

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA - UNESP

Câmpus de Jaboticabal

**CONTRIBUIÇÃO DOS ASTRÓCITOS NA
LEUCOENCEFALITE CANINA IMUNOMEDIADA CAUSADA
PELO VÍRUS DA CINOMOSE**

Tatianna Frate Schwardt De Nardo

Médica Veterinária

2018

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA - UNESP

Câmpus de Jaboticabal

**CONTRIBUIÇÃO DOS ASTRÓCITOS NA
LEUCOENCEFALITE CANINA IMUNOMEDIADA CAUSADA
PELO VÍRUS DA CINOMOSE**

Tatianna Frate Schwardt De Nardo

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Rosemeri de Oliveira Vasconcelos

**Tese apresentada à Faculdade de Ciências
Agrárias e Veterinárias – Unesp, Campus de
Jaboticabal, como parte das exigências para
a obtenção do título de Doutor em Medicina
Veterinária, área: Clínica Médica Veterinária**

2018

N224c Nardo, Tatianna Frate Schwardt De
Contribuição dos astrócitos na leucoencefalite canina
imunomediada causada pelo vírus da cinomose / Tatianna
Frate Schwardt De Nardo. -- Jaboticabal, 2018
69 f.

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista
(Unesp), Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias,
Jaboticabal
Orientadora: Rosemeri De Oliveira Vasconcelos

1. Cinomose. 2. Desmielinização. 3. Vírus. 4. Cão. I.
Título.

Sistema de geração automática de fichas catalográficas da Unesp. Biblioteca da
Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Jaboticabal. Dados fornecidos
pelo autor(a).

Essa ficha não pode ser modificada.



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

Câmpus de Jaboticabal



CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO DA TESE: CONTRIBUIÇÃO DOS ASTRÓCITOS NA LEUCOENCEFALITE CANINA
IMUNOMEDIADA CAUSADA PELO VÍRUS DA CINMOSE

AUTORA: TATIANNNA FRATE SCHWARDT DE NARDO

ORIENTADORA: ROSEMERI DE OLIVEIRA VASCONCELOS

Aprovada como parte das exigências para obtenção do Título de Doutora em MEDICINA
VETERINÁRIA, área: Clínica Médica Veterinária pela Comissão Examinadora:

Profa. Dra. ROSEMERI DE OLIVEIRA VASCONCELOS
Departamento de Patologia Veterinária / FCAV / UNESP - Jaboticabal

Profa. Dra. GEÓRGIA MODÉ MAGALHÃES
Curso de Medicina Veterinária / Instituto Federal do Sul de Minas / Muzambinho/MG

Profa. Dra. CLAUDIA MOMO
Departamento de Patologia / FMVZ - USP - São Paulo/SP

Pós-doutoranda PAMELA RODRIGUES REINA MOREIRA
Departamento de Patologia Veterinária / FCAV-UNESP/Jaboticabal-SP

Profa. Dra. DANIELA BERNADETE ROZZA (Videoconferência)
Departamento de Clínica e Cirurgia Veterinária-FMVA/UNESP / Araçatuba/SP

Jaboticabal, 23 de novembro de 2018

DADOS CURRICULARES DA AUTORA

TATIANNA FRATE SCHWARDT – nascida em oito de dezembro de 1981, natural da cidade de São Paulo, estado do São Paulo. Iniciou sua graduação no curso de Medicina Veterinária em janeiro de 2002, na Faculdade Metodista de São Paulo, tendo finalizado a mesma em dezembro de 2006. cursou o programa de residência médico-veterinária na área de Clínica Médica de Pequenos Animais do Hospital Veterinário Luís Quintiliano de Oliveira na Faculdade de Medicina Veterinária de Araçatuba (FMVA), da Universidade Estadual Paulista - Unesp, Câmpus de Araçatuba/SP, sob a orientação do Prof. Ass. Dr. Wagner Luis Ferreira, de janeiro de 2007 a janeiro de 2009. Ainda no ano de 2009, ingressou no programa de pós-graduação (mestrado) em Ciência Animal pela mesma instituição sob a orientação da Prof^a. Adj. Dr^a. Mary Marcondes, tendo-o concluído em julho de 2011. Em março de 2015 ingressou novamente no programa de pós-graduação (doutorado) em Medicina Veterinária da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias (FCAV) da Unesp, Câmpus de Jaboticabal/SP, sob a orientação da Prof^a. Ass. Dr^a. Rosemeri de Oliveira Vasconcelos. Desde fevereiro de 2013 é docente do Instituto Qualittas de Pós Graduação.



“Inicie por fazer o necessário, então o que é possível, e de repente, o impossível estará feito”

(São Francisco de Assis)

AGRADECIMENTO ESPECIAL

À minha orientadora, Rosemeri, pela confiança, amizade e apoio durante todas as etapas deste projeto. Por ter priorizado incontáveis vezes as minhas coisas e por entender minhas dificuldades na execução desse projeto, principalmente por se tratar de uma área fora da minha “zona de conforto”, obrigada por sempre me apoiar em todas as minhas decisões. Obrigada também pelos conselhos, pelos desabafos e pelos ensinamentos. E principalmente por me fazer entender a clínica, da visão patológica..... Muito mais que uma orientadora, você se tornou uma amiga.....

***“Este trabalho é dedicado aos meus pais e a minha irmã
pelo amor incondicional de sempre”***

AGRADECIMENTOS

À Deus, por me permitir chegar até aqui.

Ao meu pai, a minha mãe e meu padrasto pelo amor de sempre, por acreditarem e confiarem em mim.

Ao meu marido, por ter aceitado toda essa mudança de cidades, ter tido paciência em períodos que nem eu mesma tinha paciência comigo! Muito obrigada, te amo!

À minha orientadora, Prof^a. Dr^a. Rosemeri de Oliveira Vasconcelos, por ter acreditado em mim, me ajudado em TODAS as fases deste trabalho e por ter feito a minha passagem por Jaboticabal muito mais especial.

À professora Gisele Fabrino por ter gentilmente cedido as suas amostras e desta forma, ter contribuído de maneira fundamental na realização deste trabalho. Além de sempre se mostrar muito prestativa e me ajudar com as minhas dúvidas e necrópsias, desde a época da residência até as disciplinas de mestrado e doutorado.

À veterinária Luciana Jardim, pela concessão das amostras para que fosse possível a realização deste trabalho.

Ao professor Danísio Munari pela ajuda com a análise estatística.

Ao meu amigo Paulo por ter me ajudado e me ensinado a realizar todos as fases deste trabalho! E também por deixar o laboratório sempre com um clima engraçado e agradável e estar sempre ao meu lado em momentos importantes!!

Aos meus amigos e parceiros de laboratório, Mayara Caroline, Priscila, Pamela, Mayara Luzzi, Gaby, Andresa e Júlio por todo o suporte no laboratório e principalmente por serem os novos melhores amigos de infância!! Tenho muita sorte de por onde passo, faço amigos de vida mesmo. Obrigada pelos conselhos, desabafos, risadas, por tudo.

Aos funcionários e ex-funcionários do Departamento de Patologia Veterinária desta instituição, em especial à Mabel Custódio sempre muito disposta a ajudar e com um sorriso no rosto!!

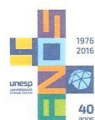
Ao técnico do laboratório Antônio, por sempre ter me ajudado, mesmo quando os prazos eram curtos. Muito obrigada!

Ao Departamento de Patologia Veterinária desta Instituição, por ter oferecido todo suporte técnico necessário para a realização deste trabalho.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPQ), pelo auxílio financeiro fornecido a esta pesquisa (141225/2016-5) pelo financiamento da bolsa de estudos.

SUMÁRIO

	Página
RESUMO.....	iii
ABSTRACT.....	iv
LISTA DE ABREVIACOES.....	v
LISTA DE TABELAS.....	vii
LISTA DE FIGURAS.....	viii
1. INTRODUÇÃO.....	01
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	03
2.1 Histórico.....	03
2.2 Características do vírus.....	04
2.3 Estirpes virais.....	05
2.4 Epidemiologia.....	07
2.5 Patogenia do VCC.....	08
2.6 Sinais clínicos da cinomose.....	09
2.7 Neuropatogenia do VCC.....	10
3. OBJETIVOS.....	19
4. MATERIAL E MÉTODOS.....	20
4.1 Análise imunohistoquímica.....	20
4.2 Análise estatística.....	22
5. RESULTADOS.....	24
6. DISCUSSÃO.....	32
7. CONCLUSOES.....	37
8. REFERÊNCIAS.....	38



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
Câmpus de Jaboticabal



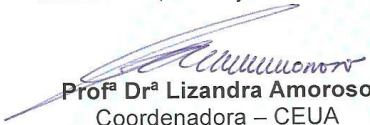
CEUA – COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

CERTIFICADO

Certificamos que o projeto intitulado "**Pesquisa de fator inibidor da migração de macrófagos (MIF) em encéfalos de cães com cinomose**", protocolo nº 007003/17, sob a responsabilidade do Prof^a. Dr^a. Rosemeri de Oliveira Vasconcelos, que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao Filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica (ou ensino) - encontra-se de acordo com os preceitos da lei nº 11.794, de 08 de outubro de 2008, no decreto 6.899, de 15 de junho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), e foi aprovado pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA), da FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS, UNESP - CÂMPUS DE JABOTICABAL-SP, em reunião ordinária de 01 de junho de 2017.

Vigência do Projeto	01/08/2017 a 01/11/2018
Espécie / Linhagem	Canina
Nº de animais	40
Peso / Idade	1-10 anos
Sexo	Ambos os sexos
Origem	Departamento de Patologia Veterinária

Jaboticabal, 01 de junho de 2017.


Prof^a Dr^a Lizandra Amoroso
Coordenadora – CEUA

CONTRIBUIÇÃO DOS ASTRÓCITOS NA LEUCOENCEFALITE CANINA IMUNOMEDIADA CAUSADA PELO VÍRUS DA CINOMOSE

RESUMO – No sistema nervoso central (SNC) a homeostase é mantida pelo contato célula a célula e por meio da expressão de receptores de membrana em neurônios, que se ligam a microglia para mantê-la em estado quiescente. Os astrócitos também contribuem com este processo, além disso, eles exercem inúmeras funções para a manutenção da imunotolerância local. Em situação de injúria, os astrócitos podem apresentar um efeito deletério, pois ativam a resposta imune e os efeitos da neuroinflamação e podem contribuir para o agravamento dos sinais clínicos neurológicos. Na cinomose canina, enfermidade infecciosa que pode cursar com desmielinização e inflamação no SNC, acredita-se que além do vírus, o processo inflamatório contribua com as lesões na substância branca. Portanto, os objetivos do presente estudo foram avaliar o papel dos astrócitos na encefalite causada pelo vírus da cinomose, por meio da imunodeteção de MHC-II, linfócitos T CD3, MMP9, MIF e GFAP nas áreas de desmielinização do encéfalo, a fim de verificar se estes achados podem estar relacionados à extensão ou gravidade das lesões encefálicas. Para isso realizou-se um estudo retrospectivo do arquivo de blocos de parafina, onde utilizou-se 21 blocos de encéfalos (cerebelo) de cães naturalmente infectados com o vírus da cinomose (grupo infectado), bem como, encéfalos de cinco animais livres de doenças sistêmicas ou que afetem o SNC (grupo controle). Na análise imunohistoquímica das amostras verificou-se marcação aumentada de GFAP, MHC-II, MMP9 e MIF nas áreas de desmielinização e no neuropilo adjacente, observada principalmente em astrócitos. A detecção de CD3 foi restrita aos manguitos perivascularares. Nas áreas de necrose liquefativa, as células Gitter foram positivas para MMP-9, MIF e MHC-II. Por esses fatos conclui-se que os astrócitos ativados influenciam no afluxo de linfócitos T para o encéfalo, resultando em leucoencefalite, que contribui para o agravamento da lesão viral nos cães do grupo infectado. Nas fases mais avançadas, os fagócitos ativados (células Gitter) nas áreas de necrose liquefativa continuam a produção de mediadores inflamatórios, mesmo após a morte dos astrócitos nestes locais, agravando as lesões encefálicas.

Palavras-chave: desmielinização, neuroinflamação, vírus, resposta imune, cão.

CONTRIBUTION OF ASTROCYTES TO IMMUNE CANINE LEUKOENCEPHALITIS CAUSED BY THE DISTEMPER VIRUS

ABSTRACT – In the central nervous system (CNS) homeostasis is maintained by cell-to-cell contact and by the expression of membrane receptors on neurons, which bind to microglia to keep it in a quiescent state. Astrocytes also contribute to this process, in addition, they exert numerous functions for the maintenance of local immunotolerance. In a situation of injury, astrocytes may have a deleterious effect, since they activate the immune response and the effects of neuroinflammation and may contribute to the worsening of clinical neurological signs. In canine distemper, an infectious disease that can occur with demyelination and inflammation in the CNS, it is believed that in addition to the virus, the inflammatory process contributes to lesions in the white matter. Therefore, the objectives of the present study were to evaluate the role of astrocytes in encephalitis caused by the distemper virus, by immunodetection of MHC-II, CD3, MMP9, MIF and GFAP T lymphocytes in the areas of brain demyelination, in order to verify whether these findings may be related to the extent or severity of brain lesions. For this, a retrospective study of the paraffin block file was carried out, using 21 blocks of cerebellum from dogs naturally infected with the distemper virus (infected group), as well as the brains of five disease-free animals systemic or affecting the CNS (control group). In the immunohistochemical analysis of the samples, there was an increased marking of GFAP, MHC-II, MMP9 and MIF in the areas of demyelination and adjacent neuropil, observed mainly in astrocytes. CD3 detection was restricted to perivascular cuffs. In areas of liquefiable necrosis, Gitter cells were positive for MMP-9, MIF and MHC-II. By these facts it is concluded that the activated astrocytes influence the influx of T lymphocytes to the brain, resulting in leukoencephalitis, which contributes to the worsening of the viral lesion in dogs of the infected group. In the more advanced stages, activated phagocytes (Gitter cells) in the areas of liquefying necrosis continue the production of inflammatory mediators, even after the death of the astrocytes in these places, aggravating the brain lesions.

KEY WORDS: demyelination, neuroinflammation, virus, immune response, dog.

LISTA DE ABREVIACOES

CD	<i>Cluster of differentiation</i> (agrupamento de diferenciação)
CD3	Agrupamento de diferenciação dos linfócitos T CD3
CD4	Agrupamento de diferenciação dos linfócitos T CD4, é um receptor específico de moléculas de MHC-II
CD8	Agrupamento de diferenciação dos linfócitos TCD8, é um receptor específico para moléculas de MHC-I
CD79	Marcador de linfócitos B
CD150	Molécula sinalizadora de ativação de linfócitos
GFAP	proteína fibrilar ácida glial
GI	Grupo infectado
GC	Grupo controle
GL	Graus de liberdade
HE	Coloração de hematoxilina e eosina
IL2	Interleucina 2
IL-6	Interleucina 6
IL-10	Interleucina 10
MAC387	Anticorpo para marcação de macrófagos
MIF	Fator de inibição da migração de macrófagos
MHC-I	Complexo de histocompatibilidade principal de classe I
MHC-II	Complexo de histocompatibilidade principal de classe II
MMP-9	Metaloproteinase-9
NK	Células <i>natural killers</i>
QM	Quadrado médio
ROS	Espécies reativas de oxignio
SNC	Sistema nervoso central
SQ	Soma dos quadrados
TCR	Receptor de linfócitos T efetores
Treg	Linfócitos T regulatórios
TGF-	Fator de transformação do crescimento beta

Th1	Resposta de linfócito T <i>helper</i> (auxiliares) do tipo 1
Th2	Resposta de linfócito T <i>helper</i> (auxiliares) do tipo 2
TRIS EDTA	Tampão para recuperação antigênica de pH básico
TRIS HCL	Tampão para lavagem de pH 7,4
VCC	Vírus da cinomose canina

LISTA DE TABELAS

	Página
Tabela 1. Anticorpos utilizados para a imunomarcção dos diferentes marcadores de inflamação em encéfalos de cães com cinomose.....	22
Tabela 2. Comparação entre grupos de animais infectados e controle para os anticorpos testados.....	28
Tabela 3. Comparação da variação das características por fator (F1 e F2).....	29
Tabela 4. Resumo da análise de variância multivariada para o Fator 1...	29
Tabela 5. Resumo da análise de variância multivariada para o Fator 2....	29

LISTA DE FIGURAS

Página

- Figura 1.** Esquema demonstrando a infecção do vírus da cinomose canina, com presença de vírus, com inflamação mínima. O vírus penetra no SNC infectando as células endimárias por duas vias: 1) O vírus entrando no SNC, pelas células do plexo coróide 2) O vírus se dissemina nas células do plexo coróide e após citólise permanecem no espaço subaracnóide e se replicam nas células endimárias 3) A replicação nos astrócitos, resultando na produção de nucleocapsídeos intracitoplasmáticos e se disseminando por astrócitos adjacentes. 4) e 5) Vírus se multiplicando até atingir os oligodendrócitos e neurônios, resultando em desmielinização e morte neuronal (Fonte: Modificado de Greene e Vandeveld, 2012)..... 14
- Figura 2** Fotomicrografias do encéfalo de cães com cinomose. A) Notar área de desmielinização na substância branca adjacente ao 4º ventrículo (*; barra = 200 µm). B) Área similar a descrita em A. Notar inúmeras inclusões acidófilas pleomórficas no citoplasma de astrócitos reativos (setas, barra = 20 µm). C) Área de necrose liquefativa repleta de células Gitter (setas, barra = 20 µm). D) Notar manguitos perivasculares e hiperemia vascular no neuropilo (setas, barra = 50 µm). Hematoxilina e Eosina 25
- Figura 3.** Fotomicrografias de imunomarcacão do encéfalo de cães com cinomose. A) Notar reatividade astrocitária (GFAP) nas áreas de desmielinização (A1 = detalhe de astrócitos gemistocíticos) e adjacentes à lesão (A2 = detalhe de astrócitos reativos; barra = 100 µm). B) Marcação de linfócitos T (CD3) no infiltrado inflamatório meningeal (detalhe), adjacente a desmielinização (*, barra = 50 µm). C) Astrócitos gemistocíticos MMP9 positivos em área de desmielinização e em células Gitter das áreas de necrose liquefativa do neuropilo (detalhe, seta, barra = 50µm). D) Marcação de MIF nos astrócitos gemistocíticos das áreas desmielinizadas (*) e neuropilo adjacente, bem como, nos maguitos perivasculares (detalhe, barra = 50µm). Complexo de polímeros ligados a peroxidase..... 27
- Figura 4.** Fotomicrografias de imunomarcacão do encéfalo de cães com cinomose. A) Notar marcação positiva e intensa para MHC-II em área de desmielinização e adjacentes à lesão. No detalhe verifica-se astrócitos gemistocíticos positivos em área desmielinizada (barra = 100 µm). B) Mesmo aspecto de A, em área adjacente ao 4º ventrículo (*; barra = 200 µm). Complexo de polímeros ligados a peroxidase..... 28

Figura 5. Variação do componente principal 1 (CP1) em relação ao componente principal (CP2) para as características estudadas. Rótulos indicam a classificação por grupo; Grupo 1 = doentes (GI); Grupo 2 = controle (GC)..... 30

Figura 6. Variação do componente principal 1 (CP1) em relação ao componente principal 2 (CP2) para as características estudadas. Vetores indicam a relação entre as características estudadas (GFAP, CD3, MIF, MHC-II e MMP9)..... 31

1. INTRODUÇÃO

As moléstias infecciosas que acometem o sistema nervoso em cães e gatos são muito comuns na rotina do atendimento clínico de animais com sinais neurológicos. Dentre elas, inúmeras etiologias podem estar presentes, porém, o diagnóstico mais prevalente é a cinomose canina. (GREENE e VANDELVELDE, 2012).

O vírus da cinomose canina (VCC) é um RNA vírus, altamente contagioso, que acomete cães e animais selvagens, podendo desencadear sinais variados, tais como diarreia, vômito, e em alguns animais, sinais neurológicos, sendo estes, geralmente a causa da eutanásia.

A doença tem apresentado, nas últimas décadas, aumento significativo do número de casos, mesmo em populações de animais vacinados, e inúmeros relatos de surtos de proporções alarmantes (MARTINS et al., 2009; DAY et al. 2016). No Brasil a doença representa cerca de 6% de todas as ocorrências clínicas e até 11% da causa dos óbitos de cães (NEGRÃO et al., 2007).

Os animais que são acometidos pelo VCC apresentam uma elevada taxa de mortalidade, que se refere a elevado número de animais que morrem pela doença em um período de tempo e um alto coeficiente de letalidade, que se refere ao poder da doença de provocar a morte, sendo inferior apenas à raiva (GEBARA et al., 2004; SONNE et al., 2009). A enfermidade não apresenta sazonalidade, predisposição racial ou sexual e a faixa etária afetada varia muito entre os animais. Entretanto, em algumas pesquisas afirma-se que há maior incidência da doença em períodos com temperaturas mais baixas (HEADLEY; GRAÇA, 2000) e em filhotes entre 60 e 90 dias. Nestes animais, a taxa de letalidade é muito alta em virtude de declínio dos anticorpos maternos e ao título insuficiente de anticorpos neutralizantes contra o vírus (MARTINS et al., 2009).

Na cinomose, o envolvimento do SNC é comum e as lesões comumente descritas são áreas de desmielinização e inflamação do neuropilo. Na literatura destaca-se que a causa da desmielinização aguda do tecido nervoso estaria relacionada à ação do vírus em diferentes tipos celulares, incluindo os oligodendrócitos e astrócitos (CARVALHO et al., 2014; PAN et al., 2013). Os astrócito

foi incriminado como responsável pela difusão do vírus no tecido nervoso pelo contato célula a célula, por meio dos seus processos citoplasmáticos (WYSS-FLUEHMANN et al., 2010). O VCC ativa astrócitos e microglia. As micróglia são estimuladas a expressar MHC-II e produzir enzimas líticas e espécies reativas do oxigênio (ROS) que são tóxicas para os neurônios e seus axônios e para as células da glia, incluindo os oligodendrócitos (CARVALHO et al., 2014). Considerando a importância dos astrócitos na homeostase e na injúria do SNC seria importante avaliar o seu papel nas lesões neurológicas da cinomose canina.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2. 1 Histórico

O VCC causa uma doença infecciosa grave que acomete cães de todas as idades e que gera alta mortalidade e morbidade. Os primeiros relatos datam de aproximadamente 300 anos. De acordo com Howell (1965), o primeiro caso suspeito ocorreu em 1746 no Peru e após aproximadamente 25 anos, casos suspeitos foram descritos na Europa. Nesta ocasião vários animais vieram a óbito com descrição de sinais semelhantes aos causados pelo VCC. Blancou (2004) apoia sua teoria que cães da América do Sul ao cruzarem o Atlântico, disseminaram a doença na Europa, tendo como porta de entrada a Espanha. Neste episódio ocorreram 900 casos de óbito em um único dia, com os sinais clínicos muito semelhantes aos da doença. Por desconhecimento na época, alguns relatos se referiam aos animais com o diagnóstico de cinomose, porém, com sinais clínicos também de outras doenças. Por este fato, os relatos deste período podem não corresponder à realidade, como foi o caso de alguns animais diagnosticados com a bactéria *Haemophilus bronchisepticus*, apresentando sinais respiratórios. Em contrapartida, em estudo realizado por Panzera et al. (2015) sugere-se a possibilidade de que as primeiras estirpes virais originaram-se dos Estados Unidos em 1880 e foram divididas em duas linhagens. Uma destas linhagens está presente até hoje em diferentes regiões geográficas.

Blancou (2004) relatou a primeira transmissão experimental realizada por Karle, que transmitiu o vírus por meio de uma escova de dente contaminada com excreções de animais doentes para lábios de cães jovens em 1844. Em 1905, o agente foi isolado pela primeira vez pelo veterinário francês Henry Carré e dois anos depois Lentz observou corpúsculos de inclusão em neurônios. Em 1912, os mesmos corpúsculos foram observados por Sinigaglia em diversos outros tecidos, originando-se o nome utilizado até hoje para as inclusões, como corpúsculos de Sinigaglia-Lentz.

Os sinais neurológicos começaram a ser descritos, com maior frequência, em 1947, quando Rubarth verificou que animais com encefalite geralmente apresentavam concomitantemente pneumonia, hiperqueratose de coxins e mioclonias, muitos destes, evoluindo para óbito (GLEDHILL, 1953). A partir dessa década, as vacinas

com vírus atenuado começaram a ser introduzidas e ajudaram a reduzir os casos da doença em vários países (APPEL, 1987). Entretanto, mesmo com a profilaxia proporcionada pela vacina, atualmente ainda são observadas epidemias relacionadas à doença, com altas taxas de morbidade e mortalidade em populações de cães e animais silvestres não vacinados e vacinados (BRESALIER; WORBOYS, 2014).

2.2 Características do vírus

O VCC pertence à ordem Mononegavirales, da subfamília Paramyxovirinae e gênero Morbillivirus (HEADLEY et al., 2009). Ele é antigenicamente semelhante ao vírus da peste bovina, ao vírus do sarampo em humanos e o vírus da cinomose focina. O vírus é grande comparado aos demais, com um diâmetro de 150-250 nm, composto por uma fita simples de RNA, de polaridade negativa, não segmentada, com aproximadamente 15.000 nucleotídeos e revestido de envoltório lipídico duplo (GREENE; VANDEVELDE, 2012).

O RNA viral codifica 6 proteínas estruturais: a proteína que forma o nucleocapsídeo, de simetria helicoidal, que contém o genoma viral e consiste da nucleoproteína (NP) e do complexo polimerase, o qual inclui as proteínas P (fosfoproteína) e L (polimerase larga). Em seu envoltório lipídico, o VCC exibe duas glicoproteínas: a hemaglutinina (HA), maior e com atividade de hemoaglutinação, fixação na célula hospedeira e tropismo celular; e a proteína de fusão (F) que é responsável pela ligação entre a membrana celular e o envelope viral. Desta forma a proteína HA é fundamental para a infecção, já que é responsável pelo reconhecimento e ligação em receptores das células do hospedeiro (VON MESSLING et al., 2006; VANDEVELDE; ZURBRIGGEN, 2005). Devido ao fato de possuir envoltório lipídico, o VCC é extremamente sensível ao calor e a desinfetantes comuns, sendo inativado e destruído em temperaturas entre 50 a 60°C em até 30 minutos, pela quebra de seu envoltório lipídico e consequente exposição de seu material genético. O agente pode sobreviver *in vivo* e nas secreções por até uma hora a 37°C e até três horas em temperatura ambiente. Em baixas temperaturas, o VCC pode manter sua capacidade infectante durante semanas e em temperaturas próximas ao ponto de congelamento, o vírus se torna estável por meses e até anos (MONTEIRO et al., 2010). Desinfecções

rotineiras do ambiente são suficientes para eliminação do vírus em hospitais e canis, não sendo necessário realizar vazios sanitários (MONTEIRO et al., 2012; GREENE; VANDEVELDE, 2012).

2.3 Estirpes virais

As estirpes do VCC são bastante similares, porém, há apenas um sorotipo viral (NEGRÃO et al., 2007). Evidências sugerem que possam existir variações antigênicas em áreas geográficas distintas, entre os tipos virais selvagens com relação às cepas vacinais, responsáveis pelo ressurgimento da doença. O sequenciamento genético e análise filogenética são métodos que indicam a relação evolucionária entre linhagens coletadas em diversas regiões geográficas e ajudam a entender as diferenças antigênicas entre cepas biologicamente distintas (CARSILLO et al., 2007). Desta forma, os estudos sorológicos e filogenéticos devem ser realizados entre as diferentes espécies, entre os animais de uma mesma espécie e em áreas geográficas distintas (MARTINS et al., 2009).

A proteína H, principal glicoproteína do envelope do VCC, é a que apresenta maior diversidade, sendo a mais adequada para monitorar mudanças genéticas no vírus (ÖRVELL, 1980). Análises filogenéticas do gene H mostraram diferenças genéticas entre as estirpes do VCC, provenientes de regiões geográficas distintas (HARDER et al., 1996; NEGRÃO, 2006). A análise do gene H do VCC, possibilita a organização das estirpes virais em genótipos (BOLT et al., 1997).

Alguns estudos que utilizaram painéis de anticorpos monoclonais, realizados com estirpes vacinais do CVV e estirpes isoladas de casos clínicos, também demonstraram grande variação antigênica na proteína H (hemaglutinina) e maior estabilidade nas proteínas F e P (HAAS et al., 1999; MOCHIZUKI et al., 1999).

A proteína H e a proteína de fusão (F) são as determinantes antigênicas do vírus e estão localizadas no envelope viral, juntamente com a matriz proteica. A proteína H é fundamental para a infecção, visto que é responsável pelo reconhecimento e ligação em receptores das células do hospedeiro (Von Messling et al., 2006). As estirpes que se distinguem em várias regiões geográficas, são devido a

proteína H que possui alta variabilidade de nucleotídeos (Hass et al., 1997; Von Messling et al., 2001).

O vírus da cinomose tem tropismo por diversos tecidos do organismo, porém, existem diversas cepas, algumas mais neurotrópicas e virulentas que outras. As mais patogênicas são a Snyder Hill e R252, que são altamente neurotrópicas e imunossupressoras (MORO; VASCONCELOS, 2003; ALVES et al., 2006). As mais conhecidas podem produzir sinais clínicos distintos, variando entre os sistemas acometidos, a duração e a intensidade de sinais clínicos (CORRÊA; CORRÊA, 1992).

As estirpes Onderstepoort e Rockborn são as mais utilizadas em todo o mundo para a elaboração de vacinas contra o VCC (MOCHIZUKI et al., 2002). A cepa Snyder Hill é a mais utilizada em experimentos de inoculação intraencefálica, tanto em estudos da patogênese viral quanto em desafios pós-vacinais, devido ao seu grande potencial neurotrópico (NEGRÃO et al., 2007).

A maioria das cepas circulantes são geneticamente divergentes das cepas usadas na produção de vacinas. As cepas de Onderstepoort e Snyder Hill (designadas como linhagem América 1) foram utilizadas para a produção de vacinas desde os anos 50, e são utilizadas até hoje. Muitos questionaram a eficácia dessas vacinas, com relatos de falhas em cães vacinados no Japão, México, Argentina e Estados Unidos (MARTELLA et al. 2011). No entanto, até então linhagens emergentes, com diversidade genética significativa tem sido detectadas e já se discute a utilização de novas cepas nas vacinas (KAPIL; YEARY, 2011).

De acordo com recentes estudos, existe uma nova cepa circulando no Texas, Washington, Carolina do Sul e leste do Canadá. Riley e Wilkes (2015) ao colherem amostras de cães positivos de 2010 a 2014 verificaram uma cepa geneticamente distinta de todos os genótipos previamente identificados, porém, ainda muito semelhante com as já existentes. Ainda não é conhecido o impacto deste genótipo para a população canina e para animais silvestres, quando comparado a outros genótipos circulantes.

2.4 Epidemiologia

Não existem fatores predisponentes para o estabelecimento da doença, tais como sexo, idade ou raça (GAMA et al., 2005). No entanto, alguns trabalhos enfatizam que a sua incidência é maior no período em que há diminuição da taxa de anticorpos maternos, que ocorre entre os 60 e 90 dias de idade. Animais de todas as idades podem ser acometidos, principalmente por falhas imunológicas ou ausência de vacinação (QUINN et al., 2005).

Em relação a raças caninas, supõe-se que cães braquicefálicos são menos susceptíveis à infecção e tendem a apresentar menor índice de mortalidade e sequelas quando comparados aos dolicocefálicos (GREENE; VANDEVELDE, 2012).

Dentre as faixas etárias, os filhotes são considerados o grupo que menos desenvolve distúrbios neurológicos. Por isso, conseguem sobreviver a uma infecção inicial e posteriormente desenvolver imunidade parcial ao vírus. No entanto, esses cães correm o risco de manifestarem a doença no SNC quando adultos, por persistência viral (FENNER et al., 2004; BRITO et al, 2016). Frade e Dantas (2011), em estudo semelhante, verificaram que 58,54% dos 41 cães estudados tinham até um ano de idade, 39,3% entre um e nove anos e 2,44% estavam acima de 10 anos de idade.

Quanto à prevalência das lesões nos diferentes sistemas do organismo canino, o total de animais com sinais clínicos respiratórios foi de 63 (9,5%), 77 animais com sinais dermatológicos (11,6%) e 69 com sinais clínicos de envolvimento gastrointestinal (10,4%). A maior prevalência foi de animais com sinais clínicos neurológicos, totalizando 454 casos (68,5%) (FRADE e DANTAS, 2011).

O VCC pode infectar diversas espécies tais como, mamíferos terrestres e marinhos, tais como, macacos (YOSHIKAWA et al., 1989; Sun et al., 2010), javalis e focas (KENNEDY et al., 2000), resultando em grande número de animais infectados. As epidemias do VCC em animais selvagens são um grave problema global e já foram associadas a altas taxas de mortalidade em leões do Serengeti e em raposas-dasilhas na Califórnia. Infecções em alguns animais silvestres no Brasil também já foram relatadas, tais como em cachorro-do-mato e raposa-do-campo (ROELKE-PARKER et al., 1996; MEGID et al., 2009; MEGID et al., 2010).

Dentre as causas estudadas para a disseminação viral e a sua adaptação a diversos tipos de hospedeiros e ambientes, a hipótese mais viável está associada à

transmissão interespecífica e recombinações virais por alterações moleculares do gene H (HAN et al., 2008). Apesar da grande variabilidade de espécies que podem ser infectadas, os cães e os furões são os principais reservatórios do vírus e são considerados a fonte de infecção para populações susceptíveis (HARDER; OSTERHAUS, 1997). Apesar de serem observadas infecções em grandes felinos, não existem evidências de infecções naturais em gatos domésticos. Na década de 70, a infecção experimental com o VCC em gatos domésticos e suínos resultou em soroconversão, mas não em doença clínica (APPEL, 1974). Infecções experimentais produzidas com estirpes altamente virulentas resultaram apenas em discreto aumento da temperatura corporal nesses animais (GASKIN, 1974). No entanto existe um temor de que um dia possam ocorrer mutações virais que tornem o vírus adaptado e capaz de infectar e causar sinais clínicos nessa espécie, o que poderia levar a uma nova epizootia.

2.5 Patogenia do VCC

O VCC pode ser transmitido aos animais pelo contato com aerossóis, secreções e excreções, ou até mesmo pela via transplacentária (KRAKOWKA et al., 1976). O vírus, que é considerado pantrópico (tropismo por diversos tecidos), tem propriedades que o caracterizam como linfotrópico e imunossupressor, ligando-se aos receptores CD150 ou SLAM (molécula sinalizadora de ativação de linfócitos) das células linfoides. A sua replicação em macrófagos teciduais leva a consequente disseminação para tonsilas e linfonodos bronquiais nas primeiras 24 horas (APPEL, 1969). Após quatro a seis dias de intensa replicação viral local, o vírus se dissemina, pelas vias linfática e sanguínea, para outros tecidos linfoides como baço, medula óssea, linfonodos mesentéricos, células de Kupffer no fígado, tecidos linfoides associados à lâmina própria no intestino e estômago, o que resulta em pico febril e em leucopenia por linfopenia (APPEL, 1969; APPEL, 1987). A partir desse momento o animal já começa a eliminar e transmitir o vírus nas secreções e excreções. Após nove a 14 dias à infecção, ocorre disseminação do vírus para vários sistemas incluindo o respiratório, gastroentérico, urogenital e tegumentar. Geralmente esta disseminação está associada a um segundo pico febril (APPEL, 1969; APPEL et al., 1981). A ligação

do vírus ao tecido epitelial é mediada pela expressão do receptor PVRL4, também denominado de nectina-4 ou N4 (NOYCE et al., 2013; ALVES et al., 2015). Finalmente, o VCC invade o SNC, resultando em sinais clínicos graves que podem levar o animal ao óbito. O curso da doença e a recuperação da infecção estão relacionados à capacidade do animal em produzir anticorpos associados à virulência da estirpe, carga viral e ao estado imunológico do animal (APPEL, 1987). Uma vez dentro do SNC, o vírus pode levar a graves sinais clínicos com prognóstico reservado a ruim (AMUDE et al., 2012).

A imunossupressão observada comumente nos animais está associada à diminuição da produção de interleucina-1 pelos macrófagos e monócitos e o aumento da síntese de prostaglandina-E2 (PGE2), um agente imunossupressor com capacidade de inibir a produção das interleucinas 2 e 12 e do interferon-gama (IFN- γ) pelos linfócitos Th1 (KRAKOWKA et al., 1987). Consequentemente ocorre diminuição na ativação de monócitos e na sua consequente apresentação de antígenos, o que contribui para a diminuição da diferenciação de linfócitos B, da formação de plasmócitos e da produção de imunoglobulinas (CARVALHO, 2014).

2.6 Sinais clínicos da cinomose

A doença sistêmica pode muitas vezes ser fatal e está comumente associada com alterações respiratórias e distúrbios gastrintestinais (BEINEKE et al., 2008). A sintomatologia clínica severa apresentada está diretamente relacionada aos casos de animais expostos a estirpes virais altamente virulentas ou a doses infectantes elevadas ou ainda à imunossupressão severa, geralmente causada pela presença do vírus na medula óssea. Entretanto, quando há aumento da titulação de anticorpos, os sinais clínicos podem desaparecer e o vírus ser eliminado da maioria dos tecidos, ou persistir, por longos períodos, em tecidos uveais, neurônios e tegumentos (BURAGOAIN; KALITA, 2017). Quando há o envolvimento gastrointestinal e respiratório, os cães infectados podem apresentar secreções nasais e oculares, que contribuem como fonte de infecção, além de ceratoconjuntivite seca, hiperqueratose de coxins digitais e dermatite pustular (SONNE et al., 2009). Esta distribuição disseminada ocorre devido ao VCC possuir alta afinidade por tecidos epiteliais e se

disseminar em cerca de 10 dias pós-infecção, a partir dos sítios primários de replicação viral (BURAGOAIN; KALITA, 2017)

Usualmente, os sinais neurológicos ocorrem na ausência de alterações sistêmicas, sendo que as manifestações neurológicas são variadas e comumente progressivas, podendo incluir mioclonia, nistagmo, ataxia, tetraparesia, tetraplegia e convulsões (AMUDE et al., 2007; AMUDE et al., 2012). Os animais que evoluem para essa condição clínico-patológica usualmente progridem a óbito ou são submetidos à eutanásia. Aqueles poucos cães que se recuperam, em grande parte apresentam sequelas neurológicas (BEINEKE et al., 2009).

A encefalite aguda, que ocorre inicialmente no curso da infecção em animais jovens ou imunossuprimidos é caracterizada por lesão viral direta. O vírus pode causar lesão multifocal nas substâncias cinzenta e branca. As lesões na substância cinzenta são resultado de infecção neuronal e necrose, e podem levar a uma poliencefalomalácia (MANGIA e PAES, 2008).

A encefalite multifocal em cães adultos acomete animais entre os quatro e seis anos de idade, com curso crônico. Esta enfermidade, normalmente não é precedida e nem coincidente com os sinais sistêmicos (CORRÊA e CORRÊA, 1992). (SUMMERS et al., 1995; GEBARA et al., 2004; GREENE, 2006; MANGIA e PAES, 2008)

2.7 Neuropatogenia do VCC

A passagem do vírus para o SNC ocorre pelo tropismo da cepa viral às células nervosas e pelo estado imunológico do animal. De acordo com Beineke et al. (2009), o VCC pode acometer neurônios, astrócitos, oligodendrócitos, células do plexo coroide e a micróglia. A diferença entre os sinais clínicos neurológicos de cães com cinomose pode estar relacionada à estirpe viral envolvida, ou seja, a cepa Snyder Hill acomete em grande parte os neurônios e a cepa R252 tem a capacidade de acometer as células da glia (VANDEVELDE; ZURBRIGGEN, 2005, SUMMERS et al., 1984). Outras duas cepas neurotrópicas importantes, são as A75/17 e a Onderstepoort que também apresentam maior tropismo por células da glia, resultando em desmielinização intensa (SUMMERS et al., 1984; GREENE; VANDEVELDE, 2012).

Na literatura existe controvérsia a respeito do mecanismo de neuroinvasão do VCC, ou seja, não há entendimento exato por qual via o vírus penetra e se dispersa pelo tecido nervoso (BEINEKE et al., 2008). Sabe-se que ocorre a disseminação pelo SNC no período de 8 a 10 dias pós-infecção. Para que isto ocorra é necessário que haja a desestabilização da barreira hematoencefálica (BHE), pela degradação da membrana basal vascular e perda das junções ocludentes do endotélio (VANDEVELDE; ZURBRIGGEN, 2005). A BHE é caracterizada como uma proteção que busca impedir ou dificultar a passagem de substâncias de diversos compartimentos de líquido do SNC para o tecido nervoso (GUYTON; HALL, 2006; MACHADO, 2002). A descoberta da permeabilidade seletiva diferenciada dos capilares do SNC data do início do século passado e foi verificada a partir da inoculação do corante azul-detripan em um camundongo e posterior observação de que todos os órgãos se coravam, com exceção do cérebro. Demonstrando, assim, que o corante provavelmente não ultrapassava a parede dos capilares cerebrais (CUNNINGHAM, 1999).

O VCC pode causar lesões nas substâncias branca e cinzenta do sistema nervoso central. Na substância branca comumente ocorre desmielinização e na substância cinzenta os danos estão relacionados à infecção neuronal e necrose do tecido nervoso. Em astrócitos é comum o aparecimento de reatividade astrocitária, bem como, a presença de inclusões citoplasmáticas e/ou nucleares (VANDEVELDE; ZURBRIGGEN, 2005; BEINEKE et al., 2015).

As lesões da fase aguda relacionadas à cinomose são histologicamente caracterizadas por discreto aumento do número de astrócitos e micróglia (ULRICH et al., 2014) e destaca-se que 95% das células infectadas pelo VCC são astrócitos (LEMPP et al., 2014). Adicionalmente, em culturas neurais foi observada a infecção restrita de oligodendrócitos, nos quais ocorre transcrição viral, mas não a translação, resultando em uma infecção não citolítica, devido à ausência de proteínas virais (ZURBRIGGEN; YAMAWAKI, 1993). Estudos experimentais com ferrets inoculados com cepas virulentas do VCC mostraram que na fase aguda da infecção, a morte neuronal, a ativação microglial, a gliose reativa e a liberação de citocinas pró-inflamatórias nas áreas infectadas desencadeiam uma forte resposta imune local, independente da imunossupressão sistêmica descrita em animais jovens. Estes

autores sugerem que a morte celular causada por dano direto do vírus pode ser amplificada pela resposta imune local (RUDD et al., 2010). Na fase crônica, os cães infectados podem apresentar polioencefalite e/ou leucoencefalomielite desmielinizantes (BEINEKE et al., 2015).

O aumento da expressão da GFAP (proteína glial fibrilar ácida) foi demonstrado em astrócitos na infecção pelo VCC, no neurópilo adjacente às áreas de desmielinização, principalmente com envolvimento do cerebelo e do tronco encefálico (ORSINI et al., 2007)

A encefalite multifocal em cães acomete frequentemente animais adultos, com curso crônico, podendo ou não ser precedida por sinais sistêmicos (TUDURY et al, 1997). O antígeno viral fica restrito a poucos astrócitos. A expressão do MHC classe II é proeminente na microglia, sendo responsável pela desmielinização contínua e pelo infiltrado mononuclear perivascular difuso. As alterações se iniciam com hiperplasia dos astrócitos e proliferação microglial na substância branca, em regiões subpiais e subependimárias (STEIN, 2006).

A desmielinização crônica coincide com a recuperação do sistema imune, por volta de 6 a 7 semanas pós-infecção e corresponde inicialmente a lesões induzidas pelo vírus, tais como, os manguitos perivascularares compostos por linfócitos, plasmócitos e macrófagos. A resposta inflamatória nas áreas de desmielinização pode levar a progressão da destruição tecidual. A secreção de citocinas pró-inflamatórias está aumentada. Possivelmente os astrócitos, o primeiro alvo do vírus, participem da amplificação da resposta inflamatória (BEINEKE et al., 2015).

Durante algum tempo chegou-se a discutir a possibilidade de que as lesões crônicas eram oriundas de uma doença autoimune, devido à produção intratecal de anticorpos contra a bainha de mielina. No entanto, não foi demonstrada a correlação entre os títulos desses anticorpos e o curso da lesão, já que se observou que animais com os maiores títulos desses anticorpos são aqueles que conseguiam se recuperar (VANDEVELDE et al., 1986).

No estudo recente de Spitzbarth et al. (2016), em que foram avaliados 17 encéfalos de animais acometidos pelo vírus da cinomose, por meio de exames histopatológico e imunoistoquímico, os autores observaram que os animais que apresentavam muitas inclusões virais, não apresentavam desmielinização e os

animais que apresentavam áreas de desmielinização, além de não serem evidentes a presença de inclusões virais, apresentaram áreas de infiltração leucocitária e a presença de células Gitter associadas a lesão.

A passagem do vírus para o SNC ocorre por monócitos e plaquetas infectadas e/ou até mesmo o vírus livre atinge o espaço subaracnoide e infecta as células endimárias (KRAKOWKA et al., 1987; KRAKOWKA, 1989). Após infecção das células endimárias, independente da via, o vírus se adere aos astrócitos por meio dos seus prolongamentos citoplasmáticos, onde se multiplica até atingir as outras células do tecido nervoso (Figura 1) (GREENE e VANDEVELDE, 2012; KHOSRAVI et al., 2016). Acredita-se que em resposta a infecção aguda, ocorra aumento no número de linfócitos e conseqüentemente aumento de receptores SLAM e nectina-4, o que facilita a infiltração e replicação viral no SNC pelos linfócitos infectados (KHOSRAVI et al., 2016). Em estudo recente verificou-se a expressão de um terceiro receptor chamado "GliaR", com capacidade de produzir uma infecção não citolítica persistente em astrócitos (ALVES et al., 2015). Um estudo experimental realizado em furões demonstrou que o VCC também pode invadir o SNC pelo nervo olfatório (RUDD et al., 2006). Os axônios dos neurônios olfatórios estão em contato íntimo com as células epiteliais respiratórias, fato que facilita a transição do vírus por estas células. Uma vez infectados, os axônios atravessam a placa cribiforme e fazem sinapse com neurônios do bulbo olfatório, permitindo a disseminação do vírus pelo lobo frontal e assim estruturas mais internas do encéfalo, como o lobo piriforme, hipocampo e hipotálamo. Embora essa via de infecção não tenha sido comprovada em cães, a similaridade entre o curso da doença entre furões e cães sugere a possibilidade de infecção por essa via em canídeos (RUDD et al., 2006). O aumento da transmissão glutamérgica, devido à diminuição da recaptação desse neurotransmissor pelos astrócitos com lesão, e a lesão direta de neurônios e células da glia, também contribuem para as lesões no tecido nervoso (BRUNNER et al., 2007; TAKENAKA et al., 2016).

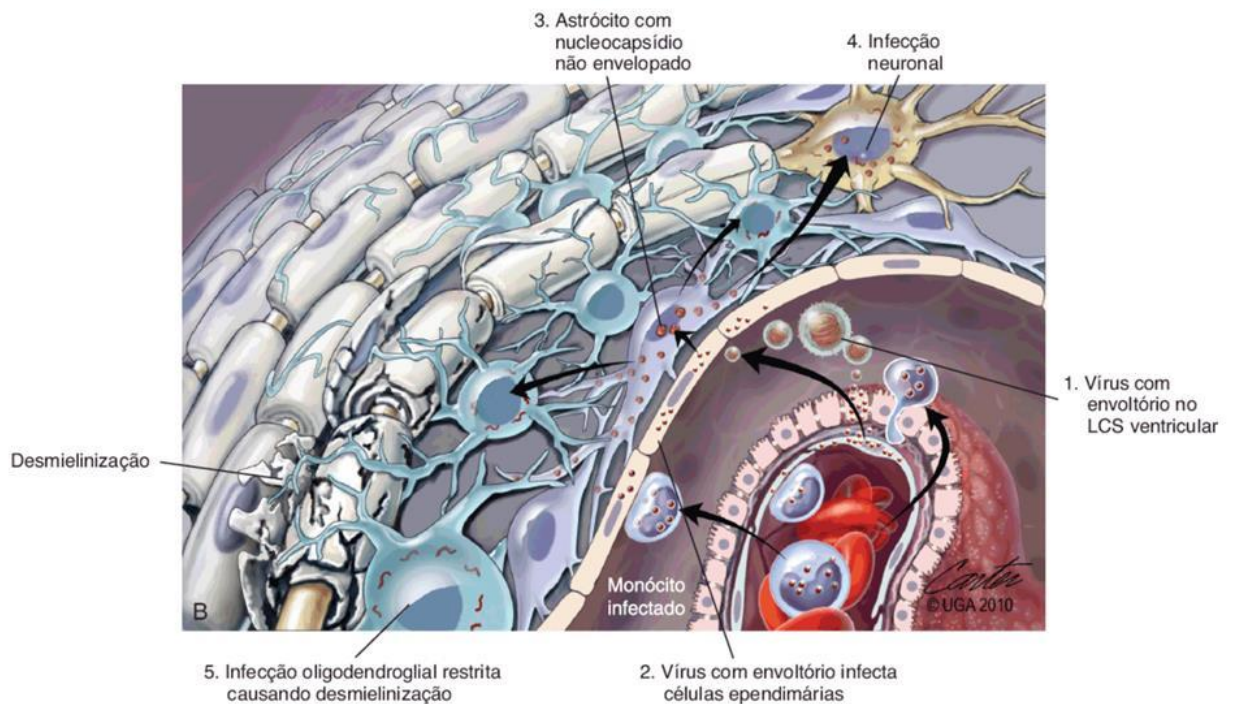


Figura 1 – Esquema demonstrando a infecção do vírus da cinomose canina, com presença de vírus, com inflamação mínima. O vírus penetra no SNC infectando as células endoteliais por duas vias: 1) O vírus entrando no SNC, pelas células do plexo coróide. 2) O vírus se dissemina nas células do plexo coróide e após citólise permanecem no espaço subaracnoide e se replicam nas células endoteliais 3) Replicação nos astrócitos, resultando na produção de nucleocapsídeos intracitoplasmáticos e disseminação para astrócitos adjacentes. 4-5) Vírus se multiplica até atingir os oligodendrócitos e neurônios, resultando em desmielinização e morte neuronal (Fonte: Modificado de Greene e Vandeveld, 2012)

Os sinais neurológicos vistos nos animais, resultantes deste processo de desequilíbrio das células gliais estão diretamente relacionadas às alterações de desmielinização no SNC, resultando em leucoencefalites desmielinizantes. É possível que a transcrição viral em oligodendrócitos interfira com funções especializadas necessárias para produção da mielina (VANDEVELDE; ZURBRIGGEN, 2005), mas dificilmente explica a desmielinização difusa da substância branca, já que menos de 10% dos oligodendrócitos são acometidos (ZURBRIGGEN et al., 1998). Alldinger e colaboradores (2000) evidenciaram em lesões agudas induzidas experimentalmente

(entre 16 a 24 dias) que o animal pode não apresentar desmielinização e sim lesões discretas como gliose e vacuolização do neurópilo. Lempp et al. (2014) descreveram que na fase aguda, o vírus induz primariamente à lesão axonal e que esta lesão influencia diretamente alterações metabólicas em oligodendrócitos, que resultaria em desmielinização extensa. Isso deve-se ao fato de que um oligodendrócito é responsável pela produção de mielina para vários axônios (VANDEVELDE; ZURBRIGGEN, 2005).

Em cães com lesões neurológicas é comum a observação da produção de interleucina 10 (IL-10). Nos animais com leucoencefalite subaguda ou crônica ocorre também sobre-regulação de IL-6, fator de necrose tumoral alfa (TNF)- α e fator de transformação do crescimento beta (TGF- β) (FRISK et al., 1999). Portanto, a progressão das lesões parece decorrer também de uma alteração do equilíbrio necessário na expressão de citocinas no SNC, e vale ressaltar que os astrócitos, que são as células responsáveis pela manutenção da homeostasia neural, podem ser responsáveis por induzir a alterações metabólicas nos oligodendrócitos, influenciando na sua capacidade de produzir mielina e resultando em lesões em regiões não infectadas diretamente pelo vírus, devido a perda de homeostasia local (VANDEVELDE; ZURBRIGGEN, 2005).

O VCC causa sinais neurológicos graves, principalmente nos animais que não conseguem desenvolver uma resposta imune humoral suficiente para eliminar o vírus. Aqueles animais que conseguem aumentar o nível de anticorpos eliminam o vírus do SNC e recuperam-se ou apresentam sinais neurológicos progressivos, devido à liberação de radicais de oxigênio por macrófagos. A persistência do vírus de algumas estirpes virais nas células do SNC parece ser o principal fator para a lesão tardia. Tal lesão é favorecida pela disseminação viral não citolítica associada à ausência de expressão das proteínas virais na membrana celular no hospedeiro e à infecção restrita de oligodendrócitos e neurônios, local onde não ocorrem translação e produção de proteína viral (LEMPP, et al. 2014; SEEHUNSEN, et al., 2016). Esse tipo de infecção atinge célula a célula do SNC, desta forma diminuindo a inflamação e a proteção imune local. Este mecanismo pode fazer com que o mesmo animal possa apresentar sinais neurológicos anos após ter demonstrado sinais sistêmicos, pois

ocorre reativação da resposta ao vírus e são desencadeados novos eventos de inflamação e desmielinização (WYSS-FLUEHMANN et al., 2010; ALVES et al., 2015).

A molécula de MHC é um conjunto complexo de genes presentes no ácido desoxirribonucleico do cromossoma. Desempenha um papel no reconhecimento intercelular e na discriminação *self / non self*, ativando as respostas imunológicas humoral e celular. Existem 3 classes de MHC: classes I, II e III. O MHC classe I é expresso na superfície da maioria das células nucleadas e faz apresentação dos antígenos peptídeos endógenos digeridos no citosol às células. O MHC classe II é expresso principalmente nas células apresentadoras de antígenos e apresenta os antígenos exógenos processados aos linfócitos T (CD4+) (KINDT et al., 2007). Sabe-se que na fase de desmielinização do tecido nervoso, as lesões são caracterizadas pela redução ou perda de proteínas virais e mRNA, apresentam elevada regulação de MHC II e infiltração de linfócitos B e subpopulações de linfócitos T (DYMENT et al., 2005; QESLA et al., 2014).

Em cães adultos, o antígeno viral fica restrito a poucos astrócitos e a expressão de MHC é proeminente nas células da micróglia, sendo responsável pela desmielinização contínua e disseminada infiltração mononuclear perivascular. As alterações têm início com hiperplasia dos astrócitos e proliferação microglial em estruturas subpiais e subependimárias na substância branca. Esta forma também está associada com a alta concentração de anticorpos antimielínicos, podendo ser uma reação secundária ao processo inflamatório (MANGIA et al., 2008)

A estabilidade da BHE pode ser alterada por inúmeros processos patológicos, soluções hipertônicas, traumas e infecções virais, que podem levar a ruptura parcial ou completa da barreira (MACHADO, 2002). A matriz extracelular compõe a BHE, desempenhando um importante papel complexo na manutenção e função do SNC (GRÖTERS et al., 2005). O principal sistema que modifica a matriz extracelular no SNC é o sistema enzimático das metaloproteinases da matriz (MACHADO et al., 2013).

As metaloproteinases são uma família de enzimas neutras, que apresentam diversas importantes funções, tais como, participação no processo de embriogênese, reparo de feridas, inflamação, artrite e neoplasias. No SNC, estas enzimas atuam na remodelação de tecidos durante o seu desenvolvimento e a capacidade de modular a

neuroinflamação, porém, são capazes de desestabilizar a BHE pela quebra dos componentes da matriz extracelular, favorecendo a migração de células inflamatórias para o interior do SNC. (GRÖTERS et al., 2005; MIAO et al., 2003; BEINEKE, 2009).

Algumas metaloproteinases são expressas em níveis baixos (constitutivos) no SNC na maioria das espécies, e podem ter seus níveis alterados quando estimuladas por componentes de patógenos infecciosos. Os processos patológicos do SNC podem estimular fontes celulares de metaloproteinases, como é o caso da micróglia, astrócitos, células endodimárias, oligodendrócitos, neurônios, além de células endoteliais (GRÖTERS et al., 2005). No entanto, para cada tipo de célula envolvida, o tipo de metaloproteinase e o estímulo que a induz são diferentes (ROSEMBERG, 2002). A MMP-9 é encontrada principalmente em células endoteliais e está estreitamente relacionada a processos inflamatórios (LEMP, et al, 2014).

A reatividade astrocitária se manifesta com proliferação dos astrócitos, chamado de astrocitose e hipertrofia, conhecido como astrogliose, desta forma, expressando-se com aumento na quantidade de filamentos intermediários e de suas proteínas constituintes, tais como a proteína glial fibrilar ácida (GFAP). A GFAP é a principal componente estrutural dos astrócitos de indivíduos adultos e, nas lesões do SNC é comum a expressão de GFAP tornar-se muito intensa. Uma forma de investigar a resposta morfológica e a distribuição dos astrócitos frente ao processo desmielinizante do SNC na cinomose canina é por meio da marcação imunohistoquímica da reatividade da GFAP, com o intuito de inferir aspectos relativos ao comportamento destas células na patogenia da desmielinização do SNC (ORSINI et al., 2009)

Em um estudo foi determinado que os astrócitos maduros (GFAP-positivos) são altamente vulneráveis à infecção pelo VCC na fase aguda da cinomose, e são detectados ao redor e na periferia das lesões (SEEHUSEN et al., 2007). Nesse mesmo estudo foi demonstrado que os astrócitos GFAP-positivos, embora vulneráveis ao ataque do VCC, são menos susceptíveis à infecção quando comparados aos astrócitos vimentina-positivos, que são representados pelos astrócitos imaturos. Alterações nos astrócitos incluem a formação de astrócitos multinucleados (SUMMERS et al., 1979) e astrócitos gemistocíticos observados na fase crônica da doença (SUMMERS et al., 1984).

O fator inibidor de macrófagos (MIF) é uma citocina pró-inflamatória que tem sido amplamente estudada devido a sua importante ação na patogênese de diversas doenças de origem inflamatória e isquêmicas. Seu mecanismo de ação consiste na indução de uma série de mediadores responsáveis pela instalação do processo inflamatório. A citocina pró-inflamatória MIF tem sido associada à resposta imune facilitando a resposta inflamatória, contudo em altos níveis é prejudicial por gerar uma reação inflamatória exacerbada (ARAÚJO, et al., 2005; MURARO e STEIN, 2015). O MIF é secretado por vários tipos celulares (linfócitos sensibilizados, glândula pituitária, pelas células da glia, rins, pulmão, próstata, testículos e pelos macrófagos), podendo desempenhar um papel importante em diversas doenças, tais como, artrite, sepse, doença de Crohn e nas encefalites. Os neurônios sintetizam e liberam rapidamente MIF, enquanto as células da glia parecem armazená-lo em pequena quantidade. O MIF desempenha um papel crítico na inflamação, sendo sua produção realçada pelos glicocorticóides, visto que MIF pode eficazmente antagonizar os efeitos antiinflamatórios e imunossupressores dos glicocorticóides nos macrófagos e nas células T sugerido por diversos estudos, onde os anticorpos contra o MIF podem diminuir a inflamação (ARAÚJO et al, 2005).

Adicionalmente, esta citocina foi incriminada nos mecanismos imunomediados de resposta anti-mielina na esclerose múltipla e em modelos experimentais murinos de encefalite alérgica experimental (COX et al., 2013). Considerando os relatos da literatura, avaliar o papel dos astrócitos e de marcadores imunoinflamatórios (MIF, MHC-II, linfócitos T, MMP9) no encéfalo de cães com cinomose permitiria verificar o papel dos astrócitos nesta enfermidade infecciosa e relacionar a sua influência sobre o processo inflamatório e desmielinizante em cães naturalmente infectados pelo VCC.

3. OBJETIVOS

Portanto, os objetivos do presente estudo foram avaliar o papel dos astrócitos na encefalite causada pelo vírus da cinomose, por meio da detecção de GFAP, MHC-II, linfócitos T (CD3), MMP9 e MIF nas áreas de desmielinização do encéfalo, a fim de verificar se estes achados podem estar relacionados com a gravidade das lesões encefálicas, na espécie canina.

Objetivo geral:

Avaliar o papel dos astrócitos na encefalite causada pelo vírus da cinomose, pela comparação da sua imunodeteção com a intensidade das lesões e com a detecção de linfócitos T, MMP-9, MHC-II, no encéfalo de cães naturalmente infectados com o VCC e comparados com cães saudáveis.

Objetivos específicos:

- Relacionar a presença de astrócitos com as lesões de cinomose
- Relacionar a população de astrócitos com a imunodeteção de linfócitos T, de células expressando MHC – II, MMP-9 e a citocina MIF
- Verificar a associação entre todos os marcadores imunoinflamatórios com a intensidade das lesões encefálicas

4. MATERIAL E MÉTODOS

O presente estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA), da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, UNESP-Campus de Jaboticabal-SP, sob o protocolo nº 007003/17.

Neste trabalho realizou-se um estudo retrospectivo de com 21 blocos de parafina de encéfalos de cães naturalmente infectados (GI) com o VCC e de cinco animais controle (GC). Todos os blocos dos grupos GI e GC são oriundos do arquivo de blocos do Departamento de Clínica, Cirurgia e Reprodução Animal (FMVA – UNESP, Campus de Araçatuba, Estado de São Paulo, Brasil) e do Departamento de Patologia Veterinária (FCAV-UNESP, Campus de Jaboticabal, Estado de São Paulo, Brasil). A seleção do material do arquivo foi feita pela análise histopatológica de todas as amostras de tecido oriundas destes animais. Para a seleção do grupo GI considerou-se apenas animais com lesões características de cinomose e sem nenhuma outra doença intercorrente encefálica ou sistêmica. O grupo GC foi selecionado com base na ausência completa de lesões no encéfalo e sem doenças sistêmicas ou neoplásicas. Para padronizar as áreas anatômicas dos encéfalos caninos optou-se por selecionar o cerebelo, pois as amostras não eram uniformes e não contemplavam todas as áreas anatômicas do encéfalo. Da mesma forma, não foi possível associar os achados histológicos com os sinais clínicos e com a idade dos cães do grupo GI, pois essas informações não constavam em todas as fichas de encaminhamento dos animais para a necropsia.

Os blocos de parafina foram cortados a 5 µm e os cortes corados com Hematoxilina e Eosina (HE) para a análise em microscopia de luz. Na análise histopatológica das amostras de encéfalo do grupo GI foram considerados o tipo de lesão (degenerativa / inflamatória / desmielinizante), a presença de corpúsculos de inclusão viral e intensidade das lesões, que foi determinada por escores: 0 (ausente), 1 (discreto), 2 (moderado) e 3 (acentuado).

4.1 Análise imunohistoquímica

O procedimento geral para o desenvolvimento desta técnica foi a desparafinização dos cortes de encéfalo em estufa a 60°C por uma hora, seguida de dois banhos em xilol por 10 minutos cada. Após as amostras foram hidratadas em

soluções decrescentes de álcool, até um banho em água destilada. Posteriormente, fez-se a recuperação antigênica pelo calor (Tabela 1), com solução tampão. No bloqueio da peroxidase endógena (Tabela 1) utilizou-se uma solução a 8% (92 mL de álcool metílico - Synth e 8 mL de peróxido de hidrogênio 30 volumes - Merk) por 30 minutos, à temperatura ambiente, em câmara escura. O bloqueio das reações inespecíficas (Tabela 1) foi feito com produto comercial (Protein Block, Dako cytometry, cód. X0909), por 30 minutos, à temperatura ambiente. Em seguida, os cortes foram incubados com os anticorpos primários com diluições e tempos de incubação específicos, a 4°C ou em temperatura ambiente, conforme as especificações de cada anticorpo (Tabela 1). Para todos os anticorpos foi utilizado o Complexo de Polímeros ligados a peroxidase (Envision Dual Link System-HRP, Dako cytometry, cód. K406189-2). Entre cada um dos passos descritos fez-se banhos em água destilada e com solução tampão Tris HCl, pH 7,4. Para a visualização da reação utilizou-se o cromógeno DAB (3,3-diaminobenzidina – Dako cytometry, cód. K3468-1). A contra-coloração foi feita com Hematoxilina de Harris e a montagem das lâminas com Entellan (Merck). Os controles negativos das diferentes imunomarcações foram realizados com o diluente de anticorpo (Dako cytometry, código S302283-2), em substituição ao anticorpo primário. Os controles positivos foram feitos com tecidos sugeridos pelos fabricantes de cada anticorpo.

Para a determinação do número de células imunomarcadas para todos os anticorpos testados realizou-se as contagens em cinco campos microscópicos de grande aumento (objetiva de 40x), no microscópio Nikon Eclipse E200 (MOREIRA et al., 2010), cuja área é 0,19625 μm^2 . A partir dos valores obtidos nestes campos, fez-se uma média do número de células imunomarcadas por animal, sendo essas médias avaliadas em cada grupo (GI e GC).

TABELA 1 - Anticorpos utilizados para a imunomarcção dos diferentes marcadores de inflamação em encéfalos de cães com cinomose.

Anticorpos primários	Célula alvo	Espécies de origem	Recuperação antigênica	Diluição	Tempo de incubação	Local de marcação
MIF	Microglia	Mouse policlonal (SANTA CRUZ, cod SC20121)	Panela de pressão (Dako) ²	1:300	18 horas (4°C)	citoplasma
	Astrócitos					
	Leucócitos					
GFAP	Astrócitos	Cow policlonal DAKO, cód. Z0334)	Microondas ¹	1:700	2 horas temperatura ambiente	citoplasma
MMP9	Endotélio	Rabbit policlonal (Cell Signaling, cód. 9661)	Panela de pressão (Dako) ²	1:200	18 horas (4°C)	citoplasma
	Leucócitos					
	Céls. glia					
CD3	Linfócitos T	Mouse monoclonal (Dako, cód. M7254)	Panela de pressão (Dako) ²	1: 350	18 horas (4°C)	membrana
MHC-II	Leucócitos	Mouse monoclonal (Dako, cód. M0746)	Panela de pressão (Dako) ²	1:200	18 horas (4°C)	membrana
	Céls. Glia					

1- Solução de citrato sódio 10 mM, pH 6,0; 2- Solução de citrato sódio 10 mM, pH 6,0, por 2 minutos na potência máxima e 10 minutos na potência mínima (750W), abrindo a cada 5 minutos para repor tampão;

4.2 Análise estatística

Os efeitos de grupo (GI e GC) sobre as características estudadas foram analisados pelo método dos quadrados mínimos (ANOVA), ponderado para variâncias heterogêneas. As análises foram realizadas utilizando o procedimento Guided Data Analysis (SAS 9.1, SAS Institute, Cary, NC, USA). A distribuição dos resíduos para cada modelo de análise não foi Normal e, por isso, os dados sofreram transformação logarítmica. As diferenças entre os grupos foram consideradas significativas quando $P < 0,05$.

Os dados foram normalizados e após submetidos a análises multivariadas (análise de componentes principais e análise de fatores), que foram realizadas para descrever a variação conjunta das características imunoinflamatórias estudadas utilizando o programa computacional R Core Team (2015).

5. RESULTADOS

Na análise em microscopia de luz dos encéfalos do grupo controle (GC) não se observou nenhuma lesão no tecido nervoso. No entanto, no grupo GI verificou-se áreas de desmielinização caracterizadas por múltiplos vacúolos pleomórficos na substância branca cerebelar, sempre associadas a proliferação de astrócitos gemistocíticos e/ou áreas de necrose de liquefação. Estas lesões tinham distribuição predominantemente multifocal e localizavam-se no cerebelo, pedúnculo cerebelar e no neuropilo adjacente ao 4º ventrículo (Figura 1A) e as meninges.

Os astrócitos gemistocíticos caracterizavam-se por apresentar citoplasma amplo e acidófilo, núcleo normocromático a hipocromático, geralmente periférico. Estas células localizavam-se especificamente dentro das áreas de desmielinização e muitas vezes apresentavam múltiplos corpúsculos de inclusão acidófilos e pleomórficos intracitoplasmáticos (Figura 2B) e intranucleares. Raras vezes foram observadas inclusões intranucleares em oligodentrócitos. No neuropilo adjacente verificou-se reatividade glial, microgliose reativa e proliferação astrocitária. As áreas de necrose liquefativa continham inúmeras células Gitter pleomórficas (Figura 2C).

A presença de inflamação foi caracterizada por manguitos perivasculares ao redor de vasos do neuropilo (Figura 2D), com envolvimento predominante da substância branca, das meninges e ocasionalmente no plexo coroide. O infiltrado inflamatório observado foi predominantemente mononuclear (linfócitos e plasmócitos).

Em dois animais (GI) verificou-se lesões sugestivas de evolução aguda, na substância branca cerebelar, caracterizadas por intensa reatividade astrocitária associada a inúmeras inclusões virais intracitoplasmáticas nestas células. Nestes casos não havia ainda áreas de desmielinização e nem a presença de manguitos perivasculares.

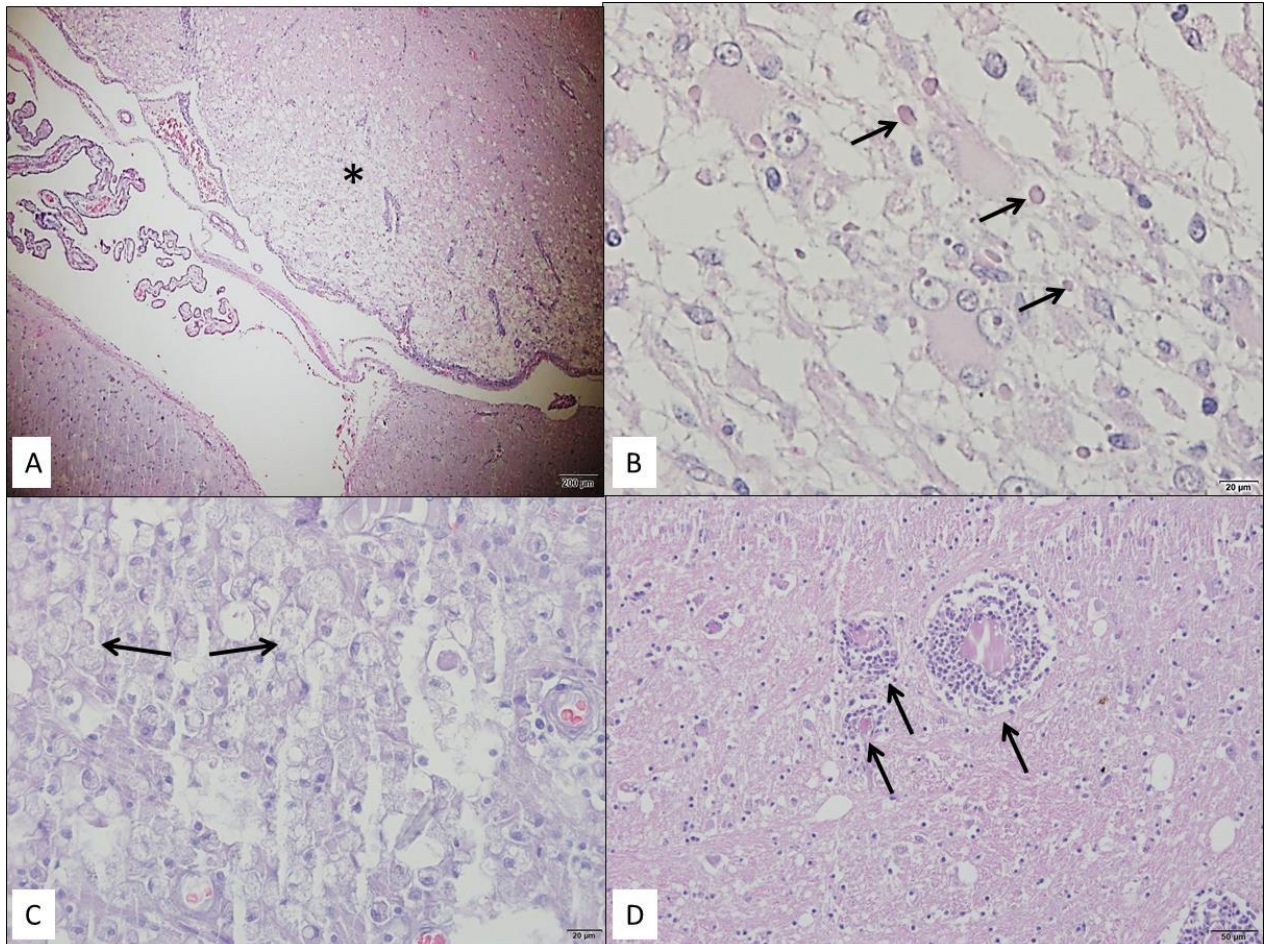


FIGURA 2. Fotomicrografias do encéfalo de cães com cinomose. A) Notar área de desmielinização na substância branca adjacente ao 4^o ventrículo (*; barra = 200 µm). B) Área similar a descrita em A. Notar inúmeras inclusões acidófilas pleomórficas no citoplasma de astrócitos reativos (setas, barra = 20 µm). C) Área de necrose liquefativa repleta de células Gitter (setas, barra = 20 µm). D) Notar manguitos perivascularres e hiperemia vascular no neuropilo (setas, barra = 50 µm). Hematoxilina e Eosina.

Na análise imunohistoquímica das imunomarcações dos diferentes anticorpos verificou-se acentuada marcação para GFAP (Figura 2A), que ocorreu em astrócitos gemistocíticos presentes nas áreas de desmielinização (Figura 2A1) e no neuropilo adjacente (Figura 2A2). No entanto, em áreas de necrose liquefativa verificou-se debris de estruturas filamentosas positivas para GFAP associadas às células Gitter.

A detecção de linfócitos T (CD3) ocorreu predominantemente nos manguitos perivascularres e ocasionalmente células positivas foram observadas dispersas no

neurópilo e na meninge (Figura 3B). A enzima MMP9 foi detectada em astrócitos (Figura 3C), na microglia, nas células Gitter das áreas de desmielinização (detalhe Figura 3C) e nos leucócitos dos manguitos perivasculares.

A citocina MIF foi detectada em astrócitos (Figura 3D) das áreas de desmielinização e regiões adjacentes, na microglia e nos leucócitos dos manguitos perivasculares (Figura 3D). A marcação de MHC-II foi intensa e difusa no encéfalo, nas substâncias branca e cinzenta próximas as áreas de desmielinização e no tecido adjacente a elas (Figuras 3A e 3B). Nas regiões mais distantes da lesão, essa marcação foi focal e discreta ou ausente. A positividade para este anticorpo foi verificada em astrócitos reativos, na micróglia, nos manguitos perivasculares e no endotélio vascular. A maior intensidade de imunomarcação de MHC-II ocorreu nas áreas de lesão e no neurópilo adjacente a elas. Os astrócitos gemistocíticos marcaram positivamente para MIF, GFAP, MMP9 (Figura 3) e MHC-II (Figura 3).

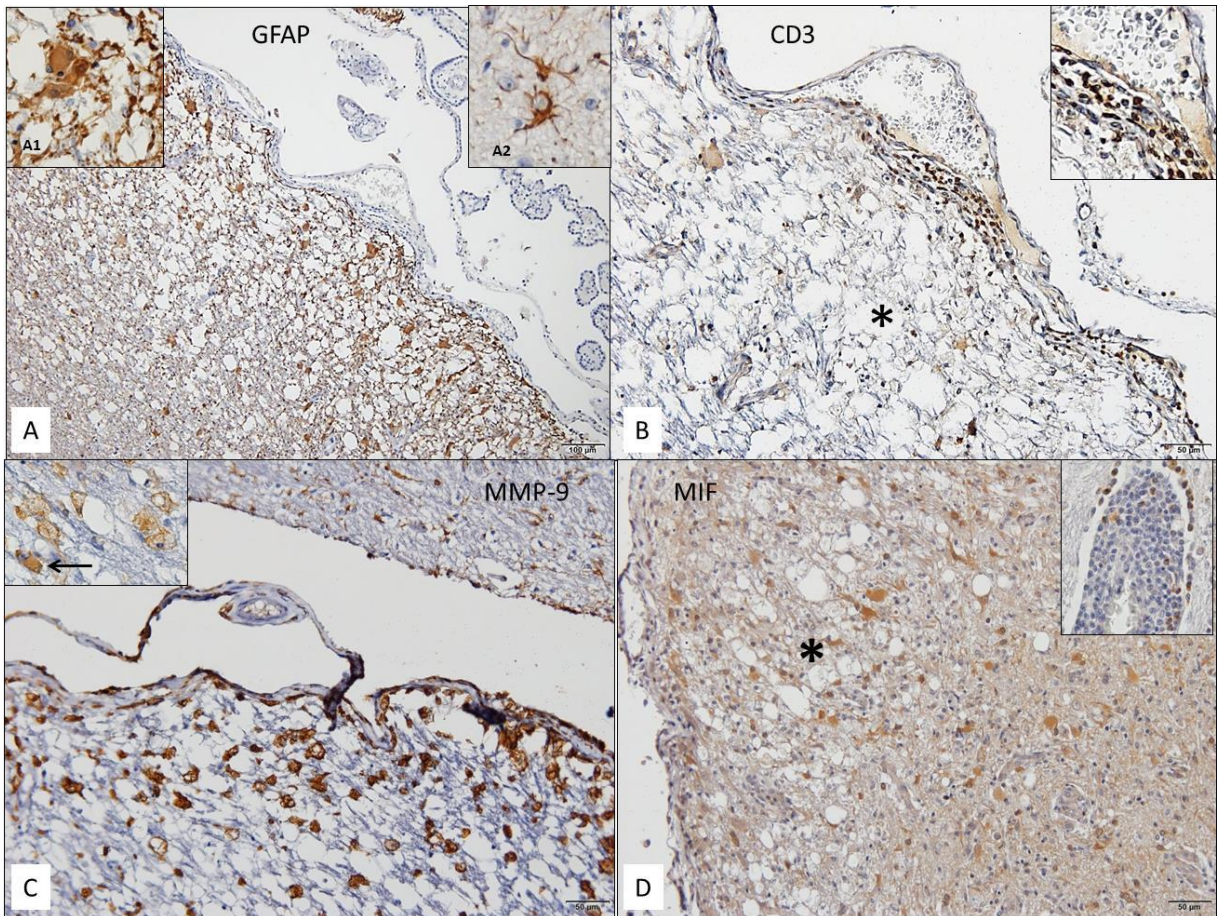


FIGURA 3 – Fotomicrografias de imunomarcação do encéfalo de cães com cinomose. A) Notar reatividade astrocitária (GFAP) nas áreas de desmielinização (A1 = detalhe de astrócitos gemistocíticos) e adjacentes à lesão (A2 = detalhe de astrócitos reativos; barra = 100 μ m). B) Marcação de linfócitos T (CD3) no infiltrado inflamatório meningeal (detalhe), adjacente a desmielinização (*; barra = 50 μ m). C) Astrócitos gemistocíticos MMP9 positivos em área de desmielinização e em células Gitter das áreas de necrose liquefativa do neuropilo (detalhe, seta, barra = 50 μ m). D) Marcação de MIF nos astrócitos gemistocíticos das áreas desmielinizadas (*) e neuropilo adjacente, bem como, nos maguitos perivasculares (detalhe, barra = 50 μ m). Complexo de polímeros ligados a peroxidase.

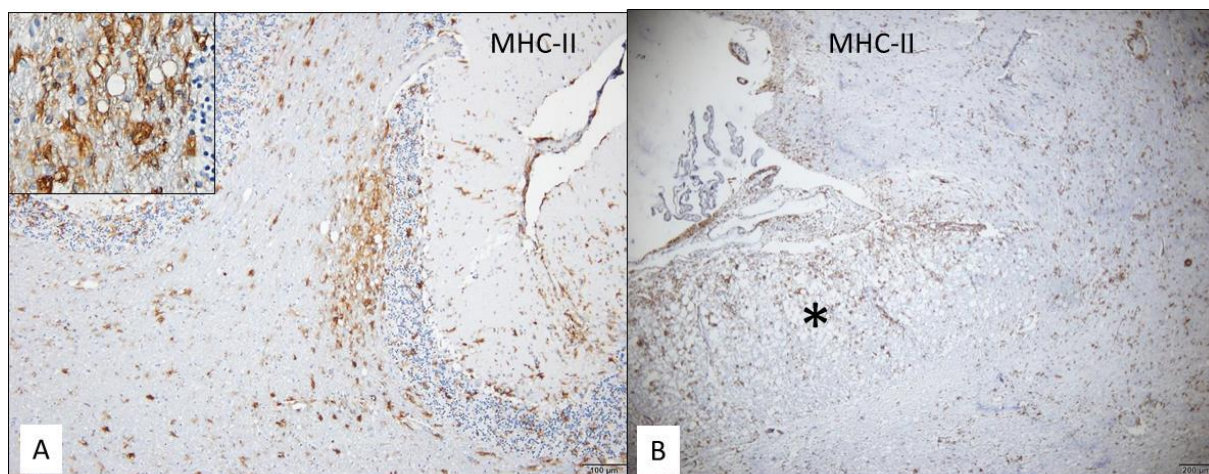


FIGURA 4 – Fotomicrografias de imunomarcção do encéfalo de cães com cinomose. A) Notar marcação positiva e intensa para MHC-II em área de desmielinização e adjacentes à lesão. No detalhe verifica-se astrócitos gemistócíticos positivos em área desmielinizada (barra = 100 µm). B) Mesmo aspecto de A, em área adjacente ao 4º ventrículo (*; barra = 200 µm). Complexo de polímeros ligados a peroxidase.

Na comparação entre os grupos verificou-se que existem diferenças significativas ($P < 0,05$) entre os grupos GI e GC para os parâmetros GFAP, MIF, CD3 e MHC-II. Apenas a detecção da enzima MMP9 não mostrou diferenças estatísticas significativas ($P > 0,05$) entre os grupos (Tabela 2).

TABELA 2 – Comparação entre grupos de animais infectados e controle para os anticorpos testados.

Variável	Média	CV**	F	P
GFAP	85,05*	9,4	61,995	0,0006
MIF	108,0*	11,6	15,062	0,0120
CD3	62,43*	29,10	8,90	0,0113
MHC-II	30,90*	13,6	21,066	0,0052
MMP9	62,28 ^{ns}	23,8	0,0626	0,8071

**Coeficiente de variação com valores transformados em Log10; F = (Anova); P = nível de significância.

* diferença significativa; ns = não significativo.

Na análise de fatores (Tabela 3), verificou-se que no primeiro fator (F1) quando o aumento da magnitude de GFAP está relacionado ao aumento de MIF e CD3

(valores positivos e maiores que 0,6), com diferenças significativas para grupo (P=0,000123; Tabela 4). No segundo fator (F2), notou-se uma relação entre as variáveis MHC e MMP9. No entanto, os grupos não diferiram para este fator (P=0,3012; Tabela 5).

TABELA 3 – Comparação da variação das características por fator (F1 e F2).

Característica	F1	F2
GFAP	0.781035	-0.080777
MIF	0.608419	0.440450
CD3	0.614181	0.007401
MHC	0.552647	0.612321
MMP9	-0.036735	0.951087
Proporção total	0.332835	0.296016

TABELA 4 – Resumo da análise de variância multivariada para o Fator 1

	GL	SQ	QM	F	P-VALOR
Intercepto	1	4.40726	4.40726	7.91601	0.009622
Grupo	1	11.63793	11.63793	20.90321	0.000123
Resíduo	24	13.36207	0.55675		
Total	25	25.00000			

GL=graus de liberdade; SQ=soma de quadrados; QM=quadrado médio

TABELA 5 - Resumo da análise de variância multivariada para o Fator 2.

	GL	SQ	QM	F	P-VALOR
Intercepto	1	0.42074	0.420741	0.422696	0.521770
Grupo	1	1.11102	1.111019	1.116182	0.301261
Resíduo	24	23.88898	0.995374		
Total	25	25.00000			

GL=graus de liberdade; SQ=soma de quadrados; QM=quadrado médio

Pela análise de Componentes Principais (Figura 5) verifica-se a distribuição dos grupos entre os Componentes 1 e 2. Nota-se pelo componente principal 1 (CP1) o qual explicou 41,86% da variabilidade dos dados, que os indivíduos do grupo controle se agruparam em região diferente dos demais animais em função da variação conjunta das características estudadas, ou seja, as mesmas permitem agrupar diferentemente os animais doentes do grupo controle.

Todas as imunomarcações avaliadas variam juntas (Figura 6). Maior associação foi observada entre GFAP e CD3 e entre MIF e MHC-II, ou seja, a magnitude dessas características aumenta na condição de doença. Biologicamente, os gráficos CP mostram que os parâmetros imunoinflamatórios variam ao mesmo tempo e estão diretamente associados. A expressão aumentada de GFAP nas áreas de lesão estava associada ao maior número de linfócitos T na lesão. Da mesma forma, os marcadores MIF e MHC-II também apresentaram um comportamento similar entre si.

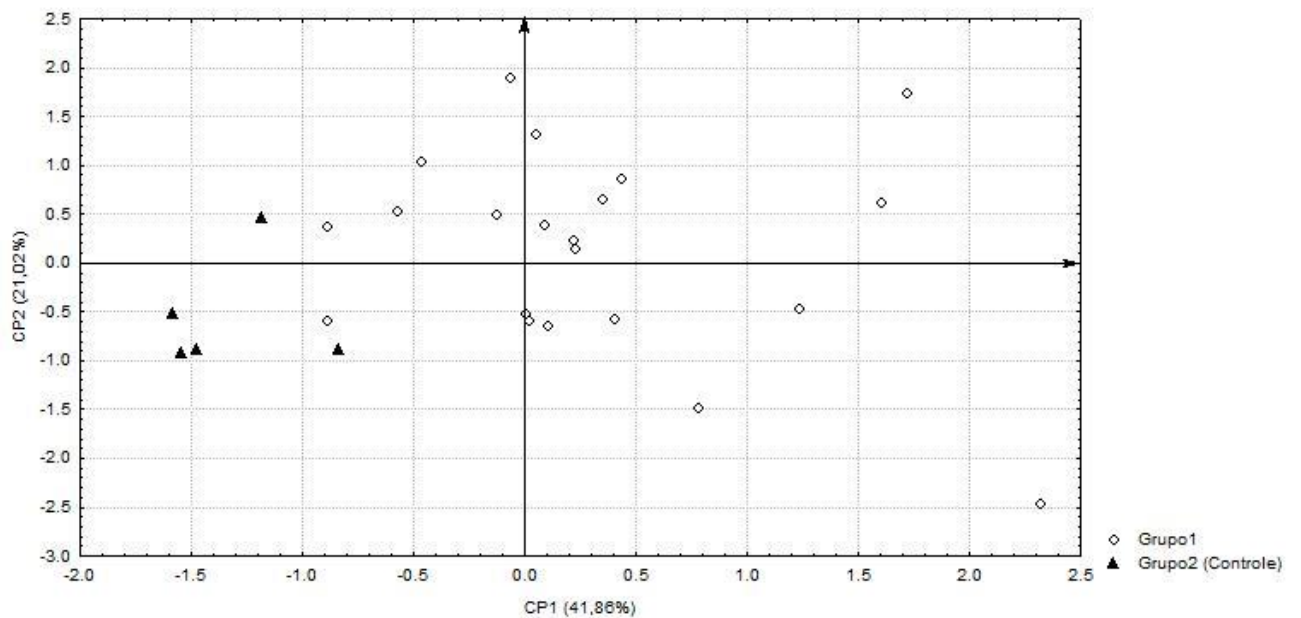


FIGURA 5 - Variação do componente principal 1 (CP1) em relação ao componente principal (CP2) para as características estudadas. Rótulos indicam a classificação por grupo; Grupo 1 = doentes (GI); Grupo 2 = controle (GC).

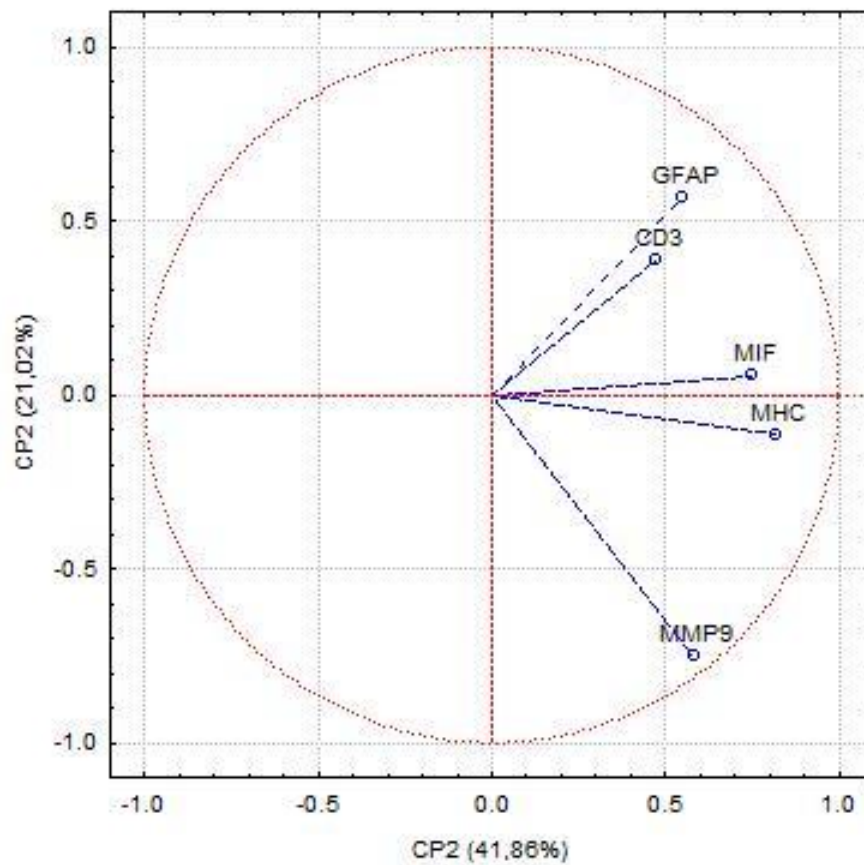


FIGURA 6 - Variação do componente principal 1 (CP1) em relação ao componente principal 2 (CP2) para as características estudadas. Vetores indicam a relação entre as características estudadas (GFAP, CD3, MIF, MHC-II e MMP9).

6. DISCUSSÃO

As lesões de cinomose foram observadas na substância branca cerebelar e em áreas adjacentes as meninges e 4º ventrículo. Esses achados estão de acordo com a literatura (VANDEVELDE; ZURBRIGGEN, 1995, CARVALHO et al., 2012, PAN et al., 2013). A presença de inclusões virais associadas a áreas de desmielinização adjacentes ao 4º ventrículo sugerem que o vírus penetra no encéfalo via líquido cefalorraquidiano, corroborando relatos da literatura (VANDEVELDE, ZURBRIGGEN, 1995, CARVALHO et al., 2012, PAN et al., 2013). Esse fato é reforçado pelos relatos de detecção de partículas virais nas células do plexo coroide e nas células do epêndima, relacionadas ao sistema ventricular (CARVALHO et al., 2012).

Alguns autores destacam que a desmielinização é decorrente da infecção de oligodendrócitos, que são células produtoras de mielina (VANDEVELDE, ZURBRIGGEN, 1995), porém, em outros estudos foi observado que a maioria das células infectadas são astrócitos (PAN et al., 2013; LEMP, 2014). Na microscopia eletrônica verificou-se que a infecção de oligodendrócitos é rara na cinomose, propondo que o vírus causa infecção nestas células, mas que mesmo assim pode influenciar a desmielinização (LEMP, 2014). Outra vertente reforça a hipótese de que a desmielinização está relacionada a alterações metabólicas que impedem o oligodendrócito de exercer suas funções, secundárias a danos vasculares ou do sistema ventricular, por efeito do vírus. No presente estudo verificou-se acentuada ativação astrocitária nas áreas de desmielinização, corroborando com outros autores que descrevem que os astrócitos contribuiriam com o processo desmielinizante por estarem em íntimo contato com estes locais (PAN et al., 2013; CARVALHO et al., 2012).

Segundo a literatura, em animais jovens a lesão neurológica da cinomose é causada por injúria viral direta, com envolvimento das substâncias cinzenta e branca (RUDD et al., 2010), incluindo necrose encefálica em cães jovens (polioencefalomalacia) e ausência de infiltrado inflamatório encefálico nesta fase, possivelmente pela imaturidade do sistema imunológico (GEBARA et al., 2006, RUDD et al., 2010) e pela imunossupressão sistêmica (RUDD et al., 2010). Em animais jovens provavelmente a lesão é decorrente da ação direta do vírus, já nos cães adultos

e idosos, as lesões encefálicas teriam origem imunomediada (GEBARA et al., 2006, RUDD et al., 2010). No presente estudo, os animais do grupo GI apresentaram áreas de necrose liquefativa restritas à substância branca cerebelar e estas sempre estavam associadas a áreas de desmielinização. No entanto dois animais apresentaram lesões sugestivas de fase aguda da infecção, onde notou-se apenas inúmeras inclusões virais em astrócitos reativos e proliferação e reatividade destas células, em concordância com os relatos destes autores (GEBARA et al., 2006, RUDD et al., 2010). Nos casos em que havia lesões desmielinizantes, sempre predominaram os astrócitos gemistocíticos nestes locais. Segundo a literatura, a presença destas células indica a cronicidade do processo (PAN et al., 2013).

Nas áreas de desmielinização, os astrócitos gemistocíticos foram um achado constante e marcante. Estas células expressaram MIF, MMP9, GFAP e MHC-II. Os astrócitos possivelmente são as primeiras células a serem ativadas após a chegada do vírus ao encéfalo. Eles contribuem para o afluxo de leucócitos no tecido nervoso, pela ativação do endotélio vascular e liberação de MMP9, que degrada a membrana basal vascular e permite a migração leucocitária para a área injuriada. Em pesquisa com a encefalite do cão velho demonstrou-se por imunohistoquímica a presença do vírus em neurônios, astrócitos, nos leucócitos dos manguitos perivasculares, no endotélio vascular e nas áreas de desmielinização. A presença de células positivas para CD3 (linfócitos T), CD79 (linfócitos B) e MAC387 (macrófagos) foi verificada no infiltrado inflamatório do neurópilo, em resposta a estímulos quimiotáticos liberados das áreas de lesão. Ainda, a marcação de vimentina em linfócitos dos manguitos, sugere que a mesma atuaria na migração leucocitária para o sítio de injúria (HEADLEY et al., 2009).

Paralelamente detectou-se marcação para MIF nos astrócitos das áreas de desmielinização e áreas adjacentes. Esta citocina pró-inflamatória é detectada em níveis basais no SNC e aumenta de forma significativa em situação de injúria, levando a ativação da microglia e ao afluxo de leucócitos para o tecido nervoso. Adicionalmente, esta citocina foi incriminada nos mecanismos imunomediados de resposta anti-mielina na esclerose múltipla e em modelos experimentais murinos de encefalite alérgica experimental (COX et al., 2013). O mesmo aspecto foi observado em animais infectados experimentalmente com vírus, tais como, da doença do Rio

Ross e chikungunya, as quais também tem um componente imunomediado. Os camundongos com maior expressão de MIF apresentaram sinais clínicos e processo inflamatório tecidual mais severo (HERRERO et al., 2011). No presente estudo pode-se sugerir que MIF seria um bom marcador para lesão neurológica severa, pois a sua detecção foi elevada nos casos de lesões mais extensas na substância branca cerebelar.

Nas áreas de necrose liquefativa notou-se restos de astrócitos positivos para GFAP entremeados na lesão. Os astrócitos gemistocíticos podem ter morrido pelos efeitos da ativação dos macrófagos / microglia nestes locais, uma vez que células Gitter também expressaram MMP9, MIF e MHC-II. Possivelmente os efeitos deletérios dos mediadores inflamatórios (espécies reativas do oxigênio, óxido nítrico e citocinas) podem ser os responsáveis pela destruição do tecido nervoso desmielinizado e pela morte astrocitária nestes locais. Provavelmente, os astrócitos ativados contribuem para a desmielinização na fase inicial da lesão, devido a ação direta do vírus sobre estas células gliais e sobre os axônios, resultando em disfunção metabólica secundária de oligodendrócitos (ULRICH et al., 2014). Após, a injúria tecidual seria amplificada pela liberação de mediadores inflamatórios liberados localmente e por fim ocorre a ação dos macrófagos ativados (células Gitter) nas áreas de necrose liquefativa. Pan et al. (2013) também verificou ausência ou baixa detecção de GFAP nas áreas de necrose liquefativa da encefalopatia desmielinizante da cinomose.

Outros autores destacam que a ativação da micróglia, induzida pelo VCC, pode ter relevância na patogênese da desmielinização aguda na cinomose, pelo aumento difuso da regulação do MHC na substância branca e pela liberação de fatores tóxicos para a mielina (VANDEVELDE e ZURBRIGGEN, 2005, STEIN et al., 2006, QESLA et al., 2014). Estes relatos coincidem com os resultados do presente estudo, pois observou-se microgliose reativa e expressão aumentada de MHC II nas áreas desmielinizadas e em áreas adjacentes, confirmando a participação microglial neste processo de amplificação da lesão nervosa.

A enzima MMP9 possivelmente foi a responsável pela quebra da barreira hematoencefálica, pela degradação da membrana basal vascular, permitindo o afluxo de leucócitos para as áreas injuriadas. Na literatura destaca-se que sua expressão está aumentada em doenças inflamatórias do SNC. Esta gelatinase induzível é

considerada um marcador sistêmico da inflamação em animais (OPDENAKKER et al., 2001). Estudo avaliando a presença de MMP2 e MMP9 no líquido e tecido cerebelar de cães com cinomose subaguda demonstrou que as formas pro-MMP2 (líquor, cerebelo) e pro-MMP9 (cerebelo) estavam elevadas em todos os animais. Já as formas ativas destas gelatinases estavam elevadas no líquido. Esses achados confirmam a participação destas enzimas na quebra da barreira hematoencefálica e com isso contribuem para o desenvolvimento da neuroinflamação e da desmielinização (MACHADO et al., 2013). Alguns estudos em humanos correlacionam de forma positiva a presença de metaloproteinasas com o agravamento da lesão, em processos que acometem o SNC (YONG et al., 2011).

A marcação de linfócitos T CD3⁺ foi verificada nos encéfalos de animais do grupo infectado (GI) e mostrou associação significativa com a marcação de GFAP (Tabela 3), ou seja, quando os parâmetros estudados foram agrupados e comparados entre os grupos. Esse fato sugere que a ativação dos astrócitos contribuiu para a migração de linfócitos T para o encéfalo. A expressão de MHC-II já foi descrita em astrócitos e na micróglia, demonstrando seu potencial de ativação de linfócitos T, pela apresentação antigênica via MHC (HAMO et al., 2007).

Portanto, em síntese seria possível inferir que o VCC chega ao sistema nervoso pelo sistema ventricular, pois a presença de lesões no neuropilo adjacente ao epêndima foi um achado frequente. Outra via seria a hematogênica e os astrócitos fazem parte da glia limitans e também compõe a barreira hematoencefálica, confirmando seu íntimo contato com antígenos que chegam por estas vias. Portanto, os astrócitos são ativados, aspecto evidenciado nas áreas de lesões pelo espessamento dos prolongamentos citoplasmáticos marcados com GFAP. A partir daí inicia-se o processo de resposta imune do encéfalo, pela produção de MIF, MMP9 e expressão de MHC-II. Isso permite a quebra da barreira hematoencefálica e a migração leucocitária para o tecido nervoso. Os leucócitos dos manguitos perivascularares amplificam a produção de citocinas e mediadores inflamatórios. Ativando a microglia. O dano tecidual causado pelos mediadores e pelos componentes nocivos liberados pela microglia possivelmente induzem as áreas de necrose liquefativa do neuropilo, que resulta em morte de astrócitos e oligodendrócitos do local. As células Gitter destes locais continuam e produção de citocinas e

mediadores inflamatórios, causando ainda mais efeitos deletérios sobre o tecido nervoso. Na análise multivariada ficou evidente que os parâmetro imunoinflamatórios do SNC variam ao mesmo tempo e estão diretamente associados na condição de doença.

Seria interessante fazer um paralelo da evolução imunomediada das lesões encefálicas da cinomose canina com a ADEM (encefalomielite disseminada aguda) em crianças. Na ADEM, as crianças desenvolvem sinais neurológicos relacionados a lesões desmielinizantes na substância branca do encéfalo e medula espinhal. Inflamação e envolvimento da substância cinzenta também são relatados. Esta alteração geralmente é precedida de infecção viral, bacteriana ou ocorre após a vacinação com vírus atenuado (sarampo, raiva, influenza, rubéola, etc.). Embora a patogenia ainda não esteja totalmente esclarecida, sugere-se que a resposta imune local seria responsável pela lesão na bainha de mielina dos axônios, o que resultaria nas lesões neurológicas (LEE, 2011). O cão com cinomose poderia ser um modelo para o entendimento da patogenia de doenças desmielinizantes humanas.

7. CONCLUSÕES

Nas condições deste estudo foi possível concluir que:

- Os astrócitos são células primordiais na ativação da resposta imune contra o VCC, pois foram detectados associados às lesões desmielinizantes e no tecido nervoso adjacente a elas.
- Os astrócitos ativados expressaram MIF, MMP9 e MHC-II e possivelmente iniciaram a neuroinflamação, a qual foi mantida posteriormente pela microglia e células inflamatórias.
- A maioria dos animais apresentou lesões caracterizadas pela presença constante de astrócitos gemistocíticos, inflamação e áreas multifocais de desmielinização e/ou necrose liquefativa, corroborando a participação desta célula glial no agravamento das lesões encefálicas;
- A citocina MIF poderia ser utilizada como um marcador de inflamação no SNC, pois sua expressão foi maior nos casos de severa desmielinização e inflamação do tecido nervoso.

REFERÊNCIAS

Alldinger S, Fonfara S, Kremmer E, Baumgärtner W (2000) Up-regulation of the hyaluronate receptor CD44 in canine distemper demyelinated plaques. **Acta Neuropathologica** 39:138-146.

Alves CM, Vasconcelos AC, Martins AS et al (2006) Morphometric analysis of the thymus of puppies infected with the Snyder Hill strain of canine distemper virus. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia** 5: 472-479.

Alves L, Khosravi M, Avila M et al. (2015) SLAM- and nectin-4-independent noncytolytic spread of canine distemper virus astrocytes. **Journal of Virology** 89:5724-5733.

Amude AM.; Carvalho GA.; Alfieri AA et al. (2007) Virus isolation and molecular characterization of canine distemper virus from a mature dog with multifocal encephalomyelitis. **Brazilian Journal of Microbiology** 38: 354-356.

Amude AM, Alfieri AA, Arias MVB et al. (2012) Clinical syndromes of nervous distemper in dogs initially presented without conventional evidences of CDV infection, **Semina: Ciência Agrárias** 33:2347-2358.

Appel MJG (1969) Pathogenesis of canine distemper. **American Journal of Veterinary Research** 30:1167-1182.

Appel M, Sheffy BE, Percy DH, Gaskin JM (1974) Canine distemper virus in domesticated cats and pigs. **American Journal of Veterinary Research** 35:803–806.

Appel MJG, Gibbs EPJ, Martin SJ et al. (1981) Morbillivirus diseases of animals and man. **Comparative diagnosis of viral disease** 6:235-297.

Appel M. (1987) Canine distemper virus. In: APPEL, M.J. **Virus infections of vertebrates**. Amsterdam: Elsevier, v.1, cap.13, p.133-159.

Appel MJ, Summers BA (1995) Pathogenicity of Morbilliviruses for terrestrial carnivores. **Veterinary Microbiology** 44:187-191.

Araújo CA, Vasconcelos DO, Cavalcanti DC et al (2005) Fator inibidor de macrófagos e septicemia **Revista Portuguesa de Imunoalergologia** 13:19-23.

Beineke A, Puff C, Seehusen F et al. (2009) Pathogenesis and immunopathology of systemic and nervous canine distemper virus. **Veterinary Immunology and Immunopathology** 127:1-18.

Beineke A, Markus S, Borlak J, Thum, T, Baumgärtner W (2008) Increase of pro-inflammatory cytokine expression in non-demyelination early cerebral lesions in nervous canine distemper. **Viral Immunology**, 21:401-410.

Beineke A, Baumgärtner W, Wohlsein P, Cross-species transmission of canine distemper virus – an update. **One Health**, V. 1 p. 49-59.

Blancou J (2004) Dog distemper: imported into Europe from South America? **Historia Medicinae Veterinariae** 29:35-41.

Bresalier M, Worboys M (2014) “Saving the lives of our dogs”: the development of canine distemper vaccine in interwar Britain. **The British Journal for the History of Science**, 47:307- 335.

Bolt G., Jensen TD, Gottschalk P., Arctander MJ, Appel R, Blixenkrone-morgler, M. (1997) Genetic diversity of the attachment (H) protein gene of current field isolates of canine distemper virus. **Journal of General Virology** 78:367-372.

Brito LBS, Pereira OAT, Choairy PA et al (2016) Aspectos epidemiológicos da cinomose em cães atendidos em um Hospital Veterinário no período de 2011 a 2013.

Pubvet 10:518-522.

Brunner JM, Plattet P, Majscheysck P et al. (2007) Canine distemper virus infection of primary hippocampal cells induce increase in extracellular glutamate and neurodegeneration. **Journal of Neurochemistry** 103:1184-1195.

Buragohain M, Goswami S, Kalita DJ (2017) Clinicopathological findings of canine distemper virus infection in dogs **Journal of Entomology and Zoology Studies** 5:1817-1819

Carsillo T, Traylor Z, Choi C et al. (2007) Hsp72, a host determinant of measles virus neurovirulence. **Journal of Virology**, 80: 11031-11039.

Carvalho OV, Botelho CV, Ferreira CGT et al (2012) Immunopathogenic and neurological mechanisms of canine distemper virus **Advances in Virology** 2012:01-10

Carvalho OV, Saraiv, GL, Ferreira CGT (2014) et al. In vitro antiviral efficacy of ribavirin and interferon-alpha against canine distemper virus. **Canadian Journal of Veterinary Research** 78:283-289

Corrêa CNM (1992) Cinomose. In: CORRÊA, W. M.; CORRÊA, C. N. M. **Enfermidades Infecciosas dos Mamíferos Domésticos**. p. 655-670.

Cox MG, Kithcart AP, Pitt D et al (2013) Macrophage migration inhibitory factor potentiates autoimmune-mediated neuroinflammation **Journal of Immunology** 191:1041-1054.

Cunningham JG (1999) Tratado de fisiologia veterinária: líquido cerebrospinal, barreira hematoencefálica. In: **Tratado de fisiologia veterinária** 2 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan p. 88-91.

Day MJ, Horzinek MC, Schultz RD et al. (2016) WSAVA guidelines for the vaccination of dogs and cats. **Journal of Small Animal Practice** 51:1-32

Dymend DA, Herrera BM, Cader MZ et al (2005) Complex interactions among MHC haplotypes in multiple sclerosis: susceptibility and resistance. **Human Molecular Genetics** 14:2019-2026.

Fenner WR (2004) Doenças do cérebro In: Ettinger S.J. & Feldman E.C. **Tratado de Medicina Interna Veterinária: doenças do cão e do gato**. 5ª ed. Guanabara Koogan, Rio de Janeiro, p.586-638.

Frade TEM, Dantas ACM (2011) Aspectos epidemiológicos, clínicos e patológicos da cinomose canina. **VIII Congresso de Iniciação Científica**. Universidade Federal de Campina Grande, Universidade Federal de Campina Grande, Patos.

Frisk AL, König M, Moritz A et al. (1999) Detection of canine distemper virus nucleoprotein RNA by reverse transcription-PCR using serum, whole blood, and cerebrospinal fluid from dogs with distemper. **Journal of Clinical Microbiology** 37: 36-43.

Gama FGV, Nishimori CT, Sobreira MR et al. (2005) Caracteres físico-químicos e citológicos do liquor de cães em diferentes fases da cinomose. **Ciência Rural**, 35:596-601.

Gaskin JM (1974) Canine distemper virus in domesticated cats and pigs. **Advances in Enzymology - and Related Areas of Molecular Biology** 40:803-806.

Gebara CMS, Wosiacki SR, Negrão FJ et al (2004) Lesões histológicas no sistema nervoso central de cães com encefalite e diagnóstico molecular da infecção pelo vírus da cinomose canina. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia** 56:168-174.

Gebara CMS, Wosiacki SR, Negrão et al (2006) Lesões histológicas no sistema nervoso central de cães com encefalite e diagnóstico molecular da infecção pelo vírus da cinomose canina. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia** 56:168-174.

Gledhill AW (1953) Some veterinary diseases of medical interest. **British Medical** 9:237-241

Greene CE, Vandeveld M Canine Distemper. (2012) In: GREENE, C.E. **Infectious Disease Of The Dog And Cat** Saunders Elsevier p. 25-41.

Gröters S, Alldinger S, Baumgärtner W (2005) Up-regulation of mRNA for matrix metalloproteinases-9 and -14 in advanced lesions of demyelinating canine distemper leukoencephalitis. **Acta Neuropathology**, 110:369-382.

Guyton AC, Hall JE (2006) Tratado de fisiologia médica: fluxo sanguíneo cerebral, líquido cefalorraquidiano, metabolismo cerebral. In: **Tratado de fisiologia médica** 11 ed. Rio de Janeiro: Saunders Elsevier, p. 761-767

Hamo L, Stohlman SS, Otto-Duessel M, Bergmann CC (2007) Distinct regulation of MHC molecule expression on astrocytes and microglia during viral encephalomyelitis. **Glia**, 55:1169- 1177.

Han GZ, Liu XP, Li SS (2008) Cross-species recombination in the haemagglutinin gene of canine distemper virus. **Virus Research** 136:198-201.

Harder TC, Osterhaus AD (1997) Canine distemper virus—a morbillivirus in search of a new host. **Trends of Microbiology** 5:120-124.

Hass R, Johann JM, Caetano CF et al. (1999) Níveis de anticorpos contra o vírus da cinomose canina e o parvovírus canino em cães não vacinados e vacinados. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia** 60:270-274.

Headley SA, Graça DL (2000) Canine distemper: epidemiological findings of 250 cases. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Science** 37:134-143.

Headley SS, Amude AM, Alfieri AF, Bracarense APFRL, Alfieri AA, Summers BA (2009) Molecular detection of Canine distemper virus and the immunohistochemical characterization of the neurologic lesions in naturally occurring old dog encephalitis. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation** 21:588–597.

Herrero LJ, Nelson M, Srikiatikhackorn A, Gu R et al (2011) Critical role for macrophage migration inhibitory factor (MIF) in Ross River virus-induced arthritis and myositis. **Proceedings of the National Academy of Sciences** 108:12048-12053.

Kapil S, Yeary TJ (2011) Canine distemper spillover in domestic dogs from urban wildlife. **Veterinary Clinics: Small Animal Practice** 41:1069-1086.

Kennedy S, Kuiken T, Jepson PD et al. (2000) Mass die-off of Caspian seals caused by canine distemper virus, **Emerging Infectious Diseases Journal** 6:637-639.

Khosravi M, Bringolf F, Rothlisberger S, et al (2016) Canine distemper virus fusion activation: critical role of residue E123 of CD150/SLAM **Journal of Virology** 90:622-1637.

Krakowka S (1989) Canine virus infectivity of various blood fractions for central nervous system vasculature. **Journal of Neuroimmunology**, 21:75-80.

Krakovka S, Ringler SS, Lewis M et al. (1987) Immunossupression By Canine Distemper Virus: Modulation Of In Vitro Immunoglobulin Synthesis, Interleukin Release And Prostaglandin E 2 Production. **Veterinary Immunology and Immunopathology** 15:181-201.

Krakovka S, Koestner A (1976) Age-related susceptibility to infection with canine distemper virus in gnotobiotic dogs. **The Journal of Infectious Diseases** 134: 629-632.

Lee, Y.J (2011) Acute disseminated encephalomyelitis in children: differential diagnosis from multiple sclerosis on the basis of clinical course. **Korean J Pediatr** 54:234-240.

Lempp C, Spitzbarth I, Puff C et al (2014) New aspects of the pathogenesis of canine distemper leukoencephalitis. **Viruses**, 6:2571-2601.

Machado ABM **Neuroanatomia funcional: vascularização do sistema nervoso central e barreiras encefálicas (2002)** 2 ed. São Paulo: Atheneu, p. 87- 99.

Machado GF, Melo GD, Souza MS, Machado AA et al (2013) Zymographic patterns of MMP-2 and MMP-9 in the CSF and cerebellum of dogs with subacute distemper leukoencephalitis. **Veterinary Immunology and Immunopathology** v. 154, p.68-74

Mangia SH, Moraes LF Takahira, RK. et al. (2015) Efeitos colaterais do uso da ribavirina, prednisona e DMSO em cães naturalmente infectados pelo vírus da cinomose. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, 34:449-454.

Martella V, Elia G, Buonavoglia C (2009) Canine Distemper Virus. **Veterinary Clinics: Small Animal Practice** 38:787-797.

Martins DBL, Lopes STA, França RT (2009) Cinomose canina – revisão de literatura. **Acta Veterinaria Brasilica**, 3:68-76.

Megid J, Souza VAF, Teixeira CR et al. (2009) Canine distemper virus in a Crab-eating Fox (*Cerdocyon thous*) in Brazil: case report and phylogentic analyses. **Journal of Wildlife Diseases** v.45, n.2, p.527-530.

Megid J, Teixeira C.R, Amorin RL et al. (2005) First identification of canine distemper virus in Hoary Fox (*Lycalopex vetulus*): pathologic aspects and virus phylogeny. **Journal of Wildlife Diseases** 46:303-305.

Miao Q, Baumgärtner W, Failing K, Alldinger S (2003) Phasedependent expression of matrix metalloproteinases and their inhibitors in demyelinating canine distemper encephalitis. **Acta Neuropathology**, v. 106, n. 5, p. 486-494.

Mochizuki M, Hashimoto M, Hagiwara S et al.(2003) Genotypes of canine distemper virus determined by analysis of the hemagglutinin genes of recent isolates from dogs in Japan. **Journal of Clinical Microbiology** 37:2936–2942.

Mochizuki M, Motoyoshi M, Maeda K, Kai K (2002) 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 and Immunology** 9:921-924.

Monteiro MVB, Santos MP, Costa CTC, Whiteman, CTC et al (2010) Cinomose canina nos animais domésticos e silvestres. **Revista Ciência Agronômica** 53, 2:216-223.

Monteiro MVB, Santos MP, Figueiredo MJFM, Monteiro FOB (2012) Avaliação Clínica e Hematológica de Cães Com Cinomose em Belém, Pará; **Ciência Animal**; 18:41-44.

Moreira PRR, Vieira LM Andrade MMC, Barros M.B et al (2010) Immune response pattern of the popliteal lymph nodes of dogs with visceral leishmaniasis. **Journal of Parasitology Research** 107:605-613

Moro L, Martins AS, Alves C.M et al. (2003) Apoptosis in the cerebellum of dogs with distemper. **Journal of Veterinary Medicine** 50:221-225.

Muraro SP, Stein RT (2015) O fator inibidor da migração de macrófagos (mif) contribui para a formação da inflamação em resposta à infecção pelo vírus sincicial respiratório (VSR) **Seminário Interno de Avaliação da Iniciação Científica**.

Negrão FJ, Alfieri AA, Alfieri AF (2007) Avaliação da urina e de leucócitos como amostras biológicas para a detecção ante mortem do vírus da cinomose canina por RT-PCR em cães naturalmente infectados. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia** 59:253-257.

Noyce RS, Delpeut S, Richardson CD (2013) Dog nectin-4 is an epithelial cell receptor for canine distemper virus that facilitates virus entry and syncytia formation. **Virology**, 436:210–220.

Opdenakker G, Van Den Steen PE Dubois B et al (2001) Gelatinase B functions as regulator and effector in leukocyte biology. **Journal of Leukocyte Biology** 69:851-859

Orsini H, Bondan EF, Sanchez M et al (2007) Marcação imunoistoquímica da expressão astrocitária de proteína glial fibrilar ácida e de vimentina no sistema nervoso central de cães com cinomose. **Arquivos de Neuro-Psiquiatria** 65:1070-1077.

Orvell C (1980) Structural polypeptides of canine distemper vírus. **Archives of Virology** 66:193-206.

Pan Y, Liu X, Meng L et al (2013) Pathogenesis of demyelinating encephalopathy in dogs with spontaneous acute canine distemper. **International Journal of Agriculture and Biology** 12:334-43.

Panzera Y, Sarute N, Iraola G et al. (2015) Molecular phylogeography of canine distemper virus: geographic origin and global spreading. **Molecular Phylogenetics and Evolution** 9:147-154.

Qesla V, Barthel Y, Herder V et al (2014) Canine Distemper Virus Infection Leads to an Inhibitory Phenotype of Monocyte-Derived Dendritic Cells *In Vitro* with Reduced Expression of Co-Stimulatory Molecules and Increased Interleukin-10 Transcription. **Plos One.**, 4:136-146.

Quinn PJ, Markey BK, Carter ME et al (2005) **Microbiologia Veterinária e Doenças Infecciosas**. Porto Alegre.

Riley MC, Wilkes RP (2015) Sequencing of emerging canine distemper virus strain reveals new distinct genetic lineage in the United States associated with disease in wildlife and domestic canine populations. **Journal of Virology** 12:1-10.

R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. URL <https://www.R-project.org/>, 2015.

Roelke-Parker ME, Munson L, Packer et al. (1996) A canine distemper virus epidemic in Serengeti lions (*Panthera leo*). **Nature**, 379:441–445.

Rudd PA, Bastián-Hamel LE, Von Messling V (2010) Acute canine distemper encephalitis is associated with rapid neuronal loss and local immune activation. **Journal of General Virology** 91:980–989.

Santos JP, Borges CEF, Locce CC, et al (2012) Estudo retrospectivo de cães positivos para cinomose, em ensaio imunocromatográfico, atendidos no hospital veterinário de Uberaba-MG. **Veterinária Notícias** 1831-36.

Stein VM, Baumgärtner W, Kreienbrock L et al (2006) Canine microglial cells: stereotypy in immunophenotype and specificity in function? **Veterinary Immunology and Immunopathology** 113:277-287.

Seehusen F, Al-Azreg SA, Raddatz B.B et al (2016) Accumulation of Extracellular Matrix in Advanced Lesions of Canine Distemper Demyelinating Encephalitis **Plos One**, 7:1-27.

Sonne L, Oliveira EC, Pescador CA et al. (2009) Achados patológicos e imunohistoquímicos em cães infectados naturalmente pelo vírus da cinomose canina. **Pesquisa Veterinária Brasileira** 29:143-149.

Spitzbarth L, Lempp C, Kegler K et al (2016) Immunohistochemical and transcriptome analyses indicate complex breakdown of axonal transport mechanisms in canine distemper leukoencephalitis. **Brain Behaviour** 3:1-19.

Summers BA, Greisen HA, Appe MJ (1984) Canine distemper encephalomyelitis: variation with virus strain. **Journal of Comparative Pathology** 94:65-75.

Sun Z, Li A, Ye H et al (2010) Natural infection with canine distemper virus in hand-feeding Rhesus monkeys in China. **Veterinary Microbiology** 141:374-378.

Takenaka A, Sato H, Ikeda F, Yoneda M, , Kai C (2016) Infectious progression of canine distemper vírus from circulating cerebrospinal fluid into the central nervous system. **Journal of Virology** 90:9285-9292.

Tudury EA, Arias MVB, Bacarense APLNB et al (1997) Observações clínicas e laboratoriais e cães com cinomose nervosa. **Ciência Rural**, 27:229-235.

Ulrich R, Puff. C, Wewetzwer K et al Transcriptional Changes in Canine Distemper Virus-Induced Demyelinating Leukoencephalitis Favor a Biphasic Mode of Demyelination. **Plos One**, 9:95-97

Vandeveldel M, Zurbriggen A, Steck, A et al. (1986) Studies on the intrathecal humoral immune response in canine distemper encephalitis, **Journal of Neuroimmunology** 11:41-51.

Vandeveldel M, Zurbriggen A (1995) The neurobiology of canine distemper virus infection. **Veterinary Microbiology** 44:271-280.

Vandeveldel M, Zurbriggen A (2005) Demyelination in canine distemper virus infection: a review. **Acta Neuropathologica** 7:56-68.

Von Messling V, Svitek N, Cattaneo R (2006) Receptor (SLAM [CD150]) recognition and the V protein sustain swift lymphocyte-based invasion of mucosal tissue and lymphatic organs by a morbillivirus. **Journal of Virology** 80:6084-6092.

Yong VW, Power C, Forsyth P, Edwards DR (2011) Metalloproteinases in biology and pathology of the nervous system. **Neurological Sciences** 2:502- 511.

Yoshikawa Y, Ochikubo F, Matsubara Y (1989) Natural infection with canine distemper virus in a Japanese monkey (*Macaca fuscata*). **Veterinary Microbiology** 20:193-205.

Wyss-Fluehmann G, Zurbriggen A, Vandeveldel M (2009) Canine Distemper virus persistence in demyelinating encephalitis by swift intracellular cell-to-cell spread in astrocytes is controlled by the viral attachment protein. **Acta Neuropathologica** 119:617–630.

Zurbriggen A, Yamawaki M (1993) Restricted canine distemper virus infection of oligodendrocytes. **Laboratory Investigation** 68:277-284.

Zurbriggen A, Schmid I, Graber HU et al. (1988) Oligodendroglial pathology in canine distemper. **Acta Neuropathologica** 95:71-77.

