst.go.jp/article/jvms/advpub/0/advpub_14-0648/_article>. Acesso em: 29 jan. 2015.

PACKIARAJAH, P.; WALKER, C.; GILKERSON, J.; WHALLEY, J. M.; LOVE, D. N. Immune responses and protective efficacy of recombinant baculovirus-expressed glycoproteins of equine herpesvirus 1 (EHV-1) gB, gC and gD alone or in combinations in BALB/c mice. **Veterinary Microbiology**, v. 61, n. 4, p. 261–278, 15 abr. 1998. Disponível em: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0378113598001898>>. Acesso em: 8 fev. 2015.

PLUMMER, G.; COLEMAN, P. L.; CLEVELAND, P. H.; HENSON, D. Neurovirulence of equine herpesvirus type I in mice of different ages. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 128, n. 2, p. 202–10, ago. 1973. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/4723082>>. Acesso em: 8 fev. 2015.

PUSTERLA, N.; DAVID WILSON, W.; MADIGAN, J. E.; FERRARO, G. L. Equine herpesvirus-1 myeloencephalopathy: A review of recent developments. **The Veterinary Journal**, v. 180, n. 3, p. 279–289, jun. 2009. Disponível em: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1090023308002864>>. Acesso em: 8 fev. 2015.

PUSTERLA, N.; HUSSEY, G. S. Equine Herpesvirus 1 Myeloencephalopathy. **Veterinary Clinics of North America: Equine Practice**, v. 30, n. 3, p. 489–506, dez. 2014. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.cveq.2014.08.006>>.

REINER, U. R.; DE LUCCA NETO, D.; NILSSON, M. R.; NILSSON, T. T.; KOTAIT, I. Isolamento do vírus do aborto equino em Campinas, estado de São Paulo. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE MEDICINA VETERINÁRIA, 13, 1972, Brasília. **Anais...** Brasília: Sociedade Brasileira de Medicina Veterinária, 1972. p. 283-284

RIMSTAD, E.; EVENSEN, O. The identification of equid herpesvirus 1 in paraffin-embedded tissues from aborted fetuses by polymerase chain reaction and immunohistochemistry. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v. 5, n. 2, p. 174–183, 1 abr. 1993. Disponível em: <<http://vdi.sagepub.com/lookup/doi/10.1177/104063879300500206>>. Acesso em: 8 fev. 2015.

ROLLINSON, E. A.; WHITE, G. Relative activities of acyclovir and BW759 against Aujeszky's disease and equine rhinopneumonitis viruses. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 24, n. 2, p. 221–226, 1 ago. 1983. Disponível em: <<http://aac.asm.org/cgi/doi/10.1128/AAC.24.2.221>>. Acesso em: 8 fev. 2015.

SILVA, A. A. **Gestão sanitária do abortamento e mortalidade perinatal em equinos: leptospira e herpesvírus equino - 1 como agentes causais**. 2014. 109p. Dissertação (Mestrado) - Instituto Biológico, São Paulo, 2014.

SLATER, J. D.; BORCHERS, K.; THACKRAY, A. M.; FIELD, H. J. The trigeminal ganglion is a location for equine herpesvirus 1 latency and reactivation in the horse. **Journal of General Virology**, v. 75, n. 8, p. 2007–2016, 1 ago. 1994. Disponível em: <<http://jgv.sgmjournals.org/content/journal/jgv/10.1099/0022-1317-75-8-2007>>. Acesso em: 4 fev. 2015.

SLATER, J. D.; GIBSON, J. S.; FIELD, H. J. Pathogenicity of a thymidine kinase-deficient mutant of equine herpesvirus 1 in mice and specific pathogen-free foals. **Journal of General Virology**, v. 74, n. 5, p. 819–828, 1 maio 1993. Disponível em: <<http://jgv.sgmjournals.org/content/journal/jgv/10.1099/0022-1317-74-5-819>>. Acesso em: 4 fev. 2015.

SMITH, K. C.; WHITWELL, K. E.; MUMFORD, J. A.; HANNANT, D.; BLUNDEN, A. S.; TEARLE, J. P. Virulence of the V592 isolate of equid herpesvirus-1 in ponies. **Journal of Comparative Pathology**, v. 122, n. 4, p. 288–297, abr. 2000a. Disponível em: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0021997599903730>>. Acesso em: 4 fev. 2015.

SMITH, K. L.; ALLEN, G. P.; BRANSCUM, A. J.; FRANK COOK, R.; VICKERS, M. L.; TIMONEY, P. J.; BALASURIYA, U. B. R. The increased prevalence of neuropathogenic strains of EHV-1 in equine abortions. **Veterinary Microbiology**, v. 141, n. 1-2, p. 5–11, 24 fev. 2010. Disponível em: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0378113509003526>>. Acesso em: 4 fev. 2015.

SMITH, P. M.; ZHANG, Y.; GRAFTON, W. D.; JENNINGS, S. R.; O'CALLAGHAN, D. J. Severe murine lung immunopathology elicited by the pathogenic equine herpesvirus 1 strain RacL11 correlates with early production of macrophage inflammatory proteins 1alpha, 1beta, and 2 and tumor necrosis factor alpha. **Journal of Virology**, v. 74, n. 21, p. 10034–10040, 1 nov. 2000b. Disponível em: <<http://jvi.asm.org/cgi/doi/10.1128/JVI.74.21.10034-10040.2000>>.

STIERSTORFER, B.; EICHHORN, W.; SCHMAHL, W.; BRANDMÜLLER, C.; KAADEN, O. R.; NEUBAUER, A. Equine herpesvirus type 1 (EHV-1) myeloencephalopathy: a case report. **Journal of Veterinary Medicine. B, Infectious Diseases and Veterinary Public Health**, v. 49, n. 1, p. 37–41, 2002. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11911591>>. Acesso em: 17 fev. 2015.

STOKES, A.; ALLEN, G. P.; PULLEN, L. A.; MURRAY, P. K. A hamster model of equine herpesvirus type 1 (EHV-1) infection; passive protection by monoclonal antibodies to EHV-1 glycoproteins 13, 14 and 17/18. **Journal of General Virology**, v. 70, n. 5, p. 1173–1183, 1 maio 1989. Disponível em: <<http://jgv.sgmjournals.org/content/journal/jgv/10.1099/0022-1317-70-5-1173>>. Acesso em: 17 fev. 2015.

TANIGUCHI, A.; FUKUSHI, H.; MATSUMURA, T.; YANAI, T.; MASEGI, T.; HIRAI, K. Pathogenicity of a new neurotropic equine herpesvirus 9 (gazelle herpesvirus 1) in horses. **Journal of Veterinary Medical Science**, v. 62, n. 2, p. 215–218, fev. 2000. Disponível em: <<http://joi.jlc.jst.go.jp/JST.JSTAGE/jvms/62.215?from=CrossRef>>. Acesso em: 17 fev. 2015.

THOMSON, G. W.; MCCREADY, R.; SANFORD, E.; GAGNON, A. Case report: an outbreak of herpesvirus myeloencephalitis in vaccinated horses. **Canadian Veterinary Journal**, v. 20, n. 1, p. 22–25, 1979. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/216473>>. Acesso em: 17 fev. 2015.

TSUJIMURA, K.; YAMANAKA, T.; KONDO, T.; FUKUSHI, H.; MATSUMURA, T. Pathogenicity and immunogenicity of equine herpesvirus type 1 mutants defective in either gI or gE gene in murine and hamster models. **Journal of Veterinary Medical Science**, v. 68, n. 10, p. 1029–1038, out. 2006. Disponível em: <<http://joi.jlc.jst.go.jp/JST.JSTAGE/jvms/68.1029?from=CrossRef>>. Acesso em: 17 fev. 2015.

TURAN, N.; YILDIRIM, F.; ALTAN, E.; SENNAZLI, G.; GUREL, A.; DIALLO, I.; YILMAZ, H. Molecular and pathological investigations of EHV-1 and EHV-4 infections in horses in Turkey. **Research in Veterinary Science**, v. 93, n. 3, p. 1504–1507, dez. 2012. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.rvsc.2012.01.019>>. Acesso em: 17 fev. 2015.

VAN WOENSEL, P. A. M.; GOOVAERTS, D.; MARKX, D.; VISSER, N. A mouse model for testing the pathogenicity of equine herpes virus-1 strains. **Journal of Virological Methods**, v. 54, n. 1, p. 39–49, jul. 1995. Disponível em: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/0166093495000240>>. Acesso em: 19 out. 2014.

VANDEKERCKHOVE, A. P.; GLORIEUX, S.; GRYSPEERDT, A. C.; STEUKERS, L.; DUCHATEAU, L.; OSTERRIEDER, N.; VAN DE WALLE, G. R.; NAUWYNCK, H. J. Replication kinetics of neurovirulent versus non-neurovirulent equine herpesvirus type 1 strains in equine nasal mucosal explants. **Journal of General Virology**, v. 91, n. 8, p. 2019–2028, 1 ago. 2010. Disponível em: <<http://jgv.sgmjournals.org/content/journal/jgv/10.1099/vir.0.019257-0>>. Acesso em: 19 out. 2014.

VARRASSO, A.; DYNON, K.; FICORILLI, N.; HARTLEY, C. A.; STUDDERT, M. J.; DRUMMER, H. E. Identification of equine herpesviruses 1 and 4 by polymerase chain reaction. **Australian Veterinary Journal**, v. 79, n. 8, p. 563–569, ago. 2001. Disponível em: <<http://doi.wiley.com/10.1111/j.1751-0813.2001.tb10751.x>>. Acesso em: 19 out. 2014.

WALKER, C.; PACKIARAJAH, P.; GILKERSON, J. R.; LOVE, D. N.; WHALLEY, J. M. Primary and challenge infection of mice with equine herpesvirus 1, strain HSV25A. **Virus Research**, v. 57, n. 2, p. 151–162, out. 1998. Disponível em: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0168170298000926>>. Acesso em: 19 out. 2014.

WALTER, J.; SEEH, C.; FEY, K.; BLEUL, U.; OSTERRIEDER, N. Clinical observations and management of a severe equine herpesvirus type 1 outbreak with abortion and encephalomyelitis. **Acta Veterinaria Scandinavica**, v. 55, n. 1, p. 19, 2013. Disponível em: <<http://www.actavetscand.com/content/55/1/19>>. Acesso em: 19 out. 2014.

WELCH, H. M.; BRIDGES, C. G.; LYON, A. M.; GRIFFITHS, L.; EDINGTON, N. Latent equid herpesviruses 1 and 4: detection and distinction using the polymerase chain reaction and co-cultivation from lymphoid tissues. **Journal of General Virology**, v. 73, n. 2, p. 261–268, 1 fev. 1992. Disponível em: <<http://jgv.sgmjournals.org/content/journal/jgv/10.1099/0022-1317-73-2-261>>. Acesso em: 19 out. 2014.

WESTERFIELD, C.; DIMOCK, W. W. The pathology of equine virus abortion. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 109, n. 833, p. 101–111, 1946.

WOHLSEIN, P.; LEHMBECKER, A.; SPITZBARTH, I.; ALGERMISSEN, D.; BAUMGÄRTNER, W.; BÖER, M.; KUMMROW, M.; HAAS, L.; GRUMMER, B. Fatal epizootic equine herpesvirus 1 infections in new and unnatural hosts. **Veterinary Microbiology**, v. 149, n. 3-4, p. 456–460, 5 maio 2011. Disponível em: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S037811351000564X>>. Acesso em: 5 nov. 2014.

YU, M. H. H.; KASEM, S.; YOSHIKAZI, N.; PAGAMJAV, O.; YAMAGUCHI, T.; OHYA, K.; FUKUSHI, H. Functional characterization of EUL47 in productive replication, morphogenesis and infectivity of equine herpesvirus 1. **Virus Research**, v. 163, n. 1, p. 310–319, jan. 2012. Disponível em: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0168170211004151>>. Acesso em: 5 nov. 2014.

YU, M. H. H.; KASEM, S. G. A.; TSUJIMURA, K.; MATSUMURA, T.; YANAI, T.; YAMAGUCHI, T.; OHYA, K.; FUKUSHI, H. Diverse pathogenicity of equine herpesvirus 1 (EHV-1) isolates in CBA mouse model. **Journal of Veterinary Medical Science**, v. 72, n. 3, p. 301–306, mar. 2010. Disponível em: <<http://joi.jlc.jst.go.jp/JST.JSTAGE/jvms/09-0337?from=CrossRef>>. Acesso em: 5 nov. 2014.

ZANUZZI, C.; SCROCHI, M.; FUENTEALBA, N.; NISHIDA, F.; PORTIANSKY, E.; MUGLIA, C.; GIMENO, E.; BARBEITO, C.; GALOSI, C. Effects of equid herpesvirus 1 (EHV-1) AR8 and HH1 strains on BALB-c mice. **Archives of Virology**, v. 159, n. 1, p. 141–145, 13 jan. 2014. Disponível em: <<http://link.springer.com/10.1007/s00705-013-1782-8>>. Acesso em: 5 nov. 2014.