



UNIVERSIDADE ESTADUAL DO MARANHÃO
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS
CURSO DE MESTRADO EM CIÊNCIA ANIMAL

MYLENA ANDRÉA OLIVEIRA TORRES

**AVALIAÇÃO DA RESPOSTA CLÍNICA EM CÃES COM CINOMOSE
TRATADOS COM A DROGA VEGETAL DA *Morinda citrifolia* (NONI)**

São Luís

2012

MYLENA ANDRÉA OLIVEIRA TORRES

**AVALIAÇÃO DA RESPOSTA CLÍNICA EM CÃES COM CINOMOSE TRATADOS
COM A DROGA VEGETAL DA *Morinda citrifolia* (NONI)**

Dissertação apresentada ao programa de Pós-graduação da Universidade Estadual do Maranhão, como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre em Ciência Animal.

Orientadora: Profa. Dra. Ana Lúcia Abreu Silva

São Luís

2012

Torres, Mylena Andréa Oliveira.

Avaliação da resposta clínica em cães com cinomose tratados com a droga vegetal da *Morinda citrifolia* (noni) / Mylena Andréa Oliveira Torres. – São Luís, 2012.

58 f.

Dissertação (Mestrado) – Curso de Ciência Animal, Universidade Estadual do Maranhão, 2012.

Orientador: Profa. Ana Lúcia Abreu Silva

1.Cinomose. 2.*Morinda citrifolia*. 3.Sinais neurológicos. I. Título

CDU: 636.7:616.98

Dissertação de Mestrado defendida e aprovada em _____ de julho de 2012, pela banca examinadora composta pelos seguintes membros:

1º Membro

Profa. Dra. Solange de Araújo Melo
Universidade Federal do Maranhão - UFMA

2º Membro

Profa. Dra. Anali Linhares Lima
Instituto Florence de Ensino superior

3º Membro

Profa. Dra. Ana Lúcia Abreu Silva
Universidade Estadual do maranhão- UEMA
Orientadora

Aos meus amados filhos: Bruna, Natália e Vinícius, pelo amor incondicional, espera na minha ausência e por serem a razão da minha existência! Meu amor por vocês é imensurável!

Dedico!

AGRADECIMENTOS

Á **Deus** pela minha existência, por estar sempre ao meu lado em todos os momentos da minha vida e por me mostrar que o **AMOR** e o **PERDÃO** ainda são o melhor caminho.

Aos meus pais **Nilton e Rose Mary**, pelos ensinamentos transmitidos ao longo desta vida e por me ensinarem que idade e dificuldade nada têm haver com realizações de sonhos. Obrigada!

Aos meus irmãos **Niltinho e Marcelle**, pela amizade e oportunidade de aprendizado nessa vida.

A minha orientadora **Ana Lúcia Abreu Silva**, pela orientação deste trabalho, pelos ensinamentos desde a graduação, amizade e pela confiança que me foi depositada neste mestrado.

A minha irmã de coração **Eleuza Tenório**, por sua amizade, incentivo, ombro amigo, ajuda em todas as horas e por nossa amizade ter sido incondicional durante todos esses anos.

Ao avô e avó paternos de meu filho **Vinícius**, Sr. **Claudionor** e Sra. **Jesus**, pelo carinho, respeito, amizade, por ficarem com meu filho na minha ausência e por me ajudarem SEMPRE! Essa gratidão não tem preço!

A **Joicy, Solange e Zulmira** pela amizade conquistada ao longo do mestrado e pela ajuda na execução desta pesquisa. Vocês foram mais que essenciais!

A **Kássia, Rafael, João, Isadora Fontenele, Renata, Gabriel, Érico, Fernando e Lyah**, pessoas fundamentais para a realização desta pesquisa, não só com a disponibilidade, mas acima de tudo com a amizade.

Aos Veterinários e acadêmicos do HOVET-UEMA, **Daniele, Nathálya, Ulisses, Vitor Hugo, Silvio, Camila, Osnir, Léo e Oaiana**, pela contribuição nesta pesquisa, encaminhando-me todos os cães suspeitos de cinomose. Sem vocês essa pesquisa não seria concluída!

Às Profa. **Michelli Moreira, Débora Santos, Ana Maria Maciel e Anali Linhares** pela contribuição oferecida a esta pesquisa.

Ao Dr. **Paulo Dominice**, pelos seus conhecimentos, ensinamentos, ajuda na execução desta pesquisa e por não desistir NUNCA de buscar saúde e bem-estar para os animais! Felizes os animais que chegam às suas mãos!

A **Prontoclínica Veterinária**, por alguns cães cedidos a este experimento.

Ao Sr. **Dogival**, do laboratório de Nutrição Animal e a Sra **Lucinete** do Herbário da UEMA, pela ajuda na secagem das folhas do noni e na execução da exsicata.

Ao Prof^o **João José**, por seus conhecimentos transmitidos sobre o noni e por nos ceder seus frutos todas as vezes que foi preciso.

A **UEMA** pela oportunidade da graduação em Medicina Veterinária e agora pelo Mestrado em Ciência Animal.

Ao **Laboratório Cernitas**, pela disponibilidade da execução dos exames laboratoriais desta pesquisa.

A **Capex** pelo apoio financeiro, essencial e importante para realização desta pesquisa.

Aos proprietários e seus **cães** que participaram desta pesquisa, principalmente pela espera no HOVET-UEMA.

A todos aqueles que contribuíram para esta pesquisa de forma direta ou indiretamente, obrigada!

*“As pessoas mais felizes
não têm as melhores coisas.
Elas sabem fazer o melhor
das oportunidades que aparecem
em seus caminhos”.*

Clarice Lispector

TORRES, Mylena Andréa Oliveira. **AVALIAÇÃO DA RESPOSTA CLÍNICA EM CÃES COM CINOMOSE TRATADOS A DROGA VEGETAL DA *Morinda citrifolia* (NONI)**. 2012.58 f. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal) – Universidade Estadual do Maranhão, São Luís, 2012.

RESUMO

O vírus da cinomose (canine distemper vírus – CDV) acomete cães de todas as idades, raça e sexo, mas tem maior predileção por filhotes e animais não vacinados. Não há tratamento antiviral específico para a cinomose, utilizando-se o tratamento de suporte. Atualmente os fitoterápicos têm sido utilizados no tratamento de diversas enfermidades. O noni é uma planta do sul da Ásia que possui várias propriedades terapêuticas, possui um efeito imunomodulador, e um dos seus princípios biológicos é o danacantal, que é uma antraquinona natural que pode induzir a morte de células infectadas pelos vírus. Este trabalho teve como objetivo avaliar a resposta clínica em cães com cinomose tratados com a droga vegetal da *Morinda citrifolia* (noni) em São Luís – MA. Foram utilizados dezesseis cães e todos foram submetidos ao teste de triagem rápido para detecção de antígenos da classe IgG específicos para o CDV no soro. Os animais positivos foram submetidos a exames laboratoriais, como hemograma completo, análises bioquímicas e análise molecular. Os animais foram divididos em dois grupos: (G1) - cães, tratados com a droga vegetal de *M. citrifolia* 500mg/SID e (G2) - cães, submetidos ao tratamento convencional com um antibiótico e vitaminas do complexo A e B. A avaliação clínica dos animais com cinomose revelou que aos 30 dias pós-tratamento com noni, cinco animais apresentaram remissão dos sinais clínicos e melhora na série vermelha e um aumento considerável no número de plaquetas, apresentando significância estatística. A avaliação clínica revelou que aos 30 dias pós-tratamento convencional, um animal teve remissão dos sinais clínicos e os outros tiveram apenas melhora parcial do quadro clínico. A droga vegetal do noni mostrou-se eficaz na remissão dos sinais clínicos neurológicos de cães portadores da cinomose.

Palavras-chave: Cinomose, Sinais neurológicos, *Morinda citrifolia*.

TORRES, Mylena Andréa Oliveira. **EVALUATION OF CLINICAL RESPONSE OF DOGS INFECTED WITH CANINE DISTEMPER VIRUS TREATED WITH *Morinda citrifolia* (NONI) DRUG PLANT.** 2012. 58 f. Dissertation (Master in Animal Science) – Universidade Estadual do Maranhão, São Luís, 2012.

ABSTRACTY

Canine distemper virus affects dogs of all ages, breeds and sexes, but has a greater predilection for puppies and unvaccinated animals. There is no specific antiviral treatment for distemper, being made only supportive treatment. Currently phytotherapeutic agents have been used for the treatment of several diseases. Noni is a South Asian plant that has many therapeutic properties, among them an immunomodulatory effect; and one of its biological principles, damnacantal, is an anthraquinone which can induce the death of virus-infected cells. This study aimed to evaluate the clinical response of dogs with canine distemper treated with *Morinda citrifolia* (noni) drug plant in Sao Luis - MA. Sixteen dogs were used in the experiment and all of them were submitted to a rapid screening test to detect specific IgG antigens for CDV in serum. Positive animals underwent laboratory tests such as complete blood count, biochemical and molecular analysis. They were divided into two groups: (G1) - dogs undergoing conventional treatment with antibiotics and vitamin B and (G2) - dogs treated with *M. citrifolia* crude extract. Clinical evaluation showed that at 21 days after the conventional treatment, only one animal had 100% remission of clinical signs. At the same time, among the dogs undergoing treatment with noni, two animals had 100% regression of clinical signs. The noni drug plant was effective in remission of neurological signs in dogs with canine distemper virus.

Keywords: canine distemper, *Morinda citrifolia*, neurological signs

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 – <i>Morinda citrifolia</i> (folhas e frutos maduros)	29
Figura 2 – Local da coleta dos frutos de <i>Morinda citrifolia</i> (noni), Chácara Pau Brasil, São Luís – Maranhão	30
Figura 3 - Fruto e sumo de <i>Morinda citrifolia</i> (noni)	30

LISTA DE TABELAS

Tabela 01 - Valores médios e respectivos desvios padrão das variáveis dos parâmetros hematimétricos das amostras de cães com cinomose, provenientes do município de São Luís – MA, antes e após o tratamento com <i>Morinda Citrifolia</i> .	36
Tabela 02 - Valores médios e respectivos desvios padrão das variáveis dos parâmetros hematimétricos das amostras de cães com cinomose, provenientes do município de São Luís – MA, antes e após o tratamento com tratamento convencional.	37
Tabela 03 - Valores médios e respectivos desvios padrão das variáveis dos parâmetros bioquímicos das amostras de cães com cinomose, provenientes do município de São Luís – MA, antes e após o tratamento com <i>Morinda Citrifolia</i> .	38
Tabela 04 - Valores médios e respectivos desvios padrão das variáveis dos parâmetros bioquímicos das amostras de cães com cinomose, provenientes do município de São Luís – MA, antes e após o tratamento convencional.	38

LISTA DE ABREVIATURAS

ALT – alanina amino transferase
AST – amino transferase
C2 – linha controle
CD4 – células T (tipos de linfócitos)
cDNA – DNA complementar
CDV – Canine Distemper Virus
CHCM – volume corpuscular médio
DNA – ácido desoxirribonucleico
EDTA – ácido etileno diamino tetracético
F – proteína de fusão
H – hemaglutinina
IgG – imunoglobulina G
IL – interleucina
IM – intramuscular
INF γ – interferon gama
L – polimerase ou grande
M – proteína de fusão
N – nucleocapsídeo
NO – óxido nítrico
NP – nucleoproteína
P – fosfoproteína
PCR – reação da polimerase em cadeia
pH – potencial hidrogeniônico
ROS- radicais livres de O²
RNA – ácido ribonucleico

RNP – complexo ribonucleoprotéico

SNC – sistema nervoso central

SRD – sem raça definida

T – linha teste

TBE – trisborato EDTA

TE – tampão de extração

Th1 – células Thelp 1

TNF α – fator de necrose tumoral alfa

TNJ – TAHITIAN noni® Juice

VGM – volume globular médio

VO – via oral

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	15
2 REVISÃO DE LITERATURA	17
2.1 A doença e o agente etiológico	17
2.1.2 Patogenia	18
2.1.3 Transmissão	20
2.1.4 Sinais clínicos	20
2.1.5 Diagnóstico	21
2.1.6 Tratamento e Profilaxia	22
2.2 <i>Morinda citrifolia</i> (noni)	24
3 OBJETIVOS	28
3.1 Objetivo Geral	28
3.2 Objetivos Específicos	28
4 MATERIAIS E MÉTODOS	29
4.1 Coleta e preparo da droga vegetal de <i>Morinda citrifolia</i>	29
4.2 Animais e avaliação clínica	31
4.3 Coleta e análises hematológica, bioquímica e imunoenzimática	32
4.4 Análises moleculares	33
4.5 Considerações éticas	34
4.6 Delineamento experimental e análise estatística	34
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	35
6 CONCLUSÕES	42
7 PERSPECTIVAS FUTURAS	42
REFERÊNCIAS	43
APÊNDICES	52
ANEXOS	56

1. INTRODUÇÃO

A cinomose é uma doença viral altamente contagiosa causada por *Morbilivirus* da família *Paramoxiviridae*, da ordem *Mononegavirales*. É considerado um dos mais importantes patógenos de cães domésticos (SILVA et al., 2009) e está amplamente distribuído em todos os continentes. Além de infectar animais da família *Canidae*, acomete também os animais das famílias *Mustelidae* (furão), *Procyonidae* (guaxinis), *Viverridae* (mangusto), *Felidae*, *Ursidae* e mamíferos aquáticos (MANGIA, 2008; CHA et al., 2012).

No entanto, o cão (*Canis familiaris*) é o principal reservatório e serve como fonte de infecção para carnívoros selvagens. Atualmente, a cinomose é rara em vários países em função da vacinação, mas ainda é considerada uma enfermidade importante por acometer várias espécies da família *Felidae* e pode ocorrer eventualmente na população canina vacinada (VAN MOLL et al., 1995; VANDEVELDE e ZURBRIGGEN, 2005).

O vírus da cinomose (canine distemper vírus – CDV) acomete cães de qualquer idade, raça e sexo, porém tem maior predileção por filhotes e indivíduos não vacinados (SILVA et al., 2009). Os cães susceptíveis são infectados pela inalação de aerossóis ou pela ingestão de gotículas infectantes presentes nas secreções nasal e ocular, que estão ricas em partículas virais, as quais começam a ser expelidas cerca de 7 dias após a infecção. Depois de infectados, os animais podem apresentar lesões respiratórias, gastrintestinais, dermatológicas, oftalmológicas e neurológicas, que podem ocorrer sequencialmente ou isoladamente (GREENE e APPEL 2006).

Em virtude da inexistência de medicamentos antivirais ou agentes quimioterápicos de valor prático para o tratamento específico da cinomose em cães, atualmente, utiliza-se apenas o tratamento de suporte, com o uso de antibióticos, soroterapia e complexos de vitaminas B (SIGWALT, 2009).

O prognóstico é reservado para a maioria dos casos de cinomose aguda, especialmente na presença de sintomas neurológicos, quando a maioria dos animais veem a óbito. A vacinação é o melhor meio de prevenção. Atualmente no mercado nacional existem vacinas com vírus vivo modificado e são potentes, seguras e induzem imunidade efetiva para a cinomose. A idade em que os cães se tornam susceptíveis à cinomose é proporcional ao título de anticorpos de mãe, e varia de acordo com a transferência colostrálica (MATTIESEN, 2004).

Atualmente, os fitoterápicos têm sido utilizados para diversos tipos de enfermidades, em função de suas propriedades terapêuticas. *Morinda citrifolia*, noni, é uma planta do Sul da Ásia e Austrália e também é encontrada nos trópicos. Pertence a família *Rubiaceae* e subfamília *Rubioideae*, do gênero *Morinda*. É uma planta que dá flores e frutos o ano todo. A fruta é usada de forma medicinal e terapêutica, sendo usada para vários tipos de enfermidades. Em vários países da Ásia, as folhas, flores, frutos e o tronco, servem para tratamento de febre, problemas de pele, gengivite, constipação, dores de estômago e dificuldade respiratória (YANG et al., 2010; BASAR et al., 2010).

O noni possui substâncias com atividades imunomoduladoras, face ao exposto levantou-se a hipótese de que a droga vegetal do noni é eficaz no tratamento de cães infectados pelo CDV. Desta forma é imprescindível o desenvolvimento de pesquisas que visem à obtenção de uma medicação capaz da remissão dos sinais clínicos e que possa aumentar a expectativa e a qualidade de vida dos animais acometidos. Assim sendo, essa pesquisa foi necessária para validar os efeitos clínicos da droga vegetal do noni para que possa ser utilizado como coadjuvante no protocolo de tratamento dessa doença.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 A doença e o agente etiológico

A cinomose é uma doença viral que causa imunossupressão grave e comprometimento multisistêmico caracterizado principalmente por lesões, respiratórias, gastrintestinais, dermatológicas, oftálmicas e neurológicas (SUMMERS et. al., 1995; FENNER, 2004; GREENE e APPEL, 2006). O vírus é um RNA vírus do gênero *Morbilivirus*, família *Paramyxoviridae*, ordem *Mononegavirales*, e apresenta relação antigênica com os vírus do sarampo, da peste bovina e da peste de pequenos ruminantes (TIPOLD et al., 1992; HASS e BARRETT, 1996; BARRETT, 1999).

O CDV possui diâmetro variável (150-250 µm) com genoma constituído por uma fita simples de RNA contendo aproximadamente 15.690 nucleotídeos (VON MESSLING e CATTANEO, 2002).

A natureza infecciosa da doença foi demonstrada pela primeira vez por Carré, em 1905, inoculando a secreção nasal de cães infectados em cães jovens e reproduzindo experimentalmente a moléstia. A patogenia do CDV foi melhor compreendida a partir de estudos experimentais em furão, que é altamente suscetível ao vírus da cinomose e reproduz uma doença semelhante ao cão (HARTMANN, 2007).

O CDV é disseminado mundialmente e causou alta mortalidade até que vacinas eficazes começaram a serem comercializadas no final da década de 1950 (CHAPPUIS, 1995; McVEY; KENNEDY, 2008). Em regiões endêmicas, como no Brasil, é crescente o número de mortes de cães vítimas de CDV. Além disso, a mesma tem sido considerada como re-emergente em países onde já esteve controlada (SILVA et al., 2007) e surto da doença vem sendo relatados em vários países (HARTMANN, 2007).

O genoma é envolto por nucleocapsídeo helicoidal, que consiste na nucleoproteína (NP), associado à proteína matriz e ao complexo polimerase, incluindo as proteínas P (fosfoproteína) e L (polimerase ou grande). A proteína de membrana (M) está localizada na face interna do envelope e exibe as duas glicoproteínas, hemaglutinina (H) e proteína de fusão (F), que são responsáveis pela fixação na membrana dos plasmócitos (VANDEVELDE e ZURBRIGGEN, 2005; MARTELLA et al., 2007).

As proteínas L, N e P e o RNA viral formam o complexo ribonucleoprotéico (complexo RNP). A proteína M (matriz) é importante para maturação viral e funciona como conectora das glicoproteínas de superfície (F e H) ao nucleocapsídeo (BARRET, 1999; ORSINI; BONDAN, 2008; BEINEKEN et al., 2009). A NP é a principal reguladora da replicação viral e da transcrição, e conseqüentemente, é a primeira proteína exposta ao sistema imune que estimula a produção de anticorpos nos primeiros estágios da infecção (LATHA et al., 2007).

Quanto à resistência aos agentes físicos e químicos, o CDV é altamente sensível à luz ultravioleta, dessecação e altas temperaturas. O CDV é destruído em 30 minutos a 50-60°C, em uma hora a 37°C, em três horas a 20°C e permanece viável por várias semanas em temperaturas baixas (ZEE; MacLACHLAN, 2004; GREENE e APPEL, 2006). Ele pode sobreviver nos tecidos por 48 horas a 35°C e por 14 dias a 5°C. A infectividade viral é perdida em pH de 10,4 ou abaixo de 4,4, e é estável em pH 7,0 (SHEN e GORHAM, 1980). O envelope viral é sensível ao éter, clorofórmio, formol e desinfetantes a base de amônia (ZEE; MacLACHLAN, 2004; GREENE e APPEL, 2006).

2.1.2 Patogenia

Há apenas um sorotipo do vírus da cinomose, mas existem cepas virulentas, biologicamente distintas. Algumas cepas são levemente virulentas e causam infecções inaparentes. Outras causam moléstias agudas, com elevada frequência de encefalite e altos índices de mortalidade (MATTHIESEN, 2004). A literatura mostra que no mundo circulam oito cepas do vírus. No entanto, mais recentemente foi demonstrado que na América do Sul circulam uma nova cepa, encontrada apenas na Argentina e que provavelmente circula apenas em animais silvestres (PANZERA et al., 2012). Na China também foi identificado um novo isolado denominado de XJ12 (QIAO et al., 2011).

De acordo com Quinn et al. (2005), o primeiro local de replicação do vírus é o trato respiratório superior, que posteriormente se dissemina nas tonsilas e linfonodos bronquiais culminando com uma viremia associada a célula e disseminação para os outros tecidos linforreticulares. A replicação viral produz linfocitólise e leucopenia resultando em imunossupressão e permitindo o desenvolvimento de viremia secundária.

Quando há disseminação para os epitélios, após o 9º dia, o CDV é encontrado nos epitélios das mucosas conjuntival, nasal, traqueal, bronquial, glândulas mucosas, trato urinário e reprodutor, e num período de mais 3 dias ou mais tardiamente, o vírus também alcança o SNC, se distribuindo nas grandes células mononucleares da pia-meninge, neuroglias, células de Purkinje, nos neurônios do córtex cerebral, do gânglio basal e hipocampo (SANTOS, 2006).

No cão com níveis intermediários de resposta imunológica mediada por células e com títulos de anticorpos que aparecem tardiamente, após 9 a 14 dias, o vírus se dissemina pelos tecidos. Os sinais clínicos podem desaparecer quando há aumento da titulação de anticorpo, o que contribui para a eliminação do vírus. Em tecidos uveais, neurônios e tegumento, principalmente dos coxins plantares, o CDV pode persistir por longos períodos. O controle da infecção está associado à imunidade a longo prazo e interrupção da replicação viral. A proteção pode ser comprometida se o cão for exposto a uma cepa altamente virulenta, apresentar carga viral elevada ou nos casos de imunossupressão (MANGIA, 2008).

Cães gnobióticos infectados com o CDV desenvolvem uma linfopenia prolongada e depleção linfóide sistêmica. A infecção fatal pelo vírus do CDV está associada à depleção sistêmica de áreas de linfócitos T e B, resultando em uma linfopenia que se inicia uma semana após a infecção (MORO e VASCONCELOS, 1998). Segundo Schobesberger et al. (2005) a diminuição significativa de linfócitos foi observada antes da viremia, três dias pós-infecção.

A disseminação do vírus no epitélio e nos tecidos do SNC depende do grau da resposta imunológica e ocorre no período de 8 a 10 dias pós-infecção, por via hematogênica ou pelo líquido dependendo da resposta imunológica humoral ou celular do animal (TIPOLD et al., 1992; VANDEVELDE e ZURBRIGGEN, 1995; JONES et al., 2000; VANDEVELDE e ZURBRIGGEN, 2005; GREENE, 2006). O CDV na fase aguda tem predileção pelas células Th1 e CD4+ vírus. A infecção lítica das células TCD4+ pode ter inúmeras consequências, pois essa célula tem papel importante na indução e regulação da resposta imunológica (MORO e VASCONCELOS, 1998; KUMAGAI et al., 2004).

No SNC, o CDV causa principalmente desmielinização, que pode ser classificada em aguda e crônica. A desmielinização ocorre em torno da 3ª semana pós-infecção e não tem a participação de resposta inflamatória, presente no estágio crônico da infecção (VANDEVELDE e ZURBRIGGEN, 1995). Tal lesão coincide com a replicação viral nas

células da glia, principalmente das regiões como cerebelo, sistema óptico e medula espinhal (MANGIA, 2008).

A imunossupressão e resposta imunológica anormal contribuem na susceptibilidade às infecções secundárias, que podem influenciar bastante na morbidade e mortalidade da doença (HASS e BARRETT, 1996; KAJITA et al., 2006).

2.1.3 Transmissão

A transmissão ocorre principalmente por aerossóis e gotículas que contêm os vírus, por meio de secreções respiratórias, fezes e urina (MARTELLA et al., 2008). Durante a exposição natural, o CDV se propaga e entra em contato com o epitélio do trato respiratório superior. No período de 24 horas, as partículas virais se replicam nos macrófagos e se disseminam pela via linfática local, para as tonsilas e linfonodos bronqueais (TIPOLD et al., 1992; VANDEVELDE e ZURBRIGGEN, 1995; MORO e VASCONCELOS, 1998).

O vírus é eliminado por até 60-90 dias após a infecção, mas principalmente na fase aguda, de 7 a 15 dias, sendo as fontes de infecção mais comuns, os fômites, ar, água e alimentos contaminados. O vírus se propaga mais facilmente em lugares aglomerados, como lojas de animais, abrigos, canis e clínicas (DEL PUERTO et al. 2010).

2.1.4 Sinais Clínicos

A manifestação clínica da infecção depende do título, da estirpe viral infectante, da idade e perfil imunológico do animal. Sinais epiteliais da doença são freqüentes e geralmente precedem ou ocorrem simultaneamente aos sinais neurológicos, sendo que estes últimos podem ocorrer sem sinais sistêmicos associados (SANTOS, 2006).

O período de incubação para o surgimento dos sintomas clínicos do CDV aguda é geralmente, de 14 a 18 dias. Após a exposição e infecção os cães apresentam febre transitória, não muito elevada, entre o quarto e o sétimo dias, sem sintomas evidentes da doença. A temperatura retorna ao normal após 7 a 14 dias, seguido de uma segunda elevação na temperatura corporal, acompanhada de conjuntivite e rinite. Tosse, dispnéia, alteração dos ruídos pulmonares, diarreia, vômitos, anorexia, desidratação e perda de sangue com

debilitação são comumente observados em cães com cinomose na fase aguda (MATTHIESEN, 2004).

Secreções oculares e nasais mucopurulentos e pneumonia frequentemente resultam de infecções bacterianas secundárias. *Bordetella bronchiseptica* é comumente encontrada em cães com cinomose. Uveíte, cegueira repentina por lesão no nervo óptico, e degeneração retiniana podem ser observados. Erupções cutâneas, progredindo para pústulas podem ocorrer, especialmente no abdômen, mas os cães se recuperam dessas lesões com frequência. Hiperqueratose digital também pode estar presente (MANGIA, 2008).

Sinais neurológicos se instauram após a doença sistêmica. Uma encefalomielite aguda destrói predominantemente a substância cinzenta (neurônios), enquanto uma encefalomielite não-supurativa subaguda ou crônica afeta predominantemente a substância branca (causando desmielinização). Animais jovens e cães com imunodeficiência desenvolvem com frequência necrose neuronal (WYSS-FLUEHMANN et al., 2010).

No caso de encefalite aguda se observa crises epiléticas, mioclonais e alterações comportamentais, com reflexos espinhais e propriocepção anormais. As alterações do sistema nervoso central (SNC) podem ocorrer simultaneamente com outros sinais multissistêmicos (mais raramente) ou ficar retardados no início até uma a três semanas após a recuperação aparente da enfermidade sistêmica, observando-se geralmente mioclonias, ataxia, paresia, paralisia, falta de coordenação e, algumas vezes, alterações comportamentais como vocalização intensa e hiperexcitabilidade. Estes últimos frequentemente são observados como seqüela após a remissão dos sinais clínicos da doença. Em alguns cães o envolvimento do SNC pode ocorrer como única manifestação aparente de infecção (MARTELLA et al., 2008).

2.1.5 Diagnóstico

O diagnóstico da cinomose geralmente baseia-se nos sinais clínicos típicos em um cão jovem (2-6 meses) que tenha um histórico de vacinações inadequadas e possibilidades de exposição ao vírus. O diagnóstico clínico em cães sem sinais sistêmicos precedentes ou concomitantes é difícil. No entanto essa ausência de sinais clínicos não é tão frequente (SANTOS, 2006).

Devem-se levar em consideração outras doenças que podem mimetizar o quadro respiratório da cinomose, como a traqueobronquite infecciosa canina. Sinais entéricos podem

ocorrer em outras doenças como a parvovirose e a coronavirose caninas, giardíase, infecções bacterianas, gastroenterite por ingestão de toxinas e enteropatia inflamatória. Além disso, a forma neurológica também pode ser confundida com meningoencefalite granulomatosa, encefalite por protozoário (toxoplasmose e neosporose), criptococose, ehrliquiose, meningite, febre maculosa das Montanhas Rochosas, encefalite dos cães da raça pug e intoxicação pelo chumbo (TILLEY e SMITH, 2008).

Nos casos suspeitos de cinomose, tornam-se úteis a realização de exames complementares como a pesquisa de inclusão viral e PCR para confirmação do diagnóstico. O hemograma também é importante para avaliar as respostas leucocitárias (SIGWALT, 2009).

2.1.6 Tratamento e Profilaxia

Não há medicamentos anti-virais ou agentes quimioterápicos de valor prático para o tratamento específico da cinomose em cães. Antibióticos de amplo espectro são indicados para o controle das infecções bacterianas secundárias, líquidos, eletrólitos, vitaminas do complexo B e complementos nutricionais são indicados para terapia auxiliar (ELIA et al., 2008).

Casos em que o sistema respiratório é afetado devem ser tratados com broncos dilatadores e expectorantes, a fim de reduzir a tosse, pois é frequente que se desenvolva pneumonia bacteriana e insuficiência respiratória. Animais que se apresentam com quadro neurológico podem receber anticonvulsivantes e relaxantes musculares como o diazepam. Para reduzir um possível edema cerebral normalmente se administra a dexametasona (SIGWALT, 2009).

O desenvolvimento de estratégias terapêuticas deve visar à modulação imunológica. Entretanto, enquanto a modificação da resposta inflamatória danosa pode ser viável, o problema básico relacionado à presença do vírus no SNC não é resolvido (VANDEVELDE, 2004). Terapias antivirais específicas contra *Morbilivirus* não foram avaliadas ainda e por isso a mais importante intervenção veterinária é a prevenção (MANGIA, 2008).

Na encefalite multifocal progressiva causadora de tetraplegia, semicoma e incapacitação, a eutanásia é recomendada. Anticonvulsivantes devem ser utilizados, como o diazepam na dose de 0,2 a 0,8 mg/Kg pelas vias intravenosa, intramuscular e/ou oral, a cada 12 horas. Corticosteroides, como a dexametasona na dose de 2,2 mg/Kg, por via intravenosa,

podem ser utilizados por causa da base imunopatológica das lesões neuronais e para reduzir o edema cerebral, mantendo a terapia com doses anti-inflamatórias, posteriormente, reduzindo a dose até o final do tratamento. A imunossupressão causada pelos esteroides é a principal desvantagem, porque a resposta inflamatória é responsável pela retirada do vírus (TIPOLD, 1992; GREENE, 2006).

Os macrófagos e seus produtos, especialmente radicais livres de oxigênio, são importantes na indução da destruição do tecido nervoso na cinomose, por isso a administração de antioxidantes como vitamina A e vitamina C podem ser uma boa medida terapêutica (TIPOLD, 1992).

A ribavirina foi utilizada no tratamento da cinomose e estudos in vitro mostraram que a droga é capaz de inibir a replicação do vírus de forma dose e tempo-dependente (MANGIA, 2008). Ainda que a concentração não citotóxica da droga bloqueie completamente a replicação em 24 horas após a exposição, a concentração é mantida até 72 horas. Desta forma, pode-se sugerir que a ribavirina afeta o vírus ainda no meio extracelular, de maneira precoce no seu ciclo de replicação. Após 24 horas de exposição, mesmo em baixa concentração a ribavirina reduz o número de cópias de RNA (ELIA et al., 2007).

Pesquisas realizadas por Mangia (2008) constatou que animais que foram submetidos a tratamento com ribavirina começaram a apresentar melhora clínica a partir do sexto dia da administração do medicamento, porém no décimo dia de tratamento a maior parte apresentou piora e variações no estado clínico nos dias seguintes.

Vacinas produzidas com as amostras do vírus da cinomose, isoladas de cães naturalmente infectados, como as amostras Snyder Hill, Rockborn, Onderstepoort, adequadamente atenuadas em culturas de células, são eficientes em induzir o estado de imunidade dos animais vacinados, protegendo-os contra a infecção natural (BIAZZONO et al., 2001). Estas cepas, atualmente são consideradas velhas, chamadas de “old CDV” e as cepas novas, chamadas de “new CDV” de várias partes do mundo que possuem o gene e a proteína H com características diferentes (MOCHIZUKI et al., 2002).

Atualmente há no mercado nacional, vacinas com vírus vivo modificado, que são as mais potentes e seguras e que induzem imunidade efetiva para o CDV. A idade na qual os cães se tornam susceptíveis à cinomose é proporcional ao título de anticorpos da mãe. Aproximadamente 50% dos cães são imunizados por volta das seis semanas de idade (imunidade passiva) e 75% com nove semanas (SANTOS, 2006).

Devido à idade variável a qual os animais se tornam imunizáveis contra a cinomose, recomendam-se várias doses, segundo esquemas de vacinação, que maximizam a probabilidade de indução da imunidade. É recomendada a revacinação anual, visto que o título de anticorpos declina a níveis que são de protetores dentro de um ano, em até um terço dos cães jovens (MATTHIESEN, 2004).

Segundo Negrão et al. (2006), falhas vacinais podem ser geradas por múltiplos fatores como interferência de anticorpos passivos, falhas individuais na resposta imune, qualidade, conservação e variabilidade antigênica do imunógeno e infecção anterior à vacinação.

2.2 *Morinda citrifolia* (noni)

Morinda citrifolia é uma planta de pequeno porte originária da Polinésia, que produz o fruto popularmente conhecido como noni. Sua classificação taxonômica é descrita da seguinte forma: Reino *Plantae*, Filo *Magnoliophyta*, Classe *Magnoliopsida*, Ordem *Rubiales*, Família *Rubiaceae*, Gênero *Morinda*, Espécie *Morinda citrifolia* (INBiO, 1997).

A planta pertence à família *Rubiaceae* de folhas permanentes, de pequeno a médio porte. A árvore frequentemente cresce em regiões costeiras ao nível do mar e em áreas florestais com cerca de 400 metros acima do nível do mar. Desenvolve-se bem em solos vulcânicos ricos em minerais, apesar de também se desenvolverem em solos arenosos ou muito úmidos (WANG et al., 2002; McCLATHEY, 2002).

Três variedades distintas da espécie *Morinda citrifolia* são conhecidas: *Morinda citrifolia* var. *bracteata*, *Morinda citrifolia* var. *potteri* e *Morinda citrifolia* var. *citrifolia*. Elas diferem entre si principalmente por diferenças morfológicas da folha e do fruto. Das três, a variedade de maior importância econômica e medicinal é a *Morinda citrifolia* var. *citrifolia*. A origem da espécie *Morinda citrifolia* é atribuída a região da Micronésia conforme relatam Razafimandimbison et al. (2010).

O Brasil apesar de não ter tradição no cultivo do noni apresenta grande potencial edafoclimático e com uma ampla diversidade biológica considerada a maior do mundo com cerca de 60.000 espécies de plantas, o que corresponde a 20% de toda flora do planeta e 70% de todas as espécies existentes nas grandes florestas (CUNHA, 2005).

No Estado do Maranhão, a espécie *M. citrifolia* é de recente introdução, em destaque para sua capital São Luis, em função a sua localização geográfica, o clima e o solo dessa

região favorável na amplitude requerida para desenvolvimento dessa espécie, sendo as primeiras mudas plantadas em 2005 (SILVA, 2010).

De acordo com o conhecimento popular, o noni é uma fruta de extraordinárias propriedades curativas. Há mais de 2.000 anos tem sido usada com sucesso na Polinésia, China, Índia e outros lugares. O noni migrou com os habitantes dessas regiões para as ilhas do Pacífico Sul, Tahiti, Hawaí e Malásia, e prolifera melhor em qualquer parte onde exista um solo vulcânico sem poluição. Ficou demonstrado que assim como a babosa (*aloe vera*), as algas marinhas, o mamão e outros agentes botânicos, o extrato de noni auxilia na melhora de uma enorme gama de enfermidades (SOLOMON, 1999).

Cerca de 200 compostos fotoquímicos já foram identificados na planta do noni, e os principais são compostos fenólicos, ácidos orgânicos e alcaloides, incluindo flavonoides, polissacarídeos, iridóides, ligninas e triterpenóides (YANG et al., 2010). Possui a escopoletina, substância antibacteriana, antifúngica e antiinflamatória, que também ajuda a dilatar os vasos sanguíneos, o que faz baixar a pressão arterial (WANG e SU, 2001).

De acordo com Chan-Blanco et al. (2006), a quantidade de proteínas contidas no fruto é surpreendentemente alta, representando 11,3% da matéria seca do suco, e os principais aminoácidos encontrados são o ácido aspártico, ácido glutâmico e isoleucina. Os minerais representam 8,4% da matéria seca, e os principais são o potássio, enxofre, cálcio e fósforo. Traços de selênio tem sido descrito também no suco do Noni. As principais vitaminas encontradas no fruto são o ácido ascórbico (24 – 158 mg/100 g matéria seca) e provitamina A.

Os alcaloides *xeronina* e *proxeronina* foram descritos por Heinicke (1985) e Solomon (1999), como constituintes da Noni, entretanto a caracterização bioquímica e o método usado para purificação não foram publicados. A xeronina é o princípio biológico ativo do noni e é um novo alcaloide útil em medicina, alimentação e campos industriais (NELSON, 2005).

Além da xeronina, os outros compostos presentes no fruto são terpenos, compostos fenólicos, danacantal (atividade antiviral), norepinefrina, escopoletina, aminoácidos, asperulosido, iridóides, fitonutrientes, selênio, morindona, morindina, acubina, alizarina, ácido capríco, ácido caprílico, flavonoides e triterpenóides (LEVAND e LARSON, 1979; LAVAUT e LAVAUT, 2003; YANG et al., 2010).

Heinicke (1985) em estudos com o *Ananás* sp., descobriu a proxeronina, um alcaloide com ação antiinflamatória que se liga a serotonina para se converter em xeronina, um alcaloide essencial à vida. A ela são atribuídos os vários efeitos benéficos do noni. Entretanto,

há ausência de informação sobre a caracterização química deste alcaloide. Heinicke (2001), em seus estudos no Instituto de Pesquisa do Abacaxi no Havaí, utilizou o fruto do noni e isolou um material volátil que o chamou de xeronina. Ao isolar este alcaloide em estado puro, foi capaz de identificar sua exata estrutura química, pois poderia ser reduzida para uma estrutura cristalina seca (SILVA, 2010).

Poucos estudos foram realizados para garantir a segurança do uso de *M. citrifolia*. Wang et al. (2002) avaliaram a toxicidade aguda e crônica da dose do suco de noni em ratos durante 14 dias e 13 semanas respectivamente, com dose de 15000 mg/kg/dia para a toxicidade aguda. Ao final, não observou nenhuma alteração clínica ou sinal macroscópico em órgãos necropsiados dos animais tratados por 14 dias. Para a toxicidade crônica, a dose encontrada que não apresentou reações adversas foi de 80 mL/kg/dia de suco de noni. Mais recentemente, novos estudos, constataram que o consumo de suco de noni não induz a efeitos adversos no fígado (WEST et al., 2009).

Em estudo de toxicidade reprodutiva em fêmeas de ratos Wistar expostos ao extrato aquoso de noni, foi concluído que a dose de 7,5 mg/kg do extrato é capaz de produzir toxicidade reprodutiva (MÜLLER et al., 2009).

O Noni tem sido utilizado como alimento, bebida, medicamento e para tingimento de tecidos (MACCARI e MAPUSUA, 2007). A medicina tradicional chinesa, uma das mais antigas do mundo, tem documentado o uso de plantas há mais de 2000 anos. São aproximadamente 5000 espécies de plantas utilizadas, e destas, cerca de 500 espécies são comumente prescritas por médicos chineses, incluindo o chá uma das primeiras ervas mencionada na antiga literatura (THOMSON, 2007).

Palu et al. (2008) relatam que o noni melhora a resistência física de atletas devido a presença de antioxidantes em sua constituição. Há autores que identificaram a presença de ácido ascórbico na caracterização química do fruto do noni, confirmando assim o seu poder antioxidante (MOHD-ZIN et al., 2006; GISELLE, 2007). Outras substâncias antioxidantes conhecidas foram identificadas, tais como: betacaroteno, terpenoides, alcaloides, caroteno, polifenóis, flavonoides e rutina (PRAVEEN e AWANG, 2007; MURALIHARAN e SRIKANTH, 2010).

De acordo com o uso na medicina tradicional e popular, entre as enfermidades e afecções mais tratadas encontram-se: alergia, artrite, asma, câncer, depressão, diabetes, hipertensão, distúrbios menstruais, musculares, obesidade, úlceras gástricas, dores de cabeça,

inibição sexual, insônia, depressão, estresse, problemas respiratórios, AIDS, esclerose múltipla e dependência de drogas (McCLATCHEY, 2002; WANG et al. 2002; LAVAUT1 e LAVAUT2, 2003).

Estudos de atividade antitumoral demonstraram resultado positivo, tanto do suco (WANG e SU, 2001), como de substâncias isoladas da *M. citrifolia*. O Noni-ppt, substância rica em polissacarídeos do fruto de noni, apresentou percentual de cura de 25 a 45% dos tumores em camundongos (FURUSAWA, 2003). Antraquinonas isoladas da raiz inibiram o crescimento em células tumorais in vitro (KAMYIA et al., 2010).

Os efeitos da *M. citrifolia* no sistema imunológico foram comprovados por Palu et al. (2008) e por Hirazumi e Furusawa (1999), que pela diminuição da produção de IL-4 e aumento da produção de INF- γ , sugerindo modulação da via de ativação de receptores canabinoide 2, e o aumento de liberação de TNF- α , IL-1 β , IFN- γ e NO de animais tratados com suco de noni.

O noni tem sido alvo de muitas pesquisas, que já redundaram em vários artigos publicados em função de suas diversas propriedades e ainda estão sob o sigilo de patentes. Atualmente existem 58 registros envolvendo a *M. citrifolia* no órgão oficial de patentes dos Estados Unidos, US Patent Trademark Office, 77 registros na União Europeia e 5 patentes no Brasil, registradas no INPI, Instituto Nacional de Propriedade Industrial (SOUZA, 2011).

3. OBJETIVOS

3.1 Geral:

- Avaliar a resposta clínica em cães com cinomose tratados com a droga vegetal do fruto de *Morinda citrifolia* (noni) em São Luís – MA.

3.2. Específicos:

- Verificar a evolução clínica dos animais durante o tratamento;
- Avaliar os efeitos colaterais e tóxicos da droga vegetal do noni (*M. citrifolia*), através de monitoramento hematológico e provas bioquímicas de função hepática e renal, antes e após o tratamento.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Coleta e Preparo do Extrato bruto de *Morinda citrifolia* var

Inicialmente foi realizada a coleta da planta *Morinda citrifolia* var na Fazenda Escola da Universidade Estadual do Maranhão (UEMA) no Campus de São Luís – MA. Coletou-se galhos da planta com folhas, flores e frutos (Figura 1) de aproximadamente 30 cm de comprimento e foram levadas para o Herbário da UEMA, “Professora Rosa Mochel”, para a identificação botânica e elaboração da exsicata, depositada sob o nº 2346.



Figura 1: *Morinda citrifolia* (folhas e frutos maduros)

Para realização da droga vegetal foram coletados frutos da *M. citrifolia* (noni) na Chácara Pau Brasil, situada ao Sul de São Luis, Maranhão, Brasil, a 2° 30' S, 44° 18' W e a uma altitude de 48 m (Figura 2). O tipo predominante de solo é o argissolo, composto por rochas sedimentares com formação na era cenozoica. O clima é tropical, quente e úmido. A temperatura mínima na maior parte do ano fica entre 20 e 23°C e a máxima geralmente fica entre 29 e 32° C. A média pluviométrica é de 2.325 mm (LABMET, 2011).

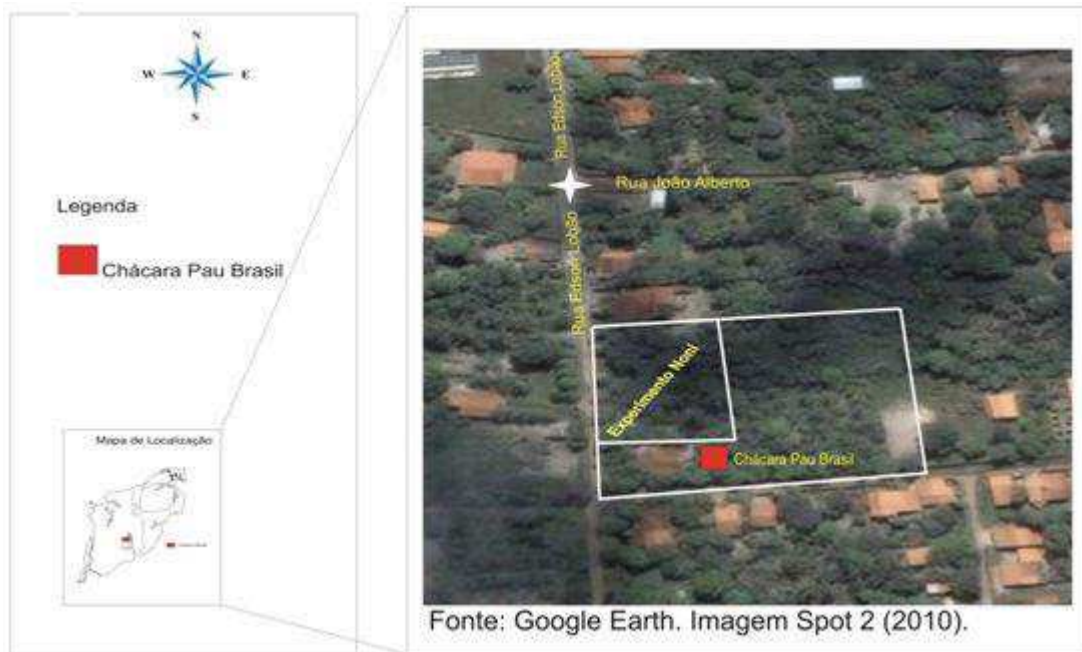


Figura 2: Local da coleta dos frutos de *M. citrifolia* (noni), Chácara Pau Brasil, São Luís – Maranhão.

Foram coletados frutos com cor esbranquiçada, polpa macia, casca bem fina e íntegra, ausentes de pragas e insetos, em seguida foram levados para o Laboratório de Anatomopatologia da UEMA. No laboratório, os frutos foram lavados com água destilada, seco com papel toalha descartável, posteriormente acondicionado em frascos de vidro estéril, vedados com plástico filme, por 3 dias, para retirada do sumo (Figura 3).



Figura 3: Fruto e sumo de *M. citrifolia* (noni).

O sumo, proveniente do extrato bruto do fruto foi coletado, filtrado em gaze estéril, centrifugado a 4000 rpm por 15 minutos, sendo após retirado o sobrenadante e armazenado em tubos estéreis envolvidos com papel alumínio, armazenados a -20°C até o envio para

liofilização. Esta foi feita em parceria com a Fiocruz/RJ, no laboratório Biomanguinhos, sendo o liofilizado e posteriormente acondicionado em cápsula gelatinosa com concentração adequada ao protocolo terapêutico.

4.2 Animais e avaliação clínica

Foram utilizados dezesseis cães que apresentaram sintomatologia clínica específica da doença e que eram positivos nos exames laboratoriais. Como critério de inclusão utilizou-se a presença dos sinais neurológico e outras sintomatologia específica, tais como vômitos, diarreia, secreções oculares e nasais, tremores, mioclonias e convulsões.

Todos os proprietários foram orientados quanto aos dois tipos de tratamento e após, assinaram um termo de consentimento livre e esclarecido (Apêndice II) conforme o tratamento escolhido. Os animais foram submetidos a uma avaliação semiológica detalhada segundo FEITOSA (1997) e identificados em uma ficha clínica específica (Apêndice I) com escore corporal definido de acordo com os sinais clínicos apresentados.

Os cães foram divididos em dois grupos:

Grupo 1 (G1): Dez cães positivos para cinomose submetidos ao tratamento com a droga vegetal de *M. citrifolia* manipulados em Farmácia de produtos naturais, na dosagem de 500 mg/kg/SID/VO durante 30 dias. A dose foi calculada em estudos in vitro de Almeida-Souza (2011).

Grupo 2 (G2) – Seis cães, submetidos ao tratamento convencional com o antibiótico enrofloxacino 50 mg/kg/BID/VO ou IV (durante 10 a 15 dias). Foi também utilizado um estimulador neurológico a base de vitaminas do complexo A e B e corticoide, dexametasona, na dose de 1mg/5kg/SID/VO.

As medicações foram administradas na mesma hora em todos os dias do tratamento. Alguns animais foram tratados em suas residências e outros ficaram no canil experimental da UEMA até o final do tratamento.

Todos os animais foram submetidos ao teste de triagem rápido para detecção de antígeno da classe IgG específicos para o vírus da cinomose canina no soro, baseada no princípio imunoenzimático em fase sólida, e para isso utilizou-se o “antigen rapid CDV Ag

test kit” (Bioeasy), seguindo as orientações fornecidas pelo fabricante. Posteriormente ao resultado positivo no imunoenzimático, os animais foram submetidos a exames laboratoriais tais como, hemograma completo, análises bioquímicas (aspartato amino transferase (AST), alanina amino transferase (ALT), uréia e creatinina) e análise molecular.

Os animais foram submetidos diariamente a exames clínicos para avaliar a evolução clínica e/ou remissão dos sinais clínicos. No momento foram avaliados os seguintes parâmetros: a coloração das mucosas, escore e temperatura corporal, grau de sensibilidade de membros torácicos e pélvicos e sensibilidade na região abdominal. Após a avaliação os animais foram agrupados de acordo com a fase da doença em que se encontravam, sendo acompanhados durante um ano.

4.3 Coleta e Análises Hematológica, Bioquímica e Imunoenzimática

Após a contenção dos animais, coletou-se por punção da veia cefálica 5 ml de sangue, utilizando tubos e agulhas de vacutainer estéreis com anticoagulante (EDTA) e sem anticoagulante. As amostras obtidas foram transportadas aos laboratórios de Patologia Clínica da UEMA e ao laboratório Cernitas, sendo armazenadas por uma semana à temperatura de 4° a 8°C até a realização das análises.

As amostras de sangue total, coletadas com anticoagulante, para análise hematológica, foram homogeneizadas (homogeneizador de soluções AP22) durante 3 minutos. Após homogeneização, os tubos de ensaio foram introduzidos um a um na sonda de amostra (probe) da máquina Bio 1800 vet (Bioeasy), sendo colhidos 10 µL para análise e obtenção dos resultados de eritograma (hemáceas, hemoglobina, hematócrito, volume corpuscular médio e CHCM) e leucograma. Adicionalmente, para identificação dos leucócitos (linfócitos, eosinófilos, monócitos e segmentados), utilizou-se o procedimento manual, sendo colocada uma gota de sangue em uma lâmina, espalhando-a com outra lâmina, realizando assim o esfregaço sanguíneo para identificação das células diferenciadas e pesquisa do corpúsculo de inclusão viral, denominado Lentz. Finalizando a análise hematológica, as proteínas plasmáticas foram contadas através do espectrofotometro Coleman 295.

Para a realização das provas bioquímicas as amostras foram acondicionadas em tubos sem anticoagulante, com gel ativador da coagulação, no volume de três a quatro mL de sangue. Após a coagulação, as amostras foram centrifugadas na rotação de 3.000 rpm durante

oito minutos, e o soro foi separado e transferido para tubos estéreis, com posterior realização das provas bioquímicas em analisador semi-automático (Celm SBA 200). Nestas análises foram utilizados kits comerciais (Labtest), seguindo as recomendações do fabricante, para determinação por métodos cinéticos, de acordo com as técnicas a seguir:

- Creatinina: Método colorimétrico por reação cinética com picrato alcalino;
- Enzimáticos da Uréia: Método enzimático colorimétrico;
- Aspartato amino transferase (AST): Método otimizado cinético em UV a 37°C;
- Alanina amino transferase (ALT): Método otimizado cinético em UV a 37°C;

A análise imunoenzimática, foi realizada com sangue total, utilizando o “antigen rapid CDV Ag test kit” (Bioeasy) de acordo com as instruções do fabricante. Esta técnica é utilizada para detecção de antígeno da classe IgG específicos para o CDV (Anexo).

4.4 Análises Moleculares

Amostras de sangue total, dos animais positivos na análise imunoenzimática, foram submetidas à análise molecular, iniciando com a extração do RNA viral, através o Kit *AxyPrep™ Body Fluid Viral DNA/RNA* (Axygen, EUA), conforme protocolo do fabricante (Anexo).

Posterior a extração, o RNA foi utilizado para síntese do cDNA (DNA complementar), através da técnica de RT-PCR, que faz uso da enzima *transcriptase reversa*. Na elaboração do cDNA foi utilizado o Kit *SuperScript III Platinum Two Step qRT-PCR with Sybr Green* (Invitrogen, Brasil). O preparo da reação foi realizado de acordo com os procedimentos descritos pelo fabricante (Anexo).

Em seguida, o cDNA foi submetido a PCR, sendo utilizado os oligonucleotídeos iniciadores CDV1 (5'-ACA GGA TTG CTG AGG ACC TAT-3') e CDV2 (5'-CAA GAT AAC CAT GTA CGG TGC-3'), descritos por Frisk et al. (1999), que amplificam um produto de 287 pares de bases (pb), referente ao gene codificador da nucleoproteína do CDV, que é responsável pela fixação na membrana dos plasmócitos (Anexo).

4.5 Considerações Éticas

O projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa Animal da Universidade Estadual do Maranhão – UEMA, sob protocolo nº 17/2010.

4.6 Delineamento experimental e análise estatística

O delineamento experimental utilizado foi inteiramente casualizado e por conveniência. A flutuação das variáveis séricas foi analisada como medidas repetidas no tempo. O modelo incluiu os efeitos fixos de tratamento, período e a interação tratamento e período. Para análise das variáveis hemácias, hemoglobina, hematócrito, leucócito, linfócito, monócitos, basófilos, segmentados, plaquetas, proteína plasmática, ureia, creatinina, ALT e AST. O modelo utilizado para a análise foi:

$$Y_{ij} = \mu + T_i + P_j + T_i \times P_j + e_{ij}$$

Sendo: Y_{ij} as medidas observadas nas unidades experimentais; μ a média geral; T_i o efeito de tratamento; P_j o efeito das datas experimentais; $T_i \times P_j$ a interação entre tratamento e datas experimentais e e_{ij} o erro experimental.

Para execução das análises estatísticas foi utilizado o procedimento PROC MIXED do programa estatístico SAS[®], versão 9. Para todas as análises considerou-se nível de significância de 5% ($P < 0,05$).

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os cães utilizados não eram vacinados e exibiam sinais clínicos compatíveis com cinomose e foram positivos no ensaio imunoenzimático CDV Ag que apresenta 98,8% de sensibilidade e 97,7% de especificidade. Destes, quinze apresentavam a forma neurológica e digestória da doença e apenas um apresentava somente a forma respiratória. Os sinais clínicos mais frequentes foram: secreção ocular e nasal, febre e apatia, vômito, anorexia, diarreia, paresia dos membros pélvicos, mioclonias, fasciculação no membro torácico esquerdo e convulsões.

Após a análise imunoenzimática, os cães foram submetidos à avaliação molecular, no intuito de confirmar os resultados e testar a viabilidade desta técnica de diagnóstico. Contudo, nem todas as amostras apresentaram amplificado de 287 pb, compatível ao gene estudado, que é responsável pela codificação da nucleoproteína do vírus da cinomose (CDV). Fato este, possivelmente relacionado com a qualidade de conservação da amostra e conseqüentemente a quantidade de RNA extraído, o que não inviabiliza a técnica como diagnóstico do CDV, mas demonstra a necessidade de um maior aparato técnico e infra estrutural.

A análise hematológica revelou que todos os cães já apresentavam algum tipo de alteração, tais como: anemia, leucocitose, trombocitopenia, diminuição do hematócrito e aumento da proteína plasmática, sendo visualizado em um deles inclusão viral (corpúsculo de Lentz, no esfregaço sanguíneo).

Após análise estatística dos resultados das coletas feitas no dia 0 e depois de 30 dias de tratamento com a droga vegetal, observou-se que dos parâmetros hematimétricos analisados, somente as plaquetas apresentaram um grau de significância estatística (Tabela 1).

Tabela 01- Valores médios e respectivos desvios padrão das variáveis dos parâmetros hematimétricos das amostras de cães com cinomose, provenientes do município de São Luís – MA, antes e após o tratamento com *Morinda Citrifolia*.

Parâmetros hematológicos	G1 ¹		G1 ²		Valores de referência	Valor p
	Média	±DP	Média	±DP		
VG (%)	37,10 ^a	±8,14	37,90 ^a	±8,34	37-55	0,7215
Hemácias (x10 ⁶ /μl)	5,69 ^a	±1,38	5,74 ^a	±1,26	5,5-8,5	0,8828
Hemoglobina (g/dL)	11,39 ^a	±2,76	11,47 ^a	±2,51	12-18	0,8961
Leucócitos	10895,00 ^a	±6253,00	12980,00 ^a	±6543,00	6.000-17.000	0,4109
Segmentados	7410,00 ^a	±1562,40	7200,00 ^a	±1275,40	3.000-11.500	0,6136
Linfócitos	1590,00 ^a	±1434,80	1620,00 ^a	±1168,90	1.000-4800	0,9145
Monócitos	18,00 ^a	±17,51	280,00 ^a	±286,00	150-1.350	0,3676
Eosinófilos	570 ^a	±496,80	805,44 ^a	±579,30	100-1.250	0,5778
Bastonetes	140,00 ^a	±117,40	170,00 ^a	±149,7	00-540	0,7577
PPT (g/dL)	7,00 ^a	±1,94	6,90 ^a	±1,37	5,5-8,0	0,9088
Plaquetas	237.630 ^a	±952,970	335,500 ^a	±170,320	200.000-500.000	0,0384

a – letras iguais na mesma linha indicam não haver diferenças estatísticas significativas entre as médias (p > 0,05).

1 - ANOVA com comparação das médias pelo teste não paramétrico de Mann-Whitney.

VG= volume globular; PPT= proteínas plasmáticas totais.

G1¹- grupo cinomose antes do tratamento com noni. G1²- grupo cinomose depois do tratamento com noni.

A avaliação clínica dos animais com cinomose revelou que aos 30 dias pós-tratamento com noni, cinco animais apresentaram remissão dos sinais clínicos e melhora na série vermelha e plaquetas. Esses animais apresentavam paresia dos membros pélvicos e após o tratamento voltaram a andar. Apresentaram sequelas no membro pélvico direito caracterizado por espasmos musculares repetitivos.

Um animal diminuiu a fasciculação do membro pélvico direito com 19 dias de tratamento e houve um aumento no número de linfócitos. Outro animal após 12 dias de tratamento apresentou diminuição da fasciculação do membro pélvico esquerdo e voltou a andar. Ele também foi positivo para *Babesia* e *Ehrlichia* e foi aplicado uma dose de imizol após 22 dias de tratamento com noni. Todos os animais tiveram o número de plaquetas aumentadas consideravelmente.

Quatro animais vieram a óbito durante o tratamento, sendo que eles estavam na fase neurológica avançada e apresentavam convulsões. Um deles apresentou também infecção urinária com presença de exsudato. Esse animal estava muito debilitado e, por isso foi submetido à fluidoterapia como tratamento de suporte porque não estava se alimentando de

forma satisfatória. Também se observou que o animal apresentava aumento dos neutrófilos segmentados e linfopenia.

Tabela 02- Valores médios e respectivos desvios padrão das variáveis dos parâmetros hematimétricos das amostras de cães com cinomose, provenientes do município de São Luís – MA, antes e após o tratamento convencional.

Parâmetros hematológicos	G1 ¹		G1 ²		Valores de referência	Valor p
	Média	±DP	Média	±DP		
VG (%)	35,667 ^a	±3,933	36,333 ^a	±4,033	37-55	0,7778
Hemácias (x10 ⁶ /μl)	5,285 ^a	±0,4507	4,892 ^a	±0,5572	5,5-8,5	0,2085
Hemoglobina (g/dL)	11,765 ^a	±2,436	11,182 ^a	±1,921	12-18	0,6549
Leucócitos	14,133 ^a	±6,166	13,042 ^a	±6,098	6.000-17.000	0,7641
Segmentados	66,833 ^a	±12,057	76,667 ^a	±6,439	3.000-11.500	0,1085
Linfócitos	21,833 ^a	±12,156	11,500 ^a	±8,712	1.000-4800	0,1214
Monócitos	2,000 ^a	±1,789	1,667 ^a	±1,366	150-1.350	0,7244
Eosinófilos	7,500 ^a	±4,806	8,000 ^a	±5,477	100-1.250	0,8699
Bastonetes	1,167 ^a	±1,329	1,333 ^a	±2,422	00-540	0,8855
PPT (g/dL)	7,500 ^a	±2,345	8,500 ^a	±2,345	5,5-8,0	0,4772
Plaquetas	266,17 ^a	±109,25	226,00 ^a	±68,635	200.000-500.000	0,4559

a – letras iguais na mesma linha indicam não haver diferenças estatísticas significativas entre as médias (p > 0,05).

1 - ANOVA com comparação das médias pelo teste não paramétrico de Mann-Whitney.

VG= volume globular; PPT= proteínas plasmáticas totais.

G1¹- grupo cinomose antes do tratamento convencional. G1²- grupo cinomose depois do tratamento convencional.

A avaliação clínica revelou que aos 30 dias pós-tratamento convencional (Tabela 2), um animal teve remissão dos sinais clínicos e os outros tiveram apenas melhora parcial do quadro clínico, inclusive com recuperação dos movimentos dos membros pélvicos. No mesmo período de tempo, dentre os cães submetidos ao tratamento com noni, quatro obtiveram remissão dos sinais clínicos.

Outro cão do tratamento convencional teve remissão parcial dos sinais clínicos, com diminuição dos movimentos oscilatórios da cabeça, recuperação dos movimentos dos membros pélvicos, ausência de convulsão, porém, as mioclonias persistiram ao longo do tratamento.

Tabela 03- Valores médios e respectivos desvios padrão das variáveis dos parâmetros bioquímicos das amostras de cães com cinomose, provenientes do município de São Luís – MA, antes e após o tratamento com *Morinda citrifolia*.

Parâmetros bioquímicos	G1 ¹		G1 ²		Valores de referência	Valor p
	Média	±DP	Média	±DP		
Uréia (mg/dl)	36,00 ^a	±21,42	51,30 ^a	±35,73	10-60	0,1075
Creatinina (mg/dl)	0,58 ^a	±0,20	0,79 ^a	±0,41	0,5-1,5	0,2697
AST (UI/L)	43,40 ^a	±18,27	47,40 ^a	±29,14	10-88	0,6520
ALT (UI/L)	43,40 ^a	±18,27	37,90 ^a	±26,18	10-88	0,5433

a – letras iguais na mesma linha indicam não haver diferenças estatísticas significativas entre as médias ($p > 0,05$).

1 - ANOVA com comparação das médias pelo teste não paramétrico de Mann-Whitney.

G1¹- grupo cinomose antes do tratamento com noni. G1²- grupo cinomose depois do tratamento com noni.

TGO (AST- - Aspartato amino transferase); TGP (ALT- Alanina amino transferase).

Tabela 04- Valores médios e respectivos desvios padrão das variáveis dos parâmetros bioquímicos das amostras de cães com cinomose, provenientes do município de São Luís – MA, antes e após o tratamento convencional.

Parâmetros bioquímicos	G1 ¹		G1 ²		Valores de referência	Valor p
	Média	±DP	Média	±DP		
Uréia (mg/dl)	27,433 ^a	±10,580	41,500 ^a	±29,222	10-60	0,3470
Creatinina (mg/dl)	0,5183 ^a	±0,2450	0,9500 ^a	±0,4806	0,5-1,5	0,1771
AST (UI/L)	53,983 ^a	±42,802	71,200 ^a	±20,398	10-88	0,3536
ALT (UI/L)	44,833 ^a	±33,630	49,867 ^a	±25,080	10-88	0,7650

a – letras iguais na mesma linha indicam não haver diferenças estatísticas significativas entre as médias ($p > 0,05$).

1 - ANOVA com comparação das médias pelo teste não paramétrico de Mann-Whitney.

G1¹- grupo cinomose antes do tratamento convencional. G1²- grupo cinomose depois do tratamento convencional.

TGO (AST- - Aspartato amino transferase); TGP (ALT- Alanina amino transferase).

As dosagens de creatinina e AST (Transaminase glutâmico-oxalacética) no soro sanguíneo mantiveram suas médias dentro dos valores de referência em todos os animais depois do tratamento com noni, sugerindo assim que o noni não exerceu efeitos hepatotóxicos e nefrotóxicos. Somente um animal apresentou a ALT (Transaminase Glutâmico Pirúvica) acima do valor de referência. Nos demais animais, os valores estavam dentro dos valores de referência.

Apesar de todos os animais apresentarem aumento nos valores séricos de ureia, em apenas dois animais foi observado que esse metabólito estava acima dos valores de referência para a espécie. É importante ressaltar que a alteração desse parâmetro individual, sugere que o noni não induz a lesão hepática na dose utilizada semelhantes a estudos de West et al. (2009).

Para que o efeito nutricional fosse descartado, seria necessário que todos os animais recebessem a mesma ração ao longo do tratamento, o que não foi possível, pois nem todos os animais ficaram no Canil Experimental da UEMA e alguns animais eram mantidos na casa de seus proprietários.

Estes achados, porém, podem estar relacionados com outros fatores, como por exemplo, um quadro moderado de desidratação e/ou o consumo de uma dieta de alto valor proteico. Nesse caso para descartar o efeito nutricional seria necessário que todos os animais recebessem a mesma ração ao longo do tratamento, o que não foi possível, pois os animais eram mantidos na casa de seus proprietários.

As dosagens de creatinina, ALT e AST no soro sanguíneo mantiveram suas médias dentro dos valores de referência em quase todos os animais depois do tratamento com noni, sugerindo assim que o noni não exerceu efeitos hepatotóxicos e nefrotóxicos. Em pesquisas com ratos foi demonstrado que o suco de noni fermentado quando administrado tem um efeito hepatoprotetor e hipoglicemiante (WEST et al., 2009; NAYAK et al., 2011). Em trabalho realizado por nosso grupo em camundongos isogênicos, observamos que o noni não alterou as funções hepáticas e renais mesmo utilizando-o por longo período (ALMEIDA-SOUZA, 2011).

Nos últimos cinco anos, a população maranhense começou a utilizar o suco do noni de forma descontrolada no tratamento de várias afecções e a grande maioria delas sem nenhum embasamento científico e sem conhecimento dos efeitos adversos do fruto do noni. A literatura mostra que o noni (*M. citrifolia*) possui em sua composição substâncias que tem propriedades anti-inflamatórias, antineoplásicas e antioxidantes, ação bactericida, antiviral e fungicida. Estas propriedades são determinadas pela presença de substâncias ativas que também podem apresentar atividade imunomoduladora (ALMEIDA-SOUZA, 2011).

Na presente pesquisa, sugere-se que o aspecto mais relevante foi a remissão dos sinais neurológicos, o que abre grandes perspectivas para o tratamento de doenças que afetam o tecido nervoso de animais e pessoas. Um grupo de pesquisadores japoneses descreve que a *M. citrifolia* em condições experimentais teve efeito protetor para os neurônios, por facilitar a secreção de insulina e por atenuar os efeitos da intolerância destas células à diminuição de glicose nos casos de isquemia (HARADA et al., 2009).

É conhecido que o CDV causa sérios danos neuronais e leva a desmielinização. Considerando que o suco do noni possui propriedades imunomoduladora, anti-inflamatória e

analgésica (BASAR et al., 2010), presumimos que os vários componentes existentes no fruto têm ação conjunta no reparo do SNC e na resposta imunológica. No entanto, dentre as substâncias identificadas no noni destaca-se o danacantal, uma antraquinona natural que demonstrou ter atividade no controle da infecção por HIV por induzir a morte de células infectadas pelo vírus (ALI et al., 2000).

Comparando-se a resposta clínica frente ao tratamento, observou-se que o noni proporcionou uma melhora em menor tempo (cinco dias). Enquanto que a utilização de drogas experimentais, como ribavirina, os animais só começaram a apresentar uma melhora no quadro clínico a partir do sétimo dia pós-tratamento (MANGIA, 2008). A eficácia do tratamento do noni em um intervalo de tempo menor pode ser um fator extremamente importante para a minimização dos danos dos neurônios, o que o tornaria muito mais eficaz na terapêutica desta doença.

Esse achado sugere que o noni tem efeito imunomodulador também em cães. Estudos realizados por Palu et al. (2008) mostram que o noni diminui a produção de IL4 e aumenta a IFN γ . O sistema imunológico pode influenciar no quadro geral do animal, com relação à produção de ROS (radicais livres de oxigênio), citocinas e no bloqueio de anticorpos anti-mielina (BÜRGE et al., 1989; TIPOLD et al., 1992; SUMMERS et al., 1995; WÜNSCHMANN et al., 1999; GRÖNE et al., 2000; MARKUS et al., 2002; STEIN et al., 2004; GREENE, 2006; STEIN et al., 2006).

Segundo estudos feitos por Elia et al. (2007), comprovou que a ribavirina causa mutações no vírus da cinomose que levam a um erro catastrófico na formação do genoma viral. Pode ser especulado que a ribavirina interfere com a RNA polimerase pela competição com nucleosídeos naturais e produz erro na terminação da cadeia de RNA do vírus. Além disso, a ribavirina afeta o vírus ainda no meio extracelular, de maneira precoce no seu ciclo de replicação.

Paresia dos membros pélvicos foi o sinal neurológico mais prevalente nos cães deste estudo. Segundo Silva (2009), a cinomose na fase neurológica é progressiva, raramente estacionando, levando à morte em curso agudo ou crônico, e sempre deixando sequelas irreversíveis, quando eventualmente o animal sobreviva.

Na atualidade o tratamento existente para a cinomose é paliativo e, normalmente quando é diagnosticada a forma neurológica, a recomendação é a eutanásia dos animais. Com base na inexistência de uma terapêutica adequada utilizamos o noni na perspectiva de

obtenção de um produto eficaz no tratamento desta importante doença de canídeos, que acomete milhares de cães, principalmente em países em desenvolvimento. Apesar da amostra ser pequena os resultados indicam que o noni pode ser uma excelente alternativa no tratamento de importantes doenças em cães. Tal aplicação já está ocorrendo em nosso grupo de pesquisa onde foi demonstrado que o noni teve eficácia no tratamento da leishmaniose visceral.

Observou-se no estudo que a eficácia do noni não foi influenciada pelo período de evolução apresentado pelos animais ao início do tratamento. Podemos sugerir o tratamento com o noni na fase neurológica da cinomose, tornando o prognóstico da enfermidade mais favorável. Também verificamos que nenhum dos animais tratados, cuja melhora do estado clínico foi evidente, apresentou sequelas incompatíveis com a vida normal.

6. CONCLUSÕES

A droga vegetal do noni mostrou-se eficaz na remissão dos sinais neurológicos de cães portadores da cinomose, porém ainda há necessidade de mais estudos para validar o seu uso terapêutico nesta doença.

O uso da droga vegetal na dose de 500mg mostrou-se seguro para cães, pois não interferiu nas funções hepáticas e renais.

7. PERSPECTIVAS FUTURAS

1. Desenvolvimento de um modelo que permita avaliar qual o mecanismo de atuação do noni no Sistema Nervoso Central;
2. Verificar por meio de PCR em tempo real, se o noni é capaz de diminuir a carga viral;
3. Avaliar se o noni foi capaz de induzir uma resposta imunoprotetora;
4. Validar um protocolo terapêutico.

REFERÊNCIAS

ALI, A.M. et al. Antiviral, cytotoxic and antimicrobial activities of anthraquinones isolated from the roots of *Morinda elliptica*. **Pharmaceutical Biology**, v. 38, p. 298-301, 2000.

ALMEIDA-SOUZA, F. **Estudo fitoquímico e atividade leishmanicida *in vitro* do extrato bruto do fruto de *Morinda citrifolia* (noni)**. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal) – Universidade Estadual do Maranhão, São Luís, 2011.

BARRETT, T. Morbillivirus infections, with special emphasis on Morbillivirus of carnivores. **Veterinary Microbiology**, v. 69, p. 3-13, 1999.

BASAR, S.; UHLENHUT, K.; HÖGER, P.; SCHÖNE, F.; WESTENDORF, J. Analgesic and antiinflammatory activity of *Morinda citrifolia* L. (noni) fruit. **Phytother. Res.**, v. 24, n. 1, p. 38-42, 2010.

BEINEKE, A; PUFF, C.; SEEHUSEEN, F. & BAUMGARTNER, W. Pathogenesis and immunopathology of systemic and nervous canine distemper. **Veterinary Immunology and Immunopathology**. V. 127, p. 1-18, 2009.

BIAZZONO, L.; HAGIWARA, M. K.; CORRÊA, A. R. Avaliação da resposta imune humoral em cães jovens imunizados contra a cinomose com vacina de vírus atenuado. **Brazilian journal of veterinary research and animal science**, v. 38, n. 5, p. 245-250, 2001.

BÜRGE, T.; GRIOT, C.; VANDEVELDE, M.; PETERHANS, E. Antiviral antibodies stimulate production of reactive oxygen species in cultured canine brain cells infected with canine distemper virus. **Journal of Virology**, v. 63, n. 6, p. 2790-2797, jun. 1989.

CHA, S. Y.; KIM, E. J. ; KANG, M. ; JANG, S. H.; LEE, H.B.; JANG, H. J. Epidemiology of canine distemper virus in wild raccoon dogs (*Nyctereutes procyonoides*) from South Korea. **Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases**, 2012.

CHAN-BLANCO, Y. e col. The noni fruit (*Morinda citrifolia* L.): A review of agricultural research, nutritional and therapeutic properties. Review. **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 19, p. 645 – 654, 2006.

CHAPPUIS, G. Control of canine distemper. **Veterinary Microbiology**, Amsterdam, v. 44, n.2-4, p. 351-358, may, 1995.

DEL PUERTO, H. L.; VASCONCELOS, A. C.; MORO, L.; ALVES, F.; BRAZ, G. F. & MARTINS, A.S. Canine distemper vírus detection in asymptomatic and non vaccinated dogs. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 30, p. 139-144, 2010.

ELIA, G.; BELLOLI, C.; CIRONE, F.; LUCENTE, M. S.; CARUSO, M.; MARTELLA, V.; DECARO, N.; BUONAVOGLIA, C.; ORMAS. In vitro efficacy of ribavirin against canine distemper virus. **Antiviral Revist.** V. 77, p. 108-113, 2008.

FEITOSA, M.M. et al..Avaliação física, citológica, de proteínas e determinação qualitativa de globulinas do líquido de cães normais e com encefalites por cinomose. **Brazilian Journal Research and Animal Science**, São Paulo, v. 34, p.147 – 151, 1997.

FENNER, W.R. Doenças do Cérebro. **Tratado de Medicina interna veterinária: doenças do cão e do gato.** 4. ed., Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2004. Cap.104, p. 586-638.

FURUSAWA, E.; HIRAZUMI, A.; STORY S.; JENSEN, J. Antitumor Potential of a Polysaccharide-rich Substance from the Fruit Juice of *Morinda citrifolia* (Noni) on Sarcoma 180 Ascites Tumor in Mice. **Phytother. Res.**,v. 17, n. 10, p. 1158 – 1164, 2003.

GISELLE, B. M. **Técnica permite acelerar obtención del jugo de noni para su comercialización.** Boletín N° 63. MICIT-CONICIT, Francia. Outubro, 2007.

GREENE, C.E. & APPEL M.J. Canine distemper, p.25-41. In: Greene C.E. (Ed.), **Infectious Diseases of the Dog and Cat.** 3 ed. Saunders Elsevier, St Louis,. p.1387, 2006.

GRÖNE, A.; ALLDINGER, S.; BAUMGÄRTNER, W. Interleukin-1 α , -6, -12 and tumor necrosis factor- α expression in brains of dogs with canine distemper virus infection. **Journal of Neuroimmunology**, v. 110, p. 20-30, 2000.

HARADA, S; HAMABE, W.; KAMIYA, K.; SATAKE, T.; TOKUYAMA, S. I. Protective effect of *Morinda citrifolia* on the ischemic neuronal damage **Yakugaku Zasshi**. 129, p. 203-207, 2009.

HARTMANN, T.L.S.; BATISTA, H.B.C.R.; DEZEN, D.; et al. Anticorpos neutralizantes contra o vírus da cinomose e da parainfluenza em cães de canis dos municípios de Novo Hamburgo e porto Alegre, RS, Brasil. **Ciência Rural**, v.37, n.4, p. 1178-1181, 2007.

HAAS, L.; BARRETT, T. Rinderpest and other animal morbillivirus infections: comparative aspects and recent developments. **Journal of veterinary medicine**, v. 43, p. 411-420, 1996.

HEINICKE, R. M. The pharmacologically active ingredient of noni. **Bull. Pac. Trop. Bot. Gard.**, v. 15, p. 10-14. 1985.

HEINICKE, R. M. The Xeronine System: A new Cellular Mechanism That Explains the Health Promoting Action of Noni and Bromelain. **Direct Source Publishing**, Orem, Utah, 2001.

HIRAZUMI, A.; FURUSAWA, E. An immunomodulatory polysaccharide-rich substance from the fruit juice of *Morinda citrifolia* (noni) with anti-tumor activity. **Phytotherapy Research**. v.13, p. 380-387, 1999.

INBiO. 1997. **Instituto Nacional de Biodiversidade. Costa Rica**. Disponível em:<<http://www.inbio.ac.cr/bims/k03/p13/c045/o0142/f01359/g008903/s028172.htm>> Acesso em: 20 de junho de 2012.

JONES, T. C., HUNT, R. D., KING, N. W. **Patologia Veterinária**. São Paulo: Manole, 2000. p. 1415.

KAJITA, M.; KATAYAMA, H.; MURATA, T.; KAI, C.; HORI, M. & OZARI, H. Canine distemper vírus induces apoptosis through caspase -3 and -8 activation in vero cells. **Journal Veterinary Medicinal B. Infection, Dis. Vet. Public Health**, v. 53, p. 273-277, 2006.

KAMATA, M. et al. Cell-based chemical genetic screen identifies damnacanthal as an inhibitor of HIV-1 vpr induced cell death. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 348, p. 1101-1106, 2006.

KAMIYA, K.; HAMABE, W.; TOKUYAMA, S.; HIRANO, K.; SATAKE, T.; KUMAMOTO-YONEZAWA, Y.; YOSHIDA, H.; MIZUSHINA, Y. Inhibitory effect of anthraquinones isolated from the Noni (*Morinda citrifolia*) root on animal A-, B- and Y-families of DNA polymerases and human cancer cell proliferation. **Food Chemistry**, v. 118, n. 3, p. 725-730, 2010.

KUMAGAI, K.; YAMAGUCHI, R.; UCHIDA, K.; TATEYAMA, S. Lymphoid apoptosis in acute canine distemper. **The Journal of veterinary medical science**. v. 66, n. 2, p. 175-181, 2004.

LATHA, D.; GEETHA, M.; RAMADASS, P.; NARAYANAN, R. B. Development of recombinant nucleocapsid protein based IgM-ELISA for the early detection of distemper infections in dogs. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 119, p. 278-286, 2007.

LAVAUT1, N. E. G.;LAVAUT2, J. A. G. *Morinda citrifolia* Linn.:potencialidades para su utilización em la salud humana. **Revista Cubana de Farmácia**, v. 37, n. 3, p. 1 –1, 2003.

LEVAND, O. & LARSON, H.O. Some chemical constituents of *Morinda citrifolia*.

Planta Med., v. 36, p.186-7, 1979.

MACCARI, M.; MAPUSUA, K. An Overview of Organic Agriculture in the Pacific. **Report Commissioned by IFOAM** (International Federation of Organic Agriculture Moviments), New York, 44 p. 2007.

MANGIA, S. H., **Tratamento experimental de cães naturalmente infectados com o vírus da cinomose na fase neurológica com o uso da Ribavirina e Dimetil-Sulfóxido (DMSO)**. 186f. Dissertação. – Botucatu, 2008.

MANGIA, S. H.; PAES, A. C. Neuropalologia da cinomose. **Vet. Zootec.** V. 15, n. 3, p. 416-428, 2008.

MARKUS, S.; FAILING, K.; BAUMGÄRTNER, W. Increase expression of proinflammatory cytokines and lack of up-regulation of anti-inflammatory cytokines in early distemper CNS lesions. **Journal of Neuroimmunology**, v. 125, p. 30-41, 2002.

MARTELLA, V.; ELIA, G.; LUCENTE, M.S.; DECARO, N.; LORUSSO, E.; BANYAI, K.; BLIXENKRONE-MOLLER, M.; LAN, N.T.; YAMAGUCHI, R.; CIRONE, F.; CARMICHAEL, L.E.; BUONAVOGLIA, C. Genotyping canine distemper virus (CDV) by a hemi-nested multiplex PCR provides a rapid approach for investigation of CDV outbreaks. **Veterinary Microbiology**, v.122, p. 32-42, 2007.

MARTELLA, V.; ELIA, G.; BUONAVOGLIA, C. Canine Distemper Virus. **Veterinary Clinics Small Animal Practice**, v. 38, p. 787-797, 2008.

MATTIESEN, A.D. **Acupuntura no tratamento de cinomose canina**. 2004. 40f. Monografia (Especialização em Acupuntura Veterinária) - faculdade de Medicina veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista, Botucatu, 2004.

McCLATHEY, W. From Polynesian Healers to Health Food Stores: Changing Perspectives of *Morinda citrifolia* (Rubiaceae). **Integrative Cancer Therapies**, v. 1, n. 2, p. 110 – 120, 2002.

McVEY, D.S.; KENNEDY, M. Vaccines for emerging and re-emerging viral diseases of companion animals. **The Veterinary Clinics of North America**. Small Animal Practice, Philadelphia, v.38, n.4, p. 903-917, July, 2008.

MOCHIZUKI, M.; MOTOYOSHI, M.; MAEDA, K.; KAI, K. Complement-mediated neutralization of canine distemper virus in vitro: cross-reaction between vaccine Onderstepoort and field KDK-1 strains with different hemagglutinin gene characteristics. **Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology**, v. 9, n. 4, p. 921-924, Jul. 2002.

MOHD-ZIN, Z.; HAMID, A. A.; OSMAN, A.; SAARI, N. Antioxidative activities of chromatographic fractions obtained from root, fruit and leaf of mengkudu (*Morinda citrifolia* L.). **Food Chemistry**, n.94, p. 169-178, 2006.

MORO, L.; VASCONCELOS, A. C. Patogenia da imunossupressão na cinomose canina. **A Hora Veterinária**, v. 17 n. 102, p. 53-57, mar./abr. 1998.

MÜLLER, J. C.; BOTELHO, G.G.K.; BUFALO, A.C.; BOARETO, A.C.; RATTMANN, Y.D.; MARTINS, E.S.; CABRINI, D.A.; OTUKI, M.F.; DALSENTER, P.R. *Morinda citrifolia* Linn (Noni): In vivo and *in vitro* reproductive toxicology. **J. Ethnopharmacol.**, v. 121, p. 229–233, 2009.

MURALIDHARAN, P. & SRIKANTH, J. Anti Epileptic Activity of *Morinda Citrifolia* Linn. Fruit Extract. **J. Chem.**, v. 7, n. 2, p. 612-616, 2010.

NAYAK, B. S.; MARSHALL, J.R.; ISITOR, G.; ADOGWA, A. Hypoglycemic and Hepatoprotective Activity of Fermented Fruit Juice of *Morinda citrifolia* (Noni) in Diabetic Rats. **Evid Based Complement Alternat Med.**, 2011.

NEGRÃO, F. J.; WOSIACKI, S. H.; ALFIERI, A. A.; ALFIERI, A. F. Perfil de restrição de um fragmento do gene da hemagglutinina amplificado pela RT-PCR a partir de estripes vacinais e selvagens do vírus da cinomose canina. **Arquivo brasileiro de medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 58, n. 6, p. 1099-1106, 2006.

NELSON, S. C. **Species Profiles for Pacific Island Agroforestry**. Nov, 2005. www.traditionaltree.org.

ORSINI, H; BONDAN, E. F. Patogenia das lesões no sistema nervoso central (SNC) na cinomose canina. **Clínica Veterinária**, São Paulo, n. 74, p. 28-34, mai/jun, 2008.

PALU, A. K.; SEIFULLA, R. D.; WEST, B.J. *Morinda citrifolia* L. (noni) improves athlete endurance: Its mechanisms of action. **J. Med. Plants Res.**, v. 2, n.7, p.154-158, 2008.

PANZERA, Y. ; CALDERÓN, M. G.; SARUTE, N.; GUASCO, S.; CARDEILLAC, A. ;BONILLA, B. Martín HERNÁNDEZ, M.; FRANCIÀ, L. ; BEDÓ, G.; TORRE, J. LA; PÉREZ, R. Evidence of two co-circulating genetic lineages of *canine distemper virus* in South America. **Virus Research**. v. 163, Issue 1, p. 401–404, Jan. 2012.

PRAVEEN, K. R.; AWANG, B. Antioxidant activity, total phenolic and flavonoid content of *Morinda citrifolia* fruit extracts from various extraction processes. **Journal of Engineering Science and Technology**. v. 2, n. 1, p. 70-80, 2007.

QUIAO, J. et al. Characterization of a new dog isolate of canine distemper virus from China. **Virus Research**, Volume 163, p. 401-104, 2011.

QUINN, P.J. et al. **Veterinária e Doenças Infecciosas**. Porto Alegre: artmed, 1 ed., p. 372-376, 2005.

RAZAFIMANDIMBISON, S.G.; McDOWELL, T.D.; HALFORD, D.A.; BREMER, B. Origin of the pantropical and nutraceutical *Morinda citrifolia* L. (*Rubiaceae*): comments on its distribution range and circumscription. **J. Biogeography**, n. 37, p. 520-529, 2010.

SAITO, T. B.; ALFIERI, A. A.; WOSIACKI, S. R.; NEGRÃO, F. J.; MORAIS, H. S. A.; ALFIERI, A. F. Detection of canine distemper virus by reverse transcriptase-polymerase chain reaction in the urine of dogs with clinical signs of distemper encephalitis. **Research in Veterinary Science**, 2005. Disponível em: www.sciencedirect.com. Acesso em: maio 2012.

SANTOS, B. M. **Cinomose canina - Revisão de Literatura**. 18f. Monografia (Especialização em Clínica Médica e Cirurgia de pequenos animais) – Universidade Castelo Branco, Goiânia, 2006.

SCHOBESBERGER, M.; SUMMERFIELD, A.; DOHERR, M. G.; ZURBRIGGEN, A.; GRIOT, C. Canine distemper virus-induced depletion of uninfected lymphocytes is associated with apoptosis. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 104, p. 33-44, 2005.

SIGWALT, D. **Cinomose em carnívoros**. 2009. 34f. Monografia (Graduação) – Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Faculdade de Medicina Veterinária, Porto Alegre, 2009.

SHEN, D. T.; GORHAM, J. R. Survival of pathogenic distemper virus at 5c and 25c. **Veterinary Medicine/ Small Animal Clinician**, Bonner springs, v. 75, n. 1, p. 69-72, jan. 1980.

SHIN, Y. J.; CHO, K. O.; CHO, H. S.; KANG, S. K.; KIM, H. J.; KIM, Y. H.; PARK, H. S.; PARK, N. Y. Comparison of one-step RT-PCR and nested PCR for the detection of canine distemper virus in clinical samples. **Australian Veterinary Journal**, v. 82, n. 1-2, p. 83-86, jan./fev. 2004.

SILVA, J. J. M. **Adubação Orgânica e Mineral de Noni: Desempenho Agronômico, Nutrição da Planta, Qualidade de Fruto e de Suco**. Areia: 104f. Tese (Doutorado em Agronomia) – 2010.

SILVA, M. C.; FIGHERA, R. A.; BRUM, J. S.; GRAÇA, D. L.; KOMMERS, G.D; IRIGOYEN, L. F. & BARROS, C. S. L. Aspectos clinopatológicos de 620 casos neurológicos de cinomose em cães. **Pesquisa Veterinária Brasileira**. V. 27, p. 215-220, 2007.

SILVA, M. C.; FIGHERA, R. A.; BRUM, J. S.; MAZZANTI, A.; D. L.; K.; PIEREZAN, F.; BARROS, C. S. L. Neuropatologia da cinomose canina: 70 casos (2005-2008). **Pesquisa Veterinária Brasileira**. V. 29, p. 643-652, 2009.

SOLOMON, N. NONI (**Morinda citrifolia**) **FRUTO INSULAR**. Geneva RD Vineyard, Utah 84058, 1999.

STATISTICAL ANALYSIS SYSTEM. **SAS: user's guide statistic**. 9th ed. Cary, p.956, 2001.

STEIN, V. M.; CZUB, M.; SCHREINER, N.; MOORE, P. F.; VANDEVELDE, M.; ZURBRIGGEN, A.; TIPOLD, A. Microglial cell activation in demyelinating canine distemper lesions. **Journal of Neuroimmunology**, v. 153, p. 122-131, 2004.

STATISTICAL ANALYSIS SYSTEM. **SAS: user's guide statistic**. 9th ed. Cary, p. 956, 2001.

STEIN, V. M.; BAUMGÄRTNER, W.; KREIENBROCK, L.; ZURBRIGGEN, A.; VANDEVELDE, M.; TIPOLD, A. Canine microglial cells: stereotypy in immunophenotype and specificity in function? **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 113, p. 277-287, 2006.

SUMMERS, B. A. et al. Pathogenicity of morbilliviruses for terrestrial carnivores. **Veterinary Microbiology**, v. 44, p. 187-191, 1995.

THOMSON, G. E. The health Benefits of Traditional Chinese Plant Medicines: Weighing the scientific evidence. **A reporter for the Rural Industries Research and Development Corporation**. Australian, 2007.

TILLEY, L.P.; SMITH, F.W.K. **Consulta Veterinária em 5 minutos – Espécie Canina e Felina**. São Paulo: Manole, 3. Ed., p. 224-225, 2008.

TIPOLD, A.; VALDEVELDE, M. JAGGY, A. Neurological manifestations of canine distemper vírus infection. **Journal of Small Animal Practice**, Oxford, v.33, p. 446-470, 1992.

VAN MOLL, P.; ALLDINGER, S.; BAUMGÄRTNER, W.; ADAMI, M. Distemper in wild carnivores: an epidemiological, histological and immunocytochemical study. **Veterinary Microbiology**, v. 44, p. 193-199, 1995.

VANDEVELDE, M. **The Pathogenesis of nervous Distemper**. Disponível em: www.vin.com/proceedings/proceedings.plx?CID=WSAVA&PID. Out, 2004. Acesso em 15/05/2012.

VANDEVELVE, M.; ZURBRIGGEN, A. The neurobiology of canine distemper virus infection. **Veterinary Microbiology**, v. 44, n. 2-4, p. 271-280, 1995.

VANDEVELVE, M.; ZURBRIGGEN, A. Demyelination in canine distemper virus infection: a review. **Acta Neuropathologica**, New York, v. 109, n. 1, p.56-68, jan. 2005.

VON MESSLING, V.; CATTANEO, R. Amino-terminal precursor sequence modulates canine distemper virus fusion protein function. **Journal of Virology**, v. 76, n. 9, p. 4172-4180, mai., 2002.

WANG, M. Y. et al. *Morinda citrifolia* (Noni): A literature review and recent advances in Noni research. **Acta Pharmacologica Sinica**, v. 23, n. 12, p. 1127 – 1141, 2002.

WANG, M.Y. & SU, C. Cancer Preventive Effect of *Morinda citrifolia* (Noni). **Ann. N. Y. Acad. Sci.**, v. 952, p. 161-168, 2001.

WEST, B. J.; DENG, S.; PALU, A. K.; JENSEN, C. J. *Morinda citrifolia* Linn. (Rubiaceae) leaf extracts mitigate UVB-induced erytrea. **Journal Natural Medicine**, n.3, p. 351-354, 2009.

WEST, B.J.; SU, C. X.; JESEN, C. J. Hepatotoxicity and subchronic toxicity tests of *Morinda citrifolia* (noni) fruit. **J Toxicol Sci.** vol. 34, P. 581-585, 2009.

WÜNCHMANN, A.; ALLDINGER, S.; KREMMER, E.; BAUMGÄRTNER, W. Identification of CD4+ and CD8+ T cell subsets and B cells in the brain of dogs with spontaneous acute, subacute-, and chronic-demyelinating distemper encephalitis. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 67, p. 101-116, 1999.

WYSS-FLUEHMANN, G.; ZURBRIGGEN, A.; VANDEVELD, M.; PLATTET, P. Canine distemper virus persistence in demyelinating encephalitis by swift intracellular cell-to-cell spread in astrocytes in controlled by the viral attachment protein. **Acta Neuropathologica**, vol. 119, p. 617-630, 2010.

YANG, J.; GADI, R.; PAULINO, R.; THOMSON, T. Total phenolics, ascorbic acid, and antioxidant capacity of noni (*Morinda citrifolia* L.) juice and powder as affected by illumination during storage. **Western Pacific Tropical Research Center**, College of Natural and Applied Sciences, University of Guam, UOG Station, Mangilao, GUAM, USA, 2010.

ZEE, Y. C.; MacLACHLAN, N. J. Paramyxoviridae, Filoviridae and Bornaviridae. In HIRSH, D. C.; MacLACHLAN, N. J.; WALKER, R. L. **Veterinary Microbiology**. 2nd ed. Iowa: Blackwell, Cap.60, 369 – 376, 2004.

APÊNDICES

APÊNDICE I



Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

A cinomose é uma doença viral altamente contagiosa causada pelo vírus da cinomose canina (canine distemper vírus – CDV). Além de cães, o CDV afeta várias espécies de carnívoros, entretanto, o cão representa o principal reservatório. A cinomose acomete cães de qualquer idade, raça e sexo, mas tem maior predileção por filhotes e indivíduos não vacinados. A cinomose pode apresentar 4 fases clínicas: tegumentar, digestória, respiratória e neurológica (não sendo obrigatório a ordem dos sintomas clínicos). O prognóstico da doença é desfavorável, tendo 80% de letalidade.

O objetivo deste estudo é avaliar o efeito de um fitoterápico no tratamento de cães portadores de cinomose.

O processo de seleção será de acordo com a sintomatologia clínica do animal e a comprovação será feita através de diagnóstico clínico e exames laboratoriais.

Sua participação nesta pesquisa consistirá em concordar com o tratamento do animal com medicações convencionais ou com o extrato bruto do fitoterápico.

Os benefícios relacionados com a participação do animal poderá ser a melhora dos sintomas da doença e aumentar a sobre vida do animal.

Esta pesquisa foi submetida ao Comitê de Ética e Experimentação Animal (CEEA) e foi aprovada sob protocolo nº 17/2010.

As informações obtidas através dessa pesquisa serão confidenciais e asseguramos o sigilo sobre sua participação. Os dados não serão divulgados de forma a possibilitar sua identificação.

Nome e assinatura do pesquisador

Declaro que entendi os objetivos, riscos e benefícios da participação do meu animal na pesquisa e concordo em participar.

Nome e assinatura do Proprietário do animal

UEMA – Universidade Estadual do Maranhão. Cidade Universitária Paulo VI – Caixa postal 09 – São Luís-MA. Fone: (98) 32573676 Fax: (98) 3257-3676. E-mail: mylena.torres@hotmail.com Celular: (98) 81893397.

APÊNDICE II



FICHA CLÍNICA DE CÃES TRATADOS COM NONI

NOME DO ANIMAL: _____ SEXO: _____ IDADE: _____ PESO: _____
PROPRIETÁRIO: _____
ENDEREÇO: _____
TELEFONE: _____
DATA: _____

ANAMNESE: (Histórico atual, tratamento prévio, antecedentes mórbidos, condições de vida)

Vacinações: _____ Vermifugações: _____

EXAME CLÍNICO:

TR _____ °C Bat. Card. _____ /min. Mov. Resp. _____ /min.

ECTOSCOPIA: (Estado geral, mucosas, pele, linfonodos, articulações, glândulas paranasais, genitália, glândula mamária, fâcias).

NEUROLÓGICO (Envolver com círculo ou descrever)

A- Observação: Estado Mental: Alerta Estupor Deprimido Convulsões Coma

Postura: Normal Oscilação da cabeça Tremor Paresia do Posterior Tetraparesia

Marcha: Ataxia Dismetria em Círculo

B- Palpação: Anormalidade na musculatura ou esquelética

C- Reações Posturais _____

D- Sensação: Localização

Hiperestesia _____

Dor superficial _____

Dor Profunda _____

Outros Sintomas Relevantes: _____

TRATAMENTO: _____

INÍCIO DO TRATAMENTO:

DATA	MEDICAÇÃO	DOSAGEM	PARAMETROS CLÍNICOS

Médico Veterinário Responsável

ANEXOS

Análise Imunoenzimática:

Pipetou-se 4 gotas de sangue total, homogeneizando por 20 segundos com o diluente, em seguida, adicionou esse homogeneizado no cassete de análise e aguardou de 5-10 minutos para avaliação do resultado; sendo a presença de duas marcações uma no campo C2 e outra no T.

Análises Moleculares

Extração do RNA viral:

Homogeneizou-se 200 µL de sangue com 200 µL do tampão de lise por 5 minutos, após adicionou-se 75 µL do tampão de remoção protéica, centrifugou por 5 minutos à 12.000g, removeu o sobrenadante, transferindo-o para outro microtubo contendo 250 µL de isopropanol e 1% ácido acético. Em seguida, o sobrenadante contendo o ácido nucleico viral foi purificado pela ligação a uma coluna Miniprep. Ao fim, o RNA viral foi submetido a lavagens em soluções tampões, para remover impurezas residuais e sal, sendo então eluído em 40 µL de tampão TE (Tris-HCl 5 mM, EDTA 0,1 mM, pH 8,5).

Técnica de RT-PCR (*transcriptase reversa*):

Utilizou-se 10 µl mix 2x *RT-reaction* (oligo dT, random hexamers, MgCl₂ e dNTPs); 2 µl mix *enzyme* (SuperScript III RT, enzima transcriptase reversa; RNaseOUT, inibidor de ribonuclease recombinante); e 3 µl de água DEPEC (*Diethylpyrocarbonate*), livre de DNase e RNase foram misturados e distribuídos em microtubos, com posterior adição de 5 µl do RNA extraído. Em seguida, os microtubos foram submetidos aos parâmetros para a transcrição reversa no termociclador (Biocycler): 25°C por 10 minutos (transcrição), 42°C por 50 minutos (extensão) e 85°C por 5 minutos (inativação da enzima). Após esta ciclagem, as amostras foram tratadas com 2,5 µl de RNase H, submetidas a novo ciclo de 37°C por 20 minutos e posterior armazenamento a -20°C.

PCR

Utilizou-se 12,5 µl PCR Master mix, 2X (50 unid/ml) *Taq* DNA polymerase; 400 µM dNTPs; 3 mM MgCl₂; pH 8,5); 1,5 µl de cada iniciador (10 pmol); 4,0 µl do DNA extraído; 5,5 µl água livre DNase e RNase . Um volume total de 25µl foi submetido à amplificação, cujos parâmetros utilizados foram: uma etapa de desnaturação inicial, 94°C por 1 minuto; 40 ciclos de 94°C por 1 minuto, 59°C por 2 minutos, 72°C por 7 minutos; uma etapa de extensão final a 72°C por 7 minutos. Objetivando aumentar a quantidade do amplificado, o produto da PCR foi submetido a uma amplificação adicional sob os mesmos parâmetros.