RENATA ASSIS CASAGRANDE

Herpesvirus simplex Tipo 1 (HSV-1) em sagüis (Callithrix jacchus e Callithrix penicillata) – **Caracterização anatomopatológica e molecular**

São Paulo

2007

RENATA ASSIS CASAGRANDE

Herpesvírus simplex Tipo 1 (HSV-1) em sagüis (Callithrix jacchus e Callithrix penicillata) – Caracterização anatomopatológica e molecular

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

Orientadora:

Profa. Dra. Eliana Reiko Matushima

São Paulo

2007

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

BIBLIOTECA VIRGINIE BUFF D'ÁPICE
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA
E ZOOTECNIA DA USP
29/5/07

DADOS INTERNACIONAIS DE CATALOGAÇÃO-NA-PUBLICAÇÃO

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

T.1858
FMVZ

Casagrande, Renata Assis

Herpesvirus simplex Tipo 1 (HSV-1) em sagüis (*Callithrix jacchus* e *Callithrix penicillata*) – Caracterização anatomopatológica e molecular / Renata Assis Casagrande. – São Paulo : R. A. Casagrande, 2007.
110 f. : il.

Dissertação (mestrado) - Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia. Departamento de Patologia, 2007.

Programa de Pós-Graduação: Patologia Experimental e Comparada.
Área de concentração: Patologia Experimental e Comparada.

Orientador: Profa. Dra. Eliana Reiko Matushima.

1. Patologia. 2. *Herpesvirus simplex*. 3. *Callithrix jacchus*.
4. *Callithrix penicillata*. 5. Sagüi. I. Título.

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia
Comissão Bioética

CERTIFICADO

Certificamos que o Projeto intitulado "*Herpesvirus simplex* tipo 1 (HSV-1) em *Callithrix jacchus* e *Callithrix penicillata* - caracterização anatomopatológica e molecular", protocolado sob o nº1109/2007, utilizando 13 (treze) sagüis (cadáver), sob a responsabilidade da Profa. Dra. Eliana Reiko Matushima, está de acordo com os princípios éticos de experimentação animal da Comissão de Bioética da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo e foi aprovado "ad referendum".

(We certify that the Research "*Herpesvirus simplex* type 1 (HSV-1) in *Callithrix jacchus* and *Callithrix penicillata* - pathological and molecular characterization", protocol number 1109/2007, utilizing 13 (thirteen) marmosets, under the responsibility Profa. Dra. Eliana Reiko Matushima, agree with Ethical Principles in Animal Research adopted by Bioethic Commission of the School of Veterinary Medicine and Zootechny of University of São Paulo and was approved "ad referendum", meeting).

São Paulo, 03 de maio de 2007

Prof. Dr. José Luis Bernardino Merusse
Presidente da Comissão de Bioética
FMVZ/USP

FOLHA DE AVALIAÇÃO

Nome: CASAGRANDE, Renata Assis

Título: *Herpesvirus simplex* Tipo 1 (HSV-1) em sagüis (*Callithrix jacchus* e *Callithrix penicillata*) – Caracterização anatomopatológica e molecular

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: _____

Assinatura: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr. _____ Instituição: _____

Assinatura: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr. _____ Instituição: _____

Assinatura: _____ Julgamento: _____

Aos meus pais, Veranis e Aldo
Por todo o apoio e incentivo nesta longa caminhada de minha vida!

*A todas as formas de vida existente neste planeta e em especial aos animais selvagens,
minha razão de viver e lutar por um mundo melhor.*

AGRADECIMENTOS

A Deus por sempre possibilitar que meus sonhos fossem realizados.

Aos meus pais Veranis e Aldo pelo amor, carinho, dedicação, confiança e por nunca me deixarem desistir, mesmo quanto tudo parecia impossível. Sempre abdicando de minha presença para que assim eu pudesse realizar meus sonhos e ideais.

A Profa. Dra. Eliana Reiko Matushima pela orientação, confiança, amizade e por ter possibilitado que eu realizasse este trabalho. Por sempre acreditar em mim e achar que meus sonhos fossem possíveis.

Ao Diego, meu namorado, amigo e conselheiro. Pelo carinho, amor, apoio. Sempre sonhando os meus sonhos e presente nos momentos mais difíceis.

As minhas irmãs, Alexsandra e Sabrina. Pela amizade, companheirismo, preocupação e amor. Leca muito obrigada pelo ombro amigo e amizade em todas as horas de minha vida.

A minha sobrinha, Ana Flávia que desde que soubemos que entraria em nossa família, nos deu um sentido a mais para viver.

A toda minha família pelo carinho, amor, incentivo e compreensão e por entenderem minha ausência.

A Sahêdi e o Marcos, por todo amor de mãe e pai que me deram nestes anos de convivência.

Aos meus grandes amigos que jamais faltaram Ana Carolina, Carolina, Daniel, Kátia e Luciana. Pelo amor, carinho, cumplicidade de todos os momentos. Nem sei o que seria de minha vida sem vocês. Minha família paulistana.

A Viviane e Luiz Fernando, pela grande amizade, carinho e ajuda que sempre recebi.

Aos residentes, Daniel Sanches, Viviane Nemer, Ana Carolina Maluenda, Carolina Pires e a patologista Luciana Neves Torres por todos os ensinamentos em patologia.

Ao Cláudio Arroyo e Luciano Antas Bugalho pela paciência, preparo de lâminas e pela grande amizade em todos os momentos. Ao Edson Luiz de Souza e Raimundo Nonato Maciel pela ajuda na sala de necropsia, amizade e carinho.

A todos do LAPCOM, Alessandra, Alice, Bruna, Igor, Luiz Fernando, Marina, Silmara, Thaís e Ticiane pelo companheirismo, ajuda e amizade.

Aos pós-graduandos Heidge Fukumasu, José L. Avanzo e Tereza C. da Silva do Laboratório de Oncologia por todo auxílio prestado, pela amizade e carinho.

A secretária da pós-graduação, Silvia Aparecida S. Bracale por todo o auxílio e amizade.

A todos os amigos e funcionários do Departamento de Patologia pelo carinho e amizade.

A Hilda F. J. Pena, Maurício Horta e Prof. Dr. Rodrigo Soares por todo o auxílio que sempre recebi.

A técnica Rosana Utiana e ao Prof. Dr. Fumio Ito pelo apoio e por permitirem a realização dos ensaios biológicos.

A técnica Telma Alves Monezi e a Profa. Dra. Dolores Ursula Mehnert por me acolherem no seu laboratório e me ensinarem a técnica de PCR.

As pós-graduandas Karina, Manuela, Natascha e Patrícia por todos os ensinamentos, carinho e acolhimento.

A Cristina Kanamura do Instituto Adolfo Lutz por realizar as IHQ com toda dedicação, perfeição e carinho.

Ao Prof. Dr. Cláudio Sergio Pannuti e ao técnico Wilton Santos Freire por possibilitarem o fechamento deste trabalho e por toda a gentileza e perfeição na realização da PCR.

Aos técnicos da Microscopia Eletrônica da Faculdade de Medicina da USP pelo auxílio e gentileza.

Ao Prof. Dr. Sérgio Rosemberg da Faculdade de Medicina por todos os ensinamentos de neuropatologia em Herpes simplex.

A Profa. Dra. Lillian R. M. Sá por todos os ensinamentos em Patologia, conselhos e atenção dispensada durante o mestrado.

Ao Prof. Dr. Frederico Pinto por todos os conselhos e atenção dispensada em todos os momentos.

Ao Prof. Dr. José Luiz Catão-Dias pelos ensinamentos, palavras de amizade, conselhos e auxílio sempre que precisei.

A Profa. Dra. Tânia Raso pela amizade, conselhos e atenção dispensada em todos os momentos.

Ao Prof. Dr. Paulo Maiorka pelos ensinamentos, incentivo e consideração sempre dispensada.

Ao Prof. Dr. Aldo Gava meu eterno orientador. Sem seus ensinamentos, carinho, dedicação e auxílio dado no início de minha vida acadêmica, nada disto seria possível.

Aos médicos veterinários Adauto V. Nunes, Adriana Joppert, André Grespan, Cristina Pereira Fotin, Dafne Neves, Fausto Quaggia Neto, Giordana Ysis, José H. Fontenelle, Lauro Soares, Liliane Milanello, Marcelo da Silva Gomes, Marta Brito Guimarães, Rodrigo H. F. Teixeira por nos encaminharem os animais, podendo assim realizar este trabalho.

As funcionárias da biblioteca da FMVZ/USP por toda a dedicação, carinho e amizade dispensados nos momentos que mais precisei.

Ao CNPq pelo suporte financeiro, que permitiu a execução deste estudo.

*Chegará o dia em que os homens conhecerão o íntimo dos animais e nesse dia um crime
contra um animal será considerado um crime contra a humanidade.*

Leonardo da Vinci

RESUMO

CASAGRANDE, R. A. *Herpesvirus simplex* **Tipo 1 (HSV-1) em sagüis (*Callithrix jacchus* e *Callithrix penicillata*) – Caracterização anatomopatológica e molecular.** [*Herpesvirus simplex* Type 1 (HSV-1) in marmosets (*Callithrix jacchus* and *Callithrix penicillata*) – Pathological and molecular characterization]. 2007. 110 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2007.

A introdução de animais selvagens no convívio com humanos representa sério risco à saúde de ambos. O objetivo deste trabalho foi comprovar a hipótese de ser o HSV-1 o agente etiológico das lesões vesiculares e ulcerativas na pele e mucosas, associadas aos quadros neurológicos observados em sagüis no Brasil. Para tal, seis sagüis do tufo branco (*Callithrix jacchus*), cinco sagüis do tufo preto (*C. penicillata*) e um híbrido, provenientes de cativeiro com suspeita de infecção herpética foram necropsiados. Dos órgãos colhidos, realizou-se exame histopatológico e imunoistoquímico (IHQ), utilizando-se os anticorpos anti-HSV-1 e anti-HSV-2 policlonais, amplificados pelo sistema estreptavidina-biotina-peroxidase e revelados com diaminobenzidina. Realizou-se tipificação viral pela PCR em fragmentos do encéfalo de nove sagüis. Para tal, fez-se extração do DNA com o Kit Qiagen® e utilizaram-se os *primers* HSV-U, HSV-1L E HSV-2L, específicos para HSV-1 e HSV-2, os quais amplificam uma sequência de 503 pb e 435 pb respectivamente. Clinicamente foram observadas convulsões, prostração, hiporexia, hipersalivação e agressividade. Na pele evidenciaram-se ulcerações, mucosa oral e língua com placas pseudomembranasas. Histologicamente, a principal lesão encontrada em todos os sagüis foi meningoencefalite necrotizante não supurativa difusa variando de leve a severa com gliose, manguitos perivasculars, vasculite necrotizante, necrose neuronal e necrose do neurópilo. Órgãos como a pele, mucosa oral, língua, fígado, baço, linfonodos, adrenais e rins também foram severamente afetados. No SNC e em alguns outros órgãos observaram-se inclusões intranucleares (Cowdry Tipo A). A IHQ revelou marcações positivas para HSV no encéfalo de todos sagüis. A mucosa oral, língua, pele, fígado, adrenais, rins, gânglios, nervos dentre outros órgãos também apresentaram marcações. A presença do HSV-1 foi confirmada pela PCR no encéfalo de 8/9 sagüis. Primatas não-humanos não são naturalmente infectados pelo HSV-1, adquirindo a doença através do contato com humanos. Sendo assim, o presente estudo comprova a existência do HSV-1 como causador de infecções fatais em sagüis no Brasil.

Palavras-chaves: Patologia. *Herpesvirus simplex*. *Callithrix jacchus*. *Callithrix penicillata*. Sagüi.

ABSTRACT

CASAGRANDE, R. A. *Herpesvirus simplex* Type 1 (HSV-1) in marmosets (*Callithrix jacchus* and *Callithrix penicillata*) – Pathological and molecular characterization. [*Herpesvirus simplex* Tipo 1 (HSV-1) em sagüis (*Callithrix jacchus* e *Callithrix penicillata*) – Caracterização anatomopatológica e molecular]. 2007. 110 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2007.

The introduction of wild animals in the convivality with humans represents serious risk to the health of both. The objective of this work was to prove the hypothesis of the HSV-1 is the agent of vesicular and ulcerative lesion in the skin and mucous membranes, associated with neurological signs observed in marmosets in Brazil. Six white-tufted-ear marmosets (*Callithrix jacchus*), five black-tufted-ear marmosets (*C. penicillata*) and one hybrid were submitted to a postmortem examination. All of them were captive and their lesions were suggestive of herpetic infection. The immunohistochemistry (IHC) was performed, using streptavidin-biotin peroxidase technique with the use of polyclonal antibodies against HSV-1 and HSV-2. DNA from central nervous system (CNS) of nine marmosets was isolated by using the Qiagen Kit[®]. Type-specific PCR was performed using the specific primers HSV-U, HSV-1L AND HSV-2L for HSV-1 and HSV-2, which amplify a sequence of 503 pb and 435 pb respectively. Clinical finding were convulsion, weakness, hiporexia, salivation, aggressivity, skin ulcers and pseudomembranous patches in the tongue and in the oral mucosa. The histopathological examination showed in all marmosets a nonsuppurative necrotizing meningoencephalitis diffuse mild to severe with gliosis, perivascular cuffing, necrotizing vasculitis, neuronal and neuropil necrosis. The skin, oral cavity, tongue, liver, spleen, lymph nodes, adrenal glands and kidneys were also severely affected. In the CNS and in other tissues were observed intranuclear inclusion bodies (Cowdry Type A). The IHC showed a specific antigen-antibody reaction in the CNS of all marmosets. It was also found in tissues like the oral mucosa, the tongue, the skin, the liver, the adrenal glands, the kidneys, the lymph nodes and the nerves. The presence of the HSV-1 was confirmed by PCR in the CNS of 8/9 marmosets. Nonhuman Primates are not infected naturally by HSV-1, acquiring the disease through the contact with humans. The present study proves that HSV-1 causes fatal infections in marmosets in Brazil.

Palavras-chaves: Pathology. *Herpesvirus simplex*. *Callithrix jacchus*. *Callithrix penicillata*. Marmoset.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 –	Localização dos <i>primers</i> de consenso para Herpesvírus na sequência do gene da polimerase.....	49
Figura 2 –	Aspecto clínico de um <i>Callithrix jacchus</i> (caso 3) infectado com HSV-1. Evidenciam-se duas vesículas ulceradas recobertas por crosta hemorrágica entre os olhos e hipersalivação.....	70
Figura 3 –	Conduto auditivo; <i>Callithrix jacchus</i> (caso 2). Lesão ulcerativa focal de aproximadamente 5mm de diâmetro.....	70
Figura 04 –	Face; <i>Callithrix jacchus</i> (caso 6). Lesões ulcerativas de aproximadamente 5mm de diâmetro, recobertas por crostas entre os olhos e na narina.....	70
Figura 5 –	Cavidade oral; <i>Callithrix penicillata</i> (caso 3). Placas ulcerativas recobertas por material fibrinoso cinza-esbranquiçado na mucosa oral e superfície dorsal e lateral da língua.....	70
Figura 6 –	SNC; <i>Callithrix penicillata</i> (caso 7). Congestão e edema acentuados das meninges.....	70
Figura 7 –	SNC; <i>Callithrix jacchus</i> (caso 10). Vasos das meninges moderadamente congestos e hemorragia cerebelar focal de aproximadamente 5mm de diâmetro.....	70
Figura 8 –	Cavidade abdominal; <i>Callithrix penicillata</i> (caso 3). Fígado aumentado de tamanho, coloração amarelada e padrão lobular moderadamente evidente. Observar também a grande deposição de tecido adiposo na cavidade abdominal.....	71
Figura 9 –	Rins; <i>Callithrix penicillata</i> (caso 3). Coloração amarelada e presença de pontos esbranquiçados e avermelhados de aproximadamente 1mm distribuídos em toda cortical e medular.....	71
Figura 10 –	Inclusões Cowdry Tipo A. A. Cérebro; <i>Callithrix penicillata</i> (caso 3). Inclusões anofílicas intranucleares nos neurônios (setas). HE. 100x. B. Fígado; <i>Callithrix jacchus</i> (caso 4). Inclusões eosinofílicas intranucleares nos hepatócitos (setas). HE. 400x.....	71
Figura 11 –	Cérebro; <i>Callithrix penicillata</i> (caso 3). Vasculite necrotizante (setas), edema e necrose do neurópilo na substância cinzenta. HE. 100x.....	71
Figura 12 –	A. Cérebro; <i>Callithrix penicillata</i> (caso 11). Encefalite necrótica não supurativa (raros neutrófilos) difusa severa. HE. 40x. B. Inclusão intranuclear anofílica e edema neuronal. HE. 400x.	71
Figura 13 –	A. Cerebelo; <i>Callithrix penicillata</i> (caso 3). Vasculite necrotizante focal severa associada à intensa exsudação neutrofílica acometendo a camada granular e substância branca. HE. 100x. B. Maior aumento do A. Presença de inclusões eosinofílicas intranucleares (seta). HE. 400x.....	71
Figura 14 –	Cerebelo; <i>Callithrix jacchus</i> (caso 10). Hemorragia necrotizante focal severa na substância branca estendendo-se a camada granular e molecular. HE. 40x.....	72
Figura 15 –	A. Língua; <i>Callithrix jacchus</i> (caso 9). Glossite necrótica ulcerativa focalmente extensa severa recoberta por exsudato fibrino supurativo. HE. 40x. B. Epitélio adjacente com inclusões intranucleares anofílicas (seta). HE. 200x.....	72
Figura 16 –	Pele; <i>Callithrix penicillata</i> (caso 3). Epitélio com edema intracelular acentuado e formação de vesícula intra-epidérmica. HE. 200x.....	72

Figura 17 –	Linfonodo; <i>Callithrix jacchus</i> (caso 9). Necrose centrofolicular acentuada (asterisco). HE. 200x.....	72
Figura 18 –	A. Rim; <i>Callithrix penicillata</i> (caso 3). Glomerulonefrite linfoplasmocitária (com macrófagos e neutrófilos ocasionais) difusa severa com nefrose e necrose tubular. HE. 40x. B. Maior aumento do A. Presença de célula sincicial (seta). HE. 400x.....	72
Figura 19 –	Adrenal; <i>Callithrix jacchus</i> (caso 9). Adrenalite necrótica supurativa difusa severa comprometendo a cortical e medular (asterisco). HE. 100x.....	72
Figura 20 –	A. Plexo de Auerbach; <i>Callithrix penicillata</i> (caso 3). Ganglioneurite com necrose neuronal. HE. 200x. B. Maior aumento do A. Neurônios com inclusões intranucleares eosinofílicas (seta). HE. 400x.....	73
Figura 21 –	A. Baço; <i>Callithrix penicillata</i> (caso 3). Seios esplênicos evidenciam inúmeras células sinciciais (setas). HE. 100x. B. Maior aumento do A. Células sinciciais (seta). HE. 400x.....	73
Figura 22 –	A. Adrenal; <i>Callithrix jacchus</i> (caso 4). Adrenalite necrótica não supurativa multifocal severa comprometendo a cortical e medular. HE. 40x. B. Maior aumento do A. Formação de células sinciciais na cortical (seta). HE. 200x.....	73
Figura 23 –	Fígado; <i>Callithrix penicillata</i> (caso 3). Infiltrado inflamatório linfoplasmocitário perivascular moderado (seta). HE. 100x.....	73
Figura 24 –	Aspecto clínico de um camundongo infectado com HSV-1. Evidencia-se prostração e eriçamento dos pêlos.....	73
Figura 25 –	Aspecto clínico de um camundongo infectado com HSV-1. Evidencia-se prostração, eriçamento dos pêlos e paralisia.....	73
Figura 26 –	A. Cérebro; camundongo. Encefalite necrótica não supurativa difusa severa com manguitos perivasculars e necrose do neurópilo. HE. 40x. B. Maior aumento do A. Inclusões intranucleares anfófilas nos neurônios (seta) HE. 400x.....	74
Figura 27 –	A. Cérebro; <i>Callithrix penicillata</i> (caso 3). Imunomarcção para HSV-1. Observar neurônios e células da glia marcadas em castanho. Estreptavidina-biotina-peroxidase. Hematoxilina. 40x. B. Maior aumento do A. 200x.....	74
Figura 28 –	A. Cerebelo; <i>Callithrix penicillata</i> (caso 3). Imunomarcção para HSV-1. Observar células de Purkinji, neurônios da camada molecular e granular marcados em castanho. Estreptavidina-biotina-peroxidase. Hematoxilina. 100x. B. Maior aumento do A. 200x.....	74
Figura 29 –	Pele; <i>Callithrix penicillata</i> (caso 3). Imunomarcção para HSV-1. Observar células epiteliais marcadas em castanho. Estreptavidina-biotina-peroxidase. Hematoxilina. 200x.....	74
Figura 30 –	Fígado; <i>Callithrix jacchus</i> (caso 4). Imunomarcção para HSV-1. Observar hepatócitos marcados em castanho. Estreptavidina-biotina-peroxidase. Hematoxilina. 200x.....	74
Figura 31 –	Rim; <i>Callithrix penicillata</i> (caso 3). Imunomarcção para HSV-1. Observar túbulos renais marcados em castanho. Estreptavidina-biotina-peroxidase. Hematoxilina. 100x.....	74
Figura 32 –	Plexo de Auerbach; <i>Callithrix penicillata</i> (caso 3). Imunomarcção para HSV-1. Observar neurônios marcados em castanho. Estreptavidina-biotina-peroxidase. Hematoxilina. 200x.....	75

Figura 33 –	Adrenal; <i>Callithrix jacchus</i> (caso 9). Imunomarcação para HSV-1. Observar células da camada medular e cortical marcadas em castanho. Estreptavidina-biotina-peroxidase. Hematoxilina. 100x.....	75
Figura 34 –	Cérebro; Camundongo. Imunomarcação para HSV-1. Observar neurônios e células da glia marcados em castanho. Estreptavidina-biotina-peroxidase. Hematoxilina. 200x.....	75
Figura 35 –	Detecção de herpesvírus pelo <i>nested</i> -PCR nas amostras encefálicas dos sagüis. DNA <i>ladder</i> de 100 pb (L), controle negativo (C-), controle positivo (C+).	65
Figura 36 –	Resultados da amplificação gênica pela PCR em diferentes concentrações de MgCl ₂ e temperaturas de anelamento. DNA de fago λ digerido com <i>HindIII/EcoRI</i> (λ).....	66
Figura 37 –	Resultados da reação da PCR utilizando <i>primers</i> específicos E1 e E2 em amostras encefálicas de sagüis. Controle negativo (C-), controle positivo (C+), DNA de fago λ digerido com <i>HindIII/EcoRI</i> (λ).....	67
Figura 38 –	Resultados da reação da PCR de amostras previamente tratadas com Vertrel [®] , utilizando os <i>primers</i> específicos para HSV-1 e HSV-2. Amostra de camundongo (Ca), controle negativo (C-), DNA <i>ladder</i> de 100 pb.....	68
Figura 39 –	Resultados da reação da PCR utilizando os <i>primers</i> específicos para HSV-1 e HSV-2. Língua (l), encéfalo (e), controle negativo (C-), DNA <i>ladder</i> de 100 pb.....	69
Figura 40 –	Cérebro; <i>Callithrix jacchus</i> (caso 10). Inúmeros nucleocapsídeos (setas) no núcleo de um neurônio. 10.000x.....	75

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Distribuição dos sagüis segundo a espécie, sexo, faixa etária e origem.....	44
Tabela 2 – Anticorpos e especificações para o diagnóstico de Herpesvírus.....	47
Tabela 3 – Principais sinais clínicos dos sagüis acometidos com infecção herpética.....	55
Tabela 4 – Principais órgãos acometidos na infecção herpética, observados na avaliação macroscópica.....	57
Tabela 5 – Principais órgãos acometidos na infecção herpética, observados na avaliação microscópica.....	59
Tabela 6 – Número de camundongos mortos pela inoculação intracerebral e o tempo de início dos sinais clínicos.....	61
Tabela 7 – Estudo imunoistoquímico nos órgãos dos sagüis.....	63

LISTA DE ABREVIATURAS

C	Canino
CITES	<i>Convention on International Trade in Endangered Species of Wild Fauna and Flora</i>
cm	Centímetro
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético
g	Grama
HE	Coloração de hematoxilina e eosina
HSE	Encefalite herpética
HSV	<i>Herpesvirus simplex</i>
HSV-1	<i>Herpesvirus simplex</i> tipo 1
I	Incisivo
HSV-2	<i>Herpesvirus simplex</i> tipo 2
IBAMA	Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis
IC	Intracerebral
IFD	Imunofluorescência direta
IHQ	Imunoistoquímica
IUCN	<i>International Union for Conservation of Nature and Natural Resources</i>
LCR	Líquido cefalorraquidiano
M	Molar
mg	Miligrama
ml	Mililitros
mM	Milimolar
mm	Milímetros
Mo	Molar
nm	Nanômetro
pb	Pares de base
PBS	Solução salina tamponada com fosfato
PCR	Reação em Cadeia pela Polimerase
PM	Pré-molar
p/v	Peso a volume
SNC	Sistema Nervoso Central
U	Unidade
UV	ultravioleta
v/v	Volume a volume
µg	Micrograma
µl	Microlitro
µM	Micromolar
µm	Micrômetro

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	20
2 OBJETIVOS	23
3 REVISÃO DE LITERATURA	25
3.1 OS PRIMATAS NEOTROPICAIS – PLATIRRINOS	25
3.1.1 O Gênero <i>Callithrix</i>	26
3.1.1.1 Enfermidades em <i>Callithrix</i>	28
3.2 A FAMÍLIA HERPESVIRIDAE	29
3.2.1 <i>Herpesvirus simplex</i> Tipo 1 (HSV-1) em seres humanos	30
3.2.1.1 Patogênese da infecção pelo HSV-1	31
3.2.1.2 Patologia da infecção pelo HSV-1	32
3.2.1.3 Encefalite por HSV-1	33
3.2.1.4 Diagnóstico da infecção pelo HSV-1	34
3.2.2 <i>Herpesvirus simplex</i> Tipo 1 (HSV-1) em primatas não-humanos	35
3.2.2.1 Infecção pelo <i>Herpesvirus simplex</i> Tipo 1 em <i>Callithrix</i>	37
3.2.3 <i>Herpesvirus</i> de primatas não-humanos com analogia ao <i>Herpesvirus simplex</i> Tipo 1	39
3.2.3.1 Infecção pelo <i>Herpesvirus simiae</i>	39
3.2.3.2 Infecção pelo <i>Herpesvirus platyrrhinae</i>	41
4 MATERIAL E MÉTODOS	44
4.1 ANIMAIS	44
4.1.1 Critérios de seleção dos sagüis	45
4.2 EXAME ANATOMOPATOLÓGICO	45
4.3 PROVA DE INOCULAÇÃO INTRACEREBRAL EM CAMUNDONGO	46
4.4 PROVA DE IMUNOFLUORESCÊNCIA DIRETA (IFD)	46
4.5 EXAME IMUNOISTOQUÍMICO	47
4.6 PRIMEIRO MÉTODO DE DETECÇÃO VIRAL PELA PCR	48
4.6.1 Antecedentes à extração do DNA	48
4.6.2 Extração do DNA	48
4.6.3 <i>Primers</i>	48
4.6.4 Reação da PCR para a detecção de <i>Herpesvirus</i>	49
4.6.4.1 <i>nested</i> PCR	50
4.6.5 Reação da PCR para a detecção de <i>Herpesvirus simplex</i>	50

4.7 SEGUNDO MÉTODO DE DETECÇÃO VIRAL PELA PCR.....	51
4.7.1 Extração do DNA.....	51
4.7.2 <i>Primers</i>	52
4.7.3 Reação da PCR para detecção de <i>Herpesvirus simplex</i> Tipo 1.....	52
4.8 AVALIAÇÃO ULTRA-ESTRUTURAL.....	53
5 RESULTADOS.....	55
5.1 CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS DOS SAGÜIS.....	55
5.1.1 Tratamentos efetuados nos sagüis com infecção herpética.....	56
5.2 HISTÓRICO DE LESÃO HERPÉTICA EM SERES HUMANOS CONTACTANTES.....	56
5.3 AVALIAÇÃO ANATOMOPATOLÓGICA.....	57
5.3.1 Exame Necroscópico.....	57
5.3.2 Exame Histopatológico.....	58
5.3.3 Causa de Morte.....	60
5.4 PROVA DE INOCULAÇÃO INTRACEREBRAL EM CAMUNDONGOS.....	60
5.5 PROVA DE IMUNOFLUORESCÊNCIA DIRETA.....	62
5.6 IMUNOISTOQUÍMICA.....	62
5.6.1 Exame imunoistoquímico nos sagüis.....	62
5.6.2 Exame imunoistoquímico nos camundongos.....	64
5.7 PRIMEIRO MÉTODO DE DETECÇÃO VIRAL PELA PCR.....	64
5.7.1 Reação da PCR para a detecção de <i>Herpesvirus</i>	64
5.7.2 Reação da PCR para a detecção de <i>Herpesvirus simplex</i> Tipo 1.....	65
5.8 SEGUNDO MÉTODO DE DETECÇÃO VIRAL PELA PCR.....	67
5.8.1 Reação da PCR para detecção de <i>Herpesvirus simplex</i> Tipo 1.....	67
5.9 AVALIAÇÃO ULTRA-ESTRUTURAL.....	69
6 DISCUSSÃO.....	77
6.1 AVALIAÇÃO CLÍNICA.....	77
6.2 AVALIAÇÃO ANATOMOPATOLÓGICA.....	80
6.3 MÉTODOS DIAGNÓSTICOS DA INFECÇÃO PELO HSV-1.....	84
6.3.1 Prova de Inoculação Intracerebral em Camundongos.....	84
6.3.2 Imunoistoquímica.....	85
6.3.3 Reação da PCR.....	86
7 CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	89
REFERÊNCIAS.....	92
APÊNDICE.....	100

1 INTRODUÇÃO

A biodiversidade do planeta encontra-se em risco. Estima-se que a cada dia pelo menos uma espécie vegetal e animal são extintas, muitas destas, sem terem sido descritas ou estudadas. O Brasil apresenta a maior diversidade biológica do planeta, detendo de 15 e 20% de toda a biodiversidade mundial e o maior número de espécies endêmicas do globo. Dentre os mamíferos, o Brasil apresenta 524 espécies sendo o país com o maior número.

A perda da diversidade biológica é causada por vários fatores, destacando-se predominantemente a perda de habitat, o tráfico ilegal, a caça, a introdução de fauna e flora exóticas e a ocorrência de epizootias devastadoras. Segundo o Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis (IBAMA) existem 69 espécies de mamíferos ameaçados de extinção no Brasil e de acordo com a *International Union for Conservation of Nature and Natural Resources* (IUCN) 73 espécies encontram-se em ameaça.

Dentre os mamíferos ameaçados destacam-se os primatas do Novo Mundo (Platirrinos), sendo o Brasil o maior detentor destas espécies, apresentando 30% ameaçadas de extinção devido a grande pressão antrópica sobre o seu habitat. Todas as espécies de Platirrinos estão incluídas na lista da *Convention on International Trade in Endangered Species of Wild Fauna and Flora* (CITES), em seu apêndice II, significando que apesar de nem todas estarem diretamente ameaçadas, apresentam algum grau de vulnerabilidade.

Poucas informações sobre as enfermidades que acometem os Platirrinos são conhecidas. No entanto, a longa história de manutenção destes animais em zoológicos, centros de Primatologia, criatórios conservacionistas desempenham papel importante para estes estudos e para a conservação *ex situ* destas espécies. Muitas dificuldades são encontradas quanto à criação destas espécies em cativeiro, sejam estas relacionadas ao manejo e a ocorrência de doenças infecciosas e parasitárias.

A relação entre os seres humanos e os calitriquídeos vêm sendo cada vez mais fortalecida, seja através da longa história de manutenção ilegal destes como animais de estimação ou ultimamente através da comercialização legal.

Esta proximidade pode acarretar na transmissão de inúmeras enfermidades. Os animais podem transmitir doenças aos seres humanos, sendo estas denominadas de antroponose. Quando na ocorrência do inverso, a transmissão de doenças dos seres humanos aos animais, denomina-se zooantroponose.

O *Herpesvirus simplex* é uma importante zooantroponose, a qual vem sendo estudada em primatas não-humanos nas últimas décadas. Os seres humanos são os reservatórios naturais do vírus e a maioria da população adulta apresenta anticorpos. A infecção primária pode ser inaparente ou ser caracterizada por lesões vesiculares na boca ou na junção mucocutânea dos lábios. Após isso, a latência é estabelecida no núcleo dos neurônios de gânglios e o indivíduo se torna portador por toda a vida.

Primatas não-humanos não são naturalmente infectados pelo *H. simplex* adquirindo a doença através do contato com humanos. Infecções autolimitantes em *Hylobates lar* (gibões), *Gorilla gorilla* (gorila) e *Pan troglodytes* (chimpanzés) têm sido descritos. Em *Aotus trivirgatus* (macaco da noite) resulta em infecção letal. Em *Callithrix jacchus* (sagüi de tufo branco), *C. penicillata* (sagüi de tufo preto) e recentemente em *C. geoffroyi* (sagüi de cara branca) tem sido descrito casos letais da doença.

No Brasil há poucos estudos, sendo que estes comprovam a existência de um *Herpesvirus* acometendo *C. jacchus* e *C. penicillata* com o quadro clínico e anatomopatológico bastante sugestivo de *H. simplex*, no entanto não havendo ainda a comprovação da participação desse agente.

Considerando a proximidade dos seres humanos com os calitriquídeos, seja em cativeiro domiciliado, ou em programas de conservação *ex situ* e até mesmo *in situ*, faz com que seja necessário realizar estudos mais aprofundados do *H. simplex* em sagüis no Brasil.

O presente trabalho foi desenvolvido com o objetivo de estudar mais aprofundadamente os casos clínicos e anatomopatológicos sugestivos de *Herpesvirus* observados em muitas clínicas veterinárias, zoológicos e serviços de Anatomia Patológica do Brasil. Visando assim, o melhor entendimento desta enfermidade em calitriquídeos, bem como métodos de diagnósticos mais efetivos.

2 OBJETIVOS

O objetivo geral deste trabalho foi comprovar a hipótese da participação do *Herpesvirus simplex* tipo 1 (HSV-1) como agente etiológico das lesões vesiculares e ulcerativas na pele e mucosas associadas aos quadros neurológicos observados em *Callithrix jacchus* (sagüi de tufo branco), *C. penicillata* (sagüi de tufo preto) no Brasil.

Para isso, os objetivos específicos foram:

- ✓ Caracterizar clinicamente os sagüis suspeitos de infecção por HSV-1;
- ✓ Avaliar as alterações anatomopatológicas nestes sagüis acometidos;
- ✓ Realizar exame imunoistoquímico com anticorpos específicos para HSV de todos os órgão possibilitando avaliar a disseminação deste agente nos órgãos;
- ✓ Realizar ensaio biológico de macerado cerebral de sagüis em camundongos, por via intracerebral, visando assim à obtenção da reprodutibilidade desta enfermidade;
- ✓ Identificar as alterações anatomopatológicas dos camundongos inoculados;
- ✓ Efetuar exame imunoistoquímico que comprovem a presença do agente nos órgãos dos camundongos inoculados;
- ✓ Realizar exame da Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) nos sagüis e camundongos inoculados, para assim poder tipificar as amostras virais encontradas.

3 REVISÃO DE LITERATURA

Os primatas estão divididos em dois grandes grupos, os Catarrinos ou Primatas do Velho Mundo, que estão distribuídos na África e Ásia e os Platyrrinos ou Primatas do Novo Mundo. Estes últimos estão distribuídos na região neotropical das Américas, do México a Argentina podendo ser denominados também de primatas Neotropicais. A separação destes dois grupos ocorreu aproximadamente a 26-27 milhões de anos. Esta recente separação resultou aos Platyrrinos adaptações ao ambiente neotropical, acarretando em inúmeras diferenças entre estes dois grupos (MANSFIELD, 2003).

Uma diferenciação básica entre estes dois grupos é que os Catarrinos apresentam narinas voltadas para baixo e um focinho longo. Já os Platyrrinos apresentam narinas voltadas para o lado e um focinho mais curto. Outras características, como a cauda preênsil nos Platyrrinos e a calosidade isquiática nos Catarrinos, distinguem morfologicamente estes dois grandes grupos de primatas. A ordem Primates é composta por 15 famílias, 77 gêneros e 279 espécies (NOWAK, 1999).

3.1 OS PRIMATAS NEOTROPICAIS – PLATYRRINOS

Os primatas são considerados importantes indicadores da biodiversidade das florestas com potencial importância para as estratégias de conservação (RYLANDS et al., 1997). O conhecimento da diversidade biológica dos Platyrrinos é de extrema importância para auxiliar na conservação destes animais. A taxonomia dos primatas Neotropicais é bastante discutida devido ao grande número de espécies, sendo considerada bastante alterada nas últimas décadas.

Segundo Rylands et al. (2000) a infraordem Platyrrhini está dividida em cinco famílias, sendo elas Callitrichidae, Cebidae, Aotidae, Pitheciidae e Atelidae, 18 gêneros, 110 espécies e 205 subespécies. Muitas destas espécies têm sido adversamente afetadas pelas atividades humanas. Isso ocorre devido à perda de habitat, caça e comercialização ilegais.

Os platyrrinos estão distribuídos em 20 países da América e possivelmente em 21 se confirmado a existência de *Alouatta caraya* no Uruguai (RYLANDS et al., 1997). O Brasil é o país que apresenta a maior diversidade de primatas Neotropicais, apresentando um alto

número de espécies endêmicas. Na Floresta Amazônica encontra-se o maior número de espécies ameaçadas de extinção, seguida pela Floresta Atlântica.

A família Callitrichidae está dividida em seis gêneros (*Callithrix*, *Callimico*, *Cebuella*, *Leontopithecus*, *Mico* e *Saguinus*), 41 espécies e 60 subespécies (RYLANDS et al., 2000), sendo que estes são encontrados nas florestas tropicais da América Central e Sul, principalmente na região Amazônica. Embora, muitas vezes o nome desta família seja denominada de Callithricidae, muitos autores aceitam Callitrichidae como a versão correta.

Estes estão entre os menores primatas do mundo, apresentando comprimento da cabeça e corpo de 130-370mm e cauda com 150-420mm. Adultos pesam de 100 a 900g e nenhuma espécie apresenta a cauda preênsil (NOWAK, 1999). Não apresentam dimorfismo sexual, os membros anteriores são menores que os posteriores, os polegares não são opositores, as mãos e pés são longos e todos os dígitos apresentam garras, exceto nos dedos dos pés (STEVENSON; RYLANDS, 1988).

Os Callitrichideos para muitos, são considerados primatas primitivos, mas novas evidências indicam que são morfologicamente e ecologicamente avançados. Apresentam boa visão e audição, e aparentemente um bom olfato. Expressões faciais são indicadas principalmente pelo movimento dos lábios. Estes animais são diurnos e arborícolas, abrigando-se à noite em buracos de árvores e cavidades (NOWAK, 1999). Vivem em pequenos grupos e ao contrário do que muitas vezes é reportado, não apresentam um sistema de acasalamento monogâmico (NOWAK, 1999). A fêmea acasala-se com mais de um macho durante a época reprodutiva e todos os membros do grupo criam os filhotes cooperativamente.

3.1.1 O Gênero *Callithrix*

Os animais do gênero *Callithrix* são os popularmente conhecidos como sagüis. De acordo com Rylands et al. (2000) este gênero apresenta seis espécies, sendo elas *Callithrix jacchus* (sagüi de tufo branco), *C. penicillata* (sagüi de tufo preto), *C. kublii* (sagüi de Weid), *C. geoffroyi* (sagüi de cara branca), *C. aurita* (sagüi da serra escuro) e *C. flaviceps* (sagüi da serra). Em geral, este gênero é pouco estudado e até os anos 70, não existia observações detalhadas destes animais em vida livre, e poucos estudos em animais mantidos em cativeiro (STEVENSON; RYLANDS, 1988).

O número de pesquisas biomédicas utilizando-se o *C. jacchus* vem aumentando progressivamente nas ultimas décadas, sendo esta a única espécie deste gênero que apresenta importância biomédica (MITTERMEIER et al., 1994). Na Europa o *C. jacchus* é o primata mais utilizado em pesquisas laboratoriais e nos Estados Unidos vem constantemente aumentando desde 1990 (ABBOTT et al., 2003).

O *C. jacchus* representa uma importante alternativa para a substituição do macaco Rhesus em pesquisas biomédicas. Seu reduzido tamanho facilita a acomodação em cativeiro, representam um menor custo e um adicional benefício para a biossegurança (MANSFIELD, 2003). Historicamente são utilizados em estudos de neurociências, biologia reprodutiva, doenças infecciosas, comportamento e no desenvolvimento de medicamentos.

Todos os membros deste gênero têm aproximadamente o mesmo tamanho e são sexualmente monomórficos. O comprimento da cabeça e corpo é de 180-300mm e a cauda de 172-405mm (STEVENSON; RYLANDS, 1988) e os animais adultos pesam entre 230-453g (NOWAK, 1999). A formula dentária é de: I 2/2; C 1/1; PM 3/3; Mo 2/2 contabilizando um total de 32 dentes. Nos *Callithrix* os caninos dificilmente se estendem além dos incisivos.

Membros deste gênero são poliândricos ou monogâmicos e apresentam somente uma fêmea alfa reprodutora (STEVENSON; RYLANDS, 1988; PISSINATI, 1993; NOWAK, 1999; VERONA; PISSINATTI, 2007). Ocorre uma supressão da fertilidade das fêmeas subordinadas do grupo devido à presença da fêmea dominante que é a única que apresenta os níveis elevados de progesterona (ALENCAR et al., 1995; VERONA; PISSINATTI, 2007). Dados indicam que os nascimentos ocorrem o ano todo em cativeiro (PETERS; GUERRA, 1998). Estudos em vida livre sugerem que os nascimentos ocorrem em agosto, setembro, outubro e novembro, podendo ocorrer também em abril, maio e junho (STEVENSON; RYLANDS, 1988).

O ciclo estral é de aproximadamente 30 dias, sendo o estro de 2-3 dias (NOWAK, 1999). O período de gestação é de aproximadamente 148 ($\pm$ 4,3) dias (PETERS; GUERRA, 1998). As fêmeas podem parir de 1-3 filhotes, sendo mais comum o nascimento de gêmeos. Os filhotes nascem com 20-35g (STEVENSON; RYLANDS, 1988). O período de lactação é de 100 dias e a maturidade sexual é de 11-15 meses para machos e 14-24 para fêmeas (NOWAK, 1999). O tempo de vida é de aproximadamente 10 anos na vida livre e mais de 16 anos no cativeiro.

Informações sumarizadas sobre estes animais indicam viver em grupos de aproximadamente 4-15 indivíduos, ocupando uma área de 0,5-28 hectares e não são territorialistas. Todos são arborícolas, mas muitos são observados no chão em florestas

abertas (*C. jacchus*, *C. penicillata*, *C. aurita*) coletando frutos caídos ou exsudatos das árvores. Em geral, eles vivem no estrato baixo das grandes florestas, entre 5-19m (STEVENSON; RYLANDS, 1988). Eles ocorrem na Amazônia, Mata Atlântica, Caatinga no e no Cerrado.

Quanto à dieta, são considerados frugívoros-insetívoros, alimentando-se de frutas, flores, exsudatos de plantas, insetos, aranhas, lagartixas, lesmas, sapos, filhotes e ovos de aves, podendo talvez comer brotos de plantas (STEVENSON; RYLANDS, 1988). Há relatos de que esses animais gastarem 25-30% do tempo em atividades de forrageamento. O *Callithrix jacchus* e *C. penicillata* são evidentemente os que mais se alimentam de exsudatos de plantas.

As espécies *C. aurita* e *C. flaviceps* encontram-se em risco de extinção pela IUCN e IBAMA e estão no apêndice I do CITES, sendo que todas as outras espécies se encontram no apêndice II. A IUCN também classifica *C. geoffroyi* como vulnerável. Todas estas espécies são colocadas em risco devido à destruição dos seus habitats.

3.1.1.1 Enfermidades em *Callithrix*

Embora muitas enfermidades que acometem os sagüis sejam conhecidas, grande parte destas informações é proveniente da literatura estrangeira. Dentre os estudos realizados no Brasil, Diniz e Costa (1995) utilizando dados clínicos e laboratoriais em 265 *C. jacchus* de cativeiro, concluiu que o maior problema encontrado nestes animais são as desordens digestivas causadas por protozoários e helmintos, seguidas pelas pneumonias e deficiências nutricionais.

Um estudo anatomopatológico realizado por Epiphanyo (1997) em calitriquídeos mantidos de cativeiro, encontrou como principal causa de morte a insuficiência cardíaco-respiratória, seguida por inanição, eutanásia e insuficiência renal. Os diagnósticos principais foram pneumonia, enterite, desnutrição, osteodistrofia e traumatismos.

Outro estudo anatomopatológico realizado por Sá (1999) em calitriquídeos e cebídeos de cativeiro e de vida livre encontrou como principal problema os processos infecto-parasitários, seguido pela síndrome do emagrecimento progressivo, alterações metabólicas, distúrbios digestivos e traumáticos.

3.2 A FAMÍLIA HERPESVIRIDAE

Infecção por *Herpesvirus* tem sido documentada há mais de 25 séculos desde a Grécia antiga. Heródoto, Hipócrates, Celso e Galeno dentre outros médicos da antiguidade denominavam uma variedade de desordens da pele como sendo “herpes”, mas provavelmente nem todas deveriam ser realmente infecção pelo herpesvírus. A palavra “herpes” vindo do grego e significa rastejar ou engatinhar, em analogia a lesão visualizada na pele. Embora, descrições mais restritivas surgiram no final do século XVII e início do século XVIII, somente no início do século XIX que o uso do termo “herpes” foi aplicado para as doenças associadas com os específicos *Herpesvirus* de hoje. No final do século XIX foi comprovada como sendo uma doença infecciosa, na mesma época em que Louis Pasteur e Robert Koch provaram a existência dos agentes infecciosos.

Os membros da família Herpesviridae são classificados baseando-se na arquitetura do vírion. Estes são formados por: **a)** core contendo uma fita linear dupla de DNA, **b)** capsídeo icosaédrico de aproximadamente 100-110nm de diâmetro contendo 162 capsômeros, **c)** tegumento amorfo, ao redor do nucleocapsídeo, **d)** envelope, onde se localizam as glicoproteínas de superfície viral. O vírion tem tamanho variando de 120 a 300nm, que se deve à variação da espessura do tegumento e envelope (ROIZMAN; PELLETT, 2001).

São altamente disseminados na natureza, sendo identificados em um vasto número de espécies animais. Até o ano de 2001 mais de 130 Herpesvirus tinham sido caracterizados, sendo nove destes, isolados da espécie humana [herpes simplex 1 (HSV-1), herpes simplex 2 (HSV-2), cytomegalovirus (HCMV), varicella-zoster vírus (VZV) and Epstein-Barr (EBV), Herpes humano 6A, 6B, 7 e 8 (HHV-6A., HHV-6B., HHV-7 e HHV-8)] (ROIZMAN; PELLETT, 2001).

Alguns herpesvírus têm largo alcance nas células hospedeiras, multiplicam eficientemente e destruindo as células infectadas (HSV-1 e HSV-2), estreito alcance (EBV, HHV-6) ou apresentam um longo ciclo replicativo (HCMV). Todos permanecem latentes, mas a especificidade celular varia de um vírus para outro.

A família Herpesviridae apresenta três subfamílias: Alphaherpesvirinae, Betaherpesvirinae e Gammaherpesvirinae. Esta divisão se faz com base nas propriedades biológicas e sequência do DNA (ROIZMAN; PELLETT, 2001).

A subfamília Alphaherpesvirinae tem variado número de hospedeiros, rápido ciclo de replicação *in vitro* e *in vivo* e uma afinidade por células epiteliais (sendo estes vírus altamente

citolíticos). São caracterizados por longos períodos de latência, principalmente em gânglios sensoriais dos hospedeiros, mas não exclusivamente. Produzem geralmente doença branda em seus hospedeiros naturais e quando infectam outros hospedeiros são considerados bastante patogênicos (HUNT, 1993a).

A subfamília Betaherpesvirinae ou Citomegaloviroses, geralmente tem hospedeiros restritos com prolongado ciclo replicativo e não são rapidamente citolíticos como os Alphaherpesvírus. *In vivo* e *in vitro* eles causam um aumento do núcleo e citoplasma da célula (citomegalia) e produz grande inclusão anfofílica intranuclear e uma pequena inclusão basofílica no citoplasma. Infecções latentes ocorrem em glândulas secretoras, como na glândula salivar, órgãos linfóides, rim, e outros tecidos. Estes agentes têm hospedeiros específicos, sendo a infecção e a doença confinadas ao hospedeiro natural (HUNT, 1993a).

A subfamília Gammaherpesvirinae geralmente apresenta hospedeiros restritos, limitada a uma família ou ordem o qual o hospedeiro natural ou reservatório pertence. Em cultura celular, todos os membros replicam em células linfoblásticas, mas são específicos para linfócitos T ou B. Alguns representantes desta subfamília são citolíticos para células epiteliais e fibroblásticas. A infecção latente ocorre nos tecidos linfóides, nos linfócitos T ou B.

3.2.1 *Herpesvirus simplex* Tipo 1 (HSV-1) em seres humanos

Herpesvírus simplex foi o primeiro herpesvírus a ser descoberto e está entre os vírus mais intensamente estudados. Seus atrativos são as suas propriedades biológicas, particularmente a habilidade de causar uma variedade de infecção, por permanecer latente por toda vida no seu hospedeiro e por ser reativado e causar lesão perto do local inicial da infecção (ROIZMAN; KNIPE, 2001). O DNA viral do HSV-1 contém 152.260 pares de base (bp) (GenBank: X14112), sendo o conteúdo de glicina e citosina de aproximadamente 68%.

Existem dois sorotipos, *Herpes simplex* tipo 1 (HSV-1) e *Herpes simplex* tipo 2 (HSV-2) (NAHMIAS; DOWDLE, 1968). Os HSV-1 e HSV-2 diferem em diversos sítios de restrição e também no tamanho das proteínas virais. Infecções orais, conjuntivais e encefalites geralmente são causadas pelo HSV-1 e infecções genitais e neonatais usualmente causadas pelo HSV-2 (ROIZMAN; KNIPE, 2001).

Embora as propriedades antigênicas destes dois vírus sejam semelhantes, a glicoproteína G induz a formação de anticorpos que permitem distingui-los do ponto de vista

imunológico. Considera-se que o HSV-1 seja responsável por causar infecções acima da cintura nos seres humanos, enquanto o HSV-2, infecções abaixo da cintura, embora exceções possam ocorrer (KOLOKOTRONIS; DOUMAS, 2006).

Os seres humanos são os hospedeiros naturais ou reservatórios do vírus. Gengivostomatites herpéticas representam a mais comum observação clínica da infecção primária por HSV, ocorrendo em 25-30% das crianças afetadas (AMIR et al., 1999). A maioria dos casos de infecção primária são assintomáticas (KOLOKOTRONIS; DOUMAS, 2006). A infecção primária pelo HSV-1 ocorre basicamente na infância, geralmente entre os 2 e 10 anos de idade, sendo que a grande maioria das crianças já foram infectadas ao atingirem a adolescência (PANNUTI, 2003). Há também uma influência socioeconômica na incidência da infecção pelo HSV-1, sendo observado que países em desenvolvimento, onde a população apresenta soropositividade mais precoce do que em países desenvolvidos.

3.2.1.1 Patogênese da infecção pelo HSV-1

O vírus é transmitido pela saliva e secreções de vesículas ou úlceras. O HSV penetra no organismo através da pele ou mucosa lesada. A infecção celular inicia-se com a fusão do envelope do vírion com a membrana das células. Algumas glicoproteínas da superfície viral são essenciais para esta fusão e para a passagem do vírus para dentro das células (HAY; RUYECHAN, 1992). O fator de crescimento fibroblástico básico (bFGF) age como receptor celular para a entrada do HSV (KANER et al., 1990). O capsídeo viral e parte do tegumento são então transportados até a membrana nuclear. O DNA viral e algumas proteínas do tegumento adentram o núcleo, iniciando o ciclo de replicação viral.

Com a replicação viral no local da infecção, o vírus intacto ou nucleocapsídeo são levados através do transporte axonal retrógrado para a raiz do gânglio dorsal, e a latência é estabelecida no núcleo dos neurônios (WHITLEY, 2001). A infecção latente nos neurônios caracteriza-se pela persistência do vírus na ausência de infecção clínica aparente e inexistência de replicação viral ativa. Esta latência foi comprovada em seres humanos pela primeira vez em 1972 (BASTIAN et al., 1972). O vírus fica latente nos gânglios sensitivos, podendo ser identificado em 48% dos neurônios, sendo que existem menos de 20 cópias de DNA viral por célula infectada (MEHTA et al., 1995).

Após a latência ser estabelecida, a reativação ocorre devido a estímulos locais ou sistêmicos, como estresse físico e mental, febre, exposição a raios ultravioletas (UV), dano tecidual e imunossupressão (BARINGER, 1975; KOLOKOTRONIS; DOUMAS, 2006; WHITLEY, 2001). Os nucleocapsídeos virais são levados através do transporte axonal anterógrado para o tecido periférico, usualmente próximo ao local da infecção primária (ROIZMAN; KNIPE, 2001). Dependendo de inúmeros fatores, a reativação pode ser assintomática ou levar a uma lesão recorrente local ou sistêmica.

Em seres humanos imunocompetentes os casos de HSV-1 são geralmente leves. Já nos pacientes imunocomprometidos, especialmente aqueles submetidos a transplantes de órgãos, a reativação da infecção latente é a regra (MACHADO et al., 1997; PANNUTI, 2003; WEINBERG et al., 1989). A maioria desses pacientes irá apresentar lesões logo após o início da excreção, que podem ser localizadas e autolimitadas ou causar quadros sistêmicos com disseminação hematogênica, acometendo pele, fígado, pulmões, adrenais e sistema nervoso central (SNC) (JOHNSON et al., 1992; PANNUTI, 1995).

3.2.1.2 Patologia da infecção pelo HSV-1

As alterações induzidas pela replicação do HSV-1 são similares na infecção primária e recorrente, mas a severidade da lesão pode variar. De acordo com Whitley (2001) as lesões representam a combinação de morte celular mediada pelo vírus associada à resposta inflamatória. As alterações induzidas pela infecção viral nas células incluem degeneração balonosa, condensação da cromatina nuclear seguido por degeneração nuclear nas células epiteliais, as quais perdem a membrana plasmática formando células gigantes multinucleadas (WHITLEY; KIMBERLIN, 2005).

Com a lise celular, há formação de vesículas entre a derme e a epiderme que contém fluido claro com grande quantidade de vírus, debris celulares, células inflamatórias e células gigantes multinucleadas (WHITLEY, 2001). A vesícula se transforma em pústula com o recrutamento de células inflamatórias e assim ocorre a resolução do processo. Quando a mucosa é envolvida, é observada com maior frequência a formação de úlceras, como resultado da ruptura vesicular, já que este tecido apresenta camada epitelial delgada. No entanto, as alterações são similares às observadas na pele. Evidencia-se também manguitos perivasculares e necrose hemorrágica.

3.2.1.3 Encefalite por HSV-1

A encefalite herpética (HSE) é a complicação mais fatal da infecção pelo HSV estando entre uma das mais severas de todas as infecções virais no SNC de seres humanos (WHITLEY; KIMBERLIN, 2005). Em geral, é atribuída principalmente ao HSV-1, mas muitos casos de meningite estão relacionados ao HSV-2. HSE é considerada a causa mais comum de encefalite fatal esporádica nos Estados Unidos (MEYER et al., 1960). Em todo o mundo, é responsável por 10-20% dos casos de encefalite viral primária ou secundária (KOLOKOTRONIS; DOUMAS, 2003).

HSE resulta, na maioria das vezes, na reativação da infecção latente pelo HSV, mas também pode ocorrer devido à infecção primária. As primeiras evidências experimentais deste fato surgiram em 1948, quando se induziu choque anafilático em coelhos com infecção latente pelo HSV, provocando encefalite (GOOD; CAMPBELL, 1945). Dois terços dos pacientes com HSE possuem anticorpos prévios anti-HSV (NAHMIAS et al., 1982). Este fato, associado à baixa frequência de isolamento do HSV em sítios periféricos na HSE, demonstra que a grande maioria dos casos de encefalite herpética em seres humanos é decorrente de reativação de infecção latente.

Não se sabe precisamente o sítio de reativação do HSV nos casos de HSE. A primeira hipótese aventada foi de que o HSV seria reativado periféricamente em gânglios sensitivos e disseminado através do fluxo axonal retrógrado, causando encefalite (DAVIS; JOHNSON, 1979). Entretanto, demonstrou-se em modelos experimentais (DRUMMOND; EGLIN; ESIRI, 1994) e em seres humanos (JAMIESON et al., 1991) que o HSV é capaz de produzir infecção latente no próprio SNC, sendo, portanto, menos eficaz em reativar-se.

A neurovirulência e a latência são propriedades biológicas do HSV que influenciam na produção da doença nos humanos (WHITLEY, 2001). A propriedade do HSV de invadir e replicar no SNC pode resultar em uma doença neurológica severa. A neurovirulência inclui a capacidade de neuroinvasividade e a habilidade de replicar em neurônios.

A apresentação clínica é, muitas vezes, inespecífica, no entanto pode haver evidências clínicas de lesão localizadas no lobo temporal (WHITLEY; KIMBERLIN, 2005). Os resultados de neuroimagem e eletroencefalograma são de reconhecida importância na avaliação inicial dos pacientes com suspeita diagnóstica de HSE, entretanto, eles não permitem diferenciar precisamente entre infecções do SNC pelo HSV e outras doenças neurológicas que mimetizam a encefalite herpética (DOMINGUES et al., 1997).

HSV é a forma mais comum de encefalite necrotizante aguda (ELLISON et al., 2005). As lesões macroscópicas são caracterizadas por necrose hemorrágica, congestão e edema. Em indivíduos imunocompetentes a HSE apresenta-se como uma encefalite localizada em áreas específicas dos lobos temporal e frontal (DRACHMAN; ADAMS, 1962). Embora seja possível induzir encefalite através de disseminação neurogênica e hematogênica do HSV (JOHNSON, 1964), apenas a primeira determina o caráter focal da doença (ANDERSON; FIELD, 1983).

Microscopicamente, as lesões encefálicas podem variar de leve a severa. Em lesões mais avançadas, observa-se necrose celular, infiltrado inflamatório intenso perivascular e no interstício constituído por linfócitos e macrófagos (ELLISON et al., 2005). Em cerca de metade dos casos encontram-se inclusões intranucleares (Cowdry tipo A), principalmente em neurônios, mas também em astrócitos e oligodendrócitos.

3.2.1.4 Diagnóstico da infecção pelo HSV-1

Até o final da década de 50, a maioria dos isolamentos virais eram obtidos através da inoculação em animais ou em membrana corioalantóica. A introdução da técnica de cultura celular tornou mais eficaz o isolamento viral. Através das lesões é possível o diagnóstico clínico, mas nos casos com envolvimento visceral é necessária a comprovação laboratorial (PANNUTI, 2003). O isolamento viral em culturas celulares, em material obtido por suabe, na maioria dos casos, o resultado é obtido em 24 a 48 horas, excepcionalmente, podendo demorar até sete dias.

A Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) também permite um diagnóstico em 24 horas, sendo considerada atualmente a técnica de eleição para a encefalite herpética, através da detecção viral no líquido cefalorraquidiano (LCR) (DOMINGUES et al., 1997; WHITLEY; KIMBERLIN, 2005). A PCR também tem se mostrado mais sensível que o isolamento viral clássico para detecção do vírus em úlceras causadas pelo HSV, além de permitir a diferenciação direta do HSV-1 e HSV-2 (PANNUTI et al., 1997). As técnicas sorológicas raramente têm utilidade no diagnóstico das infecções pelos HSV, haja vista que grande parte da população humana apresenta anticorpos.

3.2.2 *Herpesvirus simplex* Tipo 1 (HSV-1) em primatas não-humanos

Primatas não-humanos não são naturalmente infectados pelo *H. simplex* e comumente adquire a doença através do contato com humanos. São susceptíveis a ambos sorotipos e estas infecções não são comuns em nenhuma espécie de primata (HUNT, 1993b).

Infecções em *Hylobates lar* (gibões), *Gorilla gorilla* (gorila) e *Pan troglodytes* (chimpanzés) têm sido descritos (SMITH et al., 1969; EMMONS; LENNETTE, 1970; MARENNIKOVA et al., 1973). Nestas espécies a infecção geralmente é autolimitante com lesões vesiculares, erosivas e ulcerativas na cavidade oral, pele, genitália externa e conjuntiva. Infecção experimental em macaco-prego produz doença localizada (FELSBURG et al., 1972).

Em *Aotus trivirgatus* (macaco da noite), resulta em infecção disseminada e letal (HUNT; MELENDEZ, 1966; MELENDEZ et al., 1969). Os HSV-1 e HSV-2 são igualmente patogênicos em infecção experimental em macacos da noite, não sendo observada diferença clínica entre os dois (MELENDEZ et al., 1969). A patogênese da doença em macacos da noite é exatamente idêntica à provocada pelo *H. platyrrhinae*, exceto que a encefalite pode ser a seqüela mais freqüente.

As lesões encontradas tanto de forma natural como experimental em *Aotus trivirgatus* caracterizam-se por vesículas, placas necróticas, erosões e úlceras na mucosa oral, e nas junções mucocutâneas dos lábios (MELENDEZ et al., 1969) que podem ser discretas ou acometer toda a cavidade oral, estendendo para a faringe, esôfago e traquéia. A lesão pode estender para a pele adjacente e genitália externa. Conjuntivite é freqüentemente observada e lesões necróticas também podem ser observadas no fígado, adrenais e rins.

Lesões similares podem ser observadas em infecção natural em *Tupaia glis* (musaranho) (MCCLURE et al., 1972, 1980) e em lêmures (KEMP et al., 1972). Infecção experimental através da inoculação intravaginal em *Saguinus oedipus* e *S. fuscicollis* (tamarinos) com HSV-2 resultou em infecção disseminada (FELSBURG et al., 1973).

Doença generalizada em espécies susceptíveis é idêntica à induzida pelo *H. platyrrhinae* (KING, 2001). As lesões são similares em todas as espécies acometidas, no entanto, há variação da severidade (HUNT, 1993b). Necrose multifocal e dermatite vesicular são muitas vezes severas na pele da face, sendo acompanhada por blefarite e estomatite (KING, 2001).

Segundo Hunt (1993b), histologicamente há um aumento da eosinofilia das células epiteliais afetadas, degeneração balonosa, cariorrexia e cariólise dos núcleos acompanhado

por edema intracelular com progressão para a formação de vesículas. Muitas vezes, observam-se placas necróticas estendendo sobre a submucosa. As vesículas são visualizadas comumente em epitélios corneificados. O tecido necrótico pode se soltar formando úlceras.

Adjacente ao tecido necrótico, associado à degeneração balonosa, células multinucleadas e epiteliais contém inclusões intranucleares. As inclusões podem ocupar o núcleo por completo ou formar um halo em volta da mesma. Estas podem ser anfofílicas ou eosinofílicas. Na mucosa e submucosa observa-se infiltrado de neutrófilos e células mononucleares. As lesões podem estender-se até a submucosa causando necrose de fibroblastos e de vasos. Inclusões podem ser encontradas nas células mononucleares e endoteliais (HUNT, 1993b).

Lesões necróticas podem ocorrer no estômago, estendendo até o colón, atingindo a submucosa e são acompanhadas de intensa reação inflamatória. Células sinciciais são raramente vistas nestas lesões. No trato respiratório focos de necrose ocorrem no epitélio da traquéia, brônquio, bronquíolos e paredes alveolares. Em órgãos parenquimatosos, como fígado, adrenais e linfonodos podem ocorrer necrose multifocal de tamanhos variados e distribuição aleatória, muitas vezes acompanhadas de hemorragia. Inclusões intranucleares são numerosas, mas células sinciciais são raras, exceto nos ductos biliares (HUNT, 1993b).

Em *Aotus trivirgatus* a encefalite pode ser observada em casos sistêmicos, havendo necrose de neurônios principalmente na região do córtex temporal e no tálamo (HUNT, 1993b). Existe um aumento da eosinofilia do citoplasma dos neurônios e cariorrexia dos núcleos. Podem-se observar inclusões intranucleares nos neurônios e em astrócitos. Existem poucos manguitos perivasculares, mas o endotélio dos vasos pode estar hipertrófico e hiperplásico (HUNT, 1993b).

Em gibões, meningoencefalite multifocal aguda foi evidenciada na ponte e córtex cerebral. Estas alterações podem ser acompanhadas por necrose, reatividade glial e inclusões típicas de Cowdry tipo A. Durante um surto natural em gibões, a encefalite viral foi desenvolvida na minoria dos animais após apresentarem lesões orais (EMMONS; LENNETTE, 1970).

3.2.2.1 Infecção pelo *Herpesvirus simplex* Tipo 1 em *Callithrix*

Poucos relatos de HSV em *Callithrix* tem sido documentados na literatura internacional. A primeira descrição de infecção espontânea foi realizada em *C. jacchus* por Juan-Sallés et al. (1997). Este trabalho foi desenvolvido com quatro sagüis jovens que apresentaram suspeita de infecção herpética. A manifestação clínica foi de 3-4 dias, sendo caracterizada por depressão, anorexia e úlceras na pele e mucosas.

No exame necroscópico foram encontradas lesões ulcerativas associadas a exsudato fibrino-necrótico no abdômen, na junção mucocutânea dos lábios, região oronasal e nas pálpebras. Microscopicamente foi observado nestas áreas afetadas, necrose epitelial com deposição de fibrina e degeneração hidrópica e balonosa. Inclusões eosinofílicas ocasionais foram vistas nos queratinócitos. Observou-se também encefalite no córtex frontal, lobo temporal e no hipotálamo, associado a inclusões em neurônios e células da glia. A confirmação do HSV foi realizada através da PCR, não sendo feito a diferenciação entre o HSV-1 e HSV-2.

O primeiro relato de infecção natural por HSV-1 em *C. jacchus* ocorreu em 2002 (HUEMER et al., 2002). Um sagüi adulto apresentou histórico de estomatite necrotizante severa, vômito e perda de apetite, morrendo oito dias após o início dos sinais clínicos. Não foi efetuada a necropsia e a confirmação viral foi obtida através da utilização da PCR que diferenciou o HSV-1 do HSV-2, podendo assim ser comprovada a presença do primeiro.

No ano de 2003 foi descrito um surto de HSV-1 em um grupo de oito *C. jacchus* (MATZ-RENSING et al., 2003). Todos os animais apresentaram histórico de 1-2 dias com gengivite e estomatite ulcerativa, acompanhada de salivação intensa, descarga nasal, anorexia e depressão, sendo que cinco morreram naturalmente e três foram eutanasiados.

Macroscopicamente observou-se além da gengivite e estomatite ulcerativa, esplenomegalia, linfadenopatia severa em linfonodos regionais. Histologicamente encontrou-se vesiculação e ulceração severa do epitélio escamoso da língua com acantose, paraqueratose, necrose de coagulação que se entendiam até a submucosa. Inclusões intranucleares que ocupavam todo o núcleo ou eram rodeadas por um halo claro foram observadas particularmente próximas às vesículas e úlceras. Infiltração de neutrófilos, linfócitos e macrófagos foram observados na submucosa. Evidenciou-se também adrenalite, hepatite e nos demais órgãos, não foram encontradas lesões. A confirmação do HSV-1 foi realizada através da PCR.

Em 2004 relatou-se outro surto de HSV-1 em um grupo de cinco *C. jacchus* (HATT et al., 2004). Num período de sete dias, três destes animais morreram apresentando os mesmos sinais clínicos reportados por Huemer et al. (2002); Juan-Sallés et al. (1997) e Matz-Rensing et al. (2003). Duas semanas após o terceiro animal ser eutanasiado, um outro sagüi morreu subitamente, sendo que uma semana antes este animal e um outro exibiram depressão, anorexia que desapareceu espontaneamente. Nestes quatros animais que morreram, observou-se além das lesões ulcerativas na boca e língua, meningoencefalite não supurativa associada a inclusões intranucleares. No único sagüi sobrevivente foi realizada sorologia, no qual detectaram-se anticorpos anti-HSV, permanecendo soropositivo por mais de três anos.

Recentemente foi diagnosticado em *Callithrix geoffroyi* (sagüi de cara branca) um surto de infecção similar ao HSV-1 (LEFAUX et al., 2004). Este surto ocorreu em um grupo de seis sagüis, sendo caracterizada por gengivoestomatite ulcerativa associada a encefalite rapidamente fatal.

No Brasil o primeiro relato ocorreu em 1989, sendo realizado em *C. jacchus* e *C. penicillata* atendidos no Hospital Veterinário da FMVZ-USP (ANDRADE NETO et al., 1989). Estes sagüis apresentavam úlceras na boca, gengiva, palato, língua e distúrbios neurológicos. O diagnóstico foi dado através da inoculação da suspensão de tecido cerebral em camundongos por via intracerebral, sendo pós-inoculado em cultivo celular o qual apresentou efeito citopático característico de *Herpesvirus*.

O segundo relato ocorreu em dois *C. jacchus* (PACHALY; WERNER; DINIZ, 1991) com os mesmos sinais clínicos relatados por Andrade Neto et al. (1989). O diagnóstico foi dado através dos achados clínicos e anatomopatológicos. Diniz e da-Costa (1995) examinando clinicamente 265 sagüis encontraram três com encefalite fatal. Estes apresentavam perda da coordenação e vesículas na língua, sendo sugestivos de infecção por HSV. Epiphanyo (1997) realizando estudo em 561 calitriquídeos de cativeiro encontrou dois *C. penicillata* e dois *C. Jacchus* com estomatite sugestiva de HSV.

No mesmo ano foi demonstrada a presença de infecção por Herpesvírus em um *C. penicillata* na Unidade de Conservação do Parque Estadual da Serra da Tiririca, Rio de Janeiro (BRUNO et al., 1997). O diagnóstico foi estabelecido através da sintomatologia clínica, avaliação histopatológica e ultraestrutural da lesão lingual.

3.2.3 *Herpesvirus* de primatas não-humanos com analogia ao *Herpesvirus simplex* Tipo 1

A relação enzoótica do *H. simplex* em humanos é análoga ao *H. simiae* em primatas do Velho Mundo do gênero *Macaca* e ao *H. platyrrhinae* em saimiris. Atualmente muitos herpesvírus são conhecidos por infectar primatas não-humanos. Muitos destes são comuns a várias espécies, sendo considerados importantes patógenos aos primatas não-humanos e poucos são patogênicos para humanos.

3.2.3.1 Infecção pelo *Herpesvirus simiae*

Herpesvirus simiae ou Herpes B foi o primeiro herpesvírus de primatas não-humanos a ser identificado (HUNT, 1993c). Ocorre como uma infecção latente, subclínica em diversas espécies de macacos asiáticos do gênero *Macaca*, como *M. mulatta* e *M. fuscata*. Embora raramente associado com doença no hospedeiro natural, infecções acidentais em humanos resultam em uma disseminada infecção viral caracterizada por paralisia ascendente e altamente fatal. O aumento do número de casos em humanos desde 1987 tem estimulado o interesse pelo estudo desta doença.

Macacos asiáticos comumente infectados com Herpes B incluem *Macaca mulatta* (Rhesus), *M. radiata*, *M. fuscata*, *M. arctoides*, *M. cyclopis*, *M. fascicularis* (HUNT; BLAKE, 1993). Infecções em outros primatas incluindo *Erythrocebus patas* (macaco vermelho), *Colobus abyssinicus* (macaco Colobus), *Cebus apella* (macaco-prego) e *Callithrix jacchus* tem sido reportada como fatal (GAY; HOLDEN, 1933; LOOMIS et al., 1981; WILSON et al., 1990).

A incidência da infecção em macacos Rhesus imaturos é geralmente baixa, mas aumenta rapidamente com a maturidade sexual. Em algumas colônias, 80-90% dos Rhesus são soropositivos por volta dos 3-4 anos (WEIGLER et al., 1993). A proporção de animais que apresentam lesões orais e labiais é baixa. Numa grande pesquisa, utilizando-se 14.400 animais, somente 2,3 % apresentavam lesões visíveis (KEEBLE, 1960).

A transmissão do vírus pode ocorrer através de forma venérea, via fômites ou através de mordidas. Os animais permanecem infectados por toda a vida e periodicamente o vírus é

excretado nas secreções orais e genitais. A infecção primária em Rhesus é usualmente leve e autolimitante. Observam-se lesões vesiculares que progridem para úlceras, nas mucosa oral, labial e genital que curam com 10-14 dias. Estas lesões quando presentes, são semelhantes ao HSV-1 em humanos (HUNT; BLAKE, 1993).

A patogênese em animais do gênero *Macaca* é similar ao HSV-1 em humanos (HUNT; BLAKE, 1993; KING, 2001). A infecção primária leva a replicação nas células epiteliais do local de inoculação, geralmente a pele ou mucosa e subseqüentemente, os vírions são levados através do transporte axonal retrógrado até os gânglios sensoriais, onde a infecção latente é estabelecida por toda a vida do animal. Fatores responsáveis pela reativação da infecção latente são pobremente estudados. Acredita-se que os mesmos fatores que contribuem para uma reativação do HSV em humanos podem também levar o Herpes B a se reativar nos macacos.

Histologicamente, lesões cutâneas e na mucosa são caracterizadas por degeneração balonosa das células epiteliais, cariorrexia e cariólise dos núcleos com progressão para a formação de vesículas (KING, 2001). Células sinciciais multinucleadas são observadas em meio à degeneração e envolta de vesículas (HUNT; BLAKE, 1993). Inclusões intranucleares eosinofílicas e anfofílicas são observadas nas células epiteliais e nas células gigantes multinucleadas. Células inflamatórias podem estar presentes nas vesículas, epiderme e derme adjacente. Com a ruptura das vesículas, bactérias e fungos podem invadir a lesão acentuando o processo inflamatório (HUNT; BLAKE, 1993). Necroses das células endoteliais com inclusões intranucleares podem estar presentes em alguns casos.

Infecções sistêmicas em macacas são extremamente raras, mas quando ocorrem são geralmente fatais, disseminando para a maioria dos órgãos, incluindo o pulmão, fígado, baço, medula óssea e córtex da adrenal (WILSON et al., 1990; SIMON et al., 1993). Nestes casos ocorrem extensas áreas de necrose no fígado, pulmão, encéfalo, órgãos linfóides (SIMON et al., 1993), observando-se inclusões intranucleares nos hepatócitos e células de Kupffer (HUNT; BLAKE, 1993), bem como no pulmão, baço, linfonodos e no córtex da adrenal (McCLURE et al., 1973). A encefalite é caracterizada por necrose neuronal, gliose, manguitos perivasculares, inclusões intranucleares nas células da glia e nos neurônios (HUNT; BLAKE, 1993).

Partículas virais típicas de herpesvírus são observadas no núcleo das células afetadas (HUNT; BLAKE, 1993). Nas culturas celulares, células sinciciais multinucleadas e inclusões intranucleares Cowdry Tipo A caracterizam o efeito citopático (KING, 2001). O diagnóstico pode ser feito por sorologia utilizando testes como ELISA e Western blot (WARD;

HILLIARD, 1994). Através de biopsia é possível confirmar a infecção pelo herpesvírus através das lesões histológicas típicas, no entanto não podendo determinar o tipo de herpesvírus envolvido (HUNT; BLAKE, 1993).

O primeiro isolamento de herpesvírus B ocorreu em 1932 proveniente do sistema nervoso central de um funcionário de laboratório, o qual morreu após ter sido mordido por um macaco Rhesus (SABIN; WRIGHT, 1934). Mais de duas décadas se passaram para que o vírus tivesse sido reconhecido em macacos Rhesus. Menos de 40 casos em humanos tem sido documentados (HOLMES et al., 1995), sendo que a maioria destes foi resultado de injúrias infligidas por animais do gênero *Macaca*.

Em seres humanos, a dermatite vesicular é desenvolvida no local da inoculação de 1-5 dias após a exposição. O local da inoculação pode ser altamente pruriginoso e vir acompanhado de linfangite e linfadenite. Em 3-7 dias após iniciar as lesões cutâneas, os sinais neurológicos podem ocorrer devido à mielite ascendente (BOGAERT; INNES, 1962). Febre, paralisia, fraqueza muscular e conjuntivite podem ser observadas no início da mielite ascendente. A taxa de mortalidade em humanos é de aproximadamente 70%, sendo que as mortes ocorrem de 10-14 dias. Muitos dos sobreviventes apresentam seqüelas neurológicas severas.

3.2.3.2 Infecção pelo *Herpesvirus platyrrhinae*

A infecção pelo *Herpesvirus platyrrhinae* (saimirine herpesvirus 1; herpes T; *Herpesvirus tamarinus*) apresentam muitas similaridades biológicas e clínico-patológicas com o HSV em humanos. Este vírus comumente causa uma infecção latente e assintomática em macacos saimiris (*Saimiri sciureus*), mas quando transmitido naturalmente ou experimentalmente para macacos da noite (*Aotus* spp.) e inúmeras espécies de sagüis (*Callithrix* spp.) e tamarinos (*Saguinus* spp.) causa uma doença aguda fatal (HUNT; MELENDEZ, 1966; KING et al., 1967).

Os saimiris tornam-se portadores no início da vida e abrigam o vírus assintomaticamente no gânglio sensorial. Reativações periódicas e eliminação viral nas secreções orais constituem o curso primário da infecção. Análises sorológicas demonstraram anticorpos contra *H. platyrrhinae* em macacos aranha (*Ateles* spp.), macacos prego (*Cebus* spp.) e macacos barrigudo (*Lagothrix* spp.) os quais não apresentavam sinais clínicos da

doença, sugerindo que estes animais também podem servir como reservatório em populações de vida livre (HOLMES et al., 1966). Infecções em macacos da noite, sagüis e tamarins em cativeiro é uma consequência de exposição acidental ao hospedeiro reservatório com infecção latente.

A infecção primária nos saimiris é caracterizada por vesículas orais e labiais, placas necróticas e úlceras que se resolvem dentro de 10 dias (KING et al., 1967). Exatamente como a infecção pelo HSV em humanos, durante a resolução das lesões, o vírus é transportado até o gânglio trigêmio, onde a infecção latente persiste por toda a vida do animal. Podem ocorrer episódios de eliminação viral nas secreções orais.

Nas espécies susceptíveis, inadvertidas infecções resultam em uma epizootia com alta mortalidade. Clinicamente observa-se prurido, ulceração cutânea e oral, anorexia e depressão. Morte ocorre tipicamente com 24-48 horas. Em macacos da noite (*Aotus trivirgatus*), inúmeras espécies de sagüis e tamarins, após 7-10 dias de incubação, o vírus torna-se largamente disseminado e causa infecção citolítica na pele, mucosa oral e em muitos órgãos levando o animal a morte (HUNT; MELENDEZ, 1966, 1969). Surtos nestas espécies não tem sido freqüentemente reportados.

Histologicamente observa-se nas lesões cutâneas, necrose de todas as camadas da epiderme. As glândulas sebáceas, folículos pilosos e glândulas apócrinas são geralmente poupadas. Existe uma leve paraqueratose e edema intercelular na epiderme adjacente. Células gigantes multinucleadas contendo inclusões intranucleares são observadas dispersas e adjacentes à área de necrose (KING, 2001). Em infecções agudas, a reação inflamatória na derme pode ser mínima, consistindo apenas de neutrófilos.

Focos de necrose similares a estes da pele são encontrados com freqüência na mucosa oral, intestinos delgado e grosso. Na cavidade oral, placas de epitélio necrótico eventualmente se desprendem levando a formação de úlceras. Necrose multifocal é observada no fígado, baço, pulmão, rim e adrenais com proeminentes inclusões intranucleares de Cowdry tipo A (KING, 2001). A encefalite quando presente, geralmente é leve (KING, 2001).

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 ANIMAIS

Durante o período de março de 2005 a dezembro de 2006 foram utilizados 12 calitriquídeos jovens e adultos, machos e fêmeas procedentes de cativeiro domiciliado da grande São Paulo, do DEPAVE-3 Fauna (Departamento de Parques e Áreas Verdes) e do Criadouro Conservacionista José de Comoro. Estes sagüis pertenciam às espécies *Callithrix penicillata* (sagüi do tufo preto), *C. jacchus* (sagüi do tudo branco) e híbrido.

A distribuição dos sagüis, segundo a espécie, sexo, faixa etária e origem está representada na tabela 1.

Tabela 1 – Distribuição dos sagüis segundo a espécie, sexo, faixa etária e origem

CASO	ESPÉCIE ¹	SEXO	FAIXA ETÁRIA	ORIGEM ²
1	STP	Macho	Adulto	C. C. José Comoro
2	STB	Macho	Adulto	CD-OD
3	STP	Macho	Adulto	CD-OD
4	STB	Fêmea	Adulto	CD-OD
5	STB	Macho	Adulto	DEPAVE
6	STB	Fêmea	Adulto	CD-OD
7	STP	Fêmea	Jovem	CD-OD
8	Híbrido	Fêmea	Jovem	CD-L
9	STB	Macho	Adulto	CD-L
10	STB	Fêmea	Adulto	CD-L
11	STP	Fêmea	Adulto	CD-L
12	STP	Macho	Jovem	CD/OD

¹STP = sagüi do tufo preto; STB = sagüi do tufo branco.

²CD-OD = cativeiro domiciliado - origem desconhecida; CD-L = cativeiro domiciliado - legalizado pelo IBAMA.

Todos os sagüis originários do cativeiro domiciliado apresentavam histórico de terem sido atendidos em clínicas veterinárias, quando do surgimento dos sinais clínicos. Os animais dos casos 8, 9, 10 e 11 faziam parte de um grupo de cinco sagüis que viviam em uma mesma propriedade. Os casos 3 e 4 também apresentavam o mesmo proprietário. O animal do caso 5 convivia com muitos sagüis, no entanto somente este adoeceu. Os demais, não apresentavam contactantes da mesma espécie.

4.1.1 Critérios de seleção dos sagüis

Foram selecionados os sagüis que preencheram os seguintes critérios:

- a) Lesões vesiculares ou ulcerativas na pele e/ou mucosas;
- b) Quadro neurológico compatível com encefalite de instalação aguda ou subaguda;
- c) Suspeita de etiologia infecciosa do processo;
- d) Contato com seres humanos;

4.2 EXAME ANATOMOPATOLÓGICO

Os sagüis que apresentaram sinais clínicos de infecção herpética foram necropsiados no Laboratório de Patologia Comparada de Animais Selvagens (LAPCOM) do Departamento de Patologia (VPT) da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo (FMVZ/USP), conforme técnica para primatas.

Durante necropsia foram colhidos fragmentos de todos os órgãos (pele, encéfalo, língua, glândula salivar, tireóides, paratireóides, traquéia, pulmão, coração, linfonodos, baço, esôfago, estômago, intestinos, pâncreas, fígado, vesícula biliar, rim, adrenais, vesícula urinária, aparelho reprodutor masculino ou feminino) e fixados em formalina tamponada a 10%.

Depois de fixados em formol a 10% por 24 horas, os fragmentos dos órgãos foram cortados em aproximadamente 5mm e enviados ao Laboratório de Histologia do VPT-FMVZ, para posterior desidratação, diafanização e inclusão em parafina e, posteriormente, seccionados em cortes de 5µm de espessura e, finalmente, corados por hematoxilina e eosina (HE). O exame das lâminas foi realizado em microscopia de luz, com aumentos de 40x, 100x, 400x e 1000x.

Fragmentos de tecido encefálico foram congelados em -70°C para subsequente realização da PCR e inoculação intracerebral em camundongos.

4.3 PROVA DE INOCULAÇÃO INTRACEREBRAL EM CAMUNDONGO

Fragmentos de tecido encefálico foram encaminhados ao Laboratório de Raiva do Departamento de Medicina Veterinária Preventiva e Saúde Animal (VPS) da FMVZ/USP para a prova biológica. Suspensões a 20% (p/v) de tecido encefálico de nove sagüis (casos 2, 3, 4, 6, 7, 8, 9, 10, 11) inoculados via intracerebral em 10 camundongos por amostra. Estes animais eram da linhagem BalbC, machos, jovens com peso variando de 10-14g. O volume do inóculo era de 0,03ml. Foi realizada observação diária dos camundongos por 21 dias a procura de sinais neurológicos.

Fez-se eutanásia dos camundongos na fase agônica da doença, realizando-se necropsia e exame histopatológico. Fragmentos de tecido encefálico foram congelados em -70°C para subsequente realização da PCR.

4.4 PROVA DE IMUNOFLUORESCÊNCIA DIRETA (IFD)

Para a exclusão de raiva nestes sagüis, os fragmentos de encéfalos dos casos 2, 3, 4, 6, 7, 8, 9, 10 e 11 foram utilizados para a prova de IFD. Após a obtenção de impressão por pressão destes tecidos, as lâminas de microscopia foram fixadas em acetona a -15°C por duas horas e secas em temperatura ambiente. Estas foram colocadas em caixas de madeira próprias para acondicionamento de lâminas de microscopia e mantidas a -15°C para serem processadas em diferentes momentos.

O conjugado anti-rábico (diluição 1:60) foi mantido em contato com a impressão dos tecidos na superfície da lâmina e decorridos 30 minutos a 37°C, foram realizadas três lavagens com solução salina fosfatada (PBS), e secas em temperatura ambiente. Montou-se em seguida, com lamínulas utilizando glicerina tamponada pH 8,0. Lâminas apresentando inclusões intracitoplasmáticas fluorescentes características do vírus rábico foram registradas como positivas, de acordo com o método original de Goldwasser e Kissling (1958) e descrito com ligeiras modificações por Dean, Abelseth e Atanasiu (1996). O exame das lâminas foi realizado em microscopia de imunofluorescência (Nikon®).

4.5 EXAME IMUNOISTOQUÍMICO

A partir dos órgãos incluídos em parafina, de todos os sagüis (casos 1 a 12) e de 21 camundongos provenientes da inoculação intracerebral dos sagüis 2, 3, 4, 6, 7, 8, 9, 10, 11 foram obtidos cortes de 5µm de espessura, sendo estes montados em lâminas silanizadas. Estas foram encaminhadas ao Laboratório de Imunoistoquímica do Serviço de Patologia do Instituto Adolfo Lutz/SP.

As lâminas foram desparafinizadas a quente e a frio em xilol, hidratadas em solução decrescentes de álcool. As amostras, de acordo com padronização prévia, não foram submetidas à recuperação antigênica. Procedeu-se, então, com o bloqueio da peroxidase endógena com solução de peróxido de hidrogênio a 6%, diluída em metanol (v/v). A primeira etapa da reação consistiu na incubação com anticorpos primários diluídos em solução de albumina a 1% e azida sódica a 0,1% em PBS por 18 horas (over-night) a 4°C. Os anticorpos e respectivas especificações estas descritas na tabela 2.

Após a primeira etapa de incubação, os cortes foram submetidos a lavagens com PBS. Prosseguiu-se, então, para as etapas de incubação de 30 minutos a 37°C com anticorpo secundário biotilado genérico (anti-imunoglobulinas de coelho, camundongo e cabra) e, em seguida, com o complexo estreptavidina-peroxidase, componentes estes do kit LSAB® (Dako Cytomation, USA). Mucosa oral humana positiva para HSV-1 e mucosa genital humana positiva para HSV-2 foram utilizadas como controle positivo.

A revelação da reação imunoenzimática foi obtida através de solução contendo substrato cromogênico (diaminobenzidina 60 mg% + peróxido de hidrogênio 0,1% em PBS), sendo depois, os cortes submetidos a contracoloração com hematoxilina de Harrys, desidratados através de passagens consecutivas em soluções crescentes de álcool e montados com lamínula em meio permanente.

Tabela 2 - Anticorpos e especificações para o diagnóstico de Herpesvírus

Anticorpo	Clone	Espécie	Diluição	Procedência
<i>Herpes simplex 1</i>	Policlonal	Coelho	1:40000	Dako A/S, Dinamarca
<i>Herpes simplex 2</i>	Policlonal	Coelho	1:200000	Dako A/S, Dinamarca

4.6 PRIMEIRO MÉTODO DE DETECÇÃO VIRAL PELA PCR

A detecção viral utilizando-se da PCR foi realizada no Laboratório de Vírus Entéricos Humanos e Animais do Departamento de Microbiologia do Instituto de Ciências Biomédicas ICB/USP.

4.6.1 Antecedentes à extração do DNA

Fragmentos de tecido cerebral de sagüis (casos 3, 4, 6, 7, 8, 9, 10 e 11) e de 21 camundongos da inoculação intracerebral foram suspensos a 20% (p/v) em PBS mediante trituração mecânica, congelamentos sucessivos a -70°C e centrifugação visando clarificação, 2/3 do sobrenadante foi colhido.

Acrescentou-se Vertrel[®] (v/v) ao sobrenadante, homogeneizando e centrifugando várias vezes até a obtenção de uma amostra límpida. Descartava-se o sedimento, sendo o sobrenadante final utilizado para a extração do DNA.

4.6.2 Extração do DNA

O DNA presente nos fragmentos encefálicos foi extraído com solução de Trizol[®] (BRL/Life Technologies) e clorofórmio, conforme instruções do fabricante. As amostras de DNA foram estocadas a -70°C até o momento do uso.

4.6.3 *Primers*

Para a detecção de herpesvírus no SNC de sagüis utilizou-se *primers* de consenso DFA (5'-GAYTTYGCNAGYYTNTAYCC-3'), ILK (5'-TCCTGGACAAGCAGCARNYS GCNMTNAA-3') e KG1 (5'-GTCTTGCTCACCAGNTCNACNCCYTT-3') numa reação

triplex, visando a amplificação da sequência do gene da polimerase. A reação de *nested* PCR foi realizada utilizando os *primers* internos TGV (5'-TGTAACCTCGGTGTAYGGNTTYAC NGGNGT-3') e IYG (5'-CACAGAGTCCGTRTCNCCRTADAT-3') (GenBank: AB231460), os quais amplificam fragmentos de 708 pb (DFA/KG1), 452 pb (ILK/KG1) e 207 pb (TGV/IYG) conforme descrito por VanDevanter et al. (1996) e observados na Figura 1.

Figura 1 - Localização dos *primers* de consenso para Herpesvírus na sequência do gene da polimerase

Para a detecção do *Herpesvirus simplex* Tipo 1 foram utilizados os *primers* E1 (5'-GCCAGCACATCCGCGTCTT-3') e E2 (5'-GAGGACAAAGTCCTGGATGT-3') descritos por VanDevanter et al. (1996), específicos para HSV-1 e HSV-2, os quais amplificam uma sequência de 1.253 pb e 1.265 pb respectivamente, no gene da polimerase (GenBank: AB231460).

4.6.4 Reação da PCR para a detecção de *Herpesvírus*

Esta reação foi realizada conforme foi preconizada por VanDevanter et al. (1996). Uma alíquota de 5µl de DNA extraído dos fragmentos encefálicos dos sagüis e camundongos foi adicionado a uma mistura contendo 100 pmoles de cada um dos primers DFA/KG1 e

ILK/KG1, tampão 1x PCR (Tris_HCl 100mM, pH 8,3, KCl 500 mM), 2,0 µM de deoxinucleotídeos trifosfatos (dNTPs), 2,0 U de enzima DNA polimerase *Thermus thermophilus* (Biotools®) e 2,0 mM de MgCl₂, obtendo um volume final de 30µl.

A reação foi realizada na Mastercycler Gradient (Eppendorf®). A denaturação das fitas de DNA foi realizada a 99°C por 4 minutos, seguida de 40 ciclos de denaturação a 94°C por 30 segundos, anelamento a 46°C por 1 minuto e extensão a 72°C por 2 minutos. A extensão final ocorreu a 72°C por 5 minutos.

4.6.4.1 *nested* PCR

Aliquotas de 10µl dos produtos da primeira amplificação pela PCR foram adicionadas à mistura contendo 100 pmoles de cada um dos primers TGV e IYG, obtendo um volume final de 30µl. Para a amplificação de um produto final de 207 pb foi adotada a mesma metodologia descrita no item anterior.

HSV-1 cultivado em células Vero foi utilizado como vírus padrão em todos os ensaios. Os produtos da amplificação foram submetidos à eletroforese em gel de agarose a 2%, contendo 5µg/ml de brometo de etídio em solução tampão TAE (0,04M de Tris-acetato e 0,001M de EDTA). Utilizou-se um marcador de peso molecular (100 pb-DNA Ladder Biotools®) em cada gel.

4.6.5 Reação da PCR para a detecção de *Herpesvirus simplex* Tipo 1

Esta reação foi realizada conforme foi preconizada por VanDevanter et al. (1996). Uma alíquota de 5µl de DNA viral (HSV-1 padrão) foi adicionado a uma mistura contendo 100 pmoles de cada um dos primers E1 e E2, tampão 1x PCR (Tris_HCl 100mM, pH 8,3, KCl 500 mM); 2,0 µM de deoxinucleotídeos trifosfatos (dNTPs), 2,0 U de enzima DNA polimerase *Thermus thermophilus* (Biotools®) e 2,0mM de MgCl₂ obtendo um volume final de 50µl para a amplificação de um produto de 1.253 pb.

A reação foi realizada na Mastercycler Gradient (Eppendorf®). A denaturação das fitas de DNA foi realizada a 99°C por 5 minutos, seguida de 35 ciclos de denaturação a 94°C por

30 segundos, anelamento a 46°C por 1 minuto e extensão a 72°C por 3 minutos. A extensão final ocorreu a 72°C por 7 minutos.

Reações de amplificação em gradiente foram realizadas visando padronizar a técnica. Utilizou-se um gradiente de 1,5mM, 2,0mM, 2,5mM e 3,0mM de MgCl₂ para determinar a concentração ideal do mesmo na reação em associação com um gradiente de temperaturas de anelamento dos *primers* de 44,1°C, 45,3°C, 46,2°C e 47,2°C.

Os produtos da amplificação foram submetidos à eletroforese em gel de agarose a 2%, contendo 5µg/ml de brometo de etídio em solução tampão TAE (0,04M de Tris-acetato e 0,001M de EDTA). Utilizou-se um marcador de peso molecular (DNA de fago λ digerido com *HindIII/EcoRI*) em cada gel.

Após esta padronização, o DNA extraído dos fragmentos encefálicos dos sagüis e camundongos foram processados conforme a técnica descrita anteriormente de detecção do *Herpesvirus simplex* tipo 1, utilizando-se a concentração de 2,0 mM de MgCl₂ e a temperatura de anelamento de 44,1°C e também a concentração de 3,0 mM de MgCl₂ com temperatura de anelamento de 47,2°C.

4.7 SEGUNDO MÉTODO DE DETECÇÃO VIRAL PELA PCR

Esta segunda parte foi realizada no Laboratório de Virologia do Instituto de Medicina Tropical da Universidade de São Paulo (IMTSP/USP).

4.7.1 Extração do DNA

Esta segunda etapa foi procedida de duas formas: extração do DNA com o Kit Qiagen Blood (Qiagen®) das amostras dos sagüis (casos 3, 4, 6, 7, 8, 9, 10 e 11) e de um camundongo. Antes da extração, as amostras foram processadas de acordo com o item 4.6.1.

Fragmento de tecido encefálico dos sagüis (casos 3, 4, 6, 7, 8, 9, 10, 11 e 12) e de língua (casos 3, 4, 8 e 9) foram macerados e suspensos a 10% (p/v) em PBS. Após realizou-se extração do DNA com o Kit Qiagen Tissue (Qiagen®).

4.7.2 Primers

Para a detecção do HSV utilizaram-se três *primers* descritos por Nascimento et al. (1998) e Pannuti et al. (1997), que é capaz de detectar diferenças na sequência dos genes de DNA polimerase, que possui 89,7% de homologia entre HSV-1 e 2. A detecção dessas diferenças permite a tipagem entre os dois subtipos virais. O primeiro *primer* cobre uma região conservada entre os dois subtipos e denomina-se HSV-U (5'-GAGCCACTTCCAGAAGCGCAG-3'). Este iniciador promove hibridação dos nucleotídeos 1518 a 1538 do gene DNA polimerase do HSV-1 (GenBank: HS1DP/X04771) e os nucleotídeos 1755 a 1775 do gene DNA polimerase do HSV-2 (GenBank: HS2POL/M16321).

Os outros dois *primers* são específicos para o HSV-1 (HSV-1L) e HSV-2 (HSV-2L), que cobrem regiões de divergência entre os dois subtipos virais. O *primer* HSV-1L (5'-GTTCGTCCTCGTCCTCCCC-3') promove hibridação dos nucleotídeos 2002 a 2020 do gene DNA polimerase do HSV-1 e o *primer* HSV-2L (5'-GGGGCCTCCTTGTCGAG-3') é capaz de hibridar os nucleotídeos 2173 a 2189 do gene DNA polimerase do HSV-2. Esta técnica amplifica sequências de 503 pb para o HSV-1 e 435 pb para o HSV-2.

4.7.3 Reação da PCR para detecção de *Herpesvirus simplex* Tipo 1

Reação específica para detecção de HSV-1 e HSV-2 foi utilizada, baseando-se na diferença no gene da DNA polimerase entre estes dois. Esta reação foi realizada conforme preconizada por Nascimento et al. (1998) e Pannuti et al. (1997).

Uma alíquota de 5 µl de DNA extraído foi adicionado a uma mistura contendo 50 pmoles dos *primers* HSV-U, HSV-1L e HSV-2L, 50 mM KCl, 10mM Tris HCl pH 8,3, 1,5 mM de MgCl₂, 200 µM de cada dNTP, 2,5 U de Taq polimerase, obtendo um volume final de 50 µl. Foram utilizados HSV-1 e HSV-2 cultivado em células Vero como controles positivos.

A amplificação foi realizada em 35 ciclos, no termociclador (Thermal Cycler-Perkin Elmer 9600): denaturação a 94°C por 60 segundos, anelamento a 65°C por 60 segundos e extensão a 72°C por 60 segundos. A extensão final ocorreu a 72°C por 7 minutos.

Os produtos da amplificação foram submetidos à eletroforese em gel de agarose a 2%, contendo 10µg/ml de brometo de etídio em solução tampão TAE (0,04M de Tris-acetato e 0,001M de EDTA). Utilizou-se um marcador de peso molecular (100 pb-DNA Ladder Gibco BRL[®]) em cada gel. Definiu-se como HSV-1, a presença de banda com 503 pb e HSV-2, a presença de banda de 435 pb, quando visualizadas através de ultravioleta.

4.8 AVALIAÇÃO ULTRA-ESTRUTURAL

Fragmentos de aproximadamente 1 a 2 mm³ de SNC de dois sagüis (casos 3 e 10) e de dois camundongos de inoculação IC foram colhidos no momento da necropsia, fixados em solução de glutaraldeído a 2% em tampão fosfato e pós-fixados em tetróxido de ósmio a 1%, lavados em solução salina, passado em acetato de uranila a 1%, desidratados em acetona (30%, 70%, 95% e 100%) e incluídos em Araldite 502; os blocos assim obtidos foram aparados e através de ultramicrotomo Reichert Ultracut R (Leica[®]), cortes de aproximadamente 100nm de espessura (cortes semifinos), foram obtidos com navalha de vidro, e corados pelo azul de toluidina e observados ao microscópio de luz comum, a fim de selecionar áreas lesionais mais significativas ao estudo ultra-estrutural.

Os cortes ultrafinos, em espessura aproximada de 60nm, foram obtidos com navalha de diamante e contrastadas pelo acetato de uranila a 2% e citrato de chumbo. Estes foram observados ao microscópio eletrônico de transmissão (MET) JEM 1010 (JEOL[®]) a 80KW. As eletromicrografias foram obtidas por meio de chapas fotográficas de 8,3x 10,2 cm (Kodak[®]).

5 RESULTADOS

5.1 CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS DOS SAGÜIS

O curso clínico da doença foi agudo com evolução média de 3 dias (1-4). No entanto, dois animais tratados com Aciclovir sobreviveram por 16 e 23 dias. Sete sagüis (casos 2, 3, 4, 6, 9, 10 e 11) apresentaram sintomatologia neurológica e lesões herpéticas na mucosa e pele. Dois animais apresentaram alterações neurológicas (casos 7 e 12), mas sem lesões herpéticas, dois foram encontrados mortos (casos 1 e 8) e um (caso 5) os sinais eram gastroentéricos com diarreia, prostração e hiporexia.

Os achados clínicos mais frequentemente encontrados foram prostração (Figura 2) e hiporexia em 83% (10/12), 75% (9/12) apresentavam convulsões, 17% (2/12) com agressividade, hipersalivação, hipotermia e 8% (1/12) com paresia, nistagmo, anisocoria, dispnéia, vômito e diarreia.

Quanto a lesões, 50% (6/12) apresentaram úlceras na mucosa oral, 42% (5/12) lesões ulcerativas na pele e língua e apenas 8% (1/12) exibiu conjuntivite. Na tabela 3 encontram-se os principais sinais clínicos observados nos sagüis acometidos com infecção herpética. O histórico clínico detalhado de cada animal está apresentado no APÊNDICE A.

Tabela 3 – Principais sinais clínicos dos sagüis acometidos com infecção herpética

Caso	Sem sinais	Agres.	Alt. Digest.	Conv.	Hiper saliv.	Hipor.	Hipot.	L. pele/ mucosa	Prost.	Evol.
1	S	N	N	N	N	N	N	N	N	1 d.
2	N	S	S	S	S	S	N	S	S	3 d.
3	N	N	N	S	N	S	S	S	S	3 d.
4	N	S	N	S	S	S	N	S	S	2 d.
5	N	N	S	N	N	S	S	N	S	2 d.
6	N	N	N	S	N	S	N	S	S	3 d.
7	N	N	N	S	N	S	N	N	S	3 d.
8	S	N	N	N	N	N	N	N	N	1 d.
9	N	N	N	S	N	S	N	S	S	4 d.
10	N	N	N	S	N	S	N	S	S	16 d.
11	N	N	N	S	N	S	N	S	S	23 d.
12	N	N	N	S	N	S	N	N	S	3 d.

Agres, agressividade; Alt. Digest, alterações digestivas; Conv, convulsões; Hiper saliv, hipersalivação; Hipor, hiporexia; Hipot, hipotermia; L. pele/ mucosa, lesão pele ou mucosa; Prost, prostração; Evol, evolução; S, sim; N, não.

5.1.1 Tratamentos efetuados nos sagüis com infecção herpética

Destes animais, somente os sagüis dos casos 9, 10, 11 foram medicados com Aciclovir em associação com Fosfato de Levamisol (Levamisol F[®]) e tratamento de suporte.

Os animais dos casos 1 e 2 não foram medicados por veterinários, porém o proprietário do caso 2 administrou ao animal Dipirona Sódica (Lisador[®]) e Cefalexina (Keflex[®]). O sagüi 3 foi medicado com Diazepan e tratamento de apoio, sendo que o 4 não foi tratado. Já o animal 5 foi medicado com Sulfametoxazol associada a Trimetoprima (Bactrim[®]), Dimeticona (Luftal[®]) e suportes. Os animais dos casos 6, 7 e 8 não receberam nenhum medicamento, no caso 12 Enrofloxacin (Flotril[®]), mais tratamento complementares.

5.2 HISTÓRICO DE LESÃO HERPÉTICA EM SERES HUMANOS CONTACTANTES

Os sagüis dos casos 8, 9, 10 e 11 faziam parte de um mesmo grupo e o proprietário apresentava episódios freqüentes de infecção herpética labial, sendo necessário muitas vezes ser medicado com Aciclovir. No entanto, quando da fase clinica, o mesmo sempre evitou o contato com os sagüis.

Foi referido pela proprietária dos sagüis dos casos 3 e 4 que a mesma mantinha contato labial intimo com estes animais e que fornecia alimento de sua boca aos sagüis. Relatou também que alguns dias antes dos animais adoecerem, que havia ido a sua casa uma pessoa que apresentava lesão herpética labial.

O proprietário do sagüi caso 2 apresentou lesão herpética labial alguns dias antes do animal adoecer. Os demais animais não apresentaram histórico de lesão herpética em seres humanos contactantes.

5.3 AVALIAÇÃO ANATOMOPATOLÓGICA

5.3.1 Exame Necroscópico

Quanto à condição corporal, 58,3% (casos 2, 3, 4, 5, 7, 9 e 11) apresentaram estado nutricional regular, 33,4% (caso 1, 6, 8 e 10) estavam magros e 8,3% (caso 12) estava caquético. Os principais órgãos acometidos na avaliação macroscópica encontram-se na tabela 4. O exame necroscópico detalhado de cada animal está apresentado no apêndice A.

Tabela 4 – Principais órgãos acometidos na infecção herpética, observados na avaliação macroscópica

Caso	Pele	Boca	Língua	Globo ocular	SNC	Pulmões	Fígado	Baço	Linfonodo	Rins
1	N	N	N	S	N	N	N	N	N	N
2	S	N	N	N	N	N	N	N	N	N
3	N	S	S	N	S	N	S	S	N	S
4	S	S	S	N	S	N	S	N	N	N
5	N	N	N	N	N	S	S	N	N	N
6	S	S	S	N	N	N	S	N	N	N
7	N	N	N	N	S	S	S	N	N	N
8	N	S	S	N	S	N	S	S	S	N
9	N	S	S	N	S	N	S	S	N	N
10	N	N	S	N	S	S	N	S	N	S
11	N	N	N	N	S	S	S	S	N	N
12	N	N	N	N	S	S	S	S	S	S

N, não; S, sim

Macroscopicamente as lesões na pele da face, na boca e língua foram as mais frequentes, sendo observadas em 58% (7/12) dos sagüis. Estas eram caracterizadas pela formação de pequenas úlceras na pele que na maioria das vezes eram recobertas por crostas (Figuras 3 e 4). Na mucosa oral e lingual estas lesões ulcerativas eram quase sempre extensas e recobertas por material fibrinoso cinza-esbranquiçado (Figura 5).

No SNC de 58% (7/12) observou-se congestão, edema leve a acentuado das meninges (Figura 6) e em um animal (caso 10) havia hemorragia cerebelar focal (Figura 7). Os pulmões apresentavam congestão e edema leve a acentuados em 42% (5/12). O fígado de 58% (7/12) exibiu coloração amarelada, padrão lobular evidente e hepatomegalia leve a acentuada (Figura

8). Evidenciou-se também esplenomegalia em 50% (6/12), linfadenopatia em 17% (2/12). Em um sagüi os rins estavam de coloração amarelada e com pontos de aproximadamente 1mm de coloração esbranquiçada distribuídos em toda cortical e medular (Figura 9).

5.3.2 Exame Histopatológico

As lesões observadas nestes casos são características de infecção viral aguda com necrose, hemorragia, edema e infiltrado inflamatório predominantemente linfo-plasmocitário. No SNC de 58% (7/12) dos sagüis e em outros órgãos como língua, mucosa oral, pele, fígado, rins e nos plexos de Auerbach observaram-se inclusões virais intranucleares, eosinofílicas ou anfófilas que ocupavam todo o núcleo ou com formação de um halo em volta, sendo estas denominadas de inclusões Cowdry Tipo A (Figuras 10 A e B).

A principal lesão encontrada em todos os animais foi meningoencefalite necrótica não supurativa (linfo-plasmocitária com ocasionais neutrófilos) difusa variando de leve a severa com necrose neuronal, neuronofagia, satelitose, gliose, manguitos perivasculares, vasculite necrotizante, edema, microhemorragia, necrose do neurópilo (Figuras 11, 12 A e B).

Lesões na substância branca também foram observadas, sendo estas caracterizadas por degeneração walleriana difusa leve a acentuada, manguitos perivasculares e gliose. No cerebelo de um sagüi (caso 3) observou-se necrose acentuada as células de Purkinji associada a inclusões eosinofílicas intranucleares. Observou-se na camada granular vasculite necrotizante focal severa associada à intensa exsudação neutrofílica comprometendo a substância branca adjacente e inúmeras inclusões eosinofílicas intranucleares nas células granulares (Cowdry Tipo A) (Figuras 13 A e B). Em outro (caso 10), havia hemorragia necrotizante focal severa com infiltrado inflamatório misto na substância branca se entendendo para a camada granular e molecular (Figura 14).

Órgãos como a pele, mucosa oral, língua, fígado, baço, linfonodos, adrenais e rins também foram severamente afetados conforme pode ser observado na tabela 5. Nos epitélios e mucosas evidenciou-se dermatite, estomatite ou glossite necrótica ulcerativa focalmente extensa severa recoberta por exsudato fibrino supurativo. No epitélio adjacente observou-se edema intracelular acentuado e inclusões intranucleares eosinofílicas ou anfófilas (Figuras 15 A e B). Na pele de um animal (caso 3) evidenciou-se edema intracelular acentuado e formação de vesículas intra-epidérmicas (Figura 16).

No fígado havia hepatite linfoplasmocitária multifocal a difusa, leve a acentuada, com degeneração micro e macrogoticular hepatocelular difusa leve a severa e necrose de hepatócitos. No baço e linfonodos evidenciou-se necrose centrofolicular leve a acentuada (Figura 17).

As lesões renais eram caracterizadas por glomerulonefrite linfo-plasmocitária multifocal a difusa, leve a severa com nefrose e necrose tubular associada (Figura 18 A e B). As adrenais exibiam adrenalite linfo-plasmocitária, no entanto em um sagüi (caso 9) observou-se adrenalite necrótica supurativa difusa severa (Figura 19).

Em dois sagüis (casos 3 e 4) observou-se ganglioneurite, sendo o plexo de Auerbach o mais afetado, apresentando necrose neuronal e em alguns neurônios exibiam inclusões intranucleares eosinofílicas (Figuras 20 A e B). Estes mesmos animais apresentaram células sinciciais no baço (Figuras 21 A e B), linfonodos, fígado, rins e adrenais (Figuras 22 A e B).

Em grande parte dos sagüis, evidenciaram-se em diversos órgãos como coração, pulmão, fígado, rins e adrenais, infiltrado inflamatório perivascular predominantemente linfoplasmocitário leve a acentuado (Figura 23).

Os pulmões, traquéia, coração, estômago, intestinos, pâncreas foram acometidos por lesões mais brandas conforme pode ser observado na tabela 5. O exame histopatológico detalhado de cada animal está descrito no apêndice A.

Tabela 5 – Principais órgãos acometidos na infecção herpética, observados na avaliação microscópica

Órgãos	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
SNC	++	+++	+++*	+++*	++	++	+	+++*	+++*	+++*	+++*	+++*
Muc. oral	n	n	+++*	+++*	n	n	n	+++*	+++*	n	n	n
Língua	n	n	+++*	+++*	n	n	n	+++*	+++*	+	+	n
Pele	n	+++	n	+++*	n	+++*	n	n	n	n	n	n
Pulmões	n	n	+	+	+	+	+	n	n	++	++	++
Traquéia	n	n	+	n	n	n	n	n	n	+	+	n
Tireóide	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	+	n
Coração	n	n	++	+	n	n	+	n	n	+	+	n
Fígado	+	++	+	+++*	+	+	+	+	+	++	+	++
Estômago	n	n	+	n	n	n	n	n	n	+	n	n
Intestinos	n	n	+++*	+++*	++	+	+	n	++	+	+	n
Pâncreas	n	n	++	n	n	n	n	n	n	n	n	n
Adrenais	++	n	n	+++*	n	n	+	n	+++*	+	+	++
Rins	++	+	+++	+++*	+	+	+	n	+	++	+	+
Baço	n	n	+	+++	++	n	+	+	+	+	++	+++
Linfonodos	n	n	+	+++	++	n	+	+	+	+	n	+
Nervos	n	n	n	+	n	n	n	n	n	n	n	n

n=sem lesão; + lesão leve; ++ lesão moderada; +++ lesão severa; *órgãos com inclusões virais

5.3.3 Causa de Morte

Quanto à causa de morte, 69,2% (casos 1, 5, 7, 8, 9, 10, 11 e 12) apresentaram morte natural. Os achados macro e microscópicos caracterizaram colapso sistêmico em decorrência do processo infeccioso viral. Em 30,8% (casos 2, 3, 4 e 6) fez-se eutanásia devido a gravidade dos sinais clínicos e pelo risco zoonótico que estes sagüis apresentavam por causa dos sinais neurológicos que poderiam estar relacionados à encefalite rábica.

5.4 PROVA DE INOCULAÇÃO INTRACEREBRAL EM CAMUNDONGOS

Foi realizada observação diária dos camundongos inoculados com suspensões de tecido encefálico de nove sagüis (casos 2, 3, 4, 6, 7, 8, 9, 10 e 11) por 21 dias a procura de sinais neurológicos. A partir do terceiro dia pós-inoculação IC iniciaram-se os sinais clínicos, sendo estes observados em maior frequência no sexto dia, no qual 45,8% (11/24) dos animais iniciaram os sinais.

A evolução dos sinais clínicos foi de no máximo 3 dias, estando estes presentes em 54,2% (13/11) dos camundongos e os outros 45,8% (11/24) foram encontrados mortos sem a visualização dos mesmos.

Estes sinais eram caracterizados por prostração, letargia, eriçamento dos pêlos (Figura 24), exacerbação dos movimentos de autolimpeza, episódios de convulsões tônico-clônicas, sendo estas mais frequentes quando estimulados fisicamente. Estes sinais evoluíam para paralisia (Figura 25), coma e morte.

Um animal apresentou morte no primeiro dia pós-inoculação e o décimo terceiro dia foi o último em que ocorreu óbito (Tabela 6). Destes camundongos, 58,3% (14/24) morreram de forma natural e 41,7% (10/24) realizou-se eutanásia na fase agônica da doença.

Tabela 6 – Número de camundongos mortos pela inoculação intracerebral e o tempo de início dos sinais clínicos

Caso	Nº Camundongos por amostra	Nº Camundongos Mortos	Início dos sinais clínicos
2	10	3	3-5 dias
3	10	1	4 dias
4	10	0	-
6	10	1	13 dias
7	10	0	-
8	10	0	-
9	10	1	6 dias
10	10	9	1-9 dias
11	10	9	4-8 dias
Total	90	24	3-13 dias

Na necropsia, não foram observadas alterações dignas de nota, apenas que a maioria dos animais apresentava congestão de leve a moderada nas meninges. Destes animais, realizou-se exame histopatológico em 21, sendo que em três não foi possível devido ao estado de autólise em que se encontravam. Um destes três animais morreu em menos de 24 horas após a inoculação o que sugere ter sido devido ao procedimento e não a infecção viral.

Na avaliação microscópica evidenciou-se em 17 animais meningoencefalite necrótica não supurativa difusa severa com necrose neuronal, neuronofagia, satellitose, gliose, manguitos perivasculares, vasculite necrotizante, edema, microhemorragia, necrose severa multifocal do neurópilo e inclusões intranucleares eosinofílicas e anfofílicas nos neurônios (Cowdry tipo A) (Figuras 26 A e B). Quatro animais apresentaram as mesmas lesões só que de intensidade moderada.

Na substância branca do SNC e no cerebelo, 14 animais não apresentaram lesões; em cinco observou-se degeneração walleriana e manguitos perivasculares moderados; em um evidenciou-se degeneração walleriana, gliose e manguitos perivasculares acentuados e inclusões nos oligodendrócitos. Neste mesmo havia meningite leve no cerebelo e em outro manguitos perivasculares no córtex cerebelar.

Em apenas um camundongo não foram visualizadas inclusões intranucleares nos neurônios. No baço de 14 animais observou-se necrose centrofolicular leve a moderada. Nos demais órgãos não foram encontrados lesões sugestivas de processo infeccioso.

5.5 PROVA DE IMUNOFLUORESCÊNCIA DIRETA

Os tecidos encefálicos dos nove sagüis (casos 2, 3, 4, 6, 7, 8, 9, 10 e 11) em que foram realizados IFD, em nenhum houve marcação positiva para o vírus rábico.

5.6 IMUNOISTOQUÍMICA

O estudo imunoistoquímico realizado a partir dos órgãos incluídos em parafina, de todos os sagüis (casos 1 a 12) e de 21 camundongos provenientes da inoculação intracerebral dos sagüis 2, 3, 4, 6, 7, 8, 9, 10 e 11 revelaram não haver diferença para a marcação das proteínas virais do Herpesvírus, sendo que tanto o anticorpo anti-HSV-1 e anti-HSV-2 policlonais marcaram igualmente todos os tecidos.

5.6.1 Exame imunoistoquímico nos sagüis

De todos os órgãos analisados, o encéfalo teve a maior frequência de marcação positiva, seguida do fígado e rins. A frequência e intensidade de marcação nos diferentes órgãos estão representadas na tabela 7. O exame imunoistoquímico detalhado de cada animal está descrito no apêndice A.

Tabela 7 - Estudo imunoistoquímico nos órgãos dos sagüis

Órgãos	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
SNC	+	++	+++	++	+	+	+	+	++	++	++	++
Muc. oral	n	n	++	++	n	+	n	++	++	n	n	n
Língua	n	n	++	++	n	+	n	++	++	n	n	n
Pele	n	n	+	n	n	+	n	n	n	n	n	n
Pulmões	n	n	+	n	n	+	n	n	n	n	n	n
Traquéia	n	n	+	n	n	n	n	n	n	n	n	n
Coração	n	n	+	n	n	n	n	n	n	n	n	n
Fígado	+	+	++	++	+++	n	+	+++	+++	n	+	+
Esôfago	n	n	+	n	n	n	n	n	n	n	n	n
Estômago	n	n	+	n	n	n	n	n	n	n	n	n
Intestino*	n	n	+	+	+	n	n	n	+	n	n	n
Adrenais	+	n	n	+++	n	n	n	n	++	++	n	n
Rins	+	+	+++	++	++	++	+	++	++	n	n	n
Bexiga	n	n	+	n	n	n	n	n	n	n	n	n
Testículos	n	n	+	n	n	n	n	n	n	n	n	n
Ovários	n	n	n	n	n	n	n	n	n	+	n	n
Nervos	n	n	+	+	n	n	n	n	n	n	n	n

n=sem marcação; + marcação positiva em poucas células; ++ marcação positiva em muitas células; +++ marcação positiva em todo o tecido; * Plexo de Auerbach

No SNC havia marcação positiva nos neurônios e células da glia do cérebro de todos os animais (Figuras 27 A e B) e nos casos 3, 4 e 9 também houve marcação nos neurônios do cerebelo (células de Purkinji, camada molecular e granular) (Figuras 28 A e B). Na língua e mucosa oral dos sagüis 3, 4, 6, 8 e 9 observou-se marcação positiva no epitélio adjacente a área de necrose. Na língua do animal 3 havia positividade nos ductos glandulares, no caso 4 nos nervos e no caso 9 na área de necrose, nos nervos e na musculatura. Na pele do sagüi 3 evidenciou-se marcação positiva na vesícula intra-dérmica (Figura 29) e no caso 6 no epitélio adjacente a necrose e também nas glândulas sebáceas.

Nos pulmões evidenciaram-se as proteínas virais marcadas na parede de um vaso no caso 3 e no interior de alguns macrófagos alveolares no animal 6. Observou-se no sagüi 3 marcação nas células epiteliais da traquéia, esôfago, estômago e nos gânglios do endocárdio.

No fígado, exceto os animais 6 e 10, os demais apresentaram marcação (Figura 30) e nos rins somente o 10, 11 e 12 não possuíam (Figura 31). Os plexos de Auerbach dos casos 3, 4, 5 e 9 exibiam positividade (Figura 32). Quanto as adrenais, no sagüi 1 houve marcação na medular (Figura 33), no 4 e 9 tanto na medular como na cortical e no 10 somente na cortical. O sagüi 3 apresentou positividade nos túbulos seminíferos e em um nervo da vesícula urinária. Os animais 3 e 4 também apresentaram marcação em nervos próximos a diferentes órgãos e o sagüi 10 exibiu marcação no ovário.

5.6.2 Exame imunoistoquímico nos camundongos

Dos 21 camundongos, 17 apresentaram marcação positiva em muitos neurônios e células da glia de diferentes regiões do cérebro (Figura 34), sendo que apenas três destes apresentaram marcação positiva nos muitos neurônios do cerebelo (células de Purkinji, camada molecular e granular) em diferentes focos.

Três animais apresentaram marcação positiva em apenas alguns neurônios e um não apresentou nenhuma marcação. Nos demais órgãos de todos os camundongos não houve marcação.

5.7 PRIMEIRO MÉTODO DE DETECÇÃO VIRAL PELA PCR

5.7.1 Reação da PCR para a detecção de Herpesvírus

Os resultados da detecção de vírus da família Herpesviridae em fragmentos de tecido cerebral de sagüis (casos 3, 4, 6, 7, 8, 9, 10 e 11) e de 21 camundongos, utilizando os *primers* de consenso DFA, ILK, KG1, seguida por uma reação de *nested* PCR, com os *primers* internos TGV, IYG são apresentados na figura 35. A presença do vírus da família Herpesviridae foi detectada em todas as amostras encefálicas dos sagüis e dos camundongos.

Figura 35 - Detecção de herpesvírus pelo *nested*-PCR nas amostras encefálicas dos sagüis. DNA *ladder* de 100 pb (L), controle negativo (C-), controle positivo (C+)

5.7.2 Reação da PCR para a detecção de *Herpesvírus simplex* Tipo 1

Na reação de PCR com HSV padrão foram utilizados os *primers* E1 e E2, e os fragmentos esperados eram de 1253 pb. Visando a padronização desta reação, estes produtos foram evidenciados em diferentes temperaturas de anelamento e concentrações de $MgCl_2$ (Figura 36), o que demonstrou variações nas concentrações destes produtos. Com base nestes resultados, optou-se pela concentração de 2,0 mM de $MgCl_2$ a 44,1°C (canaleta 5).

1, 5, 9, 13 – 44,1°C; 2, 6, 10, 14 – 45,3°C; 3, 7, 11, 15 – 46,2°C; 4, 8, 12, 16 – 47,2°C
 Figura 36 - Resultados da amplificação gênica pela PCR em diferentes concentrações de MgCl₂ e temperaturas de anelamento. DNA de fago λ digerido com *Hind*III/*Eco*RI (λ)

Utilizando-se a concentração de 2,0 mM de MgCl₂ e a temperatura de anelamento de 44,1°C, realizou-se PCR para HSV dos fragmentos de tecido cerebral de sagüis (casos 3, 4, 6, 7, 8, 9, 10 e 11) e de 21 camundongos. Todas as amostras foram negativas, não sendo visualizada nenhuma amplificação como pode ser observado na figura 37.

Figura 37 - Resultados da reação da PCR utilizando *primers* específicos E1 e E2 em amostras encefálicas de sagüis. Controle negativo (C-), controle positivo (C+), DNA de fago λ digerido com *HindIII/EcoRI* (λ)

Visando a obtenção de um resultado positivo destas amostras de sagüis e camundongos utilizou-se a concentração de 3,0 mM de $MgCl_2$ e a temperatura de anelamento de 47,2°C, já que esta amplificação era bastante forte no padrão, no entanto todas as amostras continuaram negativas. Como nova tentativa fez-se re-amplificação destas amostras, porém não foi possível também visualizar nenhum produto.

5.8 SEGUNDO MÉTODO DE DETECÇÃO VIRAL PELA PCR

5.8.1 Reação da PCR para detecção de *Herpesvirus simplex* Tipo 1

Das amostras de tecido encefálico dos sagüis 3, 4, 6, 7, 8, 9, 10 e 11 e de um camundongo, as quais foram tratadas com Vertrel® e após extraído o DNA com o Kit Qiagen

Blood (Qiagen®) somente os casos 6 e 11 foram positivos para HSV-1 conforme pode ser visto na figura 38.

Figura 38 - Resultados da reação da PCR de amostras previamente tratadas com Vertrel®, utilizando os *primers* específicos para HSV-1 e HSV-2. Amostra de camundongo (Ca), controle negativo (C-), DNA *ladder* de 100 pb

Os fragmentos de tecido encefálico dos sagüis (casos 3, 4, 6, 7, 8, 9, 10, 11 e 12) e de língua (casos 3, 4, 8 e 9) os quais foram feitas extrações do DNA com o Kit Qiagen Tissue (Qiagen®) foram positivos para HSV-1. Somente a amostra encefálica do caso 7 foi negativa tanto para o HSV-1 como para o HSV-2 (Figura 39).

Figura 39 - Resultados da reação da PCR utilizando os *primers* específicos para HSV-1 e HSV-2. Língua (l), encéfalo (e), controle negativo (C-), DNA *ladder* de 100 pb

5.9 AVALIAÇÃO ULTRA-ESTRUTURAL

Fragmentos de SNC de dois sagüis (casos 3 e 10) e de dois camundongos de IC foram avaliados ultra-estruturalmente. Nestes fragmentos observou-se um número variável de nucleocapsídeos de aproximadamente 100nm no núcleo dos neurônios (Figura 40). Estes apresentavam tamanho, localização e morfologia consistente com os membros da família Herpesviridae.

Figura 2 – Aspecto clínico de um *Callithrix jacchus* (caso 3) infectado com HSV-1. Evidenciam-se duas vesículas ulceradas recobertas por crosta hemorrágica entre os olhos e hipersalivação.

Figura 3 – Conduto auditivo; *Callithrix jacchus* (caso 2). Lesão ulcerativa focal de aproximadamente 5mm de diâmetro.

Figura 4 – Face; *Callithrix jacchus* (caso 6). Lesões ulcerativas de aproximadamente 5mm de diâmetro, recobertas por crostas entre os olhos e na narina.

Figura 5 – Cavidade oral; *Callithrix penicillata* (caso 3). Placas ulcerativas recobertas por material fibrinoso cinza-esbranquiçado na mucosa oral e superfície dorsal e lateral da língua.

Figura 6 – SNC; *Callithrix penicillata* (caso 7). Congestão e edema acentuados das meninges.

Figura 7 - SNC; *Callithrix jacchus* (caso 10). Vasos das meninges moderadamente congestos e hemorragia cerebelar focal de aproximadamente 5mm de diâmetro.

Figura 8 – Cavidade abdominal; *Callithrix penicillata* (caso 3). Fígado aumentado de tamanho, coloração amarelada e padrão lobular moderadamente evidente. Observar também a grande deposição de tecido adiposo na cavidade abdominal.

Figura 9 – Rins; *Callithrix penicillata* (caso 3). Coloração amarelada e presença de pontos esbranquiçados e avermelhados de aproximadamente 1mm distribuídos em toda cortical e medular.

Figura 10 – Inclusões Cowdry Tipo A. **A.** Cérebro; *Callithrix penicillata* (caso 3). Inclusões anfofílicas intranucleares nos neurônios (setas). HE. 100x. **B.** Fígado; *Callithrix jacchus* (caso 4). Inclusões eosinofílicas intranucleares nos hepatócitos (setas). HE. 400x.

Figura 11 – Cérebro; *Callithrix penicillata* (caso 3). Vasculite necrotizante (setas), edema e necrose do neurópilo na substância cinzenta. HE. 100x.

Figura 12 – **A.** Cérebro; *Callithrix penicillata* (caso 11). Encefalite necrótica não supurativa (raros neutrófilos) difusa severa. HE. 40x. **B.** Inclusão intranuclear anfofílica e edema neuronal. HE. 400x.

Figura 13 – **A.** Cerebelo; *Callithrix penicillata* (caso 3). Vasculite necrotizante focal severa associada à intensa exsudação neutrofílico acometendo a camada granular e substância branca. HE. 100x. **B.** Maior aumento do A. Presença de inclusões eosinofílicas intranucleares (seta). HE. 400x.

Figura 14 – Cerebelo; *Callithrix jacchus* (caso 10). Hemorragia necrotizante focal severa na substância branca estendendo-se a camada granular e molecular. HE. 40x.

Figura 15 – **A.** Língua; *Callithrix jacchus* (caso 9). Glossite necrótica ulcerativa focalmente extensa severa recoberta por exsudato fibrino supurativo. HE. 40x. **B.** Epitélio adjacente com inclusões intranucleares anfofílicas (seta). HE. 200x.

Figura 16 – Pele; *Callithrix penicillata* (caso 3). Epitélio com edema intracelular acentuado e formação de vesícula intra-epidérmica. HE. 200x.

Figura 17 – Linfonodo; *Callithrix jacchus* (caso 9). Necrose centrofolicular acentuada (asterisco). HE. 200x.

Figura 18 – **A.** Rim; *Callithrix penicillata* (caso 3). Glomerulonefrite linfo-plasmocitária (com macrófagos e neutrófilos ocasionais) difusa severa com nefrose e necrose tubular. HE. 40x. **B.** Maior aumento do A. Presença de célula sincicial (seta). HE. 400x.

Figura 19 – Adrenal; *Callithrix jacchus* (caso 9). Adrenalite necrótica supurativa difusa severa comprometendo a cortical e medular (asterisco). HE. 100x.

Figura 20 – **A.** Plexo de Auerbach; *Callithrix penicillata* (caso 3). Ganglioneurite com necrose neuronal. HE. 200x. **B.** Maior aumento do A. Neurônios com inclusões intranucleares eosinofílicas (seta). HE. 400x.

Figura 21 – **A.** Baço; *Callithrix penicillata* (caso 3). Seios esplênicos evidenciam inúmeras células sinciciais (setas). HE. 100x. **B.** Maior aumento do A. Células sinciciais (seta). HE. 400x.

Figura 22 – **A.** Adrenal; *Callithrix jacchus* (caso 4). Adrenalite necrótica não supurativa multifocal severa comprometendo a cortical e medular. HE. 40x. **B.** Maior aumento do A. Formação de células sinciciais na cortical (seta). HE. 200x.

Figura 23 – Fígado; *Callithrix penicillata* (caso 3). Infiltrado inflamatório linfo-plasmocitário perivascular moderado (seta). HE. 100x.

Figura 24 - Aspecto clínico de um camundongo infectado com HSV-1. Evidencia-se prostração e eriçamento dos pêlos.

Figura 25 - Aspecto clínico de um camundongo infectado com HSV-1. Evidencia-se prostração, eriçamento dos pêlos e paralisia.

Figura 26 – **A.** Cérebro; camundongo. Encefalite necrótica não supurativa difusa severa com manguitos perivasculares e necrose do neurópilo. HE. 40x. **B.** Maior aumento do A. Inclusões intranucleares anfofílicas nos neurônios (seta) HE. 400x.

Figura 27 – **A.** Cérebro; *Callithrix penicillata* (caso 3). Imunomarcção para HSV-1. Observar neurônios e células da glia marcadas em castanho. Estreptavidina-biotina-peroxidase. Hematoxilina. 40x. **B.** Maior aumento do A. 200x.

Figura 28 – **A.** Cerebelo; *Callithrix penicillata* (caso 3). Imunomarcção para HSV-1. Observar células de Purkinji, neurônios da camada molecular e granular marcados em castanho. Estreptavidina-biotina-peroxidase. Hematoxilina. 100x. **B.** Maior aumento do A. 200x.

Figura 29 – Pele; *Callithrix penicillata* (caso 3). Imunomarcção para HSV-1. Observar células epiteliais marcadas em castanho. Estreptavidina-biotina-peroxidase. Hematoxilina. 200x.

Figura 30 – Fígado; *Callithrix jacchus* (caso 4). Imunomarcção para HSV-1. Observar hepatócitos marcados em castanho. Estreptavidina-biotina-peroxidase. Hematoxilina. 200x.

Figura 31 – Rim; *Callithrix penicillata* (caso 3). Imunomarcção para HSV-1. Observar túbulos renais marcados em castanho. Estreptavidina-biotina-peroxidase. Hematoxilina. 100x.

Figura 32 – Plexo de Auerbach; *Callithrix penicillata* (caso 3). Imunomarcção para HSV-1. Observar neurônios marcados em castanho. Estreptavidina-biotina-peroxidase. Hematoxilina. 200x.

Figura 33 – Adrenal; *Callithrix jacchus* (caso 9). Imunomarcção para HSV-1. Observar células da camada medular e cortical marcadas em castanho. Estreptavidina-biotina-peroxidase. Hematoxilina. 100x.

Figura 34 – Cérebro; Camundongo. Imunomarcção para HSV-1. Observar neurônios e células da glia marcados em castanho. Estreptavidina-biotina-peroxidase. Hematoxilina. 200x.

Figura 40 – Eletromicrografia de Cérebro; *Callithrix jacchus* (caso 10). Inúmeros nucleocapsídeos (setas) no núcleo de um neurônio. 10.000x.

6 DISCUSSÃO

Os primatas Neotropicais são considerados altamente susceptíveis ao HSV-1. Neste estudo pode-se comprovar que este vírus causa uma doença aguda fatal aos sagüis e na maioria das vezes os sinais clássicos da infecção herpética se fazem presentes.

Dos 12 sagüis estudados, em oito pode-se confirmar a presença do HSV-1 pela PCR associada aos achados anatomopatológicos, imunoistoquímicos e de inoculação IC em camundongos. Em três sagüis (casos 1, 2 e 5) não fez-se PCR e em um (caso 7) esta foi negativa. Nestes casos a confirmação do herpesvírus foi realizada através da IHQ, não havendo assim a tipificação viral.

6.1 AVALIAÇÃO CLÍNICA

O curso clínico da doença foi agudo com evolução média de 3 dias (1-4) sendo semelhante aos encontrados em sagüis com HSV-1 por Pachaly, Werner e Diniz (1991); Juan-Sallés et al. (1997); Matz-Rensing et al. (2003); Hatt et al. (2004) e Lefaux et al. (2004). No entanto, Huemer et al. (2002) encontraram oito dias de evolução da doença.

Os dois animais tratados com Aciclovir sobreviveram por 16 e 23 dias. Estudo realizado por Lefaux et al. (2004) observaram que animais tratados sobreviveram por duas semanas e no efetuado por Hatt et al. (2004) evidenciaram uma sobrevida de seis dias.

Os achados clínicos mais frequentemente encontrados nos sagüis foram prostração e hiporexia em 83% (10/12), 75% (9/12) apresentavam convulsões, 17% (2/12) com agressividade, hipersalivação, hipotermia e 8% (1/12) com paresia, nistagmo, anisocoria, dispnéia, vômito e diarreia. Estes são similares aos encontrados por Pachaly, Werner e Diniz (1991); Juan-Sallés et al. (1997); Huemer et al. (2002); Matz-Rensing et al. (2003); Hatt et al. (2004) e Lefaux et al. (2004).

Em humanos, segundo Whitley et al. (1982) em um estudo analisando 92 casos de HSE, os achados de história clínica mais frequentemente referidos foram alteração de consciência, febre, cefaléia, alterações de personalidade, convulsões, hemiparesia e alterações de memória. Ao exame clínico-neurológico detectou-se alteração de personalidade, afasia,

disfunção autonômica, ataxia, hemiparesia, déficits de nervos cranianos, alteração de campo visual e papiledema.

Quanto a lesões, 50% (6/12) apresentaram úlceras na mucosa oral, 42% (5/12) lesões ulcerativas na pele e língua e apenas 8% (1/12) exibiu conjuntivite, sendo estes achados semelhantes ao encontrado em infecções pelo HSV-1 em sagüis.

Quando estes sinais neurológicos e as lesões na pele, boca e língua estão presentes pode-se sugerir uma infecção herpética, no entanto, não sendo possível a diferenciação da causada pelo HSV-1 dos demais alphaherpesvirus que acometem estes animais.

Evidenciou-se neste estudo que dois sagüis não apresentaram manifestações clínicas, sendo estes encontrados mortos. Este tipo de achado também foi observado por Matz-Rensing et al. (2003) e Hatt et al. (2004). Outros dois animais apresentaram alterações neurológicas, mas sem lesões em pele e mucosa. Juan-Sallés et al. (1997) também evidenciaram este fato. Através destes achados não é possível sugerir unicamente infecção herpética, haja vista que estas manifestações são inespecíficas e possíveis para qualquer encefalite.

Nestes casos a encefalite rábica deve ser listada como um dos possíveis diagnósticos, junto à encefalite provocada por alphaherpesvirus. Sendo Andrade et al. (1999) experimentalmente os *C. jacchus* são altamente susceptíveis a raiva. Favoretto et al. (2001) relatou oito casos de raiva em humanos no Ceará onde o transmissor foi o *C. jacchus*. O vírus foi transmitido aos humanos através de ataques e mordidas e na avaliação do SNC destes sagüis, encontrou-se uma nova variante do vírus rábico.

Em humanos a apresentação clínica da HSE é, muitas vezes, inespecífica, no entanto pode haver evidências clínicas de lesão localizadas no lobo temporal (WHITLEY; KIMBERLIN, 2005). Os resultados de neuroimagem e eletroencefalograma não permitem diferenciar precisamente entre infecções do SNC pelo HSV e outras doenças neurológicas que mimetizam a encefalite herpética (DOMINGUES et al., 1997).

Primatas não-humanos não são naturalmente infectados pelo HSV-1 e comumente adquire a doença através do contato com humanos. Estudos sobre HSV-1 em sagüis relatam o contato com humanos como sendo a causa da doença.

Segundo Pachaly, Werner e Diniz (1991); Juan-Sallés et al. (1997) e Matz-Rensing et al. (2003) os proprietários dos sagüis acometidos pelo HSV-1 apresentavam infecções herpéticas labiais poucos dias antes dos animais adoecerem. No entanto, Hatt et al. (2004) e Huemer et al. (2002) não encontraram este achado. Todavia, os proprietários possuíam contato labial íntimo com os sagüis. Lefaux et al. (2004) relataram HSV-1 em sagüis de um

zoológico. A origem aventada neste caso foi através da contaminação de alimentos cedidos aos animais pelos visitantes ou pelo contato com os tratadores.

No presente trabalho, somente os sagüis dos casos 8, 9, 10 e 11 que faziam parte de um mesmo grupo, os sagüis 3 e 4 do mesmo proprietário e o sagüi 2 apresentaram histórico de lesões herpética nos proprietários ou contactantes, no entanto, todos os animais estudados possuíam contato próximo ou íntimo com humanos.

Segundo Whitley (2001) em seres humanos a recorrência de infecção herpética labial varia de 16-61%, sendo que esta pode ocorrer na ausência de sinais clínicos. De acordo com Kolokotronis e Doumas (2006) o vírus pode ser eliminado pela saliva de humanos assintomáticos. Isso pode explicar os casos de HSV-1 em sagüis que não houve histórico de infecção herpética humana nos contactantes.

Outro fator bastante relevante é a transmissibilidade do HSV-1 entre os sagüis. Todos os animais contactantes desenvolveram a doença. A rápida disseminação no grupo sugere uma transmissão de sagüi para sagüi. Isso pode ser facilitado pela alta susceptibilidade destes animais ao HSV-1. Relatos semelhantes têm sido feitos por Matz-Rensing et al. (2003); Hatt et al. (2004) e Lefaux et al. (2004).

Observou-se neste estudo que somente três animais (casos 9, 10 e 11) foram medicados com Aciclovir. Nos demais animais, quando tratados, não se utilizou nenhum anti-viral. Relatos na literatura compartilham das mesmas evidências. De acordo com Bruno et al. (1997); Juan-Sallés et al. (1997) e Pachaly, Werner e Diniz (1991) os sagüis acometidos com HSV-1 não receberam nenhum tratamento. Nos relatos de Hatt et al. (2004) e Lefaux et al. (2004) utilizaram-se antibióticos e anti-inflamatórios e no caso de Huemer et al. (2002) usou-se Aciclovir tópico acompanhado de antibiótico sistêmico. Segundo Matz-Rensing (2003) os sagüis foram medicados com Baypamun® (*Parapoxvirus ovis* D1701 inativado).

Com isso, pode-se observar que a utilização de anti-virais nos casos de HSV-1 em sagüis é muito baixo. Segundo Pannuti (2003) o Aciclovir é a droga de escolha para tratamento das infecções pelo HSV em humanos. A dosagem é de 5mg/kg de 8/8 horas, por via endovenosa, durante 10 dias. Infecções disseminadas ou encefalite requerem doses maiores (10mg/kg) durante 10 a 14 dias. A administração por via oral também é uma opção.

Em humanos, o uso do Aciclovir em HSE, reduz a mortalidade para 19% (SKOLDENBERG et al., 1984). Embora o aciclovir seja uma droga altamente eficaz no tratamento da HSE, a morbidade ainda é alta, mesmo entre os casos corretamente tratados. Mais da metade dos pacientes permanecem com seqüelas após o tratamento (WHITLEY et

al., 1986). Acredita-se que o tipo de cepa e quantidade do vírus estão relacionados à gravidade e prognóstico da doença.

Existe um único relato de um sagüi que sobreviveu à infecção natural pelo HSV-1, o qual se recuperou espontaneamente, sem nenhum tratamento (HATT et al., 2004). Nos casos avaliados neste trabalho não houve nenhum sobrevivente à infecção, mas os animais que foram tratados com Aciclovir permaneceram vivos por um período de tempo maior.

6.2 AVALIAÇÃO ANATOMOPATOLÓGICA

Os alphaherpesvírus causam injúrias através da necrose celular. A severidade das lesões induzidas pela replicação do HSV-1 pode variar. De acordo com Whitley (2001) estas representam a combinação de morte celular mediada pelo vírus associada à resposta inflamatória.

Macroscopicamente as lesões na pele da face, na boca e língua foram as mais freqüentes, sendo observadas em 58% (7/12) dos sagüis. Estas eram caracterizadas pela formação de pequenas úlceras na pele recobertas por crostas. Na mucosa oral e línguas estas lesões ulcerativas eram extensas e recobertas por material fibrinoso cinza-esbranquiçado. Lesões semelhantes foram observadas por Bruno et al. (1997); Juan-Sallés et al. (1997); Pachaly, Werner e Diniz (1991); Huemer et al. (2002) e Hatt et al. (2004); Lefaux et al. (2004); Matz-Rensing et al. (2003).

No SNC destes sagüis observou-se congestão, edema das meninges e em um animal hemorragia cerebelar. Pachaly, Werner e Diniz (1991) também encontraram hemorragia no SNC de um sagüi, na região temporal anterior. Em humanos com HSE evidencia-se necrose hemorrágica, congestão e edema. Em indivíduos imunocompetentes a HSE apresenta-se como uma encefalite localizada em áreas específicas dos lobos temporal e frontal (DRACHMAN; ADAMS, 1962), no entanto nestes animais não foi possível observar este caráter focal.

O fígado exibia coloração amarelada, padrão lobular evidente e hepatomegalia. Evidenciou-se também esplenomegalia, linfadenopatia e no pulmão congestão e edema. Matz-Rensing et al. (2003) observaram esplenomegalia e linfadenopatia, e Juan-Sallés et al. (1997) evidenciaram apenas esplenomegalia. Nos demais trabalhos de infecção por HSV-1 em sagüis não foram observados lesões macroscópicas nos órgãos internos.

Em *Aotus trivirgatus* (macaco da noite), as lesões encontradas tanto de forma natural como experimental caracterizam-se por vesículas, placas necróticas, erosões e úlceras na mucosa oral, e nas junções mucocutâneas dos lábios (MELENDEZ et al., 1969) que podem ser discretas ou acometer toda a cavidade oral, estendendo para a faringe, esôfago e traquéia.

Microscopicamente, a principal lesão encontrada em todos os sagüis foi meningoencefalite necrotizante não supurativa difusa variando de leve a severa com gliose, manguitos perivasculares, vasculite necrotizante, necrose neuronal, satellitose, neuronofagia e necrose do neurópilo. Estas lesões acometiam preferencialmente a substância cinzenta, mas em muitos casos, por continuidade, a substância branca também era afetada, apresentando degeneração walleriana, manguitos perivasculares, gliose e hemorragia necrotizante.

Lesões encontradas em sagüis com HSV por Pachaly, Werner e Diniz (1991); Hatt et al. (2004) e Lefaux et al. (2004), acometiam somente a substância cinzenta. Enquanto as encontradas por Juan-Sallés et al. (1997) além de acometerem o córtex frontal, lobo temporal, tálamo, hipotálamo, medula oblongata, também havia lesão na substância branca do cerebelo. Em um surto descrito por Matz-Rensing et al. (2003) não foram encontrados em nenhum dos sagüis lesões encefálicas.

No SNC de 58% (7/12) observaram-se inclusões virais características de infecção herpética, denominadas de inclusões Cowdry Tipo A. Estas estavam nos neurônios, eram intranucleares, eosinofílicas ou anfófilicas e ocupavam todo o núcleo ou formavam um halo em volta, sendo semelhantes às encontradas em outros relatos de HSV. Há trabalhos que demonstram que estas também podem ser vistas em células da glia (PACHALY; WERNER; DINIZ, 1991; JUAN-SALLÉS et al., 1997; HATT et al., 2004).

Uma das propriedades biológicas mais importante do HSV-1 é a neurovirulência, que compreende a capacidade de neuroinvasividade e a habilidade de replicar em neurônios. É através desta propriedade que o HSV-1 consegue causar doença neurológica severa. Segundo Zachary (2007) os alphaherpesvírus entram no SNC principalmente pelo transporte axonal retrógrado, embora a via hematogênica nos casos de viremia também pode ocorrer.

A HSE é a complicação mais fatal da infecção pelo HSV estando entre uma das mais severas de todas as infecções virais no SNC de seres humanos (WHITLEY; KIMBERLIN, 2005), sendo a forma mais comum de encefalite necrotizante aguda (ELLISON et al., 2005). Em geral, é atribuída principalmente ao HSV-1, mas muitos casos de meningite estão relacionados ao HSV-2.

Microscopicamente, a HSE pode variar de leve a severa. Em lesões mais avançadas, observa-se necrose celular, infiltrado inflamatório intenso perivascular e no interstício

constituído por linfócitos e macrófagos (ELLISON et al., 2005). Em cerca da metade dos casos encontram-se inclusões intranucleares (Cowdry tipo A), principalmente em neurônios, mas também em astrócitos e oligodendrócitos, achados estes semelhantes ao encontrados nos sagüis.

Em *Aotus trivirgatus* a encefalite pode ser observada em casos sistêmicos, havendo necrose de neurônios principalmente na região do córtex temporal e no tálamo (HUNT, 1993b). Existe um aumento da eosinofilia do citoplasma dos neurônios e cariorrexia dos núcleos. Podem-se observar inclusões intranucleares nos neurônios e em astrócitos. Existem poucos manguitos perivasculares, mas o endotélio dos vasos pode estar hipertrófico e hiperplásico (HUNT, 1993b).

Evidenciou-se nestes sagüis, dermatite, estomatite e glossite necrótica ulcerativa focal a extensa, de leve a severa recoberta por exsudato fibrino supurativo. No epitélio adjacente observou-se edema intracelular acentuado e inclusões intranucleares anfofílicas, sendo estas lesões similares as encontradas por Matz-Rensing et al. (2003); Juan-Sallés et al. (1997); Hatt et al. (2004) e Lefaux et al. (2004).

De acordo com Whitley (2001) a vesícula na pele se transforma em pústula com o recrutamento de células inflamatórias e assim ocorre à resolução do processo. Quando a mucosa é envolvida, observa-se com maior freqüência à formação de úlceras, como resultado da ruptura vesicular, já que este tecido apresenta camada epitelial delgada. No entanto, nos sagüis do presente estudo foram observados tanto na pele como na mucosa a formação de úlceras, sendo que em nenhum caso evidenciaram-se pústulas.

Observou-se também que o fígado, baço, linfonodos, adrenais e rins foram severamente afetados. As lesões eram características de infecção viral aguda com necrose e infiltrado inflamatório predominantemente linfo-plasmocitário. Evidenciaram-se inclusões Cowdry tipo A no fígado, adrenais e rins. Os pulmões, traquéia, coração, estômago, intestinos, pâncreas, apresentaram lesões mais brandas.

Em dois sagüis (casos 3 e 4) observaram-se células sinciciais no baço, linfonodos, fígado, rins e adrenais. As alterações induzidas pela infecção do HSV-1 nas células incluem degeneração balonosa, condensação da cromatina nuclear seguido por degeneração nuclear nas células epiteliais, as quais perdem a membrana plasmática formando células gigantes multinucleadas (sincícios) (WHITLEY; KIMBERLIN, 2005).

Nos plexos de Auerbach também observaram lesões e inclusões. Segundo Zachary (2007) os alphaherpesvírus podem causar ganglioneurite o que sugere que nestes casos o HSV-1 utiliza o transporte axonal para infectar diferentes órgãos, inclusive o SNC.

No baço e linfonodos evidenciou-se necrose centrofolicular leve a acentuada. Segundo Fry e McGavin (2007) muitos agentes virais que acometem seres humanos e animais tem afinidades por linfócitos e causam destruição dos tecidos linfóides podendo levar a necrose dos centros germinativos do baço e linfonodos como foram observadas nestes sagüis. No entanto na IHQ não houve nenhuma marcação da proteína viral nestes órgãos linfóides.

Através destas lesões observadas na maioria dos órgãos, pode-se concluir que o HSV-1 faz viremia nestes animais. Demais trabalhos na literatura apontam pouco envolvimento sistêmico. Segundo Hatt et al. (2004) além das lesões no SNC, pele e mucosa, observaram apenas lesões brandas no fígado, rins e baço. Lefaux et al. (2004) evidenciaram infecções brandas nos pulmões e fígado. Juan-Sallés et al. (1997) e Matz-Rensing et al. (2003) encontraram apenas lesões leves nas adrenais.

Através dos achados anatomopatológicos, na maioria dos casos foi possível confirmar a infecção pelo herpesvírus através das lesões histológicas típicas e pela presença das inclusões Cowdry tipo A, no entanto não se consegue determinar o tipo de herpesvírus. A infecção pelo HSV-1 em sagüis, macacos da noite e tamarinos não pode ser diferenciada da infecção pelo *H. platyrrhinae* (HUNT; MELENDEZ, 1966, 1969, 1972). Ambos vírus apresentam infecção sistêmica com lesões anatomopatológicas idênticas. Encefalite não tem sido descrita nas infecções pelo *H. platyrrhinae*, mas este não pode ser um critério confiável de diferenciação (HUNT, 1993b).

Nos casos em que as lesões herpéticas na pele e mucosa, e as inclusões Cowdry tipo A estavam ausentes o diagnóstico presuntivo de herpesvírus não pode ser dado. No presente trabalhos, três sagüis (casos 1, 5 e 7) apresentaram esta problemática. Nestes casos o diagnóstico diferencial de outros agentes causadores de encefalite, como por exemplo, o vírus da raiva se faz necessário. Pelo ponto de vista neuropatológico a raiva também não pode ser diferenciada de outras encefalites quando as inclusões intracitoplasmáticas estão ausentes (ASSIS, 1982). As lesões são similares as que ocorrem na infecção pelo HSV-1, necessitando assim do isolamento ou tipificação viral.

Na avaliação ultra-estrutural dos fragmentos de SNC dos sagüis e camundongos observou-se um número variável de nucleocapsídeos de aproximadamente 100nm no núcleo dos neurônios. Estas estruturas apresentavam tamanho, localização e morfologia consistente com os membros da família Herpesviridae.

Nos casos de HSE em humanos observaram-se as mesmas estruturas (ELLISON et al., 2005). Num surto de HSV-1 em sagüis evidenciou-se na língua nucleocapsídeos virais

intranucleares nas células epiteliais e um grande número de vírion envelopados no citoplasma e espaço intercelular.

6.3 MÉTODOS DIAGNÓSTICOS DA INFECÇÃO PELO HSV-1

6.3.1 Prova de Inoculação Intracerebral em Camundongos

Até o final da década de 50, a maioria dos isolamentos virais eram obtidos através da inoculação em animais ou em membrana corioalantóica. Os modelos de infecção mais utilizados são os camundongos, porquinho da índia e coelhos.

A fim de reproduzir a doença em um modelo animal e assim também poder diferenciá-la da infecção rábica, utilizando fragmentos de encéfalos dos sagüis, fez-se inoculação IC em camundongos. Em 67% (6/9) das amostras houve sintomatologia neurológica nos camundongos. Nestas mesmas amostras encefálicas de sagüis realizou-se PCR, sendo que 89% (8/9) foram positivas para o HSV-1. A inoculação como método diagnóstico de infecção viral apresentou baixa sensibilidade, no entanto em muitos casos em que técnicas moleculares não são disponíveis, esta pode ser uma alternativa.

Nas amostras em que nenhum camundongo ficou doente, sugere-se que o vírus possa ter perdido a capacidade de infectividade ou morreu. Isso pode ocorrer devido à degradação do tecido encefálico dos sagüis, pelo processo de congelamento e pelo tempo decorrido da colheita até a realização da inoculação. A carga viral nos fragmentos de SNC também é bastante relevante para que a doença seja reproduzida em outra espécie. Nos casos em que a quantidade do inóculo é muito pequena, os camundongos podem não adoecer.

Outro fator importante foi o período de observação. Neste estudo utilizou-se 21 dias, que é o estipulado para o diagnóstico de raiva. Em camundongos, a inoculação intramuscular do HSV-1 resulta em replicação viral em órgãos periféricos, transporte retrógrado do vírus no núcleo dos neurônios da raiz dorsal seguido pelo estabelecimento da infecção latente (ROIZMAN; KNIPE, 2001). Sendo assim, muitos animais podem não ter adoecido devido a este mecanismo. Talvez se o período de observação fosse maior, poderia haver manifestação clínica mais tardia da doença.

Observou-se que os sinais neurológicos começaram a aparecer no terceiro dia pós-inoculação, prosseguindo até 13°. A maior frequência (45,8%) ocorreu no sexto dia. O vírus rábico começa a manifestar-se a partir do quinto dia, sendo assim clinicamente não foi possível diferenciar estes dois agentes em grande parte dos casos.

Quanto às lesões histológicas, em todos os animais que morreram havia meningoencefalite necrótica não supurativa difusa severa com necrose neuronal, neuronofagia, satelitose, gliose, manguitos perivasculares, vasculite necrotizante, edema, microhemorragia, necrose severa multifocal do neurópilo e inclusões intranucleares eosinofílicas e anfófilas nos neurônios (Cowdry tipo A). Através destes achados é possível confirmar a infecção pelo herpesvírus, no entanto, não se consegue tipificar o agente.

Nenhum sagüi foi positivo na prova de IFD para raiva, sendo este resultado esperado já que em todos os casos acreditava-se serem causados pelo HSV-1.

6.3.2 Imunoistoquímica

O estudo imunoistoquímico realizado em todos os sagüis (casos 1 a 12) e em 21 camundongos provenientes da inoculação IC revelaram não haver diferença para a marcação dos antígenos virais do herpesvírus, sendo que tanto o anticorpo anti-HSV-1 e anti-HSV-2 policlonais marcaram igualmente todos os tecidos.

Segundo informações do fabricante (Dako[®]), estes anticorpos devem ser utilizados somente para pesquisa, não sendo recomendado o uso em procedimentos diagnósticos. Tanto o anticorpo anti-HSV-1 como o anti-HSV-2 reagem com antígenos específicos do HSV-1 e HSV-2 respectivamente, mas também com antígenos comuns a estes dois sorotipos e com todas as maiores glicoproteínas presentes no envelope. Estes não fazem reação cruzada com os Citomegalovírus e o Epstein-Barr, no entanto, em altas concentrações podem apresentar com o vírus Varicella Zoster.

De todos os órgãos analisados, o encéfalo teve a maior frequência de marcação positiva, sendo esta presente em todos os casos. Houve marcações também na língua, mucosa oral, pele, pulmões, traquéia, esôfago, estômago e nos gânglios do endocárdio, figado, adrenais, rins e plexos de Auerbach dentre outros órgãos.

Através destes resultados de IHQ não se pode concluir o tipo de herpesvirus presente nestes tecidos, haja vista que o HSV-1 e HSV-2 apresentam reações cruzadas, mas foi

possível comprovar que o HSV faz viremia nos sagüis, contribuindo assim com os achados histopatológicos.

Matz-Rensing et al. (2003) também utilizaram a IHQ como ferramenta diagnóstica em sagüis com HSV-1. Nos animais avaliados encontrou-se marcação positiva para HSV-1 na língua, SNC, fígado, mesmo que na avaliação histológica não havia sido observada lesão encefálica e hepática. Em humanos a IHQ tem sido utilizada no diagnóstico de HSE, com a demonstração do antígeno viral por até três semanas após o início da encefalite (ELLISON et al., 2005).

Nos camundongos inoculados que morreram devido à infecção pelo HSV-1, houve marcação positiva no SNC de 95% (20/21). Nos demais órgãos não se observaram marcações, demonstrando assim o caráter de lesão localizada no SNC.

6.3.3 Reação da PCR

A primeira descrição do uso da PCR no diagnóstico da encefalite pelo HSV em seres humanos foi feita em 1990, quando foi detectado no LCR de paciente com HSE (ROWLEY et al., 1990). A sensibilidade da PCR em relação à biopsia cerebral foi de 100%, sendo utilizada em casos onde outros métodos falharam.

Atualmente é a técnica de eleição para o diagnóstico da HSE, através da detecção viral no LCR (DOMINGUES et al., 1997; WHITLEY; KIMBERLIN, 2005). A PCR também tem se mostrado mais sensível que o isolamento viral clássico para detecção do vírus em úlceras causadas pelo HSV, além de permitir a diferenciação direta do HSV-1 e HSV-2 (PANNUTI et al., 1997; NASCIMENTO et al., 1998).

No presente trabalho, utilizou a PCR como sendo a técnica para a tipificação viral, de todos estes casos que através dos achados anatomopatológicos, imunoistoquímicos, ultra-estruturais e pelo ensaio biológico demonstraram ser causado pelo herpesvírus.

Para tal, foram utilizadas duas metodologias. A primeira preconizada por VanDevanter et al. (1996) que detectava amostras positivas para os vírus da família Herpesviridae através da utilização de *primers* de consenso. Esta técnica mostrou-se bastante eficiente para o objetivo proposto, sendo que todas os animais com lesões anatomopatológicas sugestivas de HSV e positivas na IHQ também foram positivas na PCR, podendo ser utilizado como triagem para a pesquisa de herpesvírus.

Através da mesma técnica proposta por VanDevanter et al. (1996), utilizaram-se os *primers* específicos para HSV-1 e HSV-2, os quais amplificam uma sequência de 1.253 pb e 1.265 pb respectivamente. Esta reação foi padronizada, mas mesmo assim nenhuma amostra foi positiva.

A causa desta negatividade é incerta, podendo ter ocorrido falhas nas reações, não possibilitando a detecção viral nas amostras clínicas, já que estas podem conter uma menor quantidade de material genético viral que a amostra padrão (controle).

A segunda metodologia da PCR foi realizada de acordo com Nascimento et al. (1998) e Pannuti et al. (1997) utilizando os *primers* HSV-U, HSV-1L E HSV-2L, específicos para HSV-1 e HSV-2, os quais amplificam uma sequência de 503 pb e 435 pb respectivamente. Realizaram-se dois métodos de extração do DNA, o primeiro as suspensões de encéfalos foram tratadas com Vertrel® e depois extraídos com o Kit Qiagen Blood. Com este processo somente duas amostras foram positivas para o HSV-1.

O segundo método de extração foi realizado utilizando-se suspensões de encéfalos seguidas de extração do DNA com o Kit Qiagen Tissue. Foram utilizadas nove amostras de encéfalos dos sagüis, sendo oito positivas para HSV-1 e os fragmentos de língua de quatro animais também foram positivos.

A clarificação das amostras com Vertrel® talvez tenha inibido a PCR ou sucessivas diluições realizadas neste processamento podem ter diminuído drasticamente a quantidade de material genético viral presente nas amostras levando assim a negatividade. O mesmo fato pode ter corroborado também para a negatividade da primeira metodologia de tipificação do HSV-1.

Através dos resultados obtidos pela PCR de fragmentos encefálicos e linguais extraídos com o Kit Qiagen® e utilizando-se os *primers* HSV-U, HSV-1L E HSV-2L, específicos para HSV-1 e HSV-2 pode-se afirmar que a PCR é muito eficiente no diagnóstico e tipificação do HSV-1.

De todas as amostras analisadas com esta última metodologia de PCR, somente uma de encéfalo foi negativa. Isso pode ter ocorrido devido à ausência de DNA viral no fragmento processado, já que a IHQ teve pouca marcação positiva e as lesões encefálicas foram leves. Com este resultado sugere-se que em infecções brandas a PCR pode dar resultado falso negativo.

Estudos descritos por Huemer et al. (2002); Matz-Rensing et al. (2003) e Lefaux et al. (2004) também chegaram ao diagnóstico de HSV-1 através da PCR, no entanto trabalhos mais antigos como o realizado por Juan-Sallés et al. (1997) conseguiram o diagnóstico de HSV sem a diferenciação dos dois sorotipos.

7 CONSIDERAÇÕES FINAIS

√ O conhecimento das enfermidades virais que acometem os primatas não humanos tem se expandido a cada dia. Isso se deve principalmente às pesquisas biomédicas, a proximidade filogenética com a espécie humana e porque os vírus podem representar um sério risco à conservação;

√ O contato próximo dos seres humanos com os sagüis, seja este através da manutenção como animais de estimação, em zoológicos, criadouros, centros de triagens e até mesmo nos programas de conservação *in situ* pode representar um sério risco a saúde humana, no entanto neste trabalho pode-se provar o inverso, os seres humanos representam um sério risco a saúde dos primatas;

√ O HSV-1 torna-se um risco ainda maior para os sagüis, pois grande parte da população humana mundial é portadora e muitas vezes eliminam o vírus sem manifestação clínica e os tratamentos para humanos existentes curam apenas a infecção, mas o estado de portador permanece, podendo ocorrer novas recidivas;

√ Observa-se que os primatas Neotropicais, neste caso em especial, os sagüis são altamente susceptíveis a infecção causada pelo HSV-1 desenvolvendo uma doença fatal;

√ Infecções pelo HSV-1 em sagüis parecem ser raras e isso pode ser avaliado erroneamente que estes animais apresentam baixo risco à infecção, no entanto isso não foi observado neste estudo e em muitos outros existentes na literatura;

√ Na infecção pelo HSV-1 em sagüis, pode-se perceber que as manifestações clínicas e as lesões anatomopatológicas muitas vezes são clássicas de infecção herpética, mas que em alguns casos não é possível diferenciar de outras enfermidades de curso agudo;

√ Técnicas complementares como a inoculação IC em camundongos e a IHQ podem elucidar melhor a enfermidade, no entanto não determinam o diagnóstico definitivo e não permitem a diferenciação entre outros herpesvírus;

√ A reação de PCR mostrou-se altamente eficaz no diagnóstico definitivo da infecção pelo HSV-1;

√ Observou-se que o HSV-1 espalha-se rapidamente em grupos de sagüis, acreditando-se então que há transmissibilidade entre eles. Sendo assim, o isolamento de animais doentes é necessário, para que se evite a contaminação;

√ Por ser a infecção do HSV-1 uma enfermidade de curso agudo, métodos diagnósticos rápidos e eficientes se fazem necessários;

√ Pode-se perceber que o tratamento para a infecção pelo HSV-1 em sagüis ainda é pouco utilizado, sendo necessário maiores estudos;

√ Através de toda temática abordada neste estudo, acredita-se que a melhor forma para evitar esta doença é a prevenção;

√ A única forma de prevenção é o contato criterioso dos sagüis com os seres humanos, através da utilização de roupas adequadas, como luvas e máscaras, pelos profissionais que manejam estes animais;

√ Evitar o contato dos humanos com os primatas, quando estes apresentam a forma clínica da doença, haja visto que nesta fase há uma grande eliminação viral.

√ Sendo assim, acredita-se que o melhor conhecimento desta enfermidade, e a educação ambiental e sanitária são peças chaves para se evitar este tipo de doença infecciosa, transmissível e fatal.

√ No Brasil existem vários trabalhos que tem suspeitado de ser o HSV-1 o causar de mortes em sagüis com vesículas e úlceras em pele e mucosas associadas a lesão neurológica, no entanto até o presente momento não havia a comprovação do mesmo;

√ Sendo assim, o presente estudo comprova a existência do HSV-1 como causador de infecções fatais em sagüis no Brasil.

REFERÊNCIAS

REFERÊNCIAS

- ABBOTT, D. H.; BARNETT, D. K.; COLMAN, R. J.; YAMAMOTO, M. E.; SCHULTZ-DARKEN, N. J. Aspects of Common Marmoset basic biology and life history important for biomedical research. **Comparative Medicine**, v. 53, n. 4, p. 339-350, 2003.
- ALENCAR, A. I.; YAMAMOTO, M. E.; OLIVEIRA, M. S.; LOPES, F. A.; SOUSA, M. B. C.; SILVA, N. G. Behavior and progesterone levels in *Callithrix jacchus* females. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 28, p. 591-595, 1995.
- AMIR, J.; HAREL, L.; SMETANA, Z.; VARSANO, I. The natural history of primary herpes simplex type 1 gingivostomatitis in children. **Pediatric Dermatology**, v. 16, n. 4, p. 259-263, 1999.
- ANDERSON, J. A.; FIELD, H. J. The distribution of herpes simplex type 1 antigen in mouse central nervous system after different routes of inoculation. **Journal of the Neurological Sciences**, v. 60, p. 181-195, 1983.
- ANDRADE M. R.; NUÑES DE OLIVEIRA, A.; ROMIJIN, P. C.; KIMURA, L.S.; COSTA, C. C. Infección experimental em primates no humanos (*Callithrix* sp.) com el virus de la rabia: acompañamiento del curso de la enfermedad. Animales de Experimentación, **La Revista Hispanoamericana**, v. 4, p. 7-10, 1999.
- ANDRADE NETO, J. P.; ANGELO, M. J. O.; ITO, F. H.; VASCONCELLOS, S. A.; NUMBERGER JUNIOR, R. Isolamento de herpes vírus em sagüis (*Callithrix jacchus* e *C. penicillata*) com quadro de encefalite. In: CONGRESSO PAULISTA DE MEDICINA VETERINÁRIA, 1989, São Paulo. **Anais...** São Paulo: Sociedade Paulista de Medicina veterinaria, 1989. p. 68
- ASSIS, R. V. C. **Neuropatologia da Encefalite Rábica**. 1982. 92 p. Dissertação (Mestrado em Patologia) - Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo, São Paulo, 1982.
- BARINGER, J. R.; *Herpes simplex* virus infection of nervous tissue in animals and man. **Progress in Medical Virology**, v. 20, p. 1-26, 1975.
- BASTIAN, F. O; RABSON, A. S; YEE C. L; TRALKA T. S. *Herpesvirus hominis*: isolation from human trigeminal ganglion. **Science**, v. 178, p. 306-307, 1972.
- BOGAERT, L.; INNES, J. R. M. Neurologic Diseases of Apes and Monkeys. In: INNES, J. R. M.; SAUNDERS, L. Z. **Comparative Neuropathology**. New York: Academic Press, 1962. p. 55-146.
- BRUNO, S. F.; LIEBHOLD, M. M.; MATZ-RENSING, K.; ROMAO, M. A. P.; DIDIER, A.; BRANDES, F.; BRESSAN, A. C. S.; KAUP, F. J. Herpesvirus infection in free-living black-tufted-ear marmoset (*Callithrix penicillata* E. Geoffroyi 1812) at the State Park of Serra da Tiririca, Niterói, Rio de Janeiro, Brasilien. **Berliner Münchner Tierärztliche Wochenschrift**, v. 110, p. 427-430, 1997.

DAVIS, L. E.; JOHNSON, R. T. An explanation for the localization of *Herpes simplex* encephalitis? **Annals of Neurology**, v. 5, p. 2-5, 1979.

DEAN, D. J.; ABELSETH, M. K.; ATANASIU, P. The fluorescent antibody test. In: MESLIN, F-X.; KAPLAN, M. M.; KOPROWSKI, H. **Laboratory techniques in rabies**. 4 ed. Geneva: World Health Organization, 1996, p. 88-95.

DINIZ, L. S. M.; COSTA, E. O. Health problems of *Callithrix jacchus* in captivity. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 28, p. 61-64, 1995.

DOMINGUES, R. B.; TSANACLIS, A. M. C.; PANNUTI, C. S. ; MAYO, M. S. ; LAKEMAN, F. D. Evaluation of the range of clinical presentations of *Herpes simplex* encephalitis by using polymerase reaction assay of cerebrospinal fluid samples. **Clinical Infectious Diseases**, v. 25, n. 1, p. 86-91, 1997.

DRACHMAN, D. A.; ADAMS, R. D. Herepes simplex and acute inclusion-body encephalitis. **Archives of Neurology**, v. 7, p. 61-79, 1962.

DRUMMOND, C. W. E; EGLIN, R. P.; ESIRI, M. M. *Herpes simplex* virus encephalitis in a mouse model: PCR evidence for CNS latency following acute infection. **Journal of the Neurological Sciences**, v. 127, p. 159-63, 1994.

ELLISON, D.; LOVE, S.; CHIMELLI, L.; HARDING, B. N.; LOWE, J.; VINTERS, H. V. **Neuropathology: A reference text of CNS pathology**. 2. ed. New York: Mosby, 2005. 755 p.

EMMONS, R. W.; LENNETTE, E. H. Natural *Herpesvirus hominis* infection of a gibbon (*Hylobates lar*). **Archiv fur die Gesamte Virusforschung**, v. 31, p. 215-218, 1970.

EPIPHANIO, S. **Patologia comparada de primatas da família *Callitrichidae* Gray, 1802 mantidos em cativeiro**. 1997. 108 p. Dissertação (Mestrado em Patologia Experimental e Comparada) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 1997.

FAVORETTO, S. R.; MATTOS, C. C.; MORAIS, N. B.; ARAÚJO, F. A. A.; MATTOS, C. A. Rabies in marmosets (*Callithrix jacchus*), Ceará, Brazil. **Emerging Infectious Diseases**, v. 7, n. 6, p. 1062-1065, 2001.

FELSBURG, P. J.; HEBERLING, R. L.; BRACK, M.; KALTER, S. S. Experimental genital infection of the marmoset. **Journal of medical Primatology**, v. 2, p. 50-60, 1973.

FELSBURG, P. J.; HEBERLING, R. L.; KALTER, S. S. Experimental genital infection of cebus monkey with oral and genital isolates of *Herpesvirus hominis* type 1 and 2. **Archiv fur die Gesamte Virusforschung**, v. 39, p. 223-227, 1972.

FRY, M. M.; MCGAVIN, M. D. Bone marrow, blood cells, and lymphatic system. In: MCGAVIN, M. D.; ZACHARY, J. F. **Pathology basis of veterinary disease**. 4. ed. Missouri: Mosby, 2007. p. 743-832.

GAY, F. P.; HOLDEN, M. The herpes encephalitis problem. **Journal of Infectious Diseases**, v. 53, p. 287-303, 1933.

GOLDWASSER, R. A.; KISSLING, R. E. Fluorescent antibody staining of street and fixed rabies virus antigens. **Proceedings of the Society of Experimental Biology**, v. 98, p. 219-223, 1958.

GOOD, R. A.; CAMPBELL, B. Potentiating effect of anaphilatic and histamine shock upon *Herpes simplex* virus infection in rabbits. **Proceedings of the Society of experimental Biology and Medicine**, v. 59, p. 305-306, 1945.

HATT, J. M.; GREY, P.; POSTHAUS, H.; BOSSART, W. Serologic survey in a colony of captive common marmosets (*Callithrix jacchus*) after infection with *Herpes somplex* type1-like virus. **Journal of Zoo and Wildlife Medicine**, v. 35, n. 3, p. 387-390, 2004.

HAY, J.; RUYECHAN, W. T. Regulation of herpes simplex virus type 1 gene expression. **Current Topic in Microbiology and Immunology**, v. 179, p. 1-14, 1992.

HOLMES, G. P.; CHAPMAN, L. E. ; STEWART, J. A. ; STRAUS, J. A.; STRAUS, S. E.; HILLIARD, J. K.; DAVENPORT, D. S. Guidelines for the prevention and treatment of B-virus infections in exposed persons. **Clinical Infectious Disease**, v. 20, p. 421-439, 1995.

HOLMES, A. W.; DEVINE, J. A.; NOWAKOWSKI, E.; DEINHARDT, F. The epidemiology of a herpes virus infection of New World monkey. **Journal of Immunology**, v. 96, p. 668-671, 1966.

HUEMER, H. O.; LARCHER, C.; CZEDIK-EYSENBERG, T. ; NOWOTNY, N.; REIFINGER, M. Fatal infection of a pet monkey with Human herpesvirus 1. **Emerging Infectious Diseases**, v. 8, n. 6, 639-641, 2002.

HUNT, R. D. Herpesviruses of primates: an introduction. In: JONES, T. C.; MOHR, U.; HUNT, R. D. **Monographs on pathology of laboratory animals: nonhuman primates I**. Berlin Heidelberg: Springer-Verlag, 1993a. p. 74-78.

HUNT, R. D. *Herpesvirus simplex* infection. In: JONES, T. C.; MOHR, U.; HUNT, R. D. **Monographs on pathology of laboratory animals: nonhuman primates I**. Berlin Heidelberg: Springer-Verlag, 1993b, p. 82-86.

HUNT, R. D.; BLAKE, B. J. Herpesvirus B infection. In: JONES, T. C.; MOHR, U.; HUNT, R. D. **Monographs on pathology of laboratory animals: nonhuman primates I**. Berlin Heidelberg: Springer-Verlag, 1993c, p. 78-81.

HUNT, R. D.; MELENDEZ, L. V. Clinical, epidemiologic, and pathologic features of cytoidal and oncogenic herpesvirus in South American monkeys. **Journal of the National Cancer Institute**, v. 49, p. 261-271, 1972.

HUNT, R. D.; MELENDEZ, L. V. Herpes virus infection of non-human primates: a review. **Laboratory Animal Care**, v. 19, p. 221-234, 1969.

HUNT, R. D.; MELENDEZ, L. V. Spontaneous herpes-T infection in the owl monkey (*Aotus trivirgatus*). **Veterinary Pathology**, v. 3, p. 1-26, 1966.

JAMIESON, G. A.; MAITLAND, N. J. ; WILCOCK, G. K.; CRASKE, J.; ITZHAKI, R. F. Latent *Herpes simplex* virus type 1 in normal and Alzheimer's brains. **Journal of Medical Virology**, v. 33, p. 224-227, 1991.

JOHNSON, J. R.; EGAAS, S.; GLEAVES, C. A.; HACKMAN, R.; BOWDEN, R. A. Hepatitis due to *Herpes simplex* virus in marrow-transplant recipients. **Clinical Infectious Diseases**, v. 14, n. 1, p. 38-45, 1992.

JOHNSON, R. T. The pathogenesis of herpes virus encephalitis. I. Virus pathways to the nervous system of suckling mice demonstrated by fluorescent antibody staining. **The journal of Experimental Medicine**, v. 119, p. 343-356, 1964.

JUAN-SALLÉS, C.; RAMOS-VARA, J. A.; PRATS, N.; SOLÉ-NOCOLÁS, J.; SEGALÉS, J.; MARCO, A. J. Spontaneous *Herpes simplex* virus infection in common marmosets (*Callithrix jacchus*). **Journal of Veterinary Diagnostic**, v. 9, p. 341-345, 1997.

KANER, R. J. ; BAIRD, A. ; MANSUKHANI, A.; BASILICO, C.; SUMMERS, B. D.; FLORKIEWICZ, R. Z.; HAJJAR, D. P. Fibroblast growth factor receptor in a portal of cellular entry for *Herpes simplex* virus type 1. **Science**, v. 248, p. 1410-1413, 1990.

KEEBLE, S. A. B virus infection in monkeys. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 85, p. 960-969, 1960.

KEMP, G. E.; LOSOS, G. L.; CAUSEY, O. R.; EMMONS, R. W.; GOLDING, R. R. Isolation of *Herpesvirus hominis* from lemurs: a naturally occurring epizootic at a zoological garden in Nigeria. **The African Journal of Medical Sciences**, v. 3, p. 177-185, 1972.

KING, N. W. Herpesvirus of Nonhuman Primates. In: WILLIAMS, E. S.; BARKER, I. K. **Infectious diseases of wild mammals**. 3. ed. Iowa: Iowa University Press, 2001. p. 147-178.

KING, N. W.; HUNT, R. D.; DANIEL, M. D. ; MELENDEZ, L. V. Overt herpes-T infection in squirrel monkeys (*Saimiri sciureus*). **Laboratory Animal Care**, v. 17, p. 413-423, 1967.

KOLOKOTRONIS, A.; DOUMAS, S. *Herpes simplex* virus infection, with particular reference to the progression and complications of primary herpetic gingivostomatitis. **Clinical Microbiology and Infection**, v. 12, n. 3, p. 202-211, 2006.

LEFAUX, B.; DUPREZ, R.; TANGUY, M.; LONGEART, L.; GESSAIN, A.; BOULANGER, E. Letter to the editor. **Veterinary Pathology**, v. 41, p. 302-303, 2004.

LOOMIS, M. R.; NEILL, T. O.; BUSH, M.; MONTALI, R. J. Fatal herpesvirus infection in patas monkeys and a black and white colobus monkey. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 179, p. 1236-1239, 1981.

MACHADO, C. M.; VILAS BOAS, L. S.; DULLEY, F. L.; CANTO, C. L. M.; FREIRE, W. S.; MACEDO, M. C.; MASSUMOTO, C.; OSTRONOFF, M. PANNUTI, C. S. *Herpes*

simplex virus shedding in bone marrow transplant recipients during low-dose oral acyclovir prophylaxis. **The Brazilian Journal of Infectious Diseases**, v. 1, p. 27-30, 1997.

MANSFIELD, K. Marmoset models commonly used in biomedical research. **Comparative Medicine**, v. 53, n. 4, p. 383-392, 2003.

MARENNIKOVA, S. S.; MALTSEVA, V. I.; SHELUKHINA, E. M.; SHENKMAN, L. S.; KORNEEVA, V. I. Ageneralized herpetic infection simulating smallpox in a gorilla. **Intervirolgy**, v. 2, p. 280-286, 1973.

MATZ-RENSING, K.; JENTSCH, K. D.; RENSING, S.; LANGENHUYZEN, S.; VERSCHOOR, E.; NIPHUIS, H.; KAUP, F. J. Fatal *Herpes simplex* infection in a group of common marmosets (*Callithrix jacchus*). **Veterinary Pathology**, v. 40, p. 405-411, 2003.

McCLURE, H. M.; SWENSON, R. B.; KALTER, S. S.; LESTER, T. L. Natural genital *Herpesvirus hominis* infection in chimpanzees. **Laboratory Animal Science**, v. 30, p. 895-901, 1980.

McCLURE, H. M.; OLBERLING, B.; STROZIER, L. M. Disseminated herpesvirus infection in a rhesus monkey (*Macaca mulatta*). **Journal of Medical Primatology**, v. 2, p. 190-194, 1973.

McCLURE, H. M.; KEELING, M. E.; OLBERLING, B.; HUNT, R. D.; MELENDEZ, L. V. Natural *Herpesvirus hominis* infection of tree shrews (*Tupaia glis*). **Laboratory Animal Science**, v. 22, p. 517-521, 1972.

MEHTA, A.; MAGGIONCALDA, J.; BAGASRA, O.; THIKKAYARAPU, S.; SAIKUMARI, P.; VALYINAGY, T.; FRASER, N. W.; BLOCK, T. M. In situ DNA PCR and RNA hybridization detection of herpes simplex virus sequences in trigeminal ganglia of latently infected mice. **Virology**, v. 206, n. 1, p. 633-640, 1995.

MELENDEZ, L. V.; ESPANA, C.; HUNT, R. D.; DANIEL, M. D. Natural *Herpes simplex* infection in the owl monkey (*Aotus trivirgatus*). **Laboratory Animal Care**, v. 19, p. 38-45, 1969.

MEYER JUNIOR, M. H.; JOHNSON, R. T.; CRAWFORD, I. P.; DASCOMB, H. E.; ROGERS, N. G. Central nervous system syndromes of "viral" etiology. **The American Journal of Medicine**, v. 29, p. 334-347, 1960.

NAHMIAS, A. J.; WHITLEY, R. J.; VISINTINE, A. N.; TAKEI, Y.; ALFORD JUNIOR, C. A. *Herpes simplex* virus encephalitis: laboratory evaluations and their diagnostic significance. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 145, n. 6, p. 829-836, 1982.

NAHMIAS, A. J.; DOWDLE, W. R. Antigenic and biologic differences in *Herpesvirus hominis*. **Progress in Medical Virology**, v. 10, p. 110-159, 1968.

NASCIMENTO, M. C.; SUMITA, L. M.; DE SOUZA, V. A. U. F.; PANNUTI, C. S. Detection and direct typing of *Herpes simplex* virus in perianal ulcers of patients with AIDS by PCR. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 36, n. 3, p. 848-849, 1998.

NOWAK, R. M. **Walker's Mammals of the world**. 6. ed. Baltimore: The Johns Hopkins University Press, 1999. 836 p.

PACHALY, J. R.; WERNER, P. R.; DINIZ, J. M. F. Infecção natural por *Herpesvirus hominis* em *Callithrix jacchus jacchus* Callithricidae (Thomas, 1903) – primates. **A Hora Veterinária**, v. 11, n. 61, p. 11-12, 1991.

PANNUTI, C. S. Infecções por vírus no paciente imunocomprometido. In: MAKSOUD, J. G. **Cirurgia pediátrica**. 2. ed. Rio de Janeiro: Revinter, 2003. p. 337-349.

PANNUTI, C. S.; FINK, M. C. D. S.; GRINBAUM, R. S.; SUMITA, L. M.; ALMEIDA, A. L. S.; REZENDE, N. F.; GOMES, M. P. S.; PINHO, J. R.R.; KIRCHHOFF, L.V. Asymptomatic perianal shedding of herpes Simplex Virus in patients with acquired immunodeficiency syndrome. **Archives of Dermatology**, v. 133, n. 2, p. 180-183, 1997.

PANNUTI, C. S. Infecções virais oportunistas. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 28, p. 32-38, 1995. Suplemento II. Trabalho apresentado ao Simpósio Internacional “Novas abordagens no tratamento de pacientes HIV positivos”. São Paulo, 1995.

PETERS, V. M.; GUERRA, M. O. Reproduction and maintenance of two species of marmoset in captivity. **Revista Brasileira de Biologia**, v. 58, n. 2, p. 169-173, 1998.

PISSINATTI, A. Manejo, reprodução e utilização biomédica de espécies do gênero *Callithrix* (Erxleben, 1977) Callitrichidae-Primates. **Revista Brasileira de Medicina Veterinária**, v. 15, n. 2, p. 57-61, 1993.

ROWLEY, A. H.; WHITLEY, R. J.; LAKEMAN, F. D.; WOLINSKY, S. M.; Rapid detection of *Herpes simplex* virus DNA in cerebrospinal fluid of patients with *Herpes simplex* encephalitis. **Lancet**, v. 335, p. 440-441, 1990.

RYLANDS, A. B.; SCHNEIDER, H.; LANGGUTH, A.; MITTERMEIER, R. A.; GROVES, C. P.; RODRÍGUEZ-LUNA, E. An assessment of the diversity of new world primates. **Neotropical Primates**, v. 8, n. 2, p. 61-93, 2000.

RYLANDS, A. B.; MITTERMEIER, R. A.; RODRÍGUEZ-LUNA, E. Conservation of Neotropical Primates: Threatened Species and an analysis of primate diversity by country and region. **Folia Primatologica**, v. 68, p. 134-160, 1997.

ROIZMAN, B.; KNIPE, D. M. Herpes Simplex viruses and their replication. In: KNIPE, D. M.; HOWLEY, P. M. **Fields virology**. 4. ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 2001. p. 2400-2459.

ROIZMAN, B.; PELLETT, P. E. The family herpesviridae: a brief introduction. In: KNIPE, D. M.; HOWLEY, P. M. **Fields virology**. 4. ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 2001. p. 2381-2397.

SÁ, L. R. M. **Determinação e caracterização de enfermidades que acometem Calitriquídeos e Cebídeos** (Estudo Multidisciplinar). 1999. 174 f. Dissertação (Mestrado em

Patologia Experimental e Comparada) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 1999.

SIMON, M. A.; DANIEL, M. D.; LEE-PARRITZ, D.; KING, N. W.; RINGLER, D. J. Disseminated B virus infection in a cynomolgus monkey. **Laboratory Animal Science**, v. 43, p. 545-550, 1993.

SKOLDENBERG, B.; FORSGREN, M.; ALESTIG, K.; BERGSTROM, T.; BURMAN, L.; DAHLQVIST, E.; FORKMAN, A.; FRYDEN, A.; LOVGREN, K.; NORLIN, K. Acyclovir versus vidarabine in *Herpes simplex* encephalitis. Randomised multicentre study in consecutive Swedish patients. **Lancet**, v. 2, p. 707-11, 1984.

SMITH, P. C.; YUILL, T. M.; BUCHANAN, R. D.; STANTON, J. S.; CHAICUMPA, V. The gibbon (*Hylobates lar*): A new primate host for *Herpesvirus hominis* I-A natural epizootic in a laboratory colony. **Journal of Infectious Diseases**, v. 120, p. 292-297, 1969.

STEVENSON, M. F.; RYLANDS, A. B. The marmosets, genus *Callithrix*. In: MITTERMEIER, R. A.; COIMBRA-FILHO, A. F.; FONSECA, G. A. B. **Ecology and behavior of neotropical primates**. Washington D. C.: World Wildlife Fund, 1988. p. 131-222.

VANDEVANter, D. R.; WARRENER, P.; BENNETT, L.; SCHULTZ, E. R.; COULTER, S.; GARBER, R. L.; ROSE, T. M. Detection and analysis of diverse herpesviral species by consensus primer PCR. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 34, n. 7, p. 1666-1671, 1996.

VERONA, C. E. S.; PISSINATTI, A. Primates – Primatas do novo mundo (Sagui, Macaco-prego, Macaco-aranha, Bugio). In: CUBAS, Z. S.; SILVA, J. C. R.; CATÃO-DIAS, J. L. **Tratado de Animais Selvagens**. São Paulo: Roca, 2007. p. 359-377.

WARD, J. A.; HILLIARD, J. K. B virus-specific pathogenfree (SPF) breeding colonies of macaques: Issues, surveillance, and results in 1992. **Laboratory Animal Science**, v. 44, p. 222-228, 1994.

WEIGLER, B. J.; HIRD, D. W.; HILLIARD, J. K.; LERCHE, N. W.; ROBERTS, J. A.; SCOTT, L. M. Epidemiology of *Cercopithecine herpesvirus 1* (B virus) infection and shedding in a large breeding cohort of rhesus macaques. **Journal of Infectious Diseases**, v. 167, p. 257-263, 1993.

WEINBERG, A.; VILAS BOAS, L. S.; STRABELLI, T. M. V.; UIP, D. E.; AMATO NETO, V.; BELLOTTI, G.; CHAMONE, D. A. F.; DULLEY, F. L.; MASUMOTO, C. S.; FEHER, O.; MUGAIAR, K. H. B.; FINK, M. C. D. S.; PANNUTI, C. S. Infecções causadas por Herpesvirus em pacientes transplantados. **Revista do Instituto de Medicina Tropical**, v. 31, p. 83, 1989. Suplemento 7. Trabalho apresentado à III Jornada Científica do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo, São Paulo, 1989.

WHITLEY, R. J.; KIMBERLIN, D. W. Herpes simplex: encephalitis children and adolescents. **Seminars in Pediatric Infectious Diseases**, v. 16, n. 1, p. 17-23, 2005.

WHITLEY, R. J. *Herpes Simplex Viruses*. In: KNIPE, D. M.; HOWLEY, P. M. **Fields virology**. 4. ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 2001. p. 2462-2509.

WHITLEY, R. J.; ALFORD, C. A.; HIRSCH, M. S.; SCHOOLEY, R. T.; LUBY, J. P.; AOKI, F. Y.; HANLEY, D.; NAHMIAS, A. J.; SOONG, S. J. Vidarabine versus acyclovir therapy in *Herpes simplex* encephalitis. **The New England Journal of Medicine**, v. 314, n. 3, p. 144-149, 1986.

WHITLEY, R. J.; SOONG, S. J.; LINNEMAN, C. JR.; LIU, C.; PAZIN, G.; ALFORD, C. A. *Herpes simplex* encephalitis. **Clinical Assessment. Journal of American Medical Association**, v. 247, n. 3, p. 317-320, 1982.

WILSON, R. B.; HOLSCHER, M. A.; CHANG, T.; HODGES, J. R. Fatal *Herpesvirus simiae* (B virus) infection in a patas monkey (*Erythrocebus patas*). **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v. 2, p. 242-244, 1990.

ZACHARY, J. F. Nervous System. In: MCGAVIN, M. D.; ZACHARY, J. F. **Pathology BASIS OF VETERINARY DISEASE**. 4. ed. Missouri: Mosby, 2007. p. 833-971.

9 – APÊNCIDE

APÊNDICE A – Descrição clínica, anatomopatológica e imunoistoquímica dos sagüis acometidos com infecção pelo HSV-1

Caso 1: *Callithrix penicillata*, adulto, macho, Criadouro Conservacionista José de Comoro

Histórico Clínico

Este não apresentou nenhuma alteração clínica, sendo encontrado morto no recinto.

Exame Necroscópico

Estado nutricional magro.

Foi evidenciada conjuntivite purulenta bilateral.

Demais órgãos dentro da normalidade.

Exame Histopatológico

SNC: observou-se meningoencefalite necrótica não supurativa (linfoplasmocitária e ocasional presença de neutrófilos) difusa moderada com necrose neuronal e manguitos perivasculares.

Fígado: hepatite linfoplasmocitária difusa leve

Rins: nefrite intersticial linfo-plasmocitária multifocal moderada

Adrenais: adrenalite linfo-plasmocitária difusa moderada na medular.

Exame Imunoistoquímico

SNC: HSV-1 e HSV-2 positivos nos neurônios e células da glia (+).

Fígado: HSV-1 e HSV-2 positivos nos hepatócitos (+).

Adrenais: HSV-1 e HSV-2 positivos nas células da região medular (+).

Rins: HSV-1 e HSV-2 positivos nas células tubulares (+).

Caso 2: *Callithrix jacchus*, adulto, macho, Domiciliado

Histórico Clínico

Apresentou prostração, vômito, hiporexia, hipersalivação e agressividade sendo encaminhado a uma clínica veterinária 2 dias após o início destes sinais. Na avaliação clínica foi observado convulsões visuais e mastigatórias que evoluíram para tremores em todo o corpo.

Evidenciou-se lesão ulcerada próximo da boca e dos olhos e outras duas lesões na região abdominal.

O proprietário administrou ao animal dipirona sódica (Lisador[®]) e Cefalexina (Keflex[®]).

Realizou-se eutanásia 3 dias após iniciar os sinais.

O proprietário relatou que já havia perdido um outro sagüi com os mesmos sinais clínicos há aproximadamente 6 meses.

Exame Necroscópico

Estado nutricional excelente.

Lesão ulcerativa focal de aproximadamente 5mm de diâmetro, recoberta por crostas no conduto auditivo esquerdo, lábio superior e mamilo esquerdo.

Nos demais órgãos não foram observadas alterações dignas de nota.

Exame Histopatológico

SNC: meningoencefalite necrótica não supurativa (linfoplasmocitária e ocasional presença de neutrófilos) difusa moderada a acentuada com necrose neuronal, neuronofagia, satellitose, manguitos perivasculares, gliose leve a moderada, vasculite necrotizante com formação de microtrombos. Havia envolvimento da substância branca com degeneração walleriana e manguitos perivasculares.

Pele do conduto auditivo e mamilo: dermatite ulcerativa focalmente extensa severa com deposição de exsudato fibrino supurativo.

Lábio: queilite ulcerativa focalmente extensa severa com deposição de exsudato fibrino supurativo.

Fígado: hepatite necrótica multifocal moderada com infiltrado predominantemente linfoplasmocitário perivascular acentuado, degeneração micro e macrogoticular hepatocelular difusa acentuada.

Rins: nefrite intersticial linfoplasmocitária multifocal leve.

Exame Imunoistoquímico

SNC: HSV-1 e HSV-2 positivos nos neurônios e células da glia (++)

Fígado: HSV-1 e HSV-2 positivos nos hepatócitos (+).

Rins: HSV-1 e HSV-2 positivos nas células tubulares (+).

Caso 3: *Callithrix penicillata*, adulto, macho, Domiciliado

Histórico Clínico

Foi encaminhado a uma clínica veterinária por apresentar hiporexia e convulsões há 1 dia. Ao exame clínico observou-se prostração, ausência de movimentos nos membros e cabeça, episódios de convulsões e hipotermia.

Evidenciaram-se também placas pseudomembranosas na língua e cavidade oral.

Medicado com Diazepan e soro glicofisiológico.

Devido ao estado avançado da doença, 3 dias após o início dos sinais optou-se pela eutanásia.

Exame Necroscópico

Estado nutricional regular.

Mucosa oral e superfície dorsal e lateral da língua: placas ulcerativas recobertas por material fibrinoso cinza-esbranquiçado.

SNC: congestão e edema moderado das meninges.

Fígado: aumentado de tamanho, coloração amarelada e padrão lobular moderadamente evidente.

Baço: aumentado e com bordos arredondados.

Rins: coloração amarelada e com pontos de aproximadamente 1mm de coloração esbranquiçada e avermelhada distribuídos em toda cortical e medular.

Exame Histopatológico

SNC: meningoencefalite necrótica não supurativa (linfoplasmocitária com ocasionais neutrófilos) difusa severa com necrose neuronal, neuronofagia, satellitose, gliose, manguitos perivasculares, vasculite necrotizante, edema, microhemorragia, necrose do neurópilo e inúmeras inclusões eosinofílicas e anfofílicas intranucleares (Cowdry Tipo A) nos neurônios. Na substância branca observou-se degeneração walleriana difusa leve a moderada e manguitos perivasculares. No cerebelo havia necrose acentuadas as células de Purkinji associada a inclusões eosinofílicas intranucleares. Observou-se vasculite necrotizante focal

severa associada à intensa exsudação neutrofílica acometendo a camada granular e substância branca, associado a inúmeras inclusões eosinofílicas intranucleares (Cowdry Tipo A).

Mucosa oral e língua: glossite e estomatite necrótica ulcerativa focalmente extensa severa recoberta por exsudato fibrino supurativo. No epitélio adjacente observou-se edema intracelular acentuado e inclusões intranucleares eosinofílicas e anofílicas (Cowdry tipo A).

Pele próximo ao lábio: dermatite linfoplasmocitária difusa leve, epitélio com edema intracelular acentuado e formação de vesículas intra-epidérmicas.

Coração: pancardite predominantemente linfoplasmocitária multifocal leve a moderada associada, edema e hemorragia multifocal moderados no endocárdio, e ganglioneurite multifocal moderada. Infiltrado perivascular predominantemente linfo-plasmocitário leve a moderado.

Pulmões: pneumonia intersticial linfoplasmocitária difusa leve com infiltrado inflamatório linfo-plasmocitário peribronquiolar moderado associado a extensas áreas de erosão do epitélio. Atelectasia e enfisema moderado multifocal.

Traquéia: traqueíte linfoplasmocitária difusa leve a moderada.

Fígado: hepatite linfoplasmocitária difusa leve com formação de múltiplos agregados inflamatórios e infiltrado perivascular moderado. Degeneração micro e macrogoticular hepatocelular difusa severa com desorganização trabecular focos de necrose individual de hepatócitos e hepatomegalocitose. Presença de algumas células sinciciais no parênquima.

Baço e linfonodos: necrose centrofolicular leve a moderada. Nos seios esplênicos e capsulares dos linfonodos evidenciaram-se inúmeras células sinciciais.

Rins: glomerulonefrite linfoplasmocitária (com macrófagos e neutrófilos ocasionais) difusa severa com nefrose e necrose tubular acentuada e calcificação de alguns túbulos. Evidenciaram-se também algumas células sinciciais no parênquima.

Estômago: gastrite linfoplasmocitária difusa leve.

Pâncreas: pancreatite linfoplasmocitária multifocal moderada com infiltrado perivascular predominantemente linfo-plasmocitário leve.

Intestinos: Enterocolite linfo-plasmocitária difusa leve a moderada com infiltrado perivascular moderado. Reatividade de placas de Peyer com necrose centrofolicular, histiocitose acentuada e células sinciciais. Ganglioneurite atingindo o plexo de Auerbach com necrose neuronal e alguns neurônios exibiam inclusões intranucleares eosinofílicas (Cowdry tipo A).

Exame Imunoistoquímico

SNC: HSV-1 e HSV-2 positivos nos neurônios e células da glia (+++). No cerebelo, nas células de Purkinji, neurônios da camada molecular e granular (++)

Mucosa oral e língua: HSV-1 e HSV-2 positivos no epitélio adjacente a necrose e ductos de glândulas salivares (++)

Pele: HSV-1 e HSV-2 positivos no epitélio da formação vesicular (+).

Pulmão: HSV-1 e HSV-2 positivos no endotélio de vasos (+).

Traquéia e esôfago: HSV-1 e HSV-2 positivos nas células epiteliais (+) e em nervos periféricos a estes órgãos (+).

Coração: HSV-1 e HSV-2 positivos nos gânglios e nervos do endocárdio (+).

Fígado: HSV-1 e HSV-2 positivos nos hepatócitos (++)

Estômago: HSV-1 e HSV-2 positivos nas células epiteliais (+).

Intestino: HSV-1 e HSV-2 positivos nos plexos de Auerbach (+).

Rins: HSV-1 e HSV-2 positivos nas células tubulares (+++).

Bexiga: HSV-1 e HSV-2 positivos no nervo da camada muscular (+).

Testículos: HSV-1 e HSV-2 positivos nas células dos túbulos seminíferos (+).

Caso 4: *Callithrix jacchus*, adulto, fêmea, Domiciliado

Histórico Clínico

Animal caso 3 pertencente ao mesmo proprietário. O animal caso 4 apresentou hiporexia 1 dia após o início dos sinais do sagüi 3.

Ao exame clínico observou-se também placas pseudomembranosas na língua e cavidade oral, além de ulcerações na face, prostração, salivação intensa, agressividade e convulsões, optando também pela eutanásia.

Exame Necroscópico

Estado nutricional regular.

Mucosa oral jugal e na superfície dorsal e lateral da língua placas ulcerativas recobertas por material fibrinoso cinza-esbranquiçado. Evidenciaram-se também duas vesículas ulceradas de aproximadamente 5mm de diâmetro, recobertas por crosta hemorrágica entre os olhos.

Fígado: alguns pontos de aproximadamente 1mm de coloração amarelada no parênquima e padrão lobular levemente evidente.

Exame Histopatológico

SNC: meningoencefalite necrótica não supurativa difusa moderada com necrose neuronal, neuronofagia, satelitose, manguitos perivasculares, gliose, edema e microhemorragias e inclusões eosinofílicas intranucleares (Cowdry tipo A) nos neurônios. Na substância branca degeneração walleriana leve a moderada e manguitos perivasculares.

Pele, mucosa oral e língua: dermatite, estomatite e glossite necrótica ulcerativa focalmente extensa severa recoberta por exsudato fibrino supurativo com colônias bacterianas em formato de cocos aderidas na língua. No epitélio adjacente observou-se edema intracelular acentuado e inclusões intranucleares eosinofílicas e anofílicas (Cowdry tipo A). Nervos com degeneração e necrose associado a infiltrado inflamatório linfo-plasmocitário moderado.

Pulmões: edema e congestão leve, enfisema e atelectasia multifocal moderados. Infiltrado inflamatório predominantemente linfo-plasmocitário leve nos alveolos

Coração: infiltrado inflamatório predominantemente linfo-plasmocitário perivascular leve. Degeneração de miofibras difusa moderada.

Fígado: hepatite linfo-plasmocitária difusa moderada com formação de múltiplos agregados inflamatórios e na periferia de vasos leve a moderado. Degeneração micro e macrogoticular hepatocelular difusa severa, focos de necrose individual de hepatócitos e hepatomegalocitose. Evidenciaram-se inclusões eosinofílicas intranucleares (Cowdry tipo A) em inúmeros hepatócitos e células sinciciais no parênquima.

Baço e linfonodos: necrose centrofolicular moderada a acentuada e nos seios esplênicos presença de células sinciciais.

Rins: glomerulonefrite linfo-plasmocitária (com macrófagos e neutrófilos ocasionais) multifocal moderada com infiltrado perivascular, nefrose e necrose tubular moderada. Havia calcificação tubular. Observou-se em algumas células tubulares inclusões eosinofílicas intranucleares (Cowdry tipo A).

Adrenais: adrenalite necrótica não supurativa multifocal severa comprometendo a cortical e medular. Observaram-se inclusões anofílicas nas células da cortical e medular e sincícios.

Intestinos: enterocolite linfo-plasmocitária difusa leve. Ganglioneurite atingindo o plexo de Auerbach com necrose neuronal e alguns neurônios exibiam inclusões intranucleares eosinofílicas (Cowdry tipo A).

Exame Imunoistoquímico

SNC: HSV-1 e HSV-2 positivos nos neurônios e células da glia (++). No cerebelo, nas células de Purkinji (+).

Mucosa oral e língua: HSV-1 e HSV-2 positivos no epitélio adjacente a necrose e nervos (++)

Fígado: HSV-1 e HSV-2 positivos nos hepatócitos (++)

Intestino: HSV-1 e HSV-2 positivos nos plexos de Auerbach (+).

Adrenais: HSV-1 e HSV-2 positivos nas células da camada cortical e medular (+++).

Rins: HSV-1 e HSV-2 positivos nas células tubulares (++)

Caso 5: *Callithrix jacchus*, adulto, macho, DEPAVE

Histórico Clínico

O sagüi do caso 5 estava hospedado no centro de triagem (DEPAVE) há dois anos. Apresentou prostração por 1 semana seguida de diarreia profusa, hiporexia, dispnéia, hipotermia por 2 dias e morte.

Havia sido tratado com sulfametoxazol associada a trimetoprima (Bactrim[®]), dimeticona (Luftal[®]) e soro Ringer Lactato.

Exame Necroscópico

Estado nutricional bom.

Não foram encontradas lesões na pele e mucosas.

Pulmões: leve edema.

Fígado: aumentado de tamanho e com padrão lobular moderadamente evidente.

Intestino grosso: espessamento da parede e presença de conteúdo amarelado pastoso.

Exame Histopatológico

SNC: encefalite necrótica não supurativa difusa moderada com necrose neuronal, neuronofagia, satellitose, gliose, manguitos perivasculars e edema.

Pulmão: Enfisema moderado e infiltrado linfo-plasmocitário perivascular leve.

Baço e linfonodos: necrose centrofolicular moderada.

Fígado: hepatite linfo-plasmocitária difusa leve com formação de múltiplos agregados inflamatórios, e na periferia de vasos. Degeneração macrogótica hepatocelular difusa acentuada, necrose multifocal.

Rins: nefrite intersticial linfo-plasmocitária difusa leve e perivascular. Nefrose difusa acentuada.

Intestinos: enterocolite linfo-plasmocitária difusa moderada.

Exame Imunoistoquímico

SNC: HSV-1 e HSV-2 positivos nos neurônios e células da glia (+).

Fígado: HSV-1 e HSV-2 positivos nos hepatócitos (+++).

Rins: HSV-1 e HSV-2 positivos nas células tubulares (++)

Intestino: HSV-1 e HSV-2 positivos nos plexos de Auerbach (+).

Caso 6: *Callithrix jacchus*, adulto, fêmea, Domiciliado

Histórico Clínico

Encaminhado a uma clínica veterinária por apresentarem hiporexia, prostração e convulsões. Fez-se eutanásia 3 dias após o início dos sinais clínicos.

Exame Necroscópico

Estado nutricional magro.

Pele: lesão ulcerativa focal de aproximadamente 5mm de diâmetro, recoberta por crostas na região externa da narina e outra de aproximadamente 10mm entre os olhos.

Na superfície dorsal e lateral da língua e na mucosa oral próximo ao lábio encontraram-se úlceras de aproximadamente 3mm de diâmetro.

Fígado: padrão lobular levemente evidenciado.

Exame Histopatológico

SNC: meningoencefalite necrótica não supurativa difusa moderada com necrose neuronal, gliose, manguitos perivasculares, edema, microhemorragia e necrose do neurópilo acompanhada de infiltrado misto composto por linfócitos, plasmócitos, neutrófilos e macrófagos.

Pele: dermatite necrótica ulcerativa focalmente extensa severa recoberta por exsudato fibrino supurativo com colônias bacterianas em formato de cocos aderidas.

Mucosa oral e língua: estomatite e glossite necrótica ulcerativa focal leve. No epitélio adjacente observou-se edema intracelular acentuado e inclusões intranucleares anfófilas (Cowdry tipo A).

Pulmões: pneumonia intersticial linfo-plasmocitária difusa leve e na periferia de vasos e bronquíolos. Enfisema e atelectasia multifocal moderada.

Coração: infiltrado linfo-plasmocitário perivascular leve.

Fígado: hepatite linfo-plasmocitária difusa leve e na periferia de vasos. Degeneração macrogoticular hepatocelular difusa severa.

Intestino: enterocolite linfoplasmocitária difusa leve.

Rins: nefrite intersticial linfo-plasmocitária difusa leve e nefrose moderada.

Exame Imunoistoquímico

SNC: HSV-1 e HSV-2 positivos nos neurônios (+).

Mucosa oral e língua: HSV-1 e HSV-2 positivos no epitélio adjacente a necrose (+).

Pele: HSV-1 e HSV-2 positivos no epitélio e nas glândulas sebáceas (+).

Rins: HSV-1 e HSV-2 positivos nas células tubulares (++)

Pulmão: HSV-1 e HSV-2 positivos nos macrófagos alveolares (+).

Caso 7: *Callithrix penicillata*, jovem, fêmea, Domiciliado

Histórico Clínico

Encaminhado a uma clínica veterinária por apresentarem hiporexia, prostração e convulsões. Fez-se eutanásia 3 dias após o início dos sinais clínicos.

Exame Necroscópico

Estado nutricional regular.

Não apresentava lesões na pele e mucosas, sendo que estas encontravam hipocoradas.

SNC: congestão e edema acentuado das meninges.

Pulmões: extensas áreas de coloração avermelhada e consistência firme.

Fígado: aumentado de tamanho e de coloração amarelo-pálido e padrão lobular moderadamente evidente.

Exame Histopatológico

SNC: meningoencefalite necrótica não supurativa difusa leve a moderada com necrose neuronal, neuronofagia, satelitose, gliose, manguitos perivasculares, edema, microhemorragia e necrose do neurópilo.

Pulmão: pneumonia intersticial linfo-plasmocitária difusa leve com edema e congestão moderados.

Coração: miocardite linfo-plasmocitária difusa leve.

Baço e linfonodo: necrose centrofolicular leve a moderada.

Fígado: hepatite linfo-plasmocitária difusa leve e degeneração macrogoticular hepatocelular difusa severa.

Intestinos: enterocolite linfo-plasmocitária difusa leve.

Adrenais: adrenalite linfo-plasmocitária difusa leve.

Rins: nefrite intersticial linfo-plasmocitária difusa leve e nefrose moderada difusa.

Exame Imunoistoquímico

SNC: HSV-1 e HSV-2 positivos nos neurônios (+).

Fígado: HSV-1 e HSV-2 positivos nos hepatócitos (+).

Rins: HSV-1 e HSV-2 positivos nas células tubulares (++)

Caso 8: Sagüi híbrido, jovem, fêmea, Domiciliado

Histórico Clínico

Os sagüis dos casos 8, 9, 10, 11 faziam parte de um mesmo grupo de cinco animais.

Este morreu sem ter sido observado clinicamente.

Exame Necroscópico

Estado nutricional magro.

Mucosa oral e superfície dorsal e lateral da língua: placas ulcerativas parcialmente recobertas por material fibrinoso cinza-amarelado.

SNC: vasos das meninges estavam marcadamente congestionados e os hemisférios cerebrais estavam assimétricos, estando o esquerdo relativamente maior que o direito.

Fígado: padrão lobular evidente leve.

Baço aumentado de tamanho.

Linfonodos periféricos e mesentéricos: aumentados e vinháceos na superfície de corte.

Exame Histopatológico

SNC: meningoencefalite necrótica não supurativa (linfoplasmocitária com raros neutrófilos) difusa moderada com necrose neuronal, gliose, manguitos perivasculares, edema, microhemorragia, múltiplos focos de necrose do neurópilo. Evidenciaram-se inclusões intranucleares eosinofílicas nos neurônios (Cowdry tipo A). Degeneração walleriana moderada.

Mucosa oral e língua: glossite e estomatite necrótica ulcerativa focalmente extensa severa recoberta por exsudato fibrino supurativo com colônias bacterianas em formato de cocos

aderidas na língua. No epitélio adjacente observou-se edema intracelular acentuado e inclusões intranucleares eosinofílicas (Cowdry tipo A).

Pulmões: congestão e edema leve com focos hemorrágicos.

Fígado: hepatite necrótica multifocal leve e degeneração microgoticular hepatocelular difusa moderada.

Baço e linfonodos: necrose centrofolicular leve. Em um linfonodo observou-se derrame de fibrina e infiltrado neutrofílico focal no seio subcapsular.

Exame Imunoistoquímico

SNC: HSV-1 e HSV-2 positivos nos neurônios (+).

Mucosa oral e língua: HSV-1 e HSV-2 positivos no epitélio adjacente a necrose (++)

Fígado: HSV-1 e HSV-2 positivos nos hepatócitos (+++).

Rins: HSV-1 e HSV-2 positivos nas células tubulares (++)

Caso 9: *Callithrix jacchus*, adulto, macho, Domiciliado

Histórico Clínico

Encaminhado a uma clínica veterinária apresentando hiporexia, prostração, convulsões, úlceras na face, língua e mucosa oral.

Início-se o tratamento com Aciclovir, no entanto no mesmo dia animal morreu.

Morte quatro dias após o primeiro óbito do grupo (caso 8).

Exame Necroscópico

Estado nutricional regular.

Mucosa oral e superfície dorsal e lateral da língua: placas ulcerativas parcialmente recobertas por material fibrinoso cinza-amarelado.

Lábio: observou-se lesão ulcerativa focal de 2mm de diâmetro, recoberta por crosta hemorrágica na comissura labial direita.

SNC: vasos das meninges marcadamente congestos.

Pulmões: coloração avermelhada e distendidos.

Fígado: padrão lobular evidente leve.

Baço: aumentado de tamanho.

Exame Histopatológico

SNC: meningoencefalite necrótica não supurativa (linfoplasmocitária com raros neutrófilos) difusa moderada com necrose neuronal, gliose, manguitos perivasculars, edema, microhemorragia. Evidenciou-se inclusões intranucleares eosinofílicas nos neurônios (Cowdry tipo A). Na substância branca, degeneração walleriana moderada.

Mucosa oral e língua: glossite e estomatite necrótica ulcerativa focalmente extensa severa recoberta por exsudato fibrino supurativo com colônias bacterianas em formato de cocos aderidas na língua. No epitélio adjacente observou-se edema intracelular acentuado e inclusões intranucleares eosinofílicas (Cowdry tipo A).

Pulmões: edema e congestão moderados, focos hemorrágicos. Enfisema leve multifocal.

Fígado: hepatite necrótica multifocal leve e degeneração microgoticular hepatocelular difusa moderada.

Baço e linfonodos: necrose centrofolicular leve a acentuada.

Adrenais: adrenalite necrótica supurativa difusa severa com áreas de hemorragia comprometendo a cortical e medular. Observaram-se células epiteliais da região cortical com corpúsculos de inclusão intranuclear eosinofílico (Cowdry tipo A).

Rins: infiltrado predominantemente linfo-plasmocitário perivascular.
 Intestino delgado: enterite linfo-plasmocitária difusa moderada.

Exame Imunoistoquímico

SNC: HSV-1 e HSV-2 positivos nos neurônios e células da glia (++). No cerebelo, nas células de Purkinji, neurônios da camada molecular e granular (+).
 Mucosa oral e língua: HSV-1 e HSV-2 positivos na área de necrose, no epitélio adjacente a necrose, nervos e células musculares (++).
 Fígado: HSV-1 e HSV-2 positivos nos hepatócitos (+++).
 Intestino: HSV-1 e HSV-2 positivos nos plexos de Auerbach (+).
 Rins: HSV-1 e HSV-2 positivos nas células tubulares (++).
 Adrenais: HSV-1 e HSV-2 positivos na camada cortical e medular (++)

Caso 10: *Callithrix jacchus*, adulto, fêmea, Domiciliado

Histórico Clínico

Encaminhado a uma clínica veterinária apresentando hiporexia, prostração, convulsões, úlceras na face, língua e mucosa oral.
 Tratado com Aciclovir. Alguns dias após as lesões ulceradas começaram a desaparecer e o sagüi apresentou uma melhora clínica. No entanto, 16 dias após o óbito do sagüi caso 8 este animal morreu.

Exame Necroscópico

Estado nutricional magro.
 Língua: superfície dorsal de coloração esbranquiçada.
 SNC: vasos das meninges moderadamente congestos e hemorragia cerebelar de aproximadamente 5mm de diâmetro, sendo que esta comprometia grande parte do mesmo.
 Pulmões: congestão e edema moderado e alguns pontos esbranquiçados de aproximadamente 1mm no parênquima.
 Fígado: coloração vermelho intenso.
 Baço: aumentado de tamanho com os bordos arredondados.
 Rins: coloração vermelho intenso.

Exame Histopatológico

SNC: meningoencefalite necrótica não supurativa difusa severa com necrose neuronal, neuronofagia, satelitose, gliose, manguitos perivasculares, edema, microhemorragia, múltiplos focos de necrose do neurópilo. Evidenciaram-se inclusões intranucleares eosinofílicas e anfofílicas nos neurônios (Cowdry tipo A). Na substância branca observou-se degeneração walleriana e manguitos perivasculares moderados. No cerebelo havia hemorragia necrotizante focal severa com infiltrado inflamatório misto na substância branca se entendendo para a camada granular e molecular.
 Língua: glossite linfo-plasmocitária difusa leve.
 Coração: infiltrado linfo-plasmocitário leve perivascular.
 Pulmões: hemorragia, edema e congestão difusos severos com necrose vascular e pneumonia intersticial difusa leve.
 Traquéia: traqueíte linfo-plasmocitária difusa leve a moderada.
 Baço e linfonodos: necrose centrofolicular leve a moderada; no fígado congestão severa com degeneração microgoticular hepatocelular difusa leve.

Fígado: congestão severa com degeneração microgoticular hepatocelular difusa leve. Infiltrado inflamatório linfo-plasmocitário perivascular leve.

Estômago: gastrite linfo-plasmocitária difusa leve.

Intestinos: enterocolite linfo-plasmocitária difusa leve

Rins: com congestão severa, nefrite linfo-plasmocitária multifocal leve e na periferia de vasos.

Adrenais: adrenalite linfo-plasmocitária leve na camada glomerulosa e medular com congestão severa, hemorragia multifocal moderada.

Exame Imunoistoquímico

SNC: HSV-1 e HSV-2 positivos nos neurônios e células da glia (++)

Adrenais: HSV-1 e HSV-2 positivos na camada cortical (++)

Ovários: HSV-1 e HSV-2 positivos focal no estroma ovariano (+).

Caso 11: *Callithrix penicillata*, adulto, fêmea, Domiciliado

Histórico Clínico

Apresentou úlceras na língua 7 dias após o sagüi 8 ter morrido, seguida de hiporexia, prostração, convulsões e anisocoria.

Foi também tratado com Aciclovir e 5 dias após não apresentava mais nenhuma lesão na língua e passou a ganhar peso, ganhando alta 15 dias após o início dos sinais, no entanto, 7 dias após apresentou convulsões e anorexia, morrendo em menos de 24 horas.

Exame Necroscópico

Estado nutricional regular.

SNC: vasos das meninges moderadamente congestionados.

Pulmões: coloração fortemente avermelhada e edema moderado.

Fígado: aumentado de tamanho e fortemente avermelhado.

Baço: bordos arredondados.

Exame Histopatológico

SNC: meningoencefalite necrótica não supurativa difusa severa com necrose neuronal, neuronofagia, satelitose, gliose, manguitos perivasculares, vasculite necrotizante, edema, microhemorragia, necrose severa multifocal do neurópilo. Evidenciaram-se inclusões intranucleares eosinofílicas nos neurônios (Cowdry tipo A). Na substância branca observou-se degeneração walleriana, gliose e manguitos perivasculares acentuados.

Língua: glossite linfo-plasmocitária difusa leve.

Tireóide: tireoidite multifocal moderada

Coração: infiltrado linfo-plasmocitário leve perivascular.

Pulmões: congestão acentuada com hemorragia focal moderada, pneumonia intersticial difusa leve e infiltrado linfo-plasmocitário leve perivascular.

Traquéia: traqueíte linfo-plasmocitária difusa moderada.

Baço: necrose centrofolicular moderada.

Fígado: congestão severa com degeneração microgoticular hepatocelular difusa leve.

Infiltrado linfo-plasmocitário leve perivascular.

Intestinos: enterocolite linfo-plasmocitária difusa leve

Rins: congestão severa, nefrite linfo-plasmocitária multifocal leve e na periferia de vasos.

Adrenais: adrenalite linfo-plasmocitária leve na camada glomerulosa e medular.

Exame Imunoistoquímico

SNC: HSV-1 e HSV-2 positivos nos neurônios e células da glia (++)

Fígado: HSV-1 e HSV-2 positivos nos hepatócitos (+).

Caso 12: *Callithrix penicillata*, jovem, macho, DomiciliadoHistórico Clínico

Foi encontrado abandonado, permaneceu uma semana com o novo proprietário, o qual percebeu que o animal estava prostrado. Devido a isso o sagüi foi encaminhado a um veterinário que além da prostração e hiporexia, observou nistagmo, convulsões, morrendo 3 dias após.

Tratado com enrofloxacina (Flotril®) e soro Ringer Lactato.

Exame Necroscópico

Estado nutricional caquético.

SNC: vasos das meninges moderadamente congestos.

Baço: bordos arredondados.

Linfonodos submandibulares aumentados

Pulmões: congestão e edema intensos.

Fígado: coloração amarelada e com padrão lobular moderadamente evidente.

Rins: coloração avermelhada intensa com pequenas estrias na transição córtico-medular.

Exame Histopatológico

SNC: meningoencefalite necrótica não supurativa difusa severa com necrose neuronal, neuronofagia, satelitose, gliose, manguitos perivasculares, vasculite necrotizante, edema, microhemorragia, necrose severa focalmente extensa do neurópilo e inclusões intranucleares eosinofílicas nos neurônios (Cowdry tipo A). Na substância branca observou-se degeneração walleriana, gliose e manguitos perivasculares acentuados.

Mucosa oral e língua: estomatite e glossite linfo-plasmocitária difusa leve.

Pulmões: congestão, edema e hemorragia acentuados, pneumonia intersticial difusa leve e infiltrado linfo-plasmocitário perivascular leve.

Baço: necrose centrofolicular acentuada.

Linfonodos: necrose centrofolicular leve.

Fígado: congestão severa com focos hemorrágicos, degeneração macro e microgoticular hepatocelular difusa moderada. Infiltrado linfo-plasmocitário perivascular leve.

Estômago: gastrite linfo-plasmocitária difusa leve.

Intestinos: enterocolite linfo-plasmocitária difusa leve.

Rins: nefrite linfo-plasmocitária multifocal leve e infiltrado linfo-plasmocitário perivascular leve.

Adrenais: adrenalite linfo-plasmocitária moderada na medular.

Exame Imunoistoquímico

SNC: HSV-1 e HSV-2 positivos nos neurônios e células da glia (++)

Fígado: HSV-1 e HSV-2 positivos nos hepatócitos (+).