



CAMILA COSTA ABREU

**IMUNO-HISTOQUÍMICA PARA DIAGNÓSTICO
RÁPIDO DA RAIVA BOVINA E ESTUDO DA
DISTRIBUIÇÃO PERIFÉRICA DO VÍRUS**

LAVRAS – MG

2012

CAMILA COSTA ABREU

**IMUNO-HISTOQUÍMICA PARA DIAGNÓSTICO RÁPIDO DA RAIVA
BOVINA E ESTUDO DA DISTRIBUIÇÃO PERIFÉRICA DO VÍRUS**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, área de concentração em Patologia, Clínica e Cirurgia Veterinárias, para obtenção do título de Mestre.

Orientador

Dr. Pedro Soares Bezerra Júnior

LAVRAS – MG

2012

**Ficha Catalográfica Preparada pela Divisão de Processos Técnicos da
Biblioteca da UFLA**

Abreu, Camila Costa.

Imuno-histoquímica para diagnóstico rápido da raiva bovina e estudo da distribuição periférica do vírus / Camila Costa Abreu. – Lavras : UFLA, 2012.

75 p. : il.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Lavras, 2012.

Orientador: Pedro Soares Bezerra Júnior.

Bibliografia.

1. Bovinos. 2. Dispersão centrífuga. 3. Processamento em micro-ondas. 4. Fixação em micro-ondas. 5. Vírus rábico. I. Universidade Federal de Lavras. II. Título.

CDD – 636.0896953075

CAMILA COSTA ABREU

**IMUNO-HISTOQUÍMICA PARA DIAGNÓSTICO RÁPIDO DA RAIVA
BOVINA E ESTUDO DA DISTRIBUIÇÃO PERIFÉRICA DO VÍRUS**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, área de concentração em Patologia, Clínica e Cirurgia Veterinárias, para obtenção do título de Mestre.

Aprovada em 27 de fevereiro de 2012.

Dr. Djeison Lutier Raymundo – UFLA

Dra. Mary Suzan Varaschin – UFLA

Dra. Rosemeri de Oliveira Vasconcelos – UNESP/Jaboticabal

Dr. Pedro Soares Bezerra Júnior

Orientador

LAVRAS – MG

2012

Acima de tudo a Deus, por tudo o que conquistei até aqui. Por sempre indicar o caminho certo, sendo luz em minha vida.

Aos meus pais, Antonio Abreu e M^a Celeste, que sempre foram meu exemplo de vida e educação, por incentivarem os meus estudos, por todo amor e força.

A toda minha família de sangue e de coração.

Ao meu amor William, por todo o seu amor e companheirismo, por esperar que eu realize meus sonhos, sempre com paciência e respeito.

DEDICO

AGRADECIMENTOS

À Universidade Federal de Lavras, ao Departamento de Medicina Veterinária e ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, pelas oportunidades concedidas e pelos sete anos aqui vividos.

À Capes e à Fapemig pelo apoio financeiro.

Ao meu orientador, professor e amigo, Pedro, por todos os ensinamentos, não só profissionais, mas de amizade, dedicação e ética. À professora Mary, por todos os anos de patologia, pelos conhecimentos passados. Ao professor Flademir, pelo exemplo de patologista. Todo o Setor de Patologia Veterinária, professores, funcionários, alunos da pós-graduação e estagiários, amo o que faço e parte disso é graças a vocês.

Aos meus amigos. É difícil citar todo mundo aqui, cada um sabe o quanto é especial. A amizade muitas vezes foi o meu incentivo nas horas mais difíceis. Agradeço ao Clayton, meu colega desde o começo do mestrado, por desbravarmos juntos o início da pós na Patologia. À aluna de iniciação, Priscilla Akiko pela ajuda no projeto, especialmente no final.

A todos os professores que contribuíram para minha formação durante o mestrado e aos que auxiliaram neste projeto. Ao professor Gregório, pelo primeiro ano de mestrado, parte dele passado na Anatomia Veterinária. Ao professor Paulo Brandão, USP, pela disponibilidade em oferecer auxílio e proporcionar a mim ensinamentos na biologia molecular.

Aos funcionários do IMA pelos casos de raiva, acompanhados em Perdões, e pelos resultados de imunofluorescência direta. Aos produtores de Lavras e região, por abrirem as portas ao nosso trabalho.

*“Tenha sempre bons pensamentos,
porque os seus pensamentos se transformam em suas palavras.
Tenha boas palavras,
porque as suas palavras se transformam em suas ações.
Tenha boas ações,
porque as suas ações se transformam em seus hábitos.
Tenha bons hábitos,
porque os seus hábitos se transformam em seus valores.
Tenha bons valores,
porque os seus valores se transformam no seu próprio destino.”*

Mahatma Gandhi

RESUMO

O presente trabalho foi dividido em duas partes. Na primeira é apresentado o emprego de um protocolo de processamento em micro-ondas para diagnóstico histopatológico e imuno-histoquímico rápido da raiva bovina. A imuno-histoquímica (IHQ) tem sido empregada para diagnóstico de raiva em tecidos fixados em formol com resultados satisfatórios, porém o tempo para obtenção do diagnóstico é consideravelmente maior em relação à imunofluorescência direta (IFD). Por meio do protocolo avaliado foi possível um diagnóstico histopatológico provisório de raiva em torno de três horas e meia após a coleta. O diagnóstico imuno-histoquímico foi obtido em cerca de seis horas após a coleta. O protocolo apresentou 100% de correlação com a IFD, sendo bastante promissor principalmente para situações em que apenas material em formol está disponível para diagnóstico ou quando a refrigeração ou o transporte dos tecidos refrigerados são problemáticos. Na segunda parte foi realizado um estudo histopatológico e imuno-histoquímico de tecidos fora do sistema nervoso central em 48 casos de raiva bovina, confirmados pela IFD e/ou IHQ do sistema nervoso central. Nos bovinos deste estudo, foi observada inflamação mononuclear em todos os gânglios trigêmeos, espinhais, estrelados e celíacos analisados, em todas as adrenais na região medular, em 85% das neuro-hipófises, em 55% das *pars intermedias* e em 15% da *pars distalis* da adeno-hipófise. A IHQ foi positiva em 92,31% dos gânglios espinhais lombares, em 90,9% dos gânglios trigêmeos, em 41,67% dos gânglios estrelados e em 16,67% dos gânglios celíacos. Uma das adrenais avaliadas (1/17) apresentou marcação IHQ fortemente positiva no citoplasma de feocromócitos. A IHQ da hipófise foi positiva em um caso na neuro-hipófise (1/20) e em um na *pars intermedia* da adeno-hipófise (1/20). Os dados do presente estudo indicam que em casos suspeitos de raiva em bovinos, além do complexo hipófise, *rete mirabile* e gânglio trigêmeo, a avaliação de outros gânglios, particularmente os espinhais lombares, e da adrenal pode também contribuir para o diagnóstico e o entendimento da patogênese da doença nesta espécie.

Palavras-chave: Bovinos. Dispersão centrífuga. Processamento em micro-ondas. Fixação em micro-ondas. Vírus rábico.

ABSTRACT

This work was divided in two parts. The first is presented the use of a microwave processing protocol for the rapid histopathological and immunohistochemical diagnosis of bovine rabies. Immunohistochemistry (IHC) has been used for rabies diagnosis in formalin-fixed tissue with satisfactory results, although the time to diagnosis is considerably longer than that with direct immunofluorescence (DIF). The protocol provided a provisory histopathological rabies diagnosis in approximately three and half hours and the immunohistochemical diagnosis was available after six hours. The protocol achieved 100% correlation with DIF and is a promising method, particularly in situations in which only material in formalin is available for diagnosis or when the refrigeration or transportation of biological material is difficult. In the second part, it was performed an histopathological and immunohistochemical study of tissues outside the central nervous system in 48 cases of bovine rabies confirmed by the DIF and/or IHC from central nervous system. Staining among cattle of this study, inflammation was observed in all trigeminal, spinal, stellate and celiac ganglion analyzed, in all adrenal glands, at medullary region, in 85% of neurohypophysis, in 55% of the *pars intermedias* and 15% of the *pars distalis* of the adenohypophysis. IHC was positive in 92,31% of the lumbar spinal ganglion, in 90,9% of trigeminal ganglion, in 41,67% of the stellate ganglion and 16,67% of the celiac ganglion. One of the adrenal evaluated (1/17) presented IHC labeling strongly positive inside the cytoplasm of pheochromocytes. The IHC from pituitary was positive in one case in the neurohypophysis (1/20) and one in the *pars intermedia* of the adenohypophysis (1/20). The data from this study link that in suspected cases of rabies, in addition to the complex of trigeminal ganglion, *rete mirabile* and pituitary gland, the evaluation of other ganglions, specially the lombar spinal ganglion, and of the adrenal gland can also contibute to the diagnosis and to the knowledge of the pathogenesis of the disease in cattle.

Keywords: Cattle. Centrifugal dispersion. Microwave histoprocessing. Microwave fixation. Rabies virus.

SUMÁRIO

PRIMEIRA PARTE		
1	INTRODUÇÃO.....	11
2	REFERENCIAL TEÓRICO.....	14
2.1	Etiologia.....	14
2.2	Epidemiologia.....	15
2.3	Patogenia.....	16
2.3.1	Histopatologia e detecção viral em tecidos fora do sistema nervoso central.....	18
2.4	Processamento em micro-ondas.....	20
2.5	Diagnóstico.....	20
2.5.1	Necropsia e exame histopatológico do sistema nervoso central.....	21
2.5.2	Imuno-histoquímica.....	22
2.5.3	Detecção de ácidos nucleicos.....	22
	REFERÊNCIAS.....	23
SEGUNDA PARTE – ARTIGOS		
	ARTIGO 1 Domestic microwave processing for rapid immunohistochemical diagnosis of bovine rabies.....	30
	ABSTRACT.....	31
1	INTRODUCTION.....	32
2	MATERIALS AND METHODS.....	33
3	RESULTS.....	34
4	DISCUSSION.....	35
	REFERENCES.....	38
	ARTIGO 2 Histologia e imuno-histoquímica de tecidos fora do sistema nervoso central na raiva bovina.....	42
	RESUMO.....	43

1	INTRODUÇÃO.....	44
2	MATERIAL E MÉTODOS.....	46
3	RESULTADOS.....	48
4	DISCUSSÃO.....	52
5	CONCLUSÕES.....	57
	REFERÊNCIAS.....	58
	ANEXOS.....	66

1 INTRODUÇÃO

A raiva é uma doença infectocontagiosa causada por um vírus do gênero *Lyssavirus*, que afeta os mamíferos, sendo considerado um dos maiores problemas econômicos para a pecuária e de saúde pública da América do Sul (BARROS et al., 2006).

A raiva bovina está regularmente presente no estado de Minas Gerais. As condições climáticas favoráveis, presença de abrigos e o rebanho bovino presente em todo o estado, propiciam a manutenção do principal vetor da doença, o morcego hematófago *Desmodus rotundus*. Estudos têm relatado bovinos positivos nos municípios da região Sul de Minas Gerais desde 1976 até 2006 (MENEZES et al., 2008; SILVA et al., 2001).

O desenvolvimento de um protocolo de diagnóstico de rotina, alternativo para a raiva, possibilita o diagnóstico de casos em que foram inadvertidamente remetidos somente tecidos fixados em formol. Nessas situações, torna-se inviável a realização de imunofluorescência direta (IFD) para o diagnóstico de raiva, o que pode dificultar a adoção de medidas de controle e profilaxia da doença. Trabalhos recentes mostram a imuno-histoquímica (IHQ) como uma técnica eficaz, sensível e específica para o diagnóstico da raiva (ACHKAR et al., 2010; PEDROSO et al., 2008; STEIN et al., 2010).

A recente aplicação da irradiação de tecidos com micro-ondas, para o processamento de tecidos para histopatologia, tem trazido avanços em termos de redução do tempo para obtenção dos cortes, além de vantagens em relação à preservação de antígenos e ácidos nucleicos (HAFAJEE; LEONG, 2004; MORALES et al., 2002; SURI et al., 2006). Dessa forma, a aplicação deste método de processamento e posterior realização da IHQ poderiam possibilitar um diagnóstico rápido, sensível e específico da raiva bovina em tecidos fixados em formol. Além disso, a possibilidade da pesquisa e diagnóstico rápido da raiva

bovina em tecidos fixados em formol poderia reduzir riscos inerentes ao manuseio e transporte do material contaminado com o vírus, visto se tratar de uma zoonose que ainda apresenta poucas possibilidades de tratamento.

A pesquisa do vírus ou antígeno rábico, em tecidos fora do sistema nervoso central (SNC), possibilitaria o diagnóstico em situações em que o SNC não foi enviado aos laboratórios para realização de exames, por falta de pessoal habilitado ou de equipamentos adequados para coleta, ou ainda por não haver suspeita da doença no momento da necropsia. Estudos dessa natureza, empregando a técnica de IHQ, têm sido descritos principalmente em humanos, com sua detecção em diferentes tecidos fora do SNC (JACKSON et al., 1999; JOGAI; RADOTRA; BANERJEE, 2002; TOBIUME et al., 2009). Tais estudos visam além do entendimento da dispersão centrífuga do vírus rábico, o diagnóstico *ante-mortem*, o qual é realizado através de biopsias de pele (BAGÓ; REVILLA-FERNÁNDEZ; ALLERBERGER, 2005; MACEDO et al., 2006).

Em animais exames de IHQ e microscopia eletrônica realizados em *Vulpes vulpes* (raposas) e *Mephitis mephitis* (cangambás), experimentalmente infectados pelo vírus da raiva, demonstraram a presença do antígeno rábico em glândula salivar submandibular, adrenal, córnea e pele do focinho. Infiltrado mononuclear foi ainda encontrado no interstício de glândula salivar e medular da adrenal (BALACHANDRAM; CHARLTON, 1994). Em cães o antígeno da raiva já foi encontrado em glândula salivar, pela IHQ, antes de haver evidências clínicas de doença (AJAYI; RABO; BABA, 2006). Em bubalinos, experimentalmente infectados, o vírus rábico foi detectado *ante-mortem* em secreções corporais e amostras de impressão de superfícies mucosas, pela IFD (SINGH; SINGH, 2011).

Em bovinos há poucas informações sobre tal dispersão. Em estudo, o vírus rábico foi detectado na saliva e glândula salivar, através da inoculação em camundongos (DELPIETRO; LARGHI; RUSSO, 2001). Porém os estudos

imuno-histoquímicos realizados, em tecidos fora do SNC, nesta espécie, têm explorado principalmente o gânglio trigêmeo (PEDROSO et al., 2009; RECH et al., 2006).

O presente estudo é composto de uma pesquisa retrospectiva e prospectiva da presença de antígenos do vírus da raiva em tecidos fora do SNC, em casos confirmados, por meio da IFD e/ou IHQ, realizadas pelo Instituto Mineiro de Agropecuária (IMA) e pelo Setor de Patologia Veterinária (SPV) da Universidade Federal de Lavras (UFLA), respectivamente. O estudo retrospectivo foi realizado nos casos arquivados no SPV/UFLA, onde foram analisados os tecidos fora do SNC fixados em formol, incluídos em parafina e submetidos ao exame de IHQ. No estudo prospectivo, casos oriundos da região de abrangência do SPV/UFLA tiveram os tecidos processados pelo método convencional para exame histopatológico e IHQ, e também pelo processamento rápido em micro-ondas (KAHVECI; ÇAVUSOGLU; SIRMALI, 1997; SURI et al., 2006). Nesses últimos casos, foram analisados fragmentos do SNC como bulbo ao nível do óbex e córtex cerebelar para o diagnóstico imuno-histoquímico.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 Etiologia

O vírus da raiva pertence ao gênero *Lyssavirus* (do grego, *lyssa* = loucura), família *Rhabdoviridae* (do grego, *rhabdus* = bastão), ordem *Mononegavirales* (genoma composto por uma molécula de RNA, de polaridade negativa). É um vírus altamente neurotrópico que possui os mamíferos como hospedeiros. Há sete genótipos conhecidos dentro do gênero *Lyssavirus*, o vírus da raiva é do genótipo tipo 1 (WUNNER, 2007).

O vírus da raiva é composto por cinco proteínas. O nucleocapsídeo, que apresenta simetria helicoidal, é formado pelo genoma envolto pela nucleoproteína (N), junto com moléculas de outras três proteínas estruturais, a fosfoproteína (P), a polimerase viral (L) e a proteína da matriz (M). O nucleocapsídeo é envolto por um envelope lipídico, o qual é formado pela membrana lipídica da célula hospedeira e possui moléculas da glicoproteína G. O envelope o faz sensível a detergentes e solventes lipídicos, possuindo pouca resistência fora do hospedeiro. O vírus é sensível ao dessecamento, luz solar, radiação ultravioleta, hipoclorito de sódio, soda cáustica a 2%, solventes de gorduras e formalina. É inativado em temperaturas mais altas, como a 50°C por 15 minutos. Porém, mantém-se estável por longos períodos a 4 °C, por vários anos se colocado em glicerina tamponada a -20°C, e por tempo indefinido em -70°C ou temperaturas mais baixas (RODRIGUEZ et al., 2007).

2.2 Epidemiologia

Os primeiros relatos da raiva ocorreram há mais de 2700 anos, mas a doença já era conhecida há pelo menos 4000 anos (RODRIGUEZ et al., 2007). A raiva transmitida por morcegos hematófagos foi primeiramente observada por Carini (1911), mas possivelmente existe na América tropical desde a era pré-hispânica. O ciclo provavelmente ocorria na vida selvagem, sendo o morcego hematófago o principal vetor da doença, tendo como vítimas os mamíferos silvestres. Com a chegada de mamíferos domésticos e a colonização europeia, o morcego hematófago mudou seus hábitos alimentares, passando a ter preferência por mamíferos domésticos, principalmente os bovinos. O morcego hematófago é um vetor eficiente do vírus da raiva, o que acarreta em prejuízos para a produção pecuária na maioria dos países da América Latina e do Caribe (SOTA, 1993). Na América Latina, as perdas anuais para a pecuária são da ordem de aproximadamente 50 milhões de dólares americanos, a mortalidade anual oscila entre 100.000 a 500.000 bovinos (BARROS et al., 2006).

Os surtos da doença em herbívoros são cíclicos, variando em um período de dois a cinco anos, devido seu principal transmissor, pois, ao ocorrer a morte dos morcegos infectados, leva algum tempo até o repovoamento e a reinfecção da colônia (BARROS et al., 2006; FERNANDES; RIET-CORREA, 2007). No Brasil, a raiva em herbívoros é transmitida principalmente pelo morcego hematófago *Desmodus rotundus*, mas a doença pode ainda ser transmitida por outros morcegos hematófagos (*Diphylla ecaudata* e *Diaemus youngii*), assim como por cães (FERNANDES; RIET-CORREA, 2007).

No Brasil, a raiva parálitica de bovinos foi diagnosticada pela primeira vez por Carini (1911), no estado de Santa Catarina, quando corpúsculos de Negri foram identificados em cérebros de bovinos mortos, por uma doença até então considerada misteriosa. Dados do Ministério da Agricultura, Pecuária e

Abastecimento (MAPA), num período de 1987 a 2010, apontam um total de 66.135 herbívoros, incluindo 58.932 bovinos, com diagnósticos positivos para raiva em todo o Brasil (BRASIL, 2011).

A raiva bovina está regularmente presente no estado de Minas Gerais. As condições climáticas favoráveis, presença de abrigos (matas e cavernas) e o rebanho bovino em todo o estado, propiciam a manutenção do principal vetor da doença, o morcego hematófago *Desmodus rotundus*. De 1976 a 1997, num total de 7526 exames, 50,5% foram positivos para a raiva. Até o ano de 1997, 75% dos municípios mineiros possuíam casos da doença, estando o vírus da raiva bovina presente em praticamente todo o estado (SILVA et al., 2001). De 1998 a 2006, foram encontrados num total de 6873 bovinos, 44,42% positivos para raiva (MENEZES et al., 2008). Nesses estudos, a doença estava presente em maior ou menor intensidade em diferentes regiões; porém, foram observados resultados positivos nos municípios da região Sul de Minas Gerais em todos os anos analisados, desde 1976 até 2006.

Em bovinos não existe predileção por sexo ou raça, mas a doença é predominante em animais mais jovens, com menos de dois anos de idade. Tal fato é atribuído à menor imunidade desta categoria de bovinos relacionada à maior susceptibilidade e a não realização do reforço vacinal, um mês após a primeira dose (LIMA et al., 2005).

2.3 Patogenia

A principal via de infecção pelo vírus da raiva é a saliva, por mordidas de animais infectados, também existe a possibilidade de transmissão do vírus em feridas recentes pela saliva ou de material contaminado em contato com mucosas e em condições raras por via aerossol (BARROS et al., 2006; FERNANDES; RIET-CORREA, 2007). A transmissão por aerossóis tem sido

descrita nos humanos em acidentes de laboratório e cavernas contendo grande quantidade de morcegos infectados. Em humanos pode ocorrer a transmissão por transplante de tecidos e de órgãos (JACKSON, 2007, 2008).

O vírus replica nas células musculares ao redor da ferida, por um curto período, e atinge terminais de axônios motores e fusos neuromusculares (MAXIE; YOUSSEF, 2007). Porém, pode ocorrer a migração viral sem a replicação prévia no local da inoculação (RODRIGUEZ et al., 2007). As partículas virais invadem a junção neuromuscular, pela conjugação da glicoproteína presente no envelope com receptores nicotínicos de acetilcolina (MAXIE; YOUSSEF, 2007). A partir dessa primeira replicação, há migração ascendente por fluxo axoplasmático retrógrado, replicação em neurônios motores da medula espinhal com rápida migração ascendente para o encéfalo (JACKSON, 2008), principalmente tronco cerebral. Essa via motora pode ser mais importante para vetores terrestres, que produzem mordidas mais profundas (JACKSON, 2010).

Ao atingir o SNC, há nova replicação e disseminação centrífuga do vírus, em neurônios autônomos e sensoriais para diversos órgãos do corpo, como as glândulas salivares, córnea e nervos sensoriais da pele (JACKSON, 2008). A excreção viral na saliva é o principal mecanismo de disseminação viral em vetores da raiva e, conseqüentemente, de secreção viral na saliva, e ocorre poucos dias antes do aparecimento dos sinais clínicos (JACKSON, 2008; MAXIE; YOUSSEF, 2007; RODRIGUEZ et al., 2007). Já em bovinos, Delpietro, Larghi e Russo (2001) descreveram que o vírus da raiva foi encontrado em apenas 4/87 amostras de glândulas salivares, e em apenas 1/62 amostra de saliva. Tais resultados não foram considerados significativos, sendo sugeridos que os bovinos são, praticamente, hospedeiros terminais da doença, sem grande importância na transmissão do vírus para outros animais.

A entrada do vírus rábico pela via sensoria também tem sido descrita. Nesta via o vírus atinge inicialmente o gânglio espinhal pela migração centrípeta e dissemina-se para o SNC (ROSSITER; HSU; JACKSON, 2009). Tal via pode ser importante na raiva transmitida por morcegos, uma vez que estes vetores produzem mordidas mais superficiais, onde a inervação sensoria e autonômica é mais abundante (JACKSON, 2010).

Outra via recentemente reconhecida é a endovenosa, na qual se sugere que o vírus chegue ao SNC, através de fibras neuro-secretórias hipotalâmicas. Essa via também parece ter importância na doença transmitida por morcegos hematófagos (PREUSS et al., 2009).

O período de incubação da raiva varia de semanas a meses, e corresponde ao tempo que o vírus leva desde sua inoculação até chegar ao SNC, quando ocorrem os sinais clínicos. Variantes como, quantidade de vírus transmitida, local da inoculação e estado imunológico do hospedeiro, são determinantes para esse tempo (FERNANDES; RIET-CORREA, 2007; MAXIE; YOUSSEF, 2007).

2.3.1 Histopatologia e detecção viral em tecidos fora do sistema nervoso central

Em casos de raiva em humanos as lesões microscópicas mais frequentemente descritas são adrenalite e miocardite (ARAUJO; BRITO; MACHADO, 1971; JACKSON et al., 1999; JOGAI; RADOTRA; BANERJEE, 2002, MORAIS; ASSIS, 1985; TOBIUME et al., 2009). Inclusões semelhantes a corpúsculos de Negri são também descritas em feocromócitos (ALMEIDA et al., 1986). Estudos de IHQ em humanos detectaram antígenos da raiva em glândula salivar, língua, musculatura da laringe, pele do pescoço, hipófise, nervo óptico, gânglio trigêmeo, nervos espinais, plexo braquial, plexos nervosos de diversos órgãos, trato gastrintestinal, medular de adrenal e miofibras cardíacas

(JACKSON et al., 1999; JOGAI; RADOTRA; BANERJEE, 2002; TOBIUME et al., 2009; ZISHANG; ZHENBO; HONTAO, 1995). Em humanos, nervos próximos a folículos pilosos são infectados, o que permite o diagnóstico através da biopsia de pele por IFD (BINGHAM; MLAMBO, 1995), IHQ (BAGÓ; REVILLA-FERNÁNDEZ; ALLERBERGER, 2005) e RT-PCR (MACEDO et al., 2006).

Em animais um estudo histológico e imuno-histoquímico realizado em *Vulpes vulpes* (raposas) e *Mephitis mephitis* (cangambás), experimentalmente infectados pelo vírus da raiva, demonstraram um infiltrado mononuclear no interstício de glândula salivar e medular da adrenal (BALACHANDRAM; CHARLTON, 1994). Antígenos do vírus rábico nestas espécies foram detectados em glândula salivar submandibular, adrenal, córnea e pele do focinho. (BALACHANDRAM; CHARLTON, 1994). Em cães o antígeno da raiva já foi encontrado em glândula salivar, por IHQ, mesmo antes de haver evidências clínicas de doença (AJAYI; RABO; BABA, 2006). Em bubalinos, experimentalmente infectados, foi detectado o vírus rábico *ante-mortem* em secreções corporais (nasal, salivar e retal) e em amostras de impressão de superfícies mucosas (córnea e prepúcio), por meio da IFD (SINGH; SINGH, 2011). Em bovinos há poucas informações sobre tal dispersão. Em estudo, o vírus rábico foi detectado na saliva e glândula salivar, através da inoculação em camundongos (DELPIETRO; LARGHI; RUSSO, 2001). Glóbulos hialinos são frequentes em feocromócitos de bovinos com raiva, embora também ocorram em outras enfermidades (MESQUITA et al., 2011). Porém os estudos realizados, em tecidos fora do SNC, em bovinos, concentram-se principalmente no gânglio trigêmeo (PEDROSO et al., 2009; RECH et al., 2006).

2.4 Processamento em micro-ondas

Estudos relativos à irradiação de tecidos com micro-ondas, para fixação e processamento histológico de tecidos, têm sido realizados desde a década de 70 e 80, respectivamente (BOON; KOK; OUWERKERK-NOORDAM, 1986; MAYERS, 1970). Desde então, essas técnicas têm sido refinadas, e atualmente vários laboratórios de patologia humana têm empregado a irradiação de tecidos em micro-ondas na rotina de diagnóstico histopatológico (HAFAJEE; LEONG, 2004; KOK; BOON, 2003; MORALES et al., 2002).

Essa aplicação, relativamente recente, de micro-ondas para o processamento tem trazido avanços em termos de redução do tempo para obtenção dos cortes, os quais mantêm histomorfologia comparáveis a do processamento convencional (BOON; KOK, 2008).

Além disso, obtêm-se vantagens em relação à preservação de antígenos e ácidos nucleicos (HAFAJEE; LEONG, 2004; KOK; BOON, 2003; MORALES et al., 2002; SURI et al., 2006). Outra vantagem é a possibilidade de exclusão de reagentes de maior toxidez, como o xilol e a formalina, do processamento tecidual (BOON; KOK, 2008).

2.5 Diagnóstico

Por se tratar de uma doença com grande diversidade de sinais clínicos é de extrema importância que o encéfalo seja encaminhado para diagnóstico laboratorial (FERNANDES; RIET-CORREA, 2007). No Brasil o diagnóstico oficial é realizado pela prova de IFD e prova biológica (inoculação intracerebral em camundongos ou células), a partir de amostras de SNC de animais suspeitos (BRASIL, 2002). A desvantagem da prova biológica é o atraso no diagnóstico em três semanas, mas esta deve ser realizada em casos de animais negativos para

IFD que tiveram contato com pessoas (FERNANDES; RIET-CORREA, 2007). Em Minas Gerais, o Laboratório de Saúde Animal do Instituto Mineiro de Agropecuária (IMA) e o Laboratório de Zoonoses da Prefeitura Municipal de Belo Horizonte são os responsáveis pela realização do diagnóstico da raiva (SILVA; OLIVEIRA, 2009).

O MAPA recomenda que a colheita do encéfalo de bovinos seja realizada segundo o “Manual de Procedimentos para o Diagnóstico das Doenças do Sistema Nervoso Central de Bovinos” (BARROS; MARQUES, 2003). São quatro amostras requeridas para exame virológico: cerebelo seccionado ao longo do verme, segmento da medula cervical, tálamo e parte caudal de um dos hemisférios telencefálicos. Tais fragmentos devem ser remetidos congelados ou refrigerados para IFD. Para exame histopatológico, devem ser encaminhados, em formalina a 10%, tronco encefálico completo, duas partes do cerebelo e $\frac{3}{4}$ dos hemisférios telencefálicos, além do conjunto formado pela hipófise, *rete mirabile* e gânglios trigêmeos (BARROS; MARQUES, 2003).

2.5.1 Necropsia e exame histopatológico do sistema nervoso central

Não são encontradas lesões macroscópicas específicas no momento da necropsia, porém achados como feridas autoinfligidas e corpos estranhos no estômago de um carnívoro são sugestivos de raiva (MAXIE; YOUSSEF, 2007). Em bovinos, lesões inespecíficas como hiperemia das leptomínges é frequente e outras lesões secundárias podem ser observadas como distensão da bexiga e da ampola retal, a qual pode estar repleta de fezes, enfisema pulmonar e broncopneumonia por aspiração (BARROS et al., 2006; LIMA et al., 2005).

Antes de serem desenvolvidas técnicas mais sensíveis de diagnóstico laboratorial, a doença era diagnosticada apenas pela presença dos corpúsculos de Negri. Os corpúsculos são observados no citoplasma de neurônios em cerca de

70 a 87% dos casos, vistos com maior intensidade nos bovinos que sobrevivem por mais de quatro dias (BARROS et al., 2006; LIMA et al., 2005). Porém, em exames realizados a partir de animais autolisados a procura por inclusões é dificultada. Há encefalomielite não supurativa difusa, principalmente em substância cinzenta do telencéfalo e no tronco encefálico (FERNANDES; RIET-CORREA, 2007; LIMA et al., 2005), podendo também ser observada gliose focal ou difusa. Ganglioneurite em gânglio trigêmeo associada a corpúsculos de Negri e vacuolizações intracitoplasmáticas são achados frequentes da raiva (BARROS et al., 2006).

2.5.2 Imuno-histoquímica

O diagnóstico imuno-histoquímico da raiva é um diagnóstico seguro que pode ser utilizado como alternativa para a IFD. Essa técnica permite a detecção de antígenos em tecidos fixados em formalina e incluídos em parafina, o que possibilita estudos retrospectivos (PEDROSO et al., 2008; STEIN et al., 2010). Além de humanos (JOGAI; RADOTRA; BANERJEE, 2002), estudo em SNC de diversas espécies domésticas e silvestres mostra a viabilidade e sensibilidade do teste (STEIN et al., 2010).

2.5.3 Detecção de ácidos nucleicos

A detecção de ácidos nucleicos tem sido empregada tanto para pesquisa quanto para o diagnóstico de raiva. Várias técnicas têm sido empregadas para este fim, como hibridização *in situ*, RT-PCR e PCR *in situ* (BISWAL; RATHO; MISHRA, 2007; NANDIN-DAVIS; SHEEN; WANDELER, 2003; PRAVEENA et al., 2007; ROJAS et al., 2006; TOBIUME et al., 2009).

REFERÊNCIAS

- ACHKAR, S. M. et al. Sensibilidade da técnica de imuno-histoquímica em fragmentos de sistema nervoso central de bovinos e equinos naturalmente infectados pelo vírus da raiva. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, Rio de Janeiro, v. 30, n. 3, p. 211-218, mar. 2010.
- AJAYI, B. B.; RABO, J. S.; BABA, S. S. Rabies in apparently healthy dogs: histological and immunohistochemical studies. **The Nigerian Postgraduate Medical Journal**, Dublin, v. 13, n. 2, p. 128-134, June 2006.
- ALMEIDA, H. O. et al. Medulite supra-renálica em casos de raiva humana. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 81, n. 4, p. 439-442, out./dez. 1986.
- ARAÚJO, M. F.; BRITO, T.; MACHADO, C. G. Myocarditis in human rabies. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, São Paulo, v. 13, n. 21, p. 99-102, Mar./Apr. 1971.
- BAGÓ, Z.; REVILLA-FERNÁNDEZ, S.; ALLERBERGER, F. Value of immunohistochemistry for rapid ante mortem rabies diagnosis. **Internacional Journal of Infectious Diseases**, Ottawa, v. 9, n. 6, p. 351-352, Nov. 2005.
- BALACHANDRAM, A.; CHARLTON, K. Experimental Rabies Infection of Non-nervous Tissues in Skunks (*Mephitis mephitis*) and Foxes (*Vulpes vulpes*). **Veterinary Pathology**, Washington, v. 31, n. 1, p. 93-102, Jan. 1994.
- BARROS, C. S. L. et al. **Doenças do sistema nervoso de bovinos no Brasil**. São Paulo: Vallée, 2006. cap. 5, p. 21-28.
- BARROS, C. S. L.; MARQUES, G. H. F. **Procedimentos para o diagnóstico das doenças do sistema nervoso central de bovinos**. Brasília: MAPA/SDA/DDA, 2003. 50 p.

BINGHAM, J.; MLAMBO, P. Ante-mortem diagnosis of human rabies by the skin biopsy technique: three case reports from Zimbabwe. **Central African Journal of Medicine**, Salisbury, v. 41, n. 8, p. 258-260, Aug. 1995.

BISWAL, M.; RATHO, R.; MISHRA, B. Usefulness of reverse transcriptase-polymerase chain reaction for detection of rabies RNA in archival samples. **Journal Infectious Diseases**, Chicago, v. 60, n. 5, p. 298-299, Sep. 2007.

BOON, M. E.; KOK, L. P.; OUWERKERK-NOORDAM, E. Microwave-stimulated diffusion for fast processing of tissue: reduced dehydrating, clearing, and impregnating times. **Histopathology**, Oxford, v. 10, n. 3, p. 303-309, Mar. 1986.

BOON, M. E.; KOK, L. P. Theory and practice of combining coagulant fixation and microwave histoprocessing. **Biotechnic and Histochemistry**, Baltimore, v. 83, n. 6, p. 261-277, Dec. 2008.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Instrução Normativa nº 05, de 01 de março de 2002**. Aprovar as normas técnicas para o controle da raiva dos herbívoros domésticos. Disponível em: <<http://www.cda.sp.gov.br/www/legislacoes/popup.php?action=view&idleg=728>>. Acesso em: 22 jan. 2012.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Situação epidemiológica da raiva em herbívoros e suínos no período de 1987 a 2010**. Disponível em: <<http://www.agricultura.gov.br/animal/sanidade-animal>>. Acesso em: 22 set. 2011.

CARINI, A. Sur une grande epizootie de rage. **Annales de l'Institut Pasteur**, Paris, v. 25, p. 843-846, 1911.

DELPIETRO, H. A.; LARGHI, O. P.; RUSSO, R. G. Virus isolation from saliva and salivary glands of cattle naturally infected with paralytic rabies. **Preventive Veterinary Medicine**, Amsterdam, v. 48, n. 3, p. 223-228, Feb. 2001.

FERNANDES, C. G.; RIET-CORREA, F. Raiva. In: RIET-CORREA, F. et al. **Doenças de ruminantes e equídeos**. 3 ed. Santa Maria: Pallotti, 2007. v. 1, cap. 2, p. 184-198.

HAFAJEE, Z. A. M.; LEONG, A. S. Y. Ultra-rapid microwave-stimulated tissue processing with a modified protocol incorporating microwave fixation. **Pathology**, Sidney, v. 36, n. 4, p. 325-329, Aug. 2004.

JACKSON, A. C. et al. Extraneural organ involvement in human rabies. **Laboratory Investigation**, Baltimore, v. 79, n. 8, p. 945-951, Aug. 1999.

JACKSON, A. C. Pathogenesis. In: JACKSON, A. C.; WUNNER, W. H. **Rabies**. 2nd ed. San Diego: Elsevier, 2007. cap. 8, p. 23-68.

JACKSON, A. C. Rabies. **Neurologic Clinics**, Philadelphia, v. 26, n. 3, p. 717-726, Aug. 2008.

JACKSON, A. C. Rabies pathogenesis update. **Revista Pan-Amazônica de Saúde**, Ananindeua, v.1, n. 1, p. 167-172, Mar. 2010.

JOGAI, S.; RADOTRA, B. D.; BANERJEE, A. K. Rabies viral antigen in extracarnial organs: a post-mortem study. **Neuropathology and Applied Neurobiology**, Oxford, v. 28, n. 4, p. 334-338, Aug. 2002.

KAHVECI, Z.; ÇAVUSOGLU, I.; SIRMALI, S. A. Microwave fixation of whole fetal specimens. **Biotechnic & Histochemistry**, Baltimore, v. 72, n. 3, p. 144-147, May 1997.

KOK, L. P.; BOON, M. E. **Microwave for the Art of Microscopy**. Leiden: Coulomb, 2003. cap. 12, p. 151-163.

LIMA, E. F. et al. Sinais clínicos, distribuição das lesões no sistema nervoso e epidemiologia da raiva em herbívoros na região Nordeste do Brasil. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, Rio de Janeiro, v. 25, n. 4, p. 250-264, Dec. 2005.

MACEDO, C. I. et al. Diagnosis of human rabies cases by polymerase chain reaction of Neck-Skin samples. **The Brazilian Journal of Infectious Diseases**, Salvador, v. 10, n. 5, p. 341-345, Oct. 2006.

MAXIE, M. G.; YOUSSEF, S. Nervous system. In: JUBB, K. V. F.; KENNEDY, P. C.; PALMER, N. **Pathology of domestic animals**. 5th ed. St. Louis: Mosby Elsevier, 2007. v. 1, cap. 3, p. 413-415.

MAYERS, C. P. Histological fixation by microwave heating. **Journal of Clinical Pathology**, London, v. 23, n. 3, p. 273-275, Apr. 1970.

MENEZES, F. L. et al. Distribuição espaço-temporal da raiva bovina em Minas Gerais, 1998 a 2006. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, Belo Horizonte, v. 60, n. 3, p. 566-573, jun. 2008.

MESQUITA, L. P. et al. Inclusões intracitoplasmáticas hialinas na medular da adrenal de bovinos. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, Belo Horizonte, v. 63, n. 1, p. 247-249, fev. 2011.

MORAIS, C. F.; ASSIS, R. V. C. Cardiac involvement in human rabies. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, São Paulo, v. 27, n. 3, p. 145-149, May/June 1985.

MORALES, A. R. et al. Continuous-specimen-flow, high-throughput, 1-hour tissue processing: a system for rapid diagnostic tissue preparation. **Archives of Pathology & Laboratory Medicine**, Chicago, v. 126, n. 5, p. 583-590, May 2002.

NANDIN-DAVIS, S. A.; SHEEN, M.; WANDELER, A. I. Use of discriminatory probes for strain typing of formalin-fixed, rabies virus-infected tissues by in situ hybridization. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v. 41, n. 9, p. 4343-4352, Sep. 2003.

PEDROSO, P. M. O. et al. Aspectos clínicos e patológicos em bovinos afetados por raiva com especial referência ao mapeamento do antígeno rábico por imunohistoquímica. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, Rio de Janeiro, v. 29, n. 11, p. 899-904, nov. 2009.

PEDROSO, P. M. O. et al. Padronização da técnica de imunohistoquímica para raiva em amostras de tecido do sistema nervoso central de bovinos fixadas em formol e emblocadas em parafina. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, Rio de Janeiro, v. 28, n. 12, p. 627-632, dez. 2008.

PRAVEENA, P. E. et al. Detection of rabies virus genes by *in-situ* polymerase chain reaction. **Veterinary Research Communications**, Dordrecht, v. 31, n. 6, p. 775-781, Aug. 2007.

PREUSS, M. A. R. et al. Intravenous inoculation of a Bat-Associated Rabies virus causes lethal Encephalopathy in Mice through Invasion of the Brain via neurosecretory hypothalamic fibers. **PLoS Pathogens**, San Francisco, v. 5, n. 6, p. 1-10, June 2009.

RECH, R. R. et al. Histomorfologia do gânglio de Gasser, da *rete mirabile* carotídea e da hipófise de bovinos: estudo de 199 casos. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, Rio de Janeiro, v. 26, n. 2, p. 105-111, abr./jun. 2006.

RODRIGUEZ, L. et al. Rhabdoviridae. In: FLORES, E. F. **Virologia veterinária**. Santa Maria: UFSM, 2007. cap. 27, p. 689-720.

ROJAS, A. E. et al. Use of reverse transcription-polymerase chain reaction to determine the stability of rabies virus genome in brains kept at room temperature. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, Columbia, v. 18, n. 1, p. 98-101, Jan. 2006.

ROSSITER, J. P.; HSU, L.; JACKSON, A. C. Selective vulnerability of dorsal root ganglia neurons in experimental rabies after peripheral inoculation of CVS-11 in adult mice. **Acta Neuropathologica**, Berlin, v. 118, n. 2, p. 249-259, Aug. 2009.

SILVA, D. C. B.; OLIVEIRA, T. S. Colheita de material encefálico para o diagnóstico de enfermidade do sistema nervoso central. **Cadernos Técnicos de Veterinária e Zootecnia**, Belo Horizonte, v. 61, p. 1-16, jun. 2009.

SILVA, J. A. et al. Distribuição temporal e espacial da raiva bovina em Minas Gerais, 1976 a 1997. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, Belo Horizonte, v. 53, n. 3, p. 1-11, jun. 2001.

SINGH, H.; SINGH, C. K. Ante-mortem diagnosis of rabies from body secretions and mucosal impression smears in experimentally infected buffalo calves. **Indian Journal of Animal Sciences**, New Delhi, v. 81, n. 3, p. 205-208, Mar. 2011.

SOTA, C. A. **Control of bovine paralytic rabies in Latin America and the Caribbean**. 1993. Disponível em: <<http://www.fao.org/docrep/v0600t/v0600T0a.htm#control>>. Acesso em: 15 jan. 2012.

STEIN, L. T. et al. Immunohistochemical study of rabies virus within the central nervous system of domestic and wildlife species. **Veterinary Pathology**, Washington, v. 47, n. 4, p. 630-636, June 2010.

SURI, V. et al. Application of domestic microwave for urgent histopathology reporting: an evaluation. **Indian Journal of Pathology and Microbiology**, Chandigarh, v. 49, n. 3, p. 348-351, July 2006.

TOBIUME, M. et al. Rabies virus dissemination in neural tissues of autopsy cases due to rabies imported into Japan from the Philippines: immunohistochemistry. **Pathology International**, Washington, v. 59, n. 8, p. 555-566, Aug. 2009.

WUNNER, W. H. Rabies virus. In: JACKSON, A. C.; WUNNER, W. H. **Rabies**. 2nd ed. San Diego: Elsevier, 2007. cap. 2, p. 23-68.

ZISHANG, L.; ZHENBO, F.; HONTAO, Y. Rabies viral antigen in human tongues and salivary glands. **Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, London, v. 98, n. 5, p. 330-332, Oct. 1995.

ARTIGO 1

Neste item é apresentado o artigo sobre processamento em micro-ondas doméstico para diagnóstico imuno-histoquímico rápido da raiva bovina, que foi aceito para publicação na revista *Histology and Histopathology* em janeiro de 2012, registro B-4551 (ANEXO A)

**DOMESTIC MICROWAVE PROCESSING FOR RAPID
IMMUNOHISTOCHEMICAL DIAGNOSIS OF BOVINE RABIES**

Camila C. Abreu¹, Priscilla A. Nakayama¹, Clayton I. Nogueira¹, Leonardo P. Mesquita¹, Priscila F. R. Lopes¹, Mary S. Varaschin¹, Josilene do N. Seixas¹, Enio Ferreira², Pedro S. Bezerra Jr.¹

¹ Veterinary Pathology. Department of Veterinary Medicine. Federal University of Lavras. Lavras, MG, Brazil.

² Veterinary Pathology. Institute of Biological Sciences. Federal University of Minas Gerais. Belo Horizonte, MG, Brazil.

ABSTRACT

The present study describes the use of a microwave processing protocol for the rapid histopathological and immunohistochemical diagnosis of bovine rabies. Immunohistochemistry has been used for rabies diagnosis in formalin-fixed tissue with satisfactory results, although the time to diagnosis is considerably longer than that with direct immunofluorescence. The protocol provided a provisory histopathological rabies diagnosis in approximately three and half hours and the immunohistochemical diagnosis was available after six hours. The protocol achieved 100% correlation with direct immunofluorescence and is a promising method, particularly in situations in which only material in formalin is available for diagnosis or when the refrigeration or transportation of biological material is difficult.

Keywords: cattle, histopathology, microwave histoprocessing, microwave fixation, rabies virus

Offprint requests to: Pedro Soares Bezerra Jr., Patologia Veterinária, Departamento de Medicina Veterinária, Universidade Federal de Lavras, Caixa Postal 3037, Lavras-MG. CEP: 37200-000. Brazil. bezerraj@dmv.ufla.br

1 INTRODUCTION

Rabies is an infectious disease caused by a virus of the genus *Lyssavirus* that affects mammals and is considered to be one of the greatest economic problems related to livestock and public health in South America (Barros et al., 2006). Between 1987 and 2010, 66,135 herbivores, including 58,932 cattle, were infected by rabies virus in Brazil (Brasil, 2011). Although these data are significant, the real numbers could be even higher, as the disease is under-reported (Teixeira et al., 2008).

Immunohistochemistry (IHC) has been used as an alternative to direct immunofluorescence test (DIF) to detect rabies in formalin-fixed tissues from different animal species and humans (Jackson et al., 1999; Jogai et al., 2000; 2002; Bagó et al., 2005; Pedroso et al., 2008; Tobiume et al., 2009; Stein et al., 2010). Microwave irradiation of tissues for fixation and histological processing has reduced the time required to obtain slice sections and has offered the advantage of preserving antigens and nucleic acids (Mayers, 1970; Boon et al., 1986; Morales et al., 2002; Hafajee and Leong, 2004; Suri et al., 2006). The rapid diagnosis of bovine rabies in formalin-fixed tissues may also reduce the risks inherent to the handling and sending of material contaminated with the virus (Rodriguez et al., 2007).

The aim of the present study was to assess an alternative protocol for rapid rabies diagnosis in cases inadvertently shipped in formalin or from regions with limitations regarding the storage and transport of cooled biological material. In such situations, it is unfeasible to carry out DIF, which may hinder the adoption of control and preventive measures for the disease.

2 MATERIALS AND METHODS

Thirteen cases of bovine rabies were evaluated in southern Minas Gerais state (Brazil) from July 2010 to May 2011. Twelve necropsies were performed by the staff of Veterinary Pathology (VP) from Federal University of Lavras (UFLA, Brazil) and one was performed by an autonomous veterinarian who forwarded the refrigerated and formalin-fixed material to the VP. Fragments from spinal cord, cerebellum, brainstem, hippocampus and cerebral cortex of cattle were frozen and sent to the *Instituto Mineiro de Agropecuária* (IMA) for DIF examination and inoculation in mice test.

Fragments of cerebellum (13/13) and medulla oblongata at the level of obex (8/13) (approximate thickness: 3 mm) were collected in a 10% buffered formalin solution. Selected areas were based on previous studies (Pedroso et al., 2008). Fragments remained in formalin from one to two hours, which was the time between collection and the beginning of microwave processing. One of the 13 brains had already been fixed upon arrival to the VP and it wasn't possible to determine the duration of fixation in this case. Fragments were cleaved into 1-mm slices and irradiated in the same fixing solution for one minute at full power (100%), followed by one minute and a half at minimum power (10%) in a domestic microwave oven (NN-S65B, 1000W, Panasonic®) (Kahveci et al., 1997).

After fixation, tissues were dehydrated in the microwave in absolute ethyl alcohol at medium power (50%) for four minutes and diaphanized in isopropyl alcohol at medium power (50%) for four minutes, followed by immersion in paraffin and irradiation for seven minutes at close to full power (80%), with another container inside the microwave containing 200 mL of water (Boon et al., 1986; Suri et al., 2006). Cuts of 5 µm thickness were taken from

blocks and placed on slides with gelatin and Silane[®] (Sigma-Aldrich, USA) for hematoxylin and eosin staining and IHC, respectively.

IHC was performed following a pre-established protocol (Pedroso et al., 2008; Stein et al., 2010). Goat anti-rabies polyclonal antibody was used as the primary antibody (Millipore, 5199) at a dilution of 1:500. IHC was processed with and without antigen retrieval. A fragment of the central nervous system (CNS) of a rabid bovine was used as the positive control, processed in the conventional manner for histopathology and confirmed by DIF and IHC. A fragment of CNS from a bovine euthanized due to trauma was used as the negative control, with a negative result for rabies in DIF, mice inoculation and IHC.

3 RESULTS

Microwave tissue processing allowed a histopathological evaluation in approximately three and half hours after collection at the necropsy and one and half hours after receiving the formalin-fixed material sent to VP-UFLA. Tissue morphology was relatively well preserved, particularly in the cerebellum, with Negri bodies visualized in nine cases (69.2%): four in cerebellum, two in medulla oblongata at the level of obex and three in both. Nonsuppurative meningoencephalitis, characterized by a predominant lymphocytic infiltration, was found in 11 cases (84.6%): four in the cerebellum, one in medulla oblongata and six in both (Fig. 1).

Immunohistochemical diagnosis required a processing time of approximately six hours from collection at necropsy and approximately four hours after receiving the formalin-fixed material. All 13 cases were positive for rabies (Fig. 1), with labeling in all eight fragments of medulla oblongata at the level of obex (100%) (Fig. 2) and 12 of cerebellum fragments (92.3%) (Fig. 3).

The bovine without positive labeling in the cerebellum displayed weak labeling at the obex level and was the only one in the present study euthanized with barbiturates. Positive labeling in IHC for rabies, with or without antigen retrieval, was obtained in all 13 cases of microwave processing. The results of this technique achieved 100% positive correlation with the DIF performed by IMA.

4 DISCUSSION

The protocol used for microwave processing proved efficient for rapid immunohistochemical diagnosis of bovine rabies. Histological cuts were obtained approximately three and half hours after collection, which led to a rapid provisional diagnosis in 84.6% of cases, based on the presence of nonsuppurative meningoencephalitis and/or Negri bodies (Summers et al., 1994). However, IHC, performed in a six-hour period from the time of necropsy, provided greater specificity and sensitivity. The efficiency of IHC, to detect rabies virus' antigens, in animals and humans, has been demonstrated in a great number of studies (Jackson et al., 1999; Jogai et al., 2000; 2002; Bagó et al., 2005; Pedroso et al., 2008; Tobiume et al., 2009; Stein et al., 2010). The time required to complete the immunohistochemical diagnosis was similar to that required for DIF (Dean and Abelseth, 1973). Rapid diagnosis is crucial to adoption of preventive measures in the herd, as well as to humans who had contact with infected animals.

Although this protocol has been used in a limited number of cases, it does look promising, particularly in situations in which only tissue in formalin is available for confirmation of the diagnosis. This technique could be useful in regions with transportation limitations and it also avoids problems with the storage and shipping of fresh biological material. Handling of formalin-fixed

tissues is less risky than cooled or frozen material in terms of contamination, since the rabies virus is sensitive to formalin (Rodriguez et al., 2007). Furthermore, domestic microwave processing and IHC require a simpler and less expensive laboratory structure (Suri et al., 2006).

IHC was essential for rabies diagnosis in formalin-fixed tissues, particularly for cases in which no compatible lesions were found on histopathologic examination. The weak labeling in medulla oblongata and absence of labeling in cerebellum of the euthanized bovine were probably associated with lesser dissemination of rabies virus in CNS (Barros et al., 2006) due to the interruption of the disease's course.

Immunohistochemical labeling was achieved even without antigen retrieval, which reduced the processing time by 15 minutes. Nevertheless, retrieval may be important in samples with prolonged fixation (Stein et al., 2010).

Formaldehyde-fixative solutions contain little formaldehyde: instead, they contain mainly methylene glycol, formed by the reaction between formaldehyde and water. Fixation occurs in three steps: first, diffusion of methylene glycol into the tissue; second, formation of formaldehyde by dehydration of methylene glycol into the tissue; and third, binding of formaldehyde to the proteins by cross-linking. At microwave irradiation, all three steps are accelerated (Kahveci et al., 1997; Kok and Boon, 2003), contributing to the faster fixation achieved in the present study.

The material that remained in formalin at room temperature for about two hours, before microwave processing, exhibited better morphology than that stored for a short time. This better morphology of tissues was likely favored by initial penetration of methylene glycol. Microwave irradiation of fresh tissue, not previously immersed in formalin at room temperature, causes sponginess in the center of the tissue and lysis of erythrocytes (Kok and Boon, 2003). This

sponginess was visualized in some cuts of medulla oblongata which were kept in formalin for less time before irradiation.

Moreover, this technique also led to a considerable reduction in the use of xylene, which was completely excluded from the tissue processing and only used in the mounting of slides (Suri et al., 2006).

Processing tissues in a domestic microwave oven for a rapid immunohistochemical diagnosis of rabies was efficient in the cases presented here.

ACKNOWLEDGEMENTS

The authors are grateful to Professor David Driemeier for donation of primary antibody; veterinarian Denis Lucio Cardoso of the IMA for providing access to the cases from Perdões, MG, Brazil; the Animal Health Laboratory, IMA, Belo Horizonte, MG, Brazil, for DIF results of materials sent; and to Brazilian fostering agencies CAPES for Master's grant and FAPEMIG for assistance in funding this study.

REFERENCES

- Bagó Z., Revilla-Fernández S. and Allerberger F. (2005). Value of immunohistochemistry for rapid ante mortem rabies diagnosis. *Int. J. Infect. Dis.* 9, 351-352.
- Barros C.S.L., Driemeier D., Dutra I.S. and Lemos R.A.A. (2006). Raiva. In: *Doenças do sistema nervoso de bovinos no Brasil*. 1st ed. Barros C.S.L., Driemeier D., Dutra I.S. and Lemos R.A.A. (eds). Coleção Vallée. São Paulo. pp 21-28.
- Brasil. (2011). Casos de raiva por espécie. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. In: *Boletim de Defesa Sanitária Animal/ Departamento de Saúde Animal - DSA/ SDA/ Mapa*. Available in: <http://www.agricultura.gov.br/animal/sanidade-animal>. Access: October 27, 2011.
- Boon M.E., Kok L.P. and Ouwerkerk-Noordam E. (1986). Microwave-stimulated diffusion for fast processing of tissue: reduced dehydrating, clearing, and impregnating times. *Histopathology*. 10, 303-309.
- Dean D.J. and Abelseth M.K. (1973). The Fluorescent Antibody Test. In: *Laboratory Techniques in Rabies*. 3th ed. Kaplan M.M. and Koprowski H. (eds). World Health Organization. Geneva. pp 73-84.
- Hafajee Z.A.M. and Leong A.S-Y. (2004). Ultra-rapid microwave-stimulated tissue processing with a modified protocol incorporating microwave fixation. *Pathology*. 36, 325-329.
- Jackson A.C., Ye H., Phelan C.C., Ridaura-Sanz C., Zheng Q., Li Z., Wan X. and Lopez-Corella E. (1999). Extraneural organ involvement in human rabies. *Lab. Invest.* 79, 945-951.
- Jogai S., Radotra B.D. and Banerjee A.K. (2000). Immunohistochemical study of human rabies. *Neuropathol.* 20, 197-203.
- Jogai S., Radotra B.D. and Banerjee A.K. (2002). Rabies viral antigen in extracranial organs: a post-mortem study. *Neuropathol. Appl. Neurobiol.* 28, 334-338.

Kahveci Z., Çavusoglu I. and Sirmali S.A. (1997). Microwave fixation of whole fetal specimens. *Biotech. Histochem.* 72, 144-147.

Kok L.P. and Boon M.E. (2003). Microwave stabilization of fresh tissue by microwave heating. In: *Microwave for the Art of Microscopy*. 1 st ed. Kok L.P. and Boon M.E. (eds). Coulomb Press Leyden. Leiden. pp 151-163.

Mayers C.P. (1970). Histological fixation by microwave heating. *J. Clin. Pathol.* 23, 273-275.

Morales A.R., Essensfeld H., Essensfeld E., Duboue M.C., Vincek V. and Nadji, M. (2002). Continuous-specimen-flow, high-throughput, 1-hour tissue processing – A system for rapid diagnostic tissue preparation. *Arch. Pathol. Lab. Med.* 126, 583-590.

Pedroso P.M.O., Pescador C.A., Bandarra P.M., Raymundo D.L., Borba M.R., Wouters F., Bezerra Júnior P.S. and Driemeier D (2008). Standardization of immunohistochemistry technique for detection of rabies virus in formalin-fixed and paraffin-embedded tissue samples from central nervous system of cattle. *Pesq. Vet. Bras.* 28, 627-632.

Rodriguez L., Batista H.R., Roehe P.M. and Kurath G. (2007). Rhabdoviridae. In: *Virologia Veterinária*. 1st ed. Flores E.F. (ed). Ed. da UFSM. Santa Maria. pp 689-720.

Stein L.T., Rech R.R., Harrison L. and Brown C.C. (2010). Immunohistochemical study of rabies virus within the central nervous system of domestic and wildlife species. *Vet. Pathol.* 47, 630-636.

Summers B.A., Cummings J.F. and Lahunta A. (1994). Inflammatory Diseases of the Central Nervous System. In: *Veterinary Neuropathology*. 1st ed. Summers B.A., Cummings J.F. and Lahunta A. (eds). Mosby. St. Louis. pp 95-188.

Suri V., Chaturvedi S., Pant I., Dua R. and Dua S. (2006). Application of domestic microwave for urgent histopathology reporting: an evaluation. *Indian J. Pathol. Microbiol.* 49, 348-351.

Teixeira T.F., Holz C.L., Caixeta S.P.M.B., Dezen D., Cibulski S.P., Silva J.R., Rosa J.C.A., Schmidt E., Ferreira J.C., Batista H.B.C.R., Caldas E., Franco A.C. and Roehe P.M. (2008). Rabies diagnosis in the state of Rio Grande do Sul, Brazil, from 1985 to 2007. *Pesq. Vet. Bras.* 28, 515-520.

Tobiume M., Sato Y., Katano H., Nakajima N., Tanaka K., Noguchi A., Inoue S., Hasegawa H., Iwasa Y., Tanaka J., Hayashi H., Yoshida S., Kurane I. and Sata T. (2009). Rabies virus dissemination in neural tissues of autopsy cases due to rabies imported into Japan from the Philippines: Immunohistochemistry. *Pathol. Int.* 59, 555-566.

FIGURE LEGENDS

Fig. 1: Bovine rabies. Results of histopathology and immunohistochemistry of tissues processed in microwave.

Fig. 2: Bovine rabies. Immunohistochemistry of medulla oblongata at the level of obex processed in microwave, revealed in diaminobenzidine peroxidase substrate (Dako, Carpinteria, CA). Bar: 50 μ m.

Fig. 3: Bovine rabies. Immunohistochemistry of cerebellum processed in microwave, revealed in Vector® NovaRED™ substrate kit for peroxidase. Bar: 50 μ m.

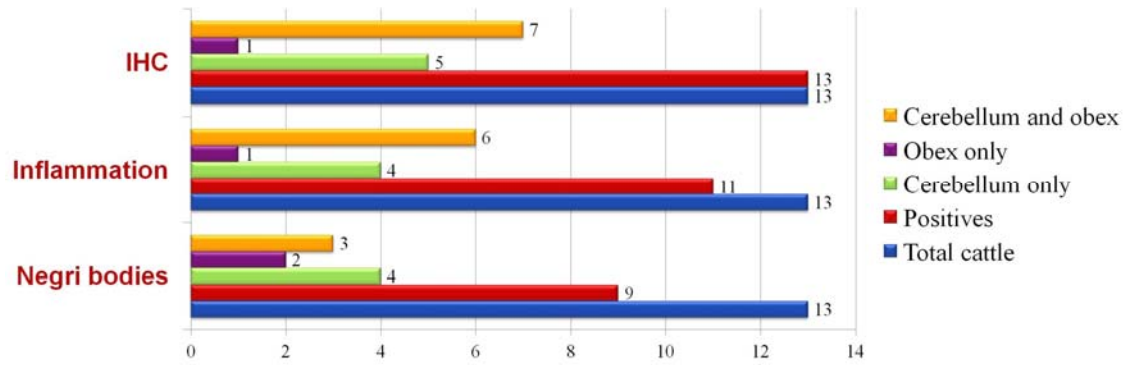


Figura 1.

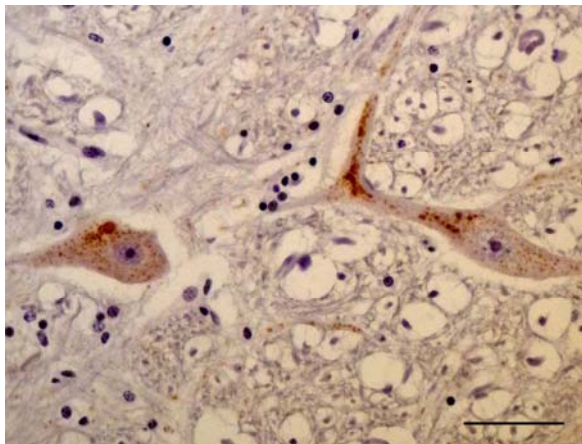


Figura 2.



Figura 3.

ARTIGO 2

Neste item é apresentado o artigo sobre o estudo histológico e imuno-histoquímico de tecidos fora do sistema nervoso central de bovinos com raiva

HISTOLOGIA E IMUNO-HISTOQUÍMICA DE TECIDOS FORA DO SISTEMA NERVOSO CENTRAL NA RAIVA BOVINA¹

Camila C. Abreu²; Priscilla A. Nakayama²; Clayton I. Nogueira²; Leonardo P. Mesquita²; Priscila F.R. Lopes²; Flademir Wouters²; Mary S. Varaschin²; Pedro S. Bezerra Jr^{2*}

RESUMO

Foi realizado um estudo histopatológico e imuno-histoquímico de tecidos fora do sistema nervoso central, em 48 casos de raiva bovina confirmados pela imunofluorescência direta e/ou imuno-histoquímica (IHQ) do sistema nervoso central. Nos bovinos deste estudo, foi observada inflamação mononuclear em todos os gânglios (trigêmeos, espinhais, estrelados e celíacos) e região medular das adrenais analisadas. Esta lesão também ocorreu em 85% das neuro-hipófises, em 55% das *pars intermedias* e em 15% das *pars distalis* das adeno-hipófises avaliadas. A IHQ foi positiva em 92,31% dos gânglios espinhais lombares, 90,9% dos gânglios trigêmeos, 41,67% dos gânglios estrelados e 16,67% dos gânglios celíacos. Uma das adrenais avaliadas (1/17) apresentou marcação IHQ fortemente positiva no citoplasma de feocromócitos. A IHQ da hipófise foi positiva em um caso na neuro-hipófise (1/20) e em um caso na *pars intermedia* da adeno-hipófise (1/20). Os dados do presente estudo indicam que em casos suspeitos de raiva, além do complexo hipófise, *rete mirabile* e gânglio trigêmeo, a avaliação de outros gânglios, particularmente o espinhal lombar, e da adrenal pode também contribuir para o diagnóstico e entendimento da apresentação clínica e patogênese da doença nos bovinos.

Palavras-chave: Adrenais. Bovinos, Dispersão centrífuga. Gânglios. Hipófise. Patologia. Vírus rábico.

¹ Recebido em.....

Aceito para publicação em.....

² Setor de Patologia Veterinária, Departamento de Medicina Veterinária, Universidade Federal de Lavras. Caixa Postal: 3037. Lavras, MG 37.200-000, Brasil. * Autor para correspondência: bezerraj@dmv.ufla.br

1 INTRODUÇÃO

A raiva é uma zoonose de distribuição mundial, causada por um vírus do gênero *Lyssavirus*, de caráter neurotrópico, que afeta os mamíferos em geral (JACKSON, 2008). No Brasil, a doença tem grande impacto na agropecuária, sendo uma das principais causas de morte em bovinos (BARROS et al., 2006). A raiva bovina é transmitida principalmente pelo morcego hematófago *Desmodus rotundus* (SOTA, 1993).

O vírus da raiva, ao ser inoculado pela saliva do morcego, migra pela via axonal motora e sensoria, até alcançar o sistema nervoso central (SNC) (JACKSON, 2010). Outra via recentemente reconhecida é a endovenosa (PREUSS et al., 2009). Sabe-se que nos vetores, a dispersão centrífuga do vírus rábico dá-se principalmente nas glândulas salivares, sendo a saliva a principal forma de contágio da doença (JACKSON, 2008). A entrada do vírus rábico via sensoria pode ser importante na raiva transmitida por morcegos, uma vez que estes vetores produzem mordidas mais superficiais, onde a inervação sensoria e autonômica é mais abundante (JACKSON, 2010). A via endovenosa tem sido apontada como importante na doença transmitida por morcegos hematófagos (PREUSS et al., 2009).

Estudos sobre lesões de raiva fora do SNC têm sido realizados principalmente em humanos (JACKSON et al., 1999; JOGAI; RADOTRA; BANERJEE, 2002; MORAIS; ASSIS, 1985; TOBIUME et al., 2009) e em espécies animais vetores da doença (AJAYI; RABO; BABA, 2006; BALACHANDRAM; CHARLTON, 1994). Nos quais têm sido descrito principalmente inflamação não supurativa em diversos tecidos como glândulas salivares, plexos nervosos do trato gastrintestinal, gânglios nervosos, medular da adrenal e fibras musculares e nervosas no coração. Glóbulos hialinos têm sido descritos em feocromócitos da medular da adrenal de humanos e bovinos com

raiva (ALMEIDA et al., 1986; MESQUITA et al., 2011). Em bovinos estudos do gânglio trigêmeo têm determinado que a ganglioneurite trigeminal é uma importante lesão que contribui para o diagnóstico da raiva nesta espécie (SUMMERS; CUMMINGS; DE LAHUNTA, 1994; RECH et al., 2006).

A distribuição do antígeno rábico em tecidos periféricos é variável entre as diferentes espécies. A maior parte dos estudos imuno-histoquímicos realizados para avaliar essa distribuição tem sido realizada em humanos (JACKSON et al., 1999; JOGAI; RADOTRA; BANERJEE, 2002; BAGÓ, 2005; TOBIUME et al., 2009). Em animais estudos semelhantes são escassos, sendo realizados principalmente nos principais vetores, como *Vulpes vulpes* (raposas) e *Mephitis mephitis* (cangambás) (BALACHANDRAM; CHARLTON, 1994), cães (AJAYI; RABO; BABA, 2006) e morcegos (VIEIRA et al., 2011). Em bubalinos, experimentalmente infectados, antígenos do vírus rábico foram detectados *ante-mortem* em secreções corporais (nasal, salivar e retal) e em impressões de superfícies mucosas (corneal e prepucial), por meio da imunofluorescência direta (IFD) (SINGH; SINGH, 2011). Em um estudo em bovinos, Delpietro, Larghi e Russo (2001) pesquisaram a presença do vírus na glândula salivar e na saliva demonstrando que esta não é significativa. Antígenos do vírus são encontrados frequentemente nos gânglios trigêmeos por imuno-histoquímica (IHQ) (PEDROSO et al., 2009).

No entanto, estudos histológicos e imuno-histoquímicos mais amplos relativos à dispersão periférica do vírus rábico em bovinos não foram encontrados. Tais estudos em outras espécies têm contribuído para o entendimento da patogenia e para o diagnóstico da raiva, o que ressalta a importância do presente estudo nos bovinos.

2 MATERIAL E MÉTODOS

O estudo foi realizado em tecidos de 48 casos de raiva bovina recebidos pelo Setor de Patologia Veterinária (SPV) da Universidade Federal de Lavras (UFLA), no período de 2000 a 2011, confirmados pela IFD e/ou IHQ do SNC, realizada pelo Instituto Mineiro de Agropecuária (IMA) e pelo referido setor, respectivamente. Nos 29 casos, do período de 2000 a 2009, utilizou-se tecidos fora do SNC, que estavam arquivados em parafina no SPV-UFLA. No período de 2010 a 2011 foi realizado um estudo prospectivo em todos os casos de bovinos que morreram apresentando sinais neurológicos, com uma coleta mais ampla de tecidos, sendo incluídos neste estudo apenas os casos com diagnóstico de raiva (19 casos). Nestes casos foram coletados diversos tecidos para processamento histológico.

No total foram avaliados fragmentos do encéfalo de 48 bovinos, hipófise de 20, gânglio trigêmeo de 33, gânglio espinhal lombar de 14, espinhal cervical de quatro, espinhal torácico de dois, celíaco de 12 e estrelado de 12, córnea de 11, nervo óptico de 10, glândula lacrimal de três, plexo braquial de 11, nervo isquiático de 15, adrenal de 17, tireoide de 15, glândula salivar parótida de 14, língua de 13, esôfago de seis, pré-estômagos de 15, abomaso de 11, fígado de 19, vesícula biliar de oito, pâncreas de 13, intestinos de 17, tonsila de oito, baço de 14, linfonodos de 15, medula óssea de cinco, músculo esquelético de sete, coração de 22, pulmão de 19, traqueia de quatro, rim de 19, bexiga de 11, glândula mamária de nove, útero de nove, ovário de cinco, testículo de um e pele (orelha, nuca, focinho, comissura labial, pelos táteis, pálpebra) de 17 bovinos (ANEXOS B, C e D).

Os tecidos foram fixados em formalina a 10% tamponada com fosfatos. Após a fixação de 24 à 48h, o material foi clivado, desidratado em concentrações crescentes de álcool etílico, diafanizado em xilol e incluído em

parafina. Fragmentos foram cortados a 5 μ m e corados pela hematoxilina e eosina (HE). Cortes de adrenal foram corados também pelo ácido periódico de Schiff (PAS). A pesquisa de lesões foi mediante microscopia de luz.

A IHQ foi realizada segundo protocolo pré-estabelecido (PEDROSO et al., 2008). Foi empregado um tempo maior do bloqueio da peroxidase endógena, para tal os cortes foram incubados por 30 minutos em solução de peróxido de hidrogênio a 3% em água destilada, em temperatura ambiente. Para o bloqueio das ligações inespecíficas (“*background*”), os cortes foram tratados com leite desnatado (Molico, Nestlé®) 5% diluído em PBS (*phosphate buffered saline*) 0,01M (pH7,4) durante uma hora. Os cortes foram incubados com o anticorpo primário (anticorpo policlonal antirraiva, produzido em cabras, Millipore, 5199), na diluição de 1:100 em PBS, incubados por uma hora em câmara úmida a 37°C.

A revelação da reação foi realizada com o cromógeno vermelho (VECTOR® NovaRED) de um a dois minutos, controlando o tempo de incubação com o aparecimento de uma coloração rosa-pálido do corte .

Como controle positivo foram utilizados cortes de SNC (bulbo ou cerebelo) de casos de raiva bovina, previamente confirmados na IFD e na IHQ.

Como controle negativo foram utilizados iguais tecidos de um bovino em que o SNC foi negativo para raiva na IFD e IHQ. Outros controles negativos foram a realização de IHQ com anticorpo primário não correlacionado (anticorpo policlonal anti-*Toxoplasma gondii* produzido em cabras VMRD, 210-70-TOXO) e a incubação com a omissão do anticorpo primário (incubação com PBS).

3 RESULTADOS

Gânglios espinhais

Dos casos de raiva bovina avaliados, 14 (29,17%) tiveram os gânglios espinhais coletados. Em 71,43% desses casos foram coletados apenas gânglios da região lombar, em 14,29% das regiões lombar e cervical, e em 14,29% das regiões lombar, cervical e torácica.

Na avaliação histopatológica, todos os gânglios espinhais apresentaram inflamação mononuclear, necrose neuronal, neuronofagia (Figura 1) e nódulos de Nageotte (Figura 2), variando apenas a intensidade dessas alterações nos diferentes níveis da medula espinhal e de um caso para o outro.

As lesões mais intensas e a marcação IHQ foram em geral mais frequentes nos gânglios espinhais lombares (Figura 3). Nestes a inflamação mononuclear mostrou-se leve em 28,57%, moderada em 14,29% e acentuada em 57,14%. A necrose neuronal se caracterizou por pericário com aumento da eosinofilia e perda de substância de Nissl, associada à picnose, cariorrexia e cariólise. O pericário de alguns neurônios necróticos estava retraído ou fragmentado. Outros não retraídos apresentavam centro mais pálido e os núcleos picnóticos, quando presentes, se encontravam na periferia, lembrando reação axonal. A neuronofagia foi caracterizada pela presença de células mononucleares com moderada quantidade de citoplasma (macrófagos), entremeados aos fragmentos do pericário. A necrose neuronal e neuronofagia foi leve em 14,29%, moderada em 71,43% e acentuada em 14,29%. Os nódulos de Nageotte, caracterizados pela hipertrofia de células satélites, ocupando locais de perda do corpo neuronal, foram raros em 64,29% e ocasionais em 35,71%. Os gânglios espinhais lombares apresentaram ainda vacuolização citoplasmática em 78,57%, sendo esta leve em 72,73% , e moderada em 27,27%, e adicionalmente, em um caso (7,14%) foi constatada a presença de corpúsculos de Negri. A IHQ

foi realizada em 13 gânglios espinhais lombares (Figura 4), com marcação em 92,31%, sendo esta leve em 75%, moderada em 16,67% e acentuada em 8,33%. Apenas em um bovino que foi submetido à eutanásia, tendo assim o curso clínico abreviado, não houve marcação na IHQ.

Nos gânglios espinhais cervicais a inflamação apresentou-se leve em 25% dos casos avaliados, moderada em 50% e acentuada em 25%. A necrose e neuronofagia em 50% foi leve, em 25% moderada e em 25% acentuada. Os nódulos de Nageotte foram raros em 25% e ocasionais em 75% desses gânglios avaliados. Havia vacuolização citoplasmática em todos os gânglios espinhais cervicais avaliados, sendo esta leve em 50% e moderada em 50%. Corpúsculos de Negri foram observados em apenas um caso (25%). Este mesmo caso apresentou marcação moderada na IHQ para raiva neste gânglio.

Nos gânglios espinhais torácicos a inflamação mononuclear foi considerada leve em 50% dos gânglios analisados e moderada em 50%. A necrose e neuronofagia foi leve em 50% dos gânglios avaliados e moderada em 50%. Os nódulos de Nageotte foram raros em todos os gânglios espinhais torácicos. Estes apresentaram vacuolização leve (50%) ou moderada (50%). A IHQ foi positiva em apenas um caso (50%) avaliado, sendo a marcação leve.

Gânglios trigêmeos

O gânglio trigêmeo foi coletado em 33 (68,75%) dos bovinos com raiva. A inflamação mononuclear foi presente em todos os gânglios trigêmeos analisados (vide Figura 3), sendo considerada leve em 27,27%, moderada em 54,55% e acentuada em 18,18%. Necrose neuronal e neuronofagia também estavam presentes em 100% dos gânglios trigêmeos analisados, sendo leve em 39,4%, moderada em 42,42% e acentuada em 18,18%. Nódulos de Nageotte foram observados em 87,88% dos gânglios trigêmeos avaliados, sendo raros em 72,41%, ocasionais em 24,14% e frequentes em 3,45%. Corpúsculos de Negri

foram presentes em 54,55% desses gânglios e leve vacuolização do pericário de neurônios foi observada em 72,73%.

Nos gânglios trigêmeos a IHQ foi positiva em 90,9% dos casos. Nesses casos positivos a marcação foi leve em 26,67%, moderada em 36,67% e acentuada em 36,67%. Em dois dos casos negativos havia um número reduzido de neurônios na amostra analisada e o outro caso negativo foi submetido à eutanásia após evolução clínica breve.

Gânglios estrelados

Em todos os 12 bovinos que tiveram os gânglios estrelados coletados (25% do total) foi possível observar inflamação mononuclear nestes tecidos (vide Figura 3), sendo esta em 25% dos gânglios leve, em 50% moderada e em 25% acentuada. Necrose e neuronofagia foram observadas em 33,33% dos gânglios estrelados avaliados, em 50% a lesão foi considerada leve e em 50% moderada. Vacuolização citoplasmática leve também estava presente em 33,33% destes gânglios. A IHQ foi positiva em 41,67% dos gânglios estrelados analisados, com marcação leve em 80% e moderada em 20%.

Gânglios celíacos

Em todos os 12 bovinos que tiveram os gânglios celíacos coletados (25% do total), havia inflamação mononuclear nestes tecidos (vide Figura 3), sendo esta lesão leve em 41,67% dos gânglios, moderada em 33,33% e acentuada em 25%. Em 50% dos gânglios celíacos avaliados havia ainda necrose e neuronofagia, sendo estas em 83,33% dos casos leve e em 16,67% moderada. Em 25% dos gânglios celíacos analisados havia vacuolização citoplasmática leve. A IHQ foi positiva em dois gânglios (16,67%), sendo a marcação leve.

Adrenais

Foram coletadas as adrenais de 17 (35,42%) dos bovinos avaliados com raiva. Pelo exame histopatológico houve inflamação mononuclear circundando vasos e nervos na medular da adrenal em todos os casos (Figura 5). Essa inflamação foi considerada leve em 41,18%, moderada em 47,06% e acentuada em 11,76%. Foram observados ainda glóbulos hialinos no citoplasma de feocromócitos em 88,24% das adrenais, a maior parte presentes tanto na zona clara quanto na zona escura (86,67%) da medular da adrenal. No entanto, em um caso essas se encontravam apenas na zona clara (6,67%) e em outro apenas na zona escura (6,67%). Os glóbulos hialinos eram evidenciados pelo PAS e não marcaram na IHQ para raiva. Esses glóbulos hialinos foram raros em 66,67%, ocasionais em 20% e frequentes em 13,33%. Os dois casos (11,77%) onde não foram observados esses glóbulos estavam em adiantado estado de autólise. Uma das adrenais avaliadas (5,88%) apresentou marcação IHQ fortemente positiva no citoplasma de feocromócitos (Figura 4).

Hipófises

Foi coletada a hipófise em 20 (41,67%) dos bovinos avaliados com raiva. Havia inflamação mononuclear na neuro-hipófise de 85%, destas em 29,41%, a lesão foi considerada leve, em 58,82% moderada e em 11,77% acentuada. Na neuro-hipófise a IHQ foi positiva em apenas um caso (5%) (Figura 6), com uma marcação leve provavelmente relacionada aos prolongamentos de neurônios. Na *pars intermedia* da adeno-hipófise houve inflamação em 55% dos casos, destas em 63,64% dos casos a lesão foi leve e em 36,36% moderada. A IHQ foi positiva em apenas um caso (5%) (Figura 7) com marcação moderada observada no citoplasma de células basófilas. Na *pars distalis* da adeno-hipófise houve inflamação em 15%, sendo a lesão leve em

66,67% e moderada em 33,33%. Não foi observada marcação na IHQ nessa porção em nenhum dos casos avaliados.

Demais tecidos avaliados

Na histopatologia e IHQ realizadas nos demais tecidos não foram encontradas lesões ou antígenos do vírus rábico.

4 DISCUSSÃO

Em todos os bovinos com raiva analisados no presente estudo foi observada inflamação mononuclear de intensidade variável nos gânglios trigêmeos, espinhais (lombares, cervicais e torácicos), estrelados e celíacos e na medular da adrenal. Inflamação semelhante foi observada também em 85% das neuro-hipófises analisadas, em 55% das *pars intermedia* e em 15% das *pars distalis* da adeno-hipófise. A inflamação tem sido frequentemente associada à presença do antígeno da raiva nos estudos em tecidos humanos fora do SNC, embora não seja considerada específica (JACKSON et al., 1999). Nos bovinos, do presente estudo, apenas nos gânglios espinhais e trigêmeos esta associação foi frequente, como descrito nos humanos. Já nos gânglios estrelados e celíacos, medular da adrenal, neuro-hipófise e *pars intermedia* da adeno-hipófise a presença de antígenos nas áreas com inflamação foi menos frequente. A inflamação observada nos casos negativos na IHQ deste estudo, também pode estar associada ao antígeno da raiva, porém em quantidade insuficiente para detecção IHQ. A evolução clínica mais curta da doença nos bovinos (BARROS et al., 2006; PEDROSO et al. 2009) em relação aos humanos (JACKSON et al., 1999; JOGAI, RADOTRA, BANERJEE, 2002), talvez possa ser um fator que justifique a menor quantidade de antígenos em tecidos fora do SNC. No presente estudo, em um bovino submetido à eutanásia, a IHQ foi negativa mesmo em

locais de marcação frequente (gânglios trigêmeo e espinhal lombar), indicando que a evolução tenha sido um fator importante. Porém, em humanos alguns estudos não encontraram correlação entre o período de incubação e o tempo de duração dos sinais clínicos até a morte, com a migração centrífuga (JACKSON et al., 1999; JOGAI, RADOTRA, BANERJEE, 2002).

A coleta do gânglio trigêmeo tem sido recomendada em casos suspeitos de raiva bovina (PEDROSO et al., 2009; RECH et al., 2006) e os dados dos casos aqui apresentados corroboram esta indicação. Nos 33 gânglios analisados neste estudo, foi observada inflamação em 100% e imunodeteção do antígeno rábico em 90,9%. Tais achados são semelhantes aos descritos na literatura que encontrou inflamação em 95% (RECH et al., 2006) e marcação IHQ em 100% (PEDROSO et al., 2009). No presente estudo apenas três bovinos com raiva foram negativos na IHQ dos gânglios trigêmeos, em dois destes as amostras apresentavam uma pequena quantidade de neurônios. O outro bovino negativo teve o curso clínico da doença abreviado, uma vez que foi submetido à eutanásia. Neste caso a não marcação IHQ provavelmente foi resultado da menor disseminação do vírus, devido à interrupção do curso da doença (BARROS et al., 2006).

Almeida et al. (2002) relataram que entre os vários locais de ataques do *Desmodus rotundus* nos bovinos, estão incluídos o focinho e as orelhas. Essas regiões recebem inervação motora pelo nervo facial, que pode servir de via de acesso do vírus da raiva aos neurônios do gânglio trigêmeo, uma vez que estes são envolvidos em atividade reflexa com neurônios do núcleo do nervo facial. Outra provável via de acesso do vírus ao gânglio trigêmeo é pela migração centrípeta a partir de terminações nervosas de seus neurônios sensoriais na pele. Essa via sensorial tem sido demonstrada (JACKSON et al., 2010; ROSSITER; HSU; JACKSON, 2009). Os neurônios do gânglio trigêmeo formam a via sensorial aferente geral de tecidos da cabeça (DE LAHUNTA; GLASS, 2009).

Lesões nestes neurônios causam redução ou perda da sensibilidade cutânea e perda ou redução nos reflexos na cabeça (DE LAHUNTA; GLASS, 2009). As lesões observadas nos gânglios trigêmeos dos bovinos deste estudo podem justificar estes sinais, que podem estar presentes em casos de raiva (BARROS et al., 2006; PEDROSO et al., 2009).

Os gânglios espinhais tiveram resultados semelhantes aos encontrados nos gânglios trigêmeos, particularmente os da região lombar. Estes tiveram inflamação em todos os casos e marcação IHQ em 92,31%, a qual não foi positiva apenas no bovino submetido à eutanásia. Esses dados demonstram que a coleta dos gânglios espinhais lombares pode contribuir para o diagnóstico da raiva bovina, da mesma forma como se preconiza a coleta do gânglio trigêmeo (PEDROSO et al., 2009; RECH et al., 2006).

Uma das explicações, para as lesões observadas nos gânglios espinhais, pode ser pela chegada do vírus da raiva via axonal retrógrada. Entre os principais locais de ataque do *Desmodus rotundus*, está a região do dorso de bovinos (ALMEIDA et al., 2002; PEREIRA; GITTI; CABRAL, 2010). Ao ser inoculado nessa região, o vírus através da junção neuromuscular, atinge neurônios motores da medula espinhal (JACKSON, 2008). Estes se conectam com interneurônios que fazem sinapse com neurônios dos gânglios espinhais (DE LAHUNTA; GLASS, 2009).

A entrada do vírus rábico pela via sensória tem sido demonstrada. Nessa o vírus atinge inicialmente o gânglio espinhal pela migração centrípeta (ROSSITER; HSU; JACKSON, 2009). Os neurônios dos gânglios espinhais se conectam com interneurônios envolvidos com atividade reflexa ou com neurônios que se projetam cranialmente para o tronco encefálico, como parte da via de percepção consciente (DE LAHUNTA; GLASS, 2009). Fornecendo acesso ao vírus para o SNC. Essa via sensória pode ser importante na raiva transmitida por morcegos, uma vez que estes vetores produzem mordidas mais

superficiais em relação a vetores terrestres. Na pele e tecido subcutâneo a inervação sensorial e autonômica é mais abundante (JACKSON, 2010).

Os neurônios dos gânglios espinhais formam a via aferente proprioceptiva geral e dessa forma as lesões mais intensas nesses gânglios observadas nos bovinos deste estudo podem estar correlacionadas com sinais de redução e perda da sensibilidade cutânea, ataxia e incoordenação de membros pélvicos (DE LAHUNTA; GLASS, 2009). Esses sinais são frequentemente observados na raiva bovina (BARROS et al., 2006; PEDROSO et al., 2009).

Foi ainda, observada marcação IHQ em 41,67% dos gânglios estrelados e em 16,67% dos gânglios celíacos. As lesões nesses gânglios foram principalmente inflamatórias, sendo as lesões degenerativas e necróticas menos frequentes e mais brandas que as observadas nos demais gânglios.

As fibras que inervam a medular da adrenal projetam-se através do gânglio celíaco (PODLECH et al., 1996). A observação de lesões e a marcação nas duas áreas demonstram que este circuito foi também afetado na dispersão viral.

Todas as 17 adrenais avaliadas apresentaram inflamação mononuclear na região medular circundando principalmente vasos e nervos. Lesões semelhantes têm sido descritas em casos de raiva em humanos (ALMEIDA et al., 1986; JACKSON et al., 1999; JOGAI; RADOTRA; BANERJEE, 2002; TOBIUME et al., 2009). Em animais, lesões semelhantes foram também relatadas em *Vulpes vulpes* (raposas), *Mephitis mephitis* (cangambás) (BALACHANDRAM; CHARLTON, 1994) e bovinos (MESQUITA et al., 2011). Tais resultados indicam que a avaliação da adrenal também seja importante para auxiliar no diagnóstico e entendimento da patogênese da doença. Glóbulos hialinos no citoplasma de feocromócitos foram observados em 88,24% das adrenais dos bovinos com raiva deste estudo. Glóbulos semelhantes têm sido descritos em várias espécies de animais de laboratórios (MCCONNEL;

TALLEY, 1977), humanos (HART; CYRUS, 1968; SUGIE et al., 2005) e bovinos (MESQUITA et al., 2011). Embora seja uma lesão inespecífica, um número maior dessas inclusões tem sido relacionado a doenças neurológicas em humanos (HART; CYRUS, 1968; SUGIE et al., 2005). Essas inclusões já foram observadas em casos de raiva em humanos (ALMEIDA et al., 1986) e bovinos (MESQUITA et al., 2011). Os dados do presente estudo reforçam essa associação.

A imunodeteção de antígenos do vírus rábico, na medular da adrenal, foi observada em apenas um caso deste estudo. Neste, houve marcação intensa no citoplasma de feocromócitos. Trabalhos com IHQ em humanos também descrevem o antígeno rábico principalmente na medular da adrenal, com marcação adicional em plexos nervosos da cápsula (JACKSON et al., 1999; JOGAI; RADOTRA; BANERJEE, 2002; TOBIUME et al., 2009). O antígeno também tem sido detectado em feocromócitos e fibras nervosas da medular da adrenal em *Vulpes vulpes* (raposas) e *Mephitis mephitis* (cangambás), experimentalmente infectados pelo vírus rábico (BALACHANDRAM; CHARLTON, 1994).

A via de acesso do vírus à medular da adrenal não é conhecida. No entanto, essa região recebe inervação principalmente de neurônios sensoriais do gânglio espinal e de neurônios simpáticos da coluna intermediária da medula espinal (ZHOU; OLDFIELD; LIVETT, 1991). Assim, a possibilidade de que neurônios da coluna dorsal infectados, pela via motora ou sensorial, disseminem o vírus nesses circuitos é viável. O mesmo neurônio da coluna dorsal pode fazer conexões com neurônios sensoriais da pele e neurônios sensoriais viscerais. Este fenômeno é denominado reflexo viscerocutâneo ou dor referida (DE LAHUNTA; GLASS, 2009; DIRKSEN, 2008). Embora a via exata de acesso do vírus rábico à medular da adrenal necessite de maiores estudos, tais conexões poderiam justificar o acesso do vírus à medular da adrenal.

Na neuro-hipófise havia inflamação mononuclear em 85%, com um caso positivo na IHQ. Na *pars intermedia* da adeno-hipófise houve inflamação em 55% dos casos, com um caso positivo na IHQ. Na *pars distalis* da adeno-hipófise houve inflamação em 15%, sem marcação IHQ. Inflamação semelhante na neuro-hipófise, tem sido descrita em bovinos com raiva em 30,77% dos casos (RECH et al., 2006). Em casos de raiva em humanos foi também descrita marcação IHQ nos lobos anterior (*pars distalis*) e posterior (*pars intermedia* e *pars nervosa*) na hipófise (TOBIUME ET AL., 2009). Os dados da literatura associados ao do presente estudo indicam a importância da observação também da hipófise em casos suspeitos de raiva.

5 CONCLUSÕES

Os dados do presente estudo indicam que em bovinos com sinais neurológicos, além da observação do complexo hipófise, *rete mirabile* e gânglio trigêmeo, a análise de outros gânglios, particularmente o espinhal lombar, e da medular da adrenal pode contribuir para o diagnóstico de raiva e entendimento dos sinais clínicos e da patogênese da doença.

Agradecimentos: À FAPEMIG por financiar este estudo e à CAPES pela bolsa de mestrado. Aos funcionários do IMA pelos resultados de IFD para raiva e pelo acesso aos casos de Perdões.

REFERÊNCIAS

AJAYI, B.B.; RABO, J.S.; BABA, S.S. Rabies in apparently healthy dogs: histological and immunohistochemical studies. **The Nigerian Postgraduate Medical Journal**, v. 13, n. 2, p. 128-134, June 2006.

ALMEIDA, E.O.; MOREIRA, E.C.; NAVEDA, L.A.B.; HERRMANN, G.P. Combate ao *Desmodus rotundus rotundus* (E. Geoffroy, 1810) na região cárstica de Cordisburgo e Curvelo, Minas Gerais. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 54, n. 2, p. 1-13, abr. 2002.

ALMEIDA, H.O.; TEIXEIRA, V.P.A.; OLIVEIRA G.; BRANDÃO, M.C.; GOBBI, H. Medulite supra-renalica em casos de raiva humana. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 81, n. 4, p. 439-442, out./dez. 1986.

BAGÓ, Z.; REVILLA-FERNÁNDEZ, S.; ALLERBERGER, F. Value of immunohistochemistry for rapid ante mortem rabies diagnosis. **Internacional Journal of Infectious Diseases**, v. 9, n. 6, p. 351-352, Nov. 2005.

BALACHANDRAM, A.; CHARLTON, K. Experimental Rabies Infection of Non-nervous Tissues in Skunks (*Mephitis mephitis*) and Foxes (*Vulpes vulpes*). **Veterinary Pathology**, v. 31, n. 1, p. 93-102, Jan. 1994.

BARROS, C.S.L.; DRIEMEIER, D.; DUTRA, I.S.; LEMOS, R.A.A. **Doenças do sistema nervoso de bovinos no Brasil**. São Paulo: Coleção Vallée, 2006. cap. 5, p. 21-28.

DE LAHUNTA, A.; GLASS, E. **Veterinary Neuroanatomy and Clinical Neurology**. 3th ed. St. Louis: Saunders. Elsevier, 2009. 540 p.

DELPIETRO, H.A.; LARGHI, O.P.; RUSSO, R.G. Virus isolation from saliva and salivary glands of cattle naturally infected with paralytic rabies. **Preventive Veterinary Medicine**, v. 48, n. 3, p. 223-228, Feb. 2001.

DIRKSEN, G. Sistema Digestivo. In: DIRKSEN, G.; GRÜNDER, H.-D.; STÖBER, M. **Rosenberger, exame clínico dos bovinos**. 3 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2008. cap. 7, p. 166-228.

HART, M.N.; CYRUS, A. Hyaline globules of the adrenal medulla. **American Journal of Clinical**, v. 49, n. 3, p. 387-391, Mar. 1968.

JACKSON, A.C. Rabies. **Neurologic Clinics**, v. 26, n. 3, p. 717-726, Aug. 2008.

JACKSON, A.C.; YE, H.; PHELAN, C.C.; RIDAURA-SANZ, C.; ZHENG, Q.; LI, Z.; WAN, X.; LOPEZ-CORELLA, E. Extraneural Organ Involvement in Human Rabies. **Laboratory Investigation**, v. 79, n. 8, p. 945-951, Aug. 1999.

JOGAI, S.; RADOTRA, B.D.; BANERJEE, A.K. Rabies viral antigen in extracranial organs: a post-mortem study. **Neuropathology and Applied Neurobiology**, v. 28, n. 4, p. 334-338, Aug. 2002.

McCONNEL, E.E.; TALLEY, F.A. Intracytoplasmic hyaline globules in the adrenal medulla of laboratory animals. **Veterinary Pathology**, v. 14, n. 5, p. 335-340, Sep. 1977.

MESQUITA, L.P.; ABREU, C.C.; WOUTERS, F.; VARASCHIN, M.S.; BEZERRA JR., P.S. Inclusões intracitoplasmáticas hialinas na medular da adrenal de bovinos. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 63, n. 1, p. 247-249, fev. 2011.

MORAIS, C.F.; ASSIS, R.V.C. Cardiac involvement in human rabies. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 27, n. 3, p. 145-149, May/June 1985.

PEDROSO, P.M.O.; COLODEL, E.M.; PESCADOR, C.A.; ARRUDA, L.P.; DRIEMEIER, D. Aspectos clínicos e patológicos em bovinos afetados por raiva com especial referência ao mapeamento do antígeno rábico por imuno-histoquímica. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 29, n. 11, p. 899-904, nov. 2009.

PEDROSO, P.M.O.; PESCADOR, C.A.; BANDARRA, P.M.; RAYMUNDO, D.L.; BORBA, M.R.; WOUTERS, F.; BEZERRA JÚNIOR, P.S.; DRIEMEIER, D. Padronização da técnica de imuno-histoquímica para raiva em amostras de tecido do sistema nervoso central de bovinos fixadas em formol e emblocadas em parafina. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 28, n. 12, p. 627-632, dez. 2008.

PEREIRA, S.N.; GITTI, C.B.; CABRAL, M.M.O. Análise da distribuição da região dos ferimentos provocados por morcegos hematófagos *Desmodus rotundus* (Geoffroy, 1810) em bovinos sob condições de campo. **Arquivo do Instituto Biológico**, v. 77, n. 2, p. 203-208, abr./jun. 2010.

PODLECH, J.; HENGERER, F.; FLECK, M.; WALEV, I.; FALKE, D. Replication of herpes simplex virus type 1 and 2 in the medulla of the adrenal gland after vaginal infection of mice. **Archives of Virology**, v. 141, n. 10, p. 1999-2008, May 1996.

RECH, R.R.; RISSI, D.R.; SILVA, M.C.; INKELMANN, M.A.; BARROS, C.S.L. Histomorfologia do gânglio de Gasser, da *rete mirabile* carotídea e da hipófise de bovinos: estudo de 199 casos. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 26, n. 2, p. 105-111, abr./jun. 2006.

SINGH, H.; SINGH, C.K. Ante-mortem diagnosis of rabies from body secretions and mucosal impression smears in experimentally infected buffalo calves. **Indian Journal of Animal Sciences**, v. 81, n. 3, p. 205-208, Mar. 2011.

SOTA, C. A. **Control of bovine paralytic rabies in Latin America and the Caribbean**. 1993. Disponível em: <<http://www.fao.org/docrep/v0600t/v0600T0a.htm#control>>. Acesso em: 15 jan. 2012.

SUGIE, M.; GOTO, J.; KAWAMURA, M. Increased norepinephrine-associated adrenomedullary inclusions in Parkinson's disease. **Pathology International**, v. 55, n. 3, p. 130-136, Mar. 2005.

SUMMERS, B.A., CUMMINGS, J.F.; DE LAHUNTA, A. Inflammatory Diseases of the Central Nervous System. In: SUMMERS, B.A., CUMMINGS, J.F.; DE LAHUNTA, A. **Veterinary Neuropathology**. 1st ed. St. Louis: Mosby, 1994. p. 95-188.

TOBIUME, M.; SATO, Y.; KATANO, H.; NAKAJIMA, N.; TANAKA, K.; NOGUCHI, A.; INOUE, S.; HASEGAWA, H.; IWASA, Y.; TANAKA, J.; HAYASHI, H.; YOSHIDA, S.; KURANE, I.; SATA, T. Rabies virus dissemination in neural tissues of autopsy cases due to rabies imported into Japan from the Philippines: Immunohistochemistry. **Pathology International**, v. 59, n. 8, p. 555-566, Aug. 2009.

VIEIRA, L.F.P.; PEREIRA, S.R.F.G.; GALANTE, A.C.; CASTILHO, J.G.; OLIVEIRA, R.N.; BRANDÃO, P.E.; KOTAIT, I. Detection of rabies virus nucleoprotein-RNA in several organs outside the Central Nervous System in naturally-infected vampire bats. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 31, n. 10, p. 922-925, Oct. 2011.

ZHOU, X.-F.; OLDFIELD, B.J.; LIVETT, B.G. Substance P-containing sensory neurons in the rat dorsal root ganglia innervate the adrenal medulla. **Journal of the Autonomic Nervous System**, v. 33, n. 3, p. 247-254, May 1991.

LEGENDAS DAS FIGURAS

Figura 1: Gânglio espinhal, bovino, raiva. Neuronofagia caracterizada pela presença de células mononucleares entremeadas aos fragmentos do pericário. HE. Barra: 50 μm .

Figura 2: Gânglio espinhal, bovino, raiva. Nódulos de Nageotte caracterizados pela hipertrofia de células satélites em locais de perda do corpo neuronal (setas). HE. Barra: 50 μm .

Figura 3: Histologia e imuno-histoquímica de gânglios na raiva bovina. Intensidade das alterações microscópicas e imunodeteção do antígeno rábico.

Figura 4: Gânglio espinhal, bovino, raiva. Imunodeteção do antígeno rábico no pericário e em prolongamento de neurônio. Método estreptavidina, biotina peroxidase, revelação com Vector® NovaRED. Barra: 50 μm .

Figura 5: Medular da adrenal, bovino, raiva. Inflamação mononuclear e forte marcação IHQ para raiva no citoplasma de feocromócitos. Método estreptavidina, biotina peroxidase, revelação com Vector® NovaRED. Barra: 50 μm .

Figura 6: Neuro-hipófise, bovino, raiva. Imunodeteção do antígeno rábico, provavelmente relacionada aos prolongamentos de neurônios. Método estreptavidina, biotina peroxidase, revelação com Vector® NovaRED. Barra: 50 μm .

Figura 7: *Pars intermedia* da adeno-hipófise, bovino, raiva. Imunodeteção do antígeno rábico no citoplasma de células basófilas. Método estreptavidina, biotina peroxidase, revelação com Vector® NovaRED. Barra: 50 μm .

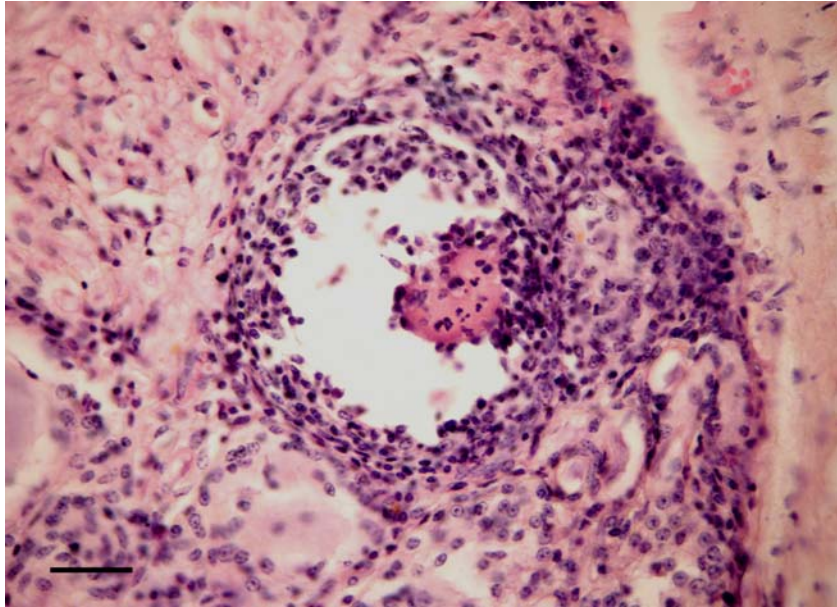


Figura 1.

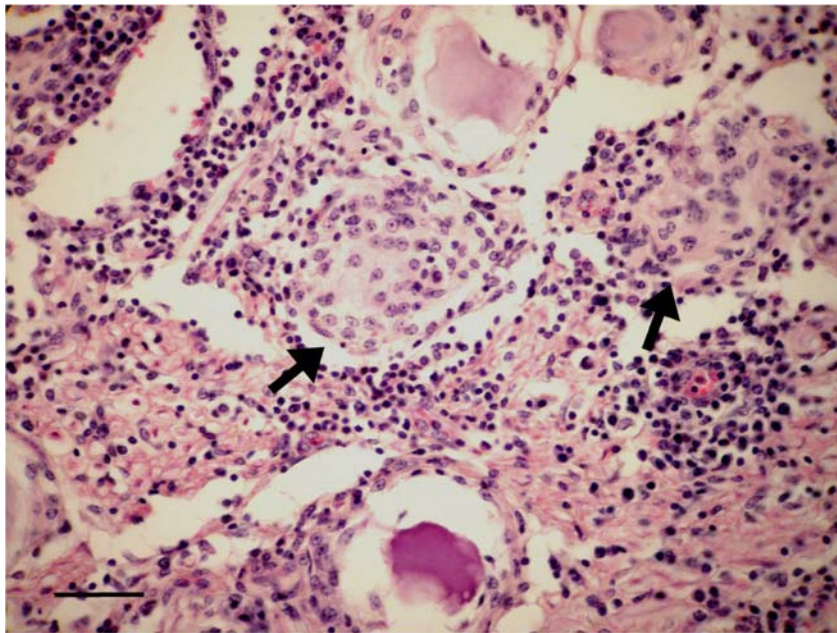


Figura 2.

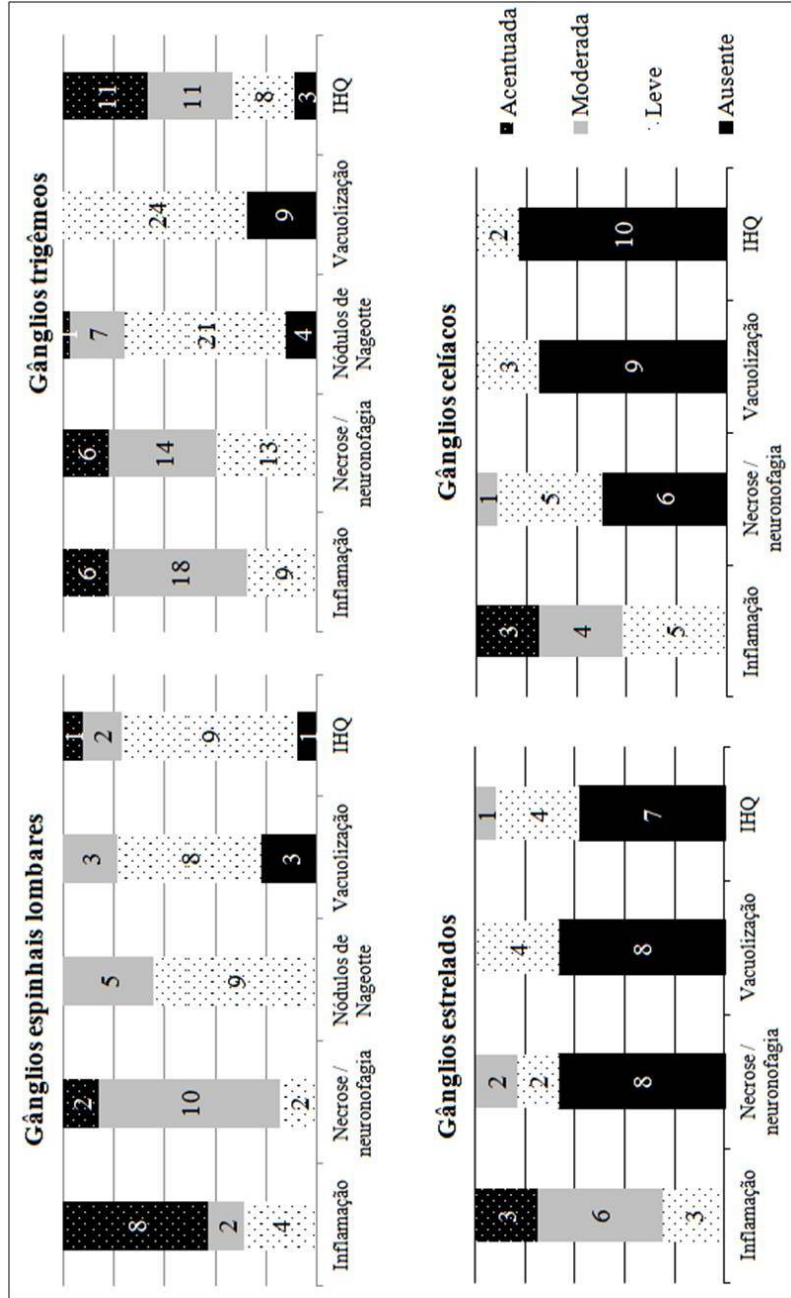


Figura 3.

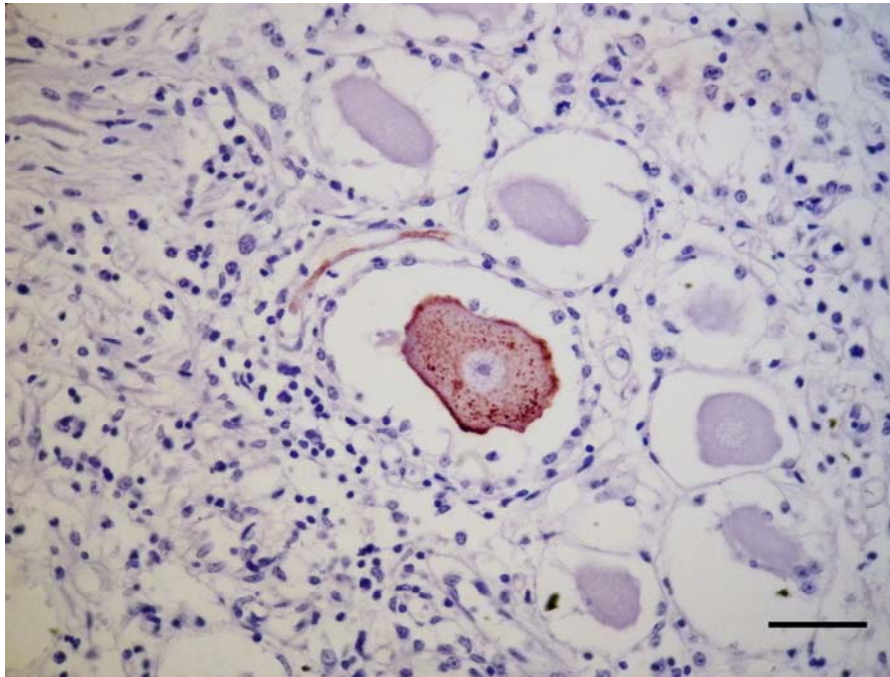


Figura 4.

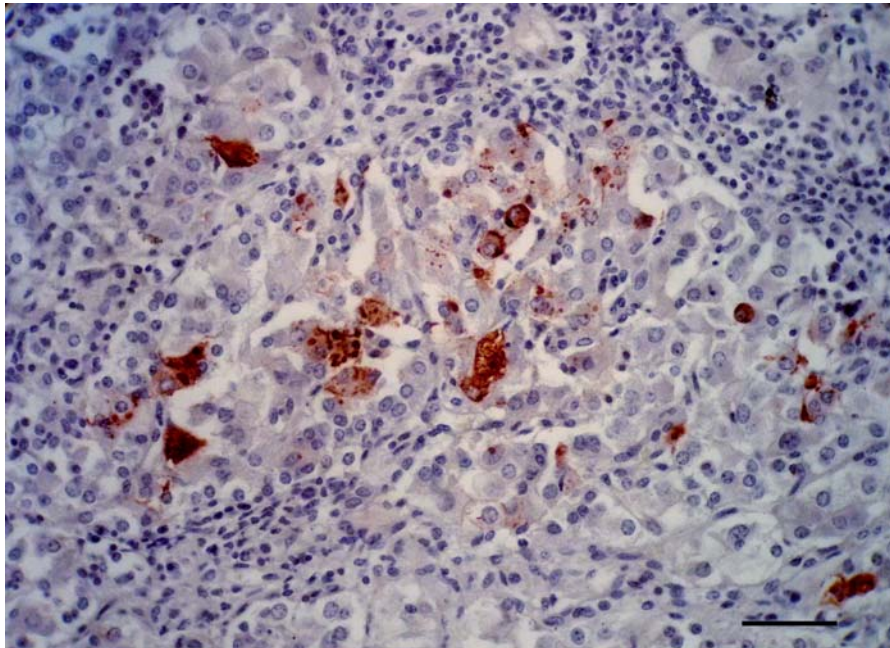


Figura 5.

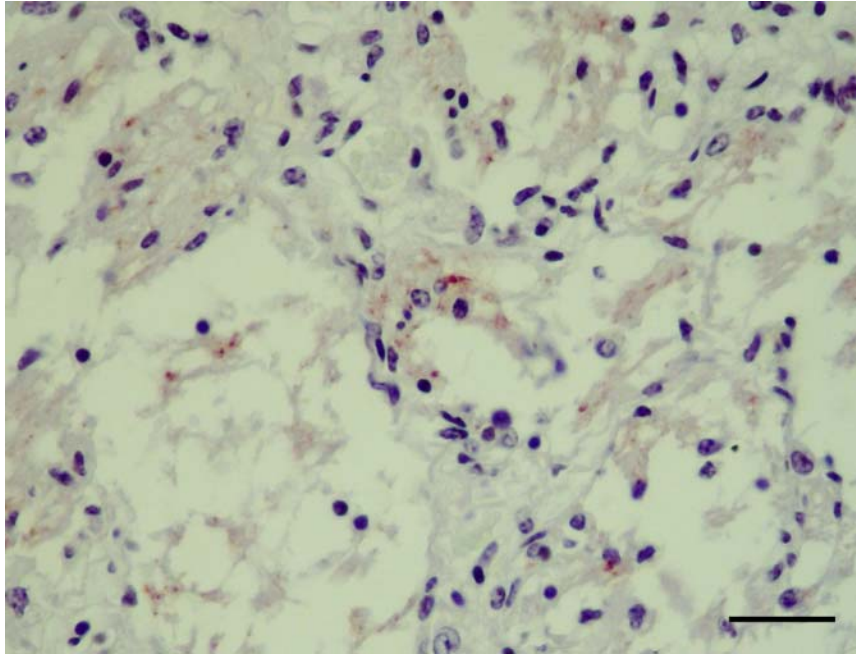


Figura 6.

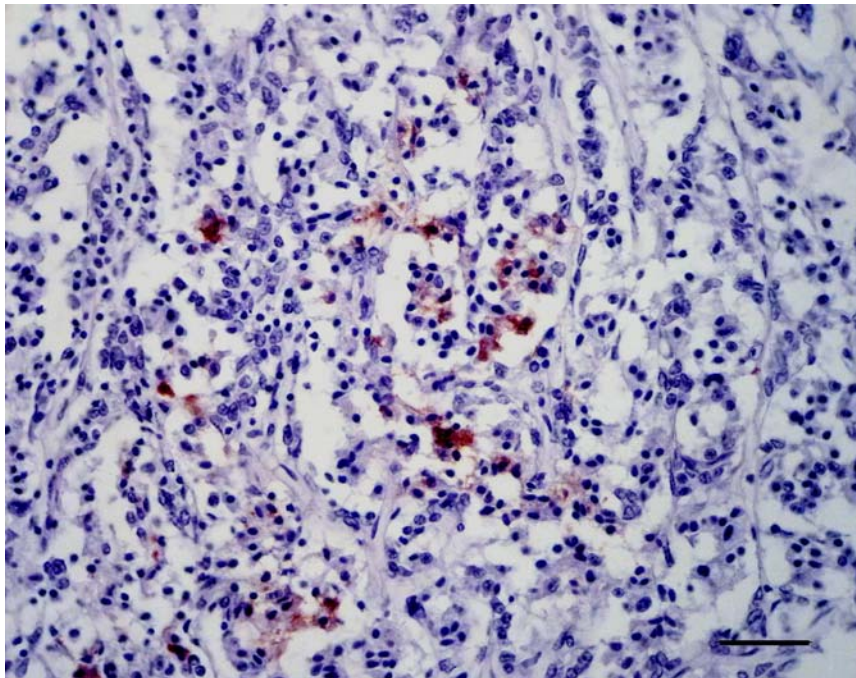


Figura 7.

ANEXOS**ANEXO A**

Prof.s. F. Hernández and J.F. Madrid, Editors
School of Medicine
University of Murcia
30100 Espinardo – MURCIA
SPAIN Fax: 34-868887508 / 34-868884150

Histology and
Istopathology
<http://www.hh.um.es>
e-mail: fhcalvo@um.es / jfmadrid@um.es

Our reference: B-4551

December 28, 2011

Dr. Pedro Soares Becerra Jr. et al.
Patologia Veterinária, Departamento de Medicina Veterinária
Universidade Federal de Lavras
Caixa Postal 3037
Lavras-MG. CEP: 37200-000. Brasil

E-mail: bezerraj@dmv.ufla.br

Dear Doctors,

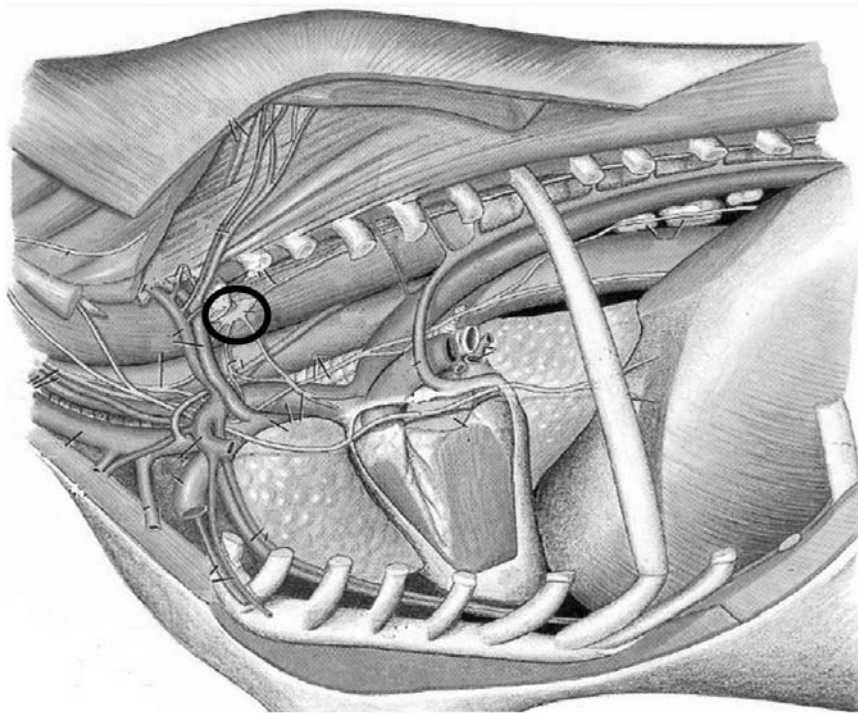
We are pleased to inform you that the paper entitled "DOMESTIC MICROWAVE PROCESSING FOR RAPID IMMUNOHISTOCHEMICAL DIAGNOSIS OF BOVINE RABIES" (authors: C.C.Abreu, P.A.Nakayama, C.I.Nogueira, L.P.Mesquita, P.F.R.Lopes, M.S.Varaschin, J. do N.Seixas, E.Ferreira and P.S.Bezerra Jr.) is acceptable for publication in HISTOLOGY AND HISTOPATHOLOGY, but it is necessary that you prepare the paper according to the editor's and referee's comments.

Publication of your paper will proceed on receipt the payment of 950 EUROS to cover part of the printing cost. The color printed photos are very expensive.

Yours sincerely,



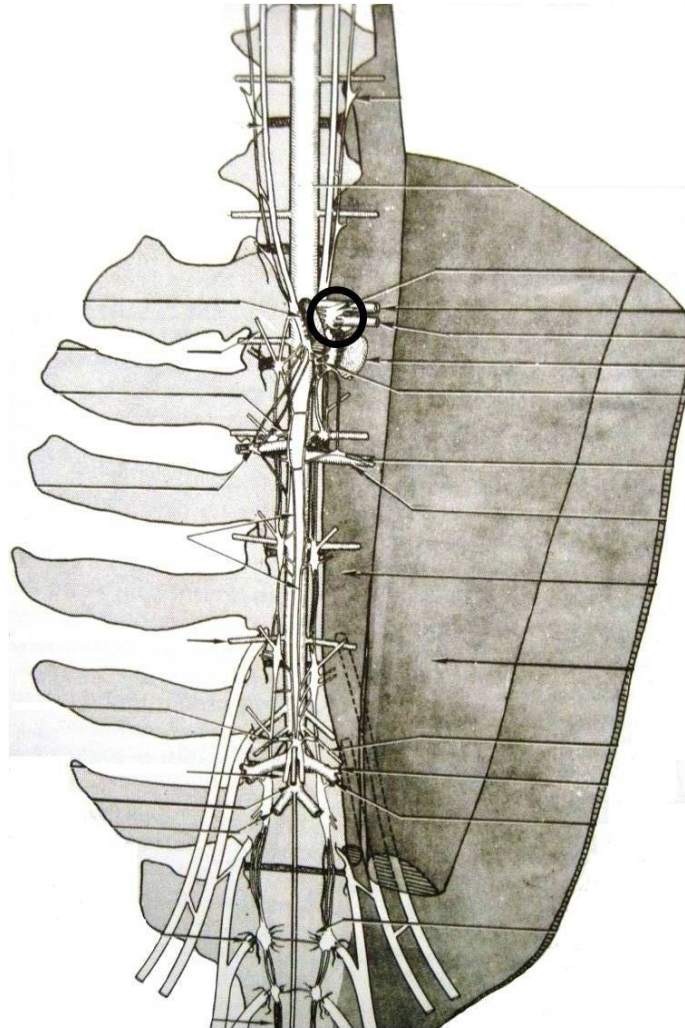
Prof. Francisco Hernández-Calvo, Founder and Editor
HISTOLOGY AND HISTOPATHOLOGY- (Impact Factor of 2010: 2.502)
e-mail: fhcalvo@um.es

ANEXO B

Cavidade torácica bovino. Gânglio estrelado (cervicotorácico) localizado ventralmente à junção costovertebral da primeira costela e ao primeiro espaço intercostal, conforme indicado pelo círculo. Adaptado de Popesko (1990).

POPESKO, P. Atlas de anatomia topográfica dos animais domésticos. 1 ed. São Paulo: Manole, 1990. v. II, p. 21.

ANEXO C



Vista ventral pós-diafragmática bovino. Gânglio celíaco localizado próximo da origem da artéria celíaca, cranial à adrenal, conforme indicado pelo círculo. Adaptado de Ghoshal (1986).

GHOSHAL, N.G. Inervação autônoma abdominal, pélvica e caudal. In: GETTY, R. Anatomia dos animais domésticos. 5 ed. Rio de Janeiro: Guanabara, 1986. v.1, cap. 35, p. 1094.

ANEXO D – Tabelas

Tabela 1	Histopatologia e imuno-histoquímica (IHQ) dos gânglios trigêmeos coletados dos bovinos com raiva de 2000 a 2011.....	70
Tabela 2	Histopatologia e imuno-histoquímica (IHQ) dos gânglios espinhais lombares coletados dos bovinos com raiva de 2009 a 2011.....	71
Tabela 3	Histopatologia e imuno-histoquímica (IHQ) dos gânglios espinhais cervicais coletados dos bovinos com raiva de 2009 a 2011.....	72
Tabela 4	Histopatologia e imuno-histoquímica (IHQ) dos gânglios espinhais torácicos coletados dos bovinos com raiva de 2011.....	72
Tabela 5	Histopatologia e imuno-histoquímica (IHQ) dos gânglios estrelados coletados dos bovinos com raiva de 2009 a 2011.....	72
Tabela 6	Histopatologia e imuno-histoquímica (IHQ) dos gânglios celíacos coletados dos bovinos com raiva de 2009 a 2011.....	73
Tabela 7	Histopatologia, coloração de ácido periódico de Schiff (PAS) e imuno-histoquímica (IHQ) das adrenais coletadas dos bovinos com raiva de 2001 a 2011.....	74
Tabela 8	Histopatologia e IHQ das hipófises coletadas dos bovinos com raiva de 2001 a 2011.....	75

Tabela 1 Histopatologia e imuno-histoquímica (IHQ) dos gânglios trigêmeos coletados dos bovinos com raiva de 2000 a 2011

Identificação	Inflamação	Nódulos de Nageotte	Necrose / neuronofagia	Vacuolização	CN	IHQ
1 351	+++	++	++	+	P	++
2 352	++	++	++	+	P	+++
3 364	++	+	++	+	A	+++
4 367	++	+++	++	+	P	++
5 394	++	+	++	+	A	++
6 423	++	+	+	+	A	+++
7 444	+	+	+	+	P	+++
8 475	+	+	+	0	P	++
9 554	+++	+	++	+	P	+++
10 619	++	+	+	+	P	++
11 N41-05	+	+	+	+	A	+
12 N100-05	+	+	+	0	P	++
13 N101-05	+++	+	++	+	P	++
14 N113-05	++	++	+	+	P	++
15 N115-05	++	+	+++	0	A	+++
16 N95-06	+++	++	+++	+	P	+++
17 N52-09	++	+	++	+	P	+
18 N65-09	++	+	++	+	P	+++
19 N103-09	++	++	+++	0	A	+++
20 N03-10	++	++	+++	+	P	+
21 N141-10	+	+	+	0	P	+++
22 N142-10	+	0	+	0	A	+++
23 N10-11	+	+	+++	0	A	+
24 N29-11	++	+	++	0	A	++
25 N38-11	+++	+	+++	0	P	+
26 N48-11	+	0	++	+	P	++
27 N49-11	++	+	++	+	A	0
28 N84-11	++	++	+	+	A	++
29 N92-11	+	+	+	+	A	0
30 N96-11	++	0	++	+	A	0

Tabela 1, conclusão

Identificação	Inflamação	Nódulos de Nageotte	Necrose / neuronofagia	Vacuolização	CN	IHQ
31 N117-11	++	+	+	+	A	+
32 N255-11	++	0	+	+	A	+
33 N263-11	+++	+	++	+	P	+

CN: corpúsculos de Negri. A: ausente. P: presente. +++ acentuado. ++ moderado. + leve. 0 ausente.

Tabela 2 Histopatologia e IHQ dos gânglios espinhais lombares coletados dos bovinos com raiva de 2009 a 2011

Identificação	Inflamação	Nódulos de Nageotte	Necrose / neuronofagia	Vacuolização	CN	IHQ
1 N52-09	+++	++	++	++	A	+
2 N65-09	+++	+	+++	++	A	+
3 N103-09	++	++	++	0	A	+
4 N03-10	++	+	++	+	A	++
5 N141-10	+	++	++	+	A	+
6 N142-10	+	+	++	0	A	-
7 N38-11	+++	++	++	++	P	++
8 N48-11	+++	+	++	+	A	+
9 N49-11	+++	+	+++	0	A	+++
10 N84-11	+	+	+	+	A	+
11 N92-11	+	+	+	+	A	+
12 N96-11	+++	+	++	+	A	0
13 N117-11	+++	+	++	+	A	+
14 N255-11	+++	++	++	+	A	+

CN: corpúsculos de Negri. A: ausente. P: presente. +++ acentuado. ++ moderado. + leve. 0 ausente. - não realizado.

Tabela 3 Histopatologia e IHQ dos gânglios espinhais cervicais coletados dos bovinos com raiva de 2009 a 2011

Identificação	Inflamação	Nódulos de Nageotte	Necrose / neuronofagia	Vacuolização	CN	IHQ
1 N52-09	+++	++	+	++	A	0
2 N65-09	++	++	+++	+	P	++
3 N92-11	+	+	+	+	A	0
4 N96-11	++	++	++	++	A	0

CN: corpúsculos de Negri. A: ausente. P: presente. +++ acentuado. ++ moderado. + leve. 0 ausente.

Tabela 4 Histopatologia e IHQ dos gânglios espinhais torácicos coletados dos bovinos com raiva de 2011

Identificação	Inflamação	Nódulos de Nageotte	Necrose / neuronofagia	Vacuolização	CN	IHQ
1 N92-11	+	+	+	++	A	0
2 N96-11	++	+	++	+	A	+

CN: corpúsculos de Negri. A: ausente. ++ moderado. + leve. 0 ausente.

Tabela 5 Histopatologia e IHQ dos gânglios estrelados coletados dos bovinos com raiva de 2009 a 2011

Identificação	Inflamação	Necrose/neuronofagia	Vacuolização	IHQ
1 N52-09	+++	0	0	+
2 N03-10	++	0	0	0
3 N141-10	+	0	0	0
4 N10-11	+	0	0	0
5 N33-11	+++	++	0	++
6 N38-11	++	+	+	0
7 N48-11	++	+	+	+
8 N49-11	++	0	+	0
9 N84-11	++	0	0	+
10 N92-11	+	0	0	0
11 N117-11	++	++	0	+
12 N255-11	+++	0	+	0

+++ acentuado. ++ moderado. + leve. 0 ausente.

Tabela 6 Histopatologia e IHQ dos gânglios celíacos coletados dos bovinos com raiva de 2009 a 2011

Identificação	Inflamação	Necrose/neuronofagia	Vacuolização	IHQ
1 N52-09	+++	0	0	+
2 N65-09	++	+	+	0
3 N103-09	+++	+	+	0
4 N141-10	+	+	0	0
5 N10-11	+	0	0	0
6 N29-11	++	0	0	0
7 N38-11	+	0	0	+
8 N48-11	+++	++	+	0
9 N49-11	+	0	0	0
10 N92-11	+	0	0	0
11 N117-11	++	+	0	0
12 N255-11	++	+	0	0

+++ acentuado. ++ moderado. + leve. 0 ausente.

Tabela 7 Histopatologia, coloração de ácido periódico de Shiff (PAS) e imuno-histoquímica (IHQ) das adrenais coletadas dos bovinos com raiva de 2001 a 2011

Identificação	Inflamação	Glóbulos hialinos	Zona afetada	IHQ
1 444	+++	++	clara e escura	+++
2 N52-09	++	+++	clara e escura	0
3 N65-09	++	+	clara e escura	0
4 N103-09	+	0	-	0
5 N142-10	++	+	clara e escura	0
6 N01-11	+	++	clara e escura	0
7 N10-11	++	0	-	0
8 N29-11	+++	+	escura	0
9 N33-11	++	+	clara e escura	0
10 N38-11	++	+	clara e escura	0
11 N48-11	+	+	clara e escura	0
12 N49-11	+	+++	clara e escura	0
13 N84-11	+	+	clara e escura	0
14 N92-11	+	+	clara	0
15 N96-11	+	+	clara e escura	0
16 N117-11	++	+	clara e escura	0
17 N255-11	++	++	clara e escura	0

+++ acentuado. ++ moderado. + leve. 0 ausente. - casos autolisados.

Tabela 8 Histopatologia e IHQ das hipófises coletadas dos bovinos com raiva de 2001 a 2011

Identificação	<i>Pars nervosa</i>		<i>Pars intermedia</i>		<i>Pars distalis</i>	
	Inflamação	IHQ	Inflamação	IHQ	Inflamação	IHQ
1 554	++	0	+	0	+	0
2 619	++	0	0	0	0	0
3 N84-04	+++	0	0	0	0	0
4 N52-09	++	0	+	0	0	0
5 N65-09	++	0	0	0	0	0
6 N103-09	+	0	+	++	+	0
7 N03-10	0	0	++	0	0	0
8 N141-10	++	0	0	0	++	0
9 N142-10	0	0	+	0	0	0
10 N10-11	+	0	0	0	0	0
11 N29-11	+	0	0	0	0	0
12 N38-11	++	0	+	0	0	0
13 N48-11	++	0	++	0	0	0
14 N49-11	+++	0	++	0	0	0
15 N84-11	++	+	+	0	0	0
16 N92-11	+	0	0	0	0	0
17 N96-11	0	0	0	0	0	0
18 N117-11	++	0	0	0	0	0
19 N255-11	+	0	+	0	0	0
20 N263-11	++	0	++	0	0	0

+++ acentuado. ++ moderado. + leve. 0 ausente.