

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA
CÂMPUS DE ARAÇATUBA**

**IMUNOMARCAÇÃO DE SUBPOPULAÇÕES DE
LINFÓCITOS CD3+, CD4+ E CD8+ ASSOCIADA À
EXPRESSÃO DE METALOPROTEINASES -2 E -9 EM
CEREBELOS DE CÃES INFECTADOS NATURALMENTE
COM VÍRUS DA CINMOSE CANINA**

Livia Castanhas Bregano

Médica Veterinária

Araçatuba – SP

2011

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”

FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA

CÂMPUS DE ARAÇATUBA

**IMUNOMARCAÇÃO DE SUBPOPULAÇÕES DE
LINFÓCITOS CD3+, CD4+ E CD8+ ASSOCIADA À
EXPRESSÃO DE METALOPROTEINASES -2 E -9 EM
CEREBELOS DE CÃES INFECTADOS NATURALMENTE
COM VÍRUS DA CINOMOSE CANINA**

Livia Castanhas Bregano

Orientadora: Profa. Dra. Tereza Cristina Cardoso da Silva

Co-orientador: Prof. Dr. Wagner Luis Ferreira

Dissertação apresentada à Faculdade de Medicina Veterinária – Unesp, Campus de Araçatuba, como parte das exigências para a obtenção do título de Mestre em Ciência Animal (Medicina Veterinária Preventiva).

Araçatuba – SP

2011

DADOS CURRICULARES DO AUTOR

LIVIA CASTANHAS BREGANO – Bauru, 15 de janeiro de 1985. Possui graduação em Medicina Veterinária pela Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho – UNESP Araçatuba/SP (2008). Tem experiência e atua principalmente nas áreas de Doenças Infeciosas de Pequenos Animais, Microbiologia e Imunologia, e Clínica Médica de Pequenos Animais. Em agosto de 2009, ingressou no programa de Mestrado em Ciência Animal na área de Medicina Veterinária Preventiva da UNESP – campus de Araçatuba. Atualmente é membro titular de representação discente dos pós-graduandos da mencionada universidade.

“Amigos, eu ganhei. Saudades eu senti, partindo. E, às vezes, eu deixei você me ver chorar, sorrindo (...) São tantas já vividas, são momentos que eu não me esqueci. Detalhes de uma vida, histórias que eu contei aqui (...) Em paz com a vida e o que ela me traz; na fé que me faz otimista demais”

(Roberto Carlos e Erasmo Carlos, 1981)

Dedico este trabalho, e tudo o que o envolveu, aos meus heróis
Dos sonhos e da vida real

Meu herói, José Carlos Bregano
Meu exemplo, minha maior saudade, minha alegria

Minha heroína, Denise Miguel Castanhas Bregano
Meu espelho, meu orgulho, minha força

É por vocês que consigo, que não desisto, que continuo
É por vocês que sou feliz

AGRADECIMENTOS

“A gratidão é a memória do coração”

(Antístenes)

Agradeço à minha mãe Denise Miguel Castanhas Bregano, porque, sem sua força, seus conselhos e seu amor, não sei viver. Meu exemplo e meu orgulho. Poucas pessoas são como você, e me sinto privilegiada de tê-la em minha vida.

Ao meu pai José Carlos Bregano, um exemplo de superação, inteligência, bondade e alegria. Em cada segundo da minha vida, você está presente, porque seu coração vive, para sempre, dentro de mim.

À minha irmã Marília Castanhas Bregano, minha companheira e amiga de todas as horas. O coração mais nobre e gentil. Minha admiração, meu carinho e meu orgulho. A vida seria muito mais bonita se as pessoas fossem iguais a você.

Aos meus avós José D' Oliveira Castanhas e Amali Miguel Castanhas que sempre foram essenciais na minha educação e formação. Vocês sempre serão a minha maior lembrança de incentivo e de amor.

Agradeço à Faculdade de Medicina Veterinária de Araçatuba / Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” por me acolher e proporcionar todo meu aprendizado tanto no período da graduação quanto durante todo o mestrado.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), pelo suporte financeiro para a realização deste trabalho.

À minha orientadora Prof^a. Dr^a. Tereza Cristina Cardoso da Silva, pela oportunidade de realização deste trabalho, pela confiança em mim depositada, por toda a orientação e conhecimento concedidos.

Ao meu co-orientador Prof. Dr. Wagner Luis Ferreira, por sempre estar disposto a me ajudar, pela paciência, pelo apoio profissional e pessoal.

À Prof^a. Dr^a. Flavia de Rezende Eugênio, à Dr^a. Vera Cláudia Lorenzetti Magalhães Curci e ao Prof. Dr. Alexandre Lima de Andrade que, com suas participações nas bancas de qualificação e defesa, foram imprescindíveis para a melhoria do meu trabalho.

À Prof^a. Dr^a. Sílvia Helena Venturolli Perri, pela colaboração na realização da análise estatística.

Às funcionárias da Biblioteca da Faculdade de Medicina Veterinária de Araçatuba, pelo apoio e auxílio na elaboração da dissertação.

À Prof^a. Dr^a. Maria Cecília Rui Luvizotto e Prof^a. Dr^a. Valéria Nobre Leal de Souza Oliva por todo o incentivo e apoio profissional e pessoal.

Às minhas amigas Juliana Peloi Vides e Tatianna Frate Schwardt que, em dois anos, se tornaram essenciais em minha vida. Foi com o apoio, o carinho, a dedicação, a cumplicidade e a amizade de vocês que consegui. “As pessoas entram na nossa vida por acaso, mas não é por acaso que elas permanecem” (Alessandra Melo).

À minha amiga Milena Araújo Viol, uma grande companhia de todas as horas. Sempre me incentivando, ouvindo e aconselhando. Nossas conversas e nossas risadas são sempre muito especiais.

Às minhas amigas Mariana Valério Orlandi, Renata Cunha Haddad, Cinthya Toledo Greco, Beatriz Cunha Prada, Nathália Orlandi Cunha, Eliza Orlandi Cunha, Maria Carolina Budini Abud e Camila Lacerda que, mesmo de longe, acompanham e participam de todos os momentos da minha vida. Minha segunda família, minhas queridas, meus amores. Mais de vinte anos de amizade e carinho. As de sempre e para sempre.

Às minhas amigas Eveline Tozzi Braga e Patricia Colavite por todo o incentivo, amizade e carinho.

Às minhas amigas Fernanda Ramos e Leticia Toiomoto; foi com elas que passei os melhores anos da minha vida. Elas sempre terão um lugar muito especial no meu coração.

Aos meus amigos do Laboratório de Virologia da Faculdade de Medicina Veterinária de Araçatuba, Heitor Flavio Ferrari, Andréa Fontes Garcia e Ana Carolina Guedes Rosa, por todos os conselhos, convívio e amizade.

Aos meus amigos Augusto Schweigert, Caio Abimussi, Marcos Augusto dos Reis Ferraz, Victor Hugo Mendonça, Silmara Sakamoto, Diogo Gauber, Gabriel Ferreira, Acácio Pacheco pela amizade, conversas, conselhos e risadas.

Às minhas filhas queridas, Pantufa e Gabriela, que são a alegria da minha vida.

“Agradeço todas as dificuldades que enfrentei; não fosse por elas,
eu não teria saído do lugar”

(Francisco de Paula Cândido Xavier)

SUMÁRIO

Página

CAPÍTULO 1 – CONSIDERAÇÕES GERAIS	16
1. Introdução	16
1.1. Histórico	17
2. Aspectos Epidemiológicos	18
3. <i>Canine Distemper Virus</i> – CDV	19
3.1. Estirpes Virais	22
4. Espectro de possíveis hospedeiros	24
5. Doenças desmielinizantes e a cinomose canina	24
6. Patogenia da cinomose canina	25
7. Doença sistêmica pela cinomose canina	27
8. Neuroinvasão pelo CDV	28
8.1. Barreira hematoencefálica	29
8.2. Matriz metaloproteinase	32
9. Neuropatogenia da cinomose	37
9.1. Desmielinização na cinomose canina	39
9.1.1. Desmielinização aguda	41
9.1.2. Desmielinização crônica	42
9.2. Células envolvidas no processo desmielinizante	43
9.2.1. Infecção de oligodendrócitos	44
9.2.2. Infecção astrocítica	45
10. Síndromes neurológicas associadas à cinomose canina	46
11. Diagnóstico	47
12. Profilaxia	48
13. Conclusão	49
REFERÊNCIAS	51

CAPÍTULO 2 – IMUNOMARCAÇÃO DE SUBPOPULAÇÕES DE LINFÓCITOS CD3+, CD4+ E CD8+ ASSOCIADA À EXPRESSÃO DE METALOPROTEINASES -2 E -9 EM CEREBELOS DE CÃES INFECTADOS NATURALMENTE COM VÍRUS DA CINOMOSE CANINA	57
RESUMO	57
1. Introdução	58
2. Material e métodos	60
2.1. Preocupações éticas	60
2.2. Amostras	60
2.3. Análise histopatológica	60
2.4. Reação de imunoistoquímica	61
2.5. Análise estatística	63
3. Resultados	63
3.1. Achados histopatológicos	63
3.2. Achados imunoistoquímicos	64
4. Discussão	68
5. Agradecimentos	70
REFERÊNCIAS	71

LISTA DE FIGURAS

Página

1. Representação esquemática da composição estrutural da partícula viral de CDV.....22
2. Representação esquemática da patogenia geral da cinomose canina...26
3. Representação esquemática da patogenia geral da cinomose canina...27
4. Representação esquemática da invasão do SNC em cães acometidos pelo CDV.....29
5. Representação esquemática comparativa entre capilar sistêmico e capilar cerebral, constituinte da barreira hematoencefálica.....31
6. Representação esquemática comparativa entre as constituições estruturais da Gelatinase A (MMP-2) e Gelatinase B (MMP-9).....34
7. Representação esquemática das principais regiões do SNC de cães acometidos pelo CDV, evidenciando cerebelo (Cc, Cm, Cv); córtex frontal (Fc); ponte (P) e medula oblonga (Mob).....38
8. Fotomicrografias de cortes histológicos de cerebelos de cães naturalmente infectados para CDV imunomarcados para MMP-9, utilizando cromógeno DAB (Sigma-Aldrich®) e contracolorados em Hematoxilina. A) Discreta imunomarcção restrita à meninge. B) Imunomarcção de grau leve no parênquima cerebelar. C) Imunomarcção moderada em camada molecular e granular do cerebelo. D) Imunomarcção intensa no parênquima cerebelar.....65
9. Fotomicrografia de cortes histológicos de cerebelos de cães naturalmente infectados para CDV imunomarcados para MMP-2, utilizando cromógeno AEC (Sigma-Aldrich®) e contracolorados em Hematoxilina. A) Imunomarcção focal no parênquima cerebelar (seta). B) Moderada marcação IHQ da camada granular do cerebelo. C) Imunomarcção generalizada no neurópil do cerebelo.....66

10. Fotomicrografia exibindo imunomarcação em cortes histológicos de cães naturalmente infectados para CDV. A) Marcação positiva para célula T CD3+. B) Marcação positiva para subpopulação de linfócitos T CD4+. C) Marcação positiva para subpopulação de linfócitos T CD8+.....66
11. Fotomicrografia exibindo inclusão intracitoplasm tica de CDV (seta) circundada por astrócitos em corte histol gico de cerebelo de c o naturalmente infectado para CDV e corado com HE.....67
12. A) Frequ ncia da detecção de MMP-2 independente dos estágios da encefalite desmielinizante de c es positivos para CDV. B) Frequ ncia da detecção de MMP-9 independente dos estágios da encefalite desmielinizante de cães positivos para CDV.....67
13. A) Frequência da detecção de MMP-2 nos diferentes estágios da encefalite desmielinizante de cães positivos para CDV. B) Frequência da detecção de MMP-9 nos diferentes estágios da encefalite desmielinizante de cães positivos para CDV.....68

LISTA DE TABELAS

Página

1. Descrição das principais classes de MMPs e seus constituintes.....33
2. Descrição dos principais inibidores de MMPs.....36
3. Descrição dos anticorpos, fabricação e diluição utilizados pelo Laboratório de Virologia da FMVA, UNESP, Araçatuba/SP.....62

IMUNOMARCAÇÃO DE SUBPOPULAÇÕES DE LINFÓCITOS CD3+, CD4+ E CD8+ ASSOCIADA À EXPRESSÃO DE METALOPROTEINASES -2 E -9 EM CEREBELOS DE CÃES INFECTADOS NATURALMENTE COM VÍRUS DA CINOMOSE CANINA

RESUMO – No presente estudo foram avaliados 30 cerebelos de cães naturalmente infectados pelo vírus da cinomose canina, confirmados por meio da reação RT-PCR (*Reverse Transcriptase Polymerase Chain Reaction*) com segmentação do gene do nucleocapsídeo viral, e por análise microscópica das lesões teciduais após a coloração Hematoxilina-Eosina e coloração de Shorr. A distribuição das subpopulações de linfócitos T foi evidenciada pela técnica de imunistoquímica, empregando-se anticorpos monoclonais CD3+, CD8+ e CD4+. Da mesma forma, a detecção da expressão das metaloproteinases (MMP) -2 e -9 também foi conduzida pela técnica de imunistoquímica e os resultados foram associados aos encontrados na imunofenotipagem. Foi possível evidenciar marcação mais expressiva de MMP-2 (86,67% de intensidade moderada a intensa) e uma alta proporção de linfócitos T CD4+ e CD8+. Nesse sentido, pode-se concluir que o vírus da cinomose canina se dispersa no sistema nervoso central, alterando a integridade estrutural da barreira hematoencefálica, provavelmente pela ação da MMP-2; e os infiltrados inflamatórios perivasculares presentes são constituídos predominantemente por subpopulações de linfócitos T CD4+ e CD8+.

Palavras-chave: Barreira hematoencefálica, CDV, interação vírus-hospedeiro

**IMMUNOSTAINING OF LYMPHOCYTE SUBPOPULATION CD3 +, CD4 +
AND CD8 + ASSOCIATED TO THE METALLOPROTEINASES EXPRESSION
-2 AND -9 IN CEREBELLUM OF NATURALLY INFECTED DOGS WITH
CANINE DISTEMPER VIRUS**

ABSTRACT – The present study evaluated 30 cerebella of dogs naturally infected with canine distemper virus, confirmed by RT-PCR (Reverse Transcriptase Polymerase Chain Reaction) to target the viral nucleocapsid gene, and by microscopic examination of tissue lesions after hematoxylin-eosin and Shorr staining. The distribution of subpopulations of T lymphocytes was demonstrated by immunohistochemistry using monoclonal antibodies against CD3 +, CD8 + and CD4 +. Similarly, detection of the expression of matrix metalloproteinases (MMP) -2 and -9 was also conducted by immunohistochemistry and the results were related to those found in immunophenotyping. The results revealing more expressive marking of MMP-2 (86.67% moderate to severe) and a high proportion of CD4 + and CD8 +. In conclusion, it can be infer that canine distemper virus is spread in the central nervous system, altering the structural integrity of the blood-brain barrier, probably by the action of MMP-2. Moreover, perivascular inflammatory infiltrates consisted predominantly of T lymphocyte subpopulations CD4 + and CD8 +.

Keywords: Barrier, CDV, virus-host interaction

CAPÍTULO 1 – CONSIDERAÇÕES GERAIS

1. Introdução

As enfermidades infecciosas que acometem o sistema nervoso central (SNC) representam um expressivo grupo de doenças em cães. Estas possuem um grande número de possíveis etiologias e podem desencadear diversos sinais clínicos graves que, em muitas vezes, são incompatíveis com a vida do animal (GEBARA et al., 2004). Dentre as principais enfermidades do SNC de cães, destaca-se a cinomose canina por ser uma doença infecciosa altamente contagiosa que acomete cães de todo o mundo (HEADLEY et al., 2009), e que 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 (MARTELLA et al., 2007; MARTINS et al., 2009).

O termo utilizado para denominar esta enfermidade varia entre os diferentes países, sendo denominada por *Esgana* em Portugal, *Moquillo Del perro* em países de língua espanhola, *Cimurro* na Itália e *Canine Distemper* na América do Norte (MONTEIRO et al., 2010). Em alguns países, a cinomose canina é encarada como risco econômico, em virtude dos mesmos serem grandes produtores de pele de animais, como é o caso da Finlândia (MARTINS et al., 2009). A enfermidade também se destaca principalmente em alguns parques africanos, por ser um dos fatores colaboradores da possível extinção de algumas espécies de animais selvagens, já que para estes animais o vírus da cinomose é altamente fatal (BEINEKE et al., 2009).

A cinomose canina apresenta um elevado coeficiente de mortalidade, que se refere a um alto número de animais que morrem pela doença em um dado intervalo de tempo; e um coeficiente de letalidade, poder da doença de provocar a morte, inferior apenas à raiva canina – que se aproxima de 100% (BREGANO et al., 2010; GEBARA et al., 2004; SONNE et al., 2009). Além

disso, a enfermidade não apresenta sazonalidade, ou seja, a ocorrência se distribui homoganeamente entre as estações do ano. Entretanto, algumas pesquisas afirmam que há uma maior incidência da doença em períodos de temperaturas mais baixas (HEADLEY; GRAÇA, 2000). A cinomose não apresenta predisposição entre sexo e raça, porém, em virtude de cães sem raça definida (SRD) serem extremamente representativos em número no Brasil. Estes animais lideram as estatísticas de incidência da enfermidade quando comparados às diferentes raças caninas (HEADLEY; GRAÇA, 2000; MARTINS et al., 2009). É sabido também, por meio da quantificação de títulos de anticorpos contra o vírus, que cães de rua são mais susceptíveis que cães domiciliados por receberem menores cuidados veterinários e por apresentarem maior chance de contato com partículas virais (MARTINS et al., 2009).

Estudos brasileiros demonstram que, em geral, os principais animais acometidos pelo vírus da cinomose estão na faixa etária de zero a um ano e meio de idade (SILVA et al., 2007). Sabe-se que há uma maior incidência e susceptibilidade em animais jovens, menores de 03 meses e não vacinados (MANGIA; PAES, 2008). Nestes animais, a taxa de letalidade é superior a 50% em virtude de declínio dos anticorpos maternos e título insuficiente de anticorpos neutralizantes contra o vírus da cinomose (MARTINS et al., 2009).

1.1. Histórico

A cinomose tem sido descrita e estudada há mais de cem anos (VANDEVELDE; ZURBRIGGEN, 2005), sendo os primeiros estudos da enfermidade datados de 1746, na América do Sul. Relatos posteriores foram registrados na Espanha, Inglaterra, Itália e Rússia, em meados de 1760. Em 1763, foram descritos o acometimento e morte de 900 cães em um único dia na cidade de Madri (Espanha) (MARTINS et al., 2009). A primeira descrição clínica detalhada foi realizada por Edward Jenner, em 1809. A primeira transmissão experimental foi realizada por Karle, que escovou o lábios de cães jovens com excreções de animais doentes, em 1844 (BLANCOU, 2004).

No ano de 1853, a hipótese, de que a cinomose canina teria sido introduzida na Europa com a entrada de colonizadores espanhóis vindos do Peru a partir do século XVII, foi estabelecida (BLANCOU, 2004). No início do século XX, o agente causador da cinomose foi isolado de cães pela primeira vez por Carré (1905). Em 1907, foram observados corpúsculos de inclusão em neurônios por Lentz, e em 1912, os mesmos corpúsculos foram observados por Sinigaglia em outros tecidos. A teoria de Carré foi, então, confirmada no ano de 1926 por Laidlaw e Dunkin, e, somente no ano de 1950, a primeira vacina contra o vírus da cinomose foi desenvolvida para cães domésticos (MARTINS et al., 2009).

2. Aspectos epidemiológicos

Apesar da cinomose canina ser uma das mais importantes doenças infecciosas de cães do mundo, há uma escassez de estudos epidemiológicos a respeito da mesma, e conseqüente falta de informações sobre sua ocorrência (DEZENGRINI et al., 2007). No Brasil, a enfermidade é considerada endêmica, representa 6% de todas ocorrências na clínica de pequenos animais, e 11% dos óbitos em cães (MONTEIRO et al., 2010; NEGRÃO et al., 2006). Entretanto, acredita-se que o grau de infecção dos animais seja significativamente maior do que o grau de doença registrado, pois é sabido que 25% a 75% dos animais susceptíveis e expostos ao vírus desenvolvem a infecção subclínica, eliminando o vírus no ambiente, contribuindo como fontes de infecção, e, principalmente, dificultando a erradicação da doença (GEBARA et al., 2004; GREENE; APPEL, 2006).

A incidência da doença foi reduzida, a partir de 1960, com o advento de vacinas vivas atenuadas, acreditando-se, na época, ter o controle da mesma. Em diversos países, onde a vacinação se tornou regular em grande parte da população canina, a prevalência da cinomose clínica tem diminuído substancialmente (NEGRÃO et al., 2006). Entretanto há relatos do aparecimento de surtos esporádicos, como os registrados na Dinamarca

(BLIXENKRONE-MOLLER et al., 1993), Finlândia (EK-KOMMONEN et al., 1997), Polônia (JOZWIK; FRIMUS, 2002), EUA (MAES et al., 2003) e Austrália (NORRIS et al., 2006). Estes surtos podem estar associados ao fato de que as vacinas atualmente utilizadas (principalmente vacinas com vírus atenuado) não induzem imunidade absoluta (MARTINS et al., 2009); e a falta de vigilância epidemiológica que buscaria identificar novas variantes do vírus da cinomose e contribuir para a criação de novas e mais eficientes vacinas (MARTELLA et al., 2007). Nas últimas décadas, houve um considerável aumento da ocorrência da cinomose, em determinados locais, que pode ser atribuído a possíveis falhas vacinais; vacinações indiscriminadas ou insuficientes; e a introdução de animais domésticos, principalmente cães, próxima a áreas de preservação ambiental, o que pode contribuir como fator de risco para a infecção tanto do animal doméstico quanto dos animais silvestres (MONTEIRO et al., 2010).

A cinomose canina destaca-se por apresentar caráter enzoótico, ou seja, quando presente em uma determinada região, a doença pode se estabelecer constantemente na mesma. Esta característica está correlacionada a fatores como a importante capacidade de persistência viral no ambiente, o aparecimento de novas estipes virais, a ocorrência de infecção em animais vacinados e de animais portadores (BEINEKE et al., 2009). A manutenção da doença em populações urbanas de cães é estabelecida pela infecção em animais suscetíveis (com ou sem doença clínica), porém, em áreas rurais, o número de cães em geral, e o contato entre eles, é baixo para a manutenção da infecção contínua, havendo sempre a necessidade de novas fontes de infecção para a perpetuação da enfermidade (BEINEKE et al., 2009).

3. *Canine Distemper Virus* – CDV

A doença é causada pelo vírus da cinomose canina (CDV – *Canine Distemper Virus*) pertencente à ordem *Mononegavirales*, família *Paramyxoviridae*, subfamília *Paramyxovirinae* e gênero *Morbillivirus* (HEADLEY et al., 2009), e que se relaciona estreitamente com outros vírus do gênero

Morbillivirus, como o vírus do sarampo, em seres humanos e o vírus da peste bovina, em ruminantes (MORO et al., 2003). Os paramixovírus, em geral, apresentam uma considerável variedade de hospedeiros, infectando principalmente mamíferos e aves. O termo *myxovirus* (do grego *myxa*, “muco”) relaciona-se com a afinidade desta família de vírus por membranas mucosas (BEINEKE et al., 2009).

O CDV é um RNA vírus fita simples, de polaridade negativa, não segmentado. Caracteriza-se por ser um agente pleomórfico, ou seja, pode se apresentar como filamentosos ou arredondados, de aproximadamente 100-250 nm de diâmetro, com nucleocapsídeo de simetria helicoidal e revestido por um envoltório lipídico duplo (envelope) (GRÖTERS et al., 2005; WÜNSCHMANN et al., 2000; WYSS-FLUEHMANN et al., 2010). Além disso, o CDV se caracteriza por ser um agente altamente imunossupressor; pantrópico, ou seja, com afinidade por diferentes tecidos, principalmente os tecidos epiteliais; com capacidade de produzir uma doença multi-sistêmica; e que pode atingir o SNC dos animais afetados (BEINEKE et al., 2008; BREGANO et al., 2010; SEEHUSEN et al., 2007).

O efeito imunossupressivo do CDV em cães é um aspecto extremamente relevante e comum a todas as possíveis estirpes virais. Este efeito favorece a ocorrência de infecções oportunistas concomitantes ao quadro clínico da cinomose canina, o que agrava o mesmo, dificultando condutas de tratamento e a possível recuperação do animal. A replicação deste vírus ocorre no citoplasma da célula hospedeira, os vírions são liberados por brotamento através da membrana celular em locais contendo proteínas do envelope viral, e o mesmo pode sofrer mutações de diferentes tipos (adição, deleção e substituição de nucleotídeos) (MONTEIRO et al., 2010). O CDV ainda pode levar à formação de sincícios e inclusões intracitoplasmáticas acidófilas características. A infecção por este vírus geralmente é citolítica, havendo descrições de infecções persistentes *in vitro*; após a transmissão por contato direto ou aerossóis, a replicação primária ocorre comumente em trato

respiratório; o CDV ainda pode exibir atividades hemaglutinante, hemolítica e de neuraminidase (BEINEKE et al., 2009).

Sob baixa temperatura, o CDV é capaz de manter sua capacidade infectante por longos períodos (algumas semanas), e em temperaturas próximas ao ponto de congelamento, o vírus se torna estável por meses e até anos. Por se caracterizar como um vírus envelopado, o CDV é facilmente inativado por solventes lipídicos, detergentes e desinfetantes, que quebram o envoltório lipídico, expõem o material genético do mesmo, e assim, o inativam. Além disso, o CDV também demonstra sensibilidade ao calor, sendo facilmente inativado à temperatura de 56°C (MONTEIRO et al., 2010).

Em relação às suas características estruturais (Figura 1), o CDV é formado por um nucleocapsídeo, de simetria helicoidal, que contém o genoma viral e consiste da nucleoproteína (NP) e do complexo polimerase, o qual inclui as proteínas P e L. Em seu envelope viral, o CDV 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; e a formação de sincícios (VANDEVELDE; ZURBRIGGEN, 2005). A proteína de ligação pode ainda ser uma proteína hemaglutinina-neuramidase (HN) ou uma proteína sem atividade de neuramidase (G), liga-se a receptores celulares de superfície. Os dois tipos de peplômeros podem induzir à produção de anticorpos neutralizantes dos vírus. Há também uma proteína de membrana (M) não-glicosada associada ao envelope (BEINEKE et al., 2009).

O tropismo celular é determinado pela quebra e ativação destas glicoproteínas que interagem com proteases tissulares específicas, restringindo a fusão para tecidos selecionados. O mecanismo se inicia pelo contato entre o receptor celular e a proteína HA, a qual muda sua conformação e transmite lateralmente um sinal para a proteína F, que vai sofrer a quebra e a ativação (VON MESSLING et al., 2006).

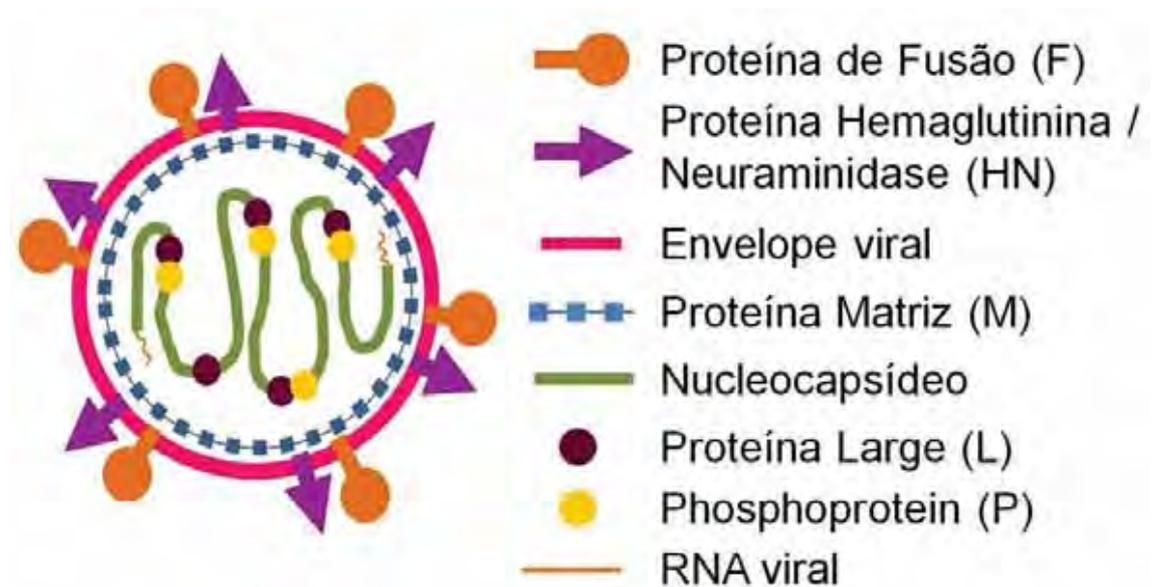


FIGURA 1. Representação esquemática da composição estrutural da partícula viral de CDV.

Apesar de haver descrições de diferentes estirpes de CDV, sabe-se que apenas um sorotipo foi descrito na literatura. Dentre estas estirpes virais distintas, algumas são consideradas levemente virulentas, provocando infecções inaparentes, e outras desencadeando quadros agudos, com o desenvolvimento frequente de encefalites e com altos índices de mortalidade. Além disso, algumas estirpes virais podem se apresentar como viscerotrópicas, o que leva a uma moléstia debilitante, com elevada mortalidade e com baixa frequência de encefalite (GEBARA et al., 2004; MONTEIRO et al., 2010).

3.1. Estirpes virais

É sabido, por meio de análises moleculares, que há uma grande similaridade entre as estirpes de CDV, e que, utilizando-se estudos com anticorpos policlonais, até o momento, há apenas um sorotipo viral (NEGRÃO et al., 2006). Para a identificação e monitoração das diferenças genéticas no vírus, as análises filogenéticas do gene da proteína H (principal glicoproteína do envelope do CDV) são extremamente relevantes e permitem a organização

das estirpes em genótipos (NEGRÃO et al., 2006). 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).

No Brasil, a primeira análise filogenética, baseada na sequencia parcial do gene N do CDV, foi capaz de demonstrar a presença de quatro grupos genéticos principais, demonstrando, parcialmente, que há uma considerável diversidade genética molecular das estirpes circulantes no país (MARTINS et al., 2009). Sabe-se também que, datam do início de 1960, as estirpes disponíveis na grande maioria das vacinas atenuadas utilizadas mundialmente, inclusive no Brasil (NEGRÃO et al., 2006).

Estas diferenças biológicas entre as estirpes de CDV podem resultar na interferência do diagnóstico e da imunoprofilaxia da enfermidade (NEGRÃO et al., 2006). Para evitar que isto ocorra, é necessário o monitoramento constante das características antigênicas e molecular das estirpes circulantes. Falhas vacinais podem ser geradas por uma infinidade de fatores que interferem significativamente na produção de uma resposta eficiente, por isso o controle destes fatores também é importante para a profilaxia adequada (NEGRÃO et al., 2006)

Dentre as estirpes mais utilizadas em todo o mundo para a elaboração de vacinas, podem-se destacar as estirpes *Onderstepoort* e *Rockborn* (NEGRÃO et al., 2006). A estirpe *Snyder Hill* é a mais reprodutível da doença. Esta exibe alta afinidade por células da substância cinzenta de todo encéfalo e capacidade consistente de neuroinvasão. Os cães infectados por via intranasal com *Snyder Hill* apresentam sinais clínicos após 4 dias da infecção. O vírus é encontrado no SNC em nove dias e 50% dos animais acometidos evoluem para doença grave (RUDD et al., 2010). Entretanto é sugerido, por alguns autores, que a invasão do SNC ocorra, na maioria, senão em todos, os casos de infecção, independentemente dos sinais clínicos (MORO et al., 2003).

4. Espectro de possíveis hospedeiros

O espectro de possíveis hospedeiros para cinomose canina é extremamente vasto e inclui numerosas famílias da ordem *Carnivora*. São susceptíveis os membros das famílias Canidae (raposas – *Vulpes vulpes*, lobos-guará – *Chrysocyon brachyurus*, dingos - *Canis dingo*), Felidae (leões – *Panthera leo*, leopardos – *Panthera pardus japonensis*, tigres – *Panthera tigris*, jaguares – *Panthera onca*), Mustelidae (ferrets – *Mustela putorius furo*, texugos – *Meles meles*), Hyaenidae (hienas – *Crocuta crocuta*), Procyonidae (racoons – *Procyon lotor* e *Nyctereutes procyonoides*), Ursidae (urso panda – *Ailuropoda melanoleuca*), Ailuridae (panda vermelho – *Ailurus fulgens*) e Viverridae (civetas – *Paguma larvata*) e Phocidae (focas – *Phoca vitulina*). As ordens Primata (família Cercopithecidae, macacos do velho mundo – *Macaca fuscata*) e Artiodactyla (família Tayassuidae (pecari de colar – *Pecari tajacu*) também podem ser acometidas (GEBARA et al., 2004; BEINEKE et al., 2008).

A infecção, principalmente em carnívoros, está associada a alta incidência de neuroinvasão (até 30% dos cães acometidos), sendo que quase todos os carnívoros silvestres apresentam a infecção em SNC. Em furões, (*Mustela putorius furo*) a enfermidade é invariavelmente fatal (RUDD et al., 2010), e em cães, a leucoencefalite desmielinizante é a principal sequela da doença (GRÖTERS et al., 2005). Surto da doença têm sido relatados em várias espécies de vida silvestre e, em muitos casos, as altas taxas de morbidade e letalidade podem contribuir para a extinção de determinadas espécies de regiões específicas (BEINEKE et al., 2009).

5. Doenças desmielinizantes e a cinomose canina

Dentre os inúmeros aspectos relevantes da cinomose canina, valem ressaltar as semelhanças das alterações neuropatológicas causadas pelo CDV quando comparadas às doenças desmielinizantes humanas (GRÖTERS et al., 2005; BEINEKE et al., 2008). Esta alta correlação entre as alterações do SNC

permite que a leucoencefalite desmielinizante pelo CDV sirva de modelo experimental confiável e espontâneo para diversas doenças humanas, sendo a peça chave para o entendimento da patogênese de enfermidades desmielinizantes, e permitindo assim desvendar os mecanismos moleculares envolvidos e desenvolver possíveis protocolos terapêuticos (MIAO et al., 2003; SEEHUSEN et al., 2007; WYSS-FLUEHMANN et al., 2010). Entretanto, não há evidências definitivas de que haja infecção natural pelo CDV em seres humanos, mesmo já tendo sido descrita infecção experimental assintomática (MARTINS et al., 2009).

A polioencefalite causada pelo vírus do sarampo é um importante exemplo de semelhantes alterações com o CDV, visto que ambos compartilham a capacidade de se propagar célula a célula (RUDD et al., 2010). Outro exemplo extremamente relevante é a esclerose múltipla, doença desmielinizante inflamatória mais importante em humanos, que leva a quadros graves de deficiências cognitivas e que recentemente foi sugerida, a partir de observações epidemiológicas, ter causa infecciosa (VANDEVELDE; ZURBRIGGEN, 2005; WYSS-FLUEHMANN et al., 2010). Alguns trabalhos sugerem que o CDV, muito mais do que apenas desencadear lesões semelhantes às doenças humanas, possa servir de agente promotor de algumas delas, como o caso de algumas doenças neuroendócrinas, a doença de Paget, a esclerose múltipla e a panencefalite esclerosante subaguda (MARTINS et al., 2009).

6. Patogenia da cinomose canina

A cinomose canina refere-se a uma enfermidade de caráter bifásico que desencadearia doença sistêmica e/ou doença neurológica (BEINEKE et al., 2008). A manifestação clínica é extremamente variável e a evolução da fase sistêmica para fase nervosa ocorre geralmente por falha na eliminação do vírus (MORO et al., 2003). A transmissão se dá, principalmente, pelo contato com partículas virais em aerossóis; gotículas contaminadas de secreções respiratórias, fezes,

urina, saliva e transplacentária (MANGIA; PAES, 2008). Quando ocorre a exposição natural (Figura 2), o CDV entra em contato com o epitélio do trato respiratório superior, há a replicação em macrófagos no período de 24 horas, e posterior disseminação para a via linfática, tonsilas e linfonodos brônquicos (VANDEVELDE; ZURBRIGGEN, 2005). Dentro de um período de 4 a 6 dias (Figura 3), a replicação viral ocorre no sistema linfoide, medula óssea, timo, baço, linfonodos mesentéricos, epitélio estomacal, placas de Payer, células de Küpffer e células mononucleares ao redor de vasos pulmonares e bronquiais (TIPOLD et al., 1992). Esta replicação viral maciça desencadeia grave imunossupressão primária, resultado dos danos virais às células linfoides (WÜNSCHMANN et al., 1999).



FIGURA 2. Representação esquemática da patogênese geral da cinomose canina.



FIGURA 3. Representação esquemática da patogenia geral da cinomose canina.

7. Doença sistêmica pela cinomose canina

A doença sistêmica pode, em muitas vezes, ser fatal e está comumente associada com doenças respiratórias e/ou distúrbios gastrintestinais (BEINEKE et al., 2008). A recuperação clínica está associada com a imunidade a longo prazo e a interrupção da replicação viral. Em casos de animais expostos à estirpes virais altamente virulentas, ou a doses infectantes altas, ou ainda à imunossupressão severa, poderá haver o comprometimento da proteção. 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 (GREENE; APPEL, 2006).

Na fase sistêmica da enfermidade, os cães infectados podem apresentar secreções nasais e oculares, que contribuem como fonte de infecção, além de

hiperqueratose de coxins digitais e dermatite pustular (SONNE et al., 2009). Dentre os possíveis achados macroscópicos para esta fase, encontram-se pulmões não colapsados, avermelhados e edemaciados; enterite catarral ou hemorrágica; e atrofia parcial ou completa de timo. À microscopia, é possível observar: pneumonia intersticial; hiperqueratose ortoqueratótica e/ou paraqueratótica de coxins digitais; e severa depleção linfóide. Além disso, corpúsculos de inclusão podem ser observados em epitélios de estômago, pelve renal, bexiga, conjuntiva, coxins digitais (SONNE et al., 2009). Esta distribuição disseminada ocorre fato do CDV possuir alta afinidade por tecidos epiteliais e se disseminar em cerca de 10 dias pós-infecção, a partir dos sítios primários de replicação (BREGANO et al., 2010).

8. Neuroinvasão pelo CDV

A respeito da capacidade de neuroinvasão do CDV, não há entendimento exato do mecanismo pelo qual o vírus penetra e se dispersa pelo tecido nervoso (BEINEKE et al., 2008). Sabe-se que ocorre a disseminação pelos tecidos do SNC no período de 8 a 10 dias pós-infecção (Figura 4). Para que isto ocorra, é necessário que haja a desestabilização da barreira hematoencefálica (BHE) pela degradação da membrana basal e perda das junções celulares (VANDEVELDE; ZURBRIGGEN, 2005). A BHE é caracterizada como um dispositivo 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). O primeiro relato a respeito da permeabilidade seletiva diferenciada dos capilares do SNC data do início deste século e foi realizado a partir da inoculação do corante azul-de-tripán em um animal 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 (MACHADO, 2002; CUNNINGHAM, 1999).

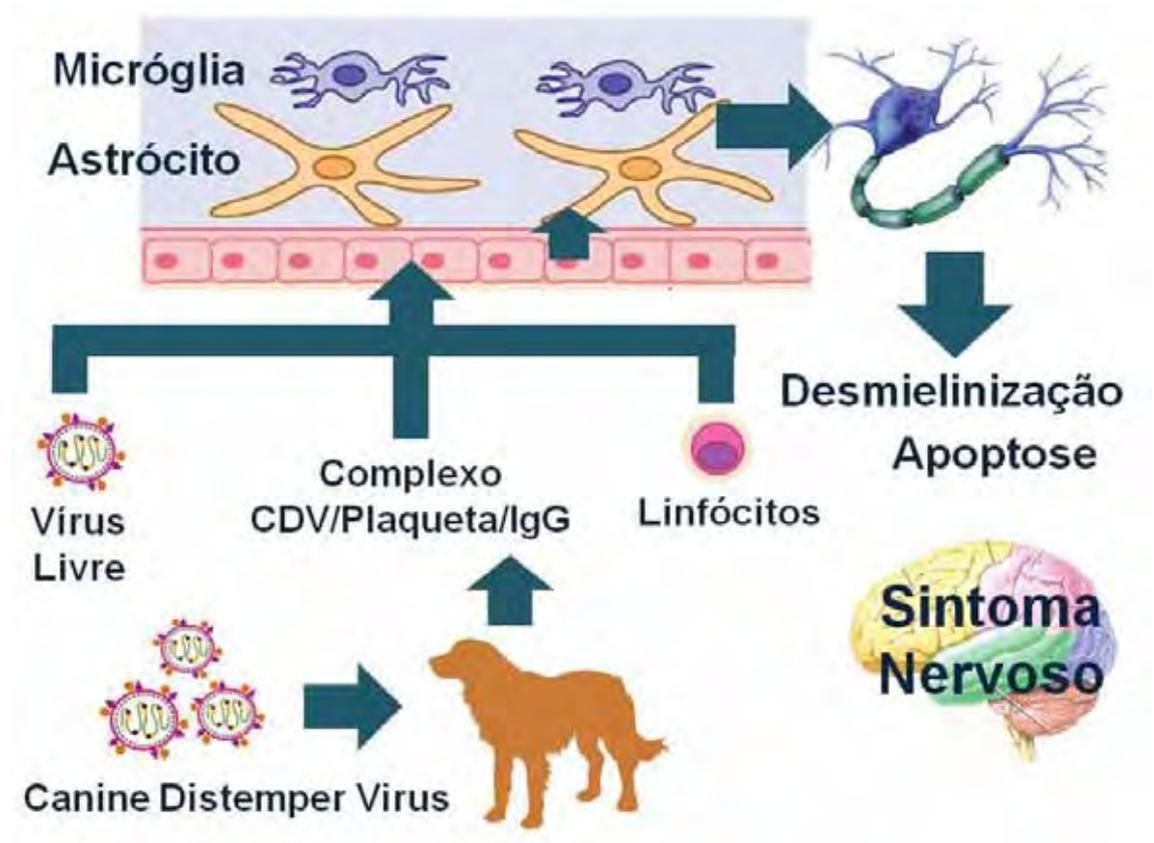


FIGURA 4. Representação esquemática da invasão do SNC em cães acometidos pelo CDV.

8.1. Barreira hematoencefálica

Dentre as diversas importâncias desta barreira, a regulação da passagem de substâncias, como medicamentos, toxinas, bilirrubinas e neurotransmissores, constitui um mecanismo de proteção do encéfalo, evitando lesões no mesmo ou alterações do seu funcionamento (GUYTON; HALL, 2006; MACHADO, 2002). A capacidade de seletividade da BHE é considerada mais qualitativa do que quantitativa. Entretanto, sabe-se que nem sempre há o impedimento completo desta passagem, apenas uma dificuldade maior da mesma; que a permeabilidade não é a mesma em todas as áreas do tecido nervoso; e que a eficiência desta barreira também está correlacionada com a faixa etária do animal, sendo mais fraca durante o desenvolvimento fetal e em

recém-nascidos (GUYTON, HALL, 2006; MACHADO, 2002). Deve-se destacar que, na região do hipotálamo, a permeabilidade da BHE aparentemente não é eficaz, o que pode estar atribuída à relação estreita entre o hipotálamo e a circulação sistêmica, sendo o mesmo responsável por controlar a osmolaridade do sangue, níveis de glicose a parâmetros críticos, e por monitorar os níveis de alguns solutos circulantes (CUNNINGHAM, 1999).

É possível se estabelecer genericamente um escore de permeabilidade da BHE, atribuindo-se um alto grau de permeabilidade a substâncias, como água, dióxido de carbono, oxigênio e a maioria das substâncias lipossolúveis; a eletrólitos como sódio, cloreto e potássio, um baixo grau e, para a maioria das grandes moléculas orgânicas não-lipossolúveis, acredita-se serem quase totalmente impermeáveis (GUYTON; HALL, 2006). Além disso, para o transporte de hormônios, a barreira hematoencefálica conta com moléculas transportadoras específicas que se ligam a receptores também específicos (GUYTON; HALL, 2006). A glicose penetra facilmente por mecanismos específicos mediados por carreadores, que são moléculas proteicas especializadas embebidas nas membranas celulares das células endoteliais (CUNNINGHAM, 1999).

Diversos estudos têm sido realizados na tentativa de elucidar a localização e caracterização anatômica da BHE. Sabe-se que principalmente dois elementos do SNC estão envolvidos na sua constituição, o neuropilo e o capilar cerebral (Figura 5). Neurópilo refere-se ao espaço entre os vasos, os corpos de neurônios e as células neurogliais; preenchido por prolongamentos de neurônios e células neurogliais; com espaço intercelular pequeno; e com quantidade de substância intercelular menor que nos demais sistemas. Por apresentar esta estrutura predominantemente celular, atribui-se ao neuropilo ser a base anatômica da BHE e dificultar a passagem de substâncias provenientes dos capilares (MACHADO, 2002).

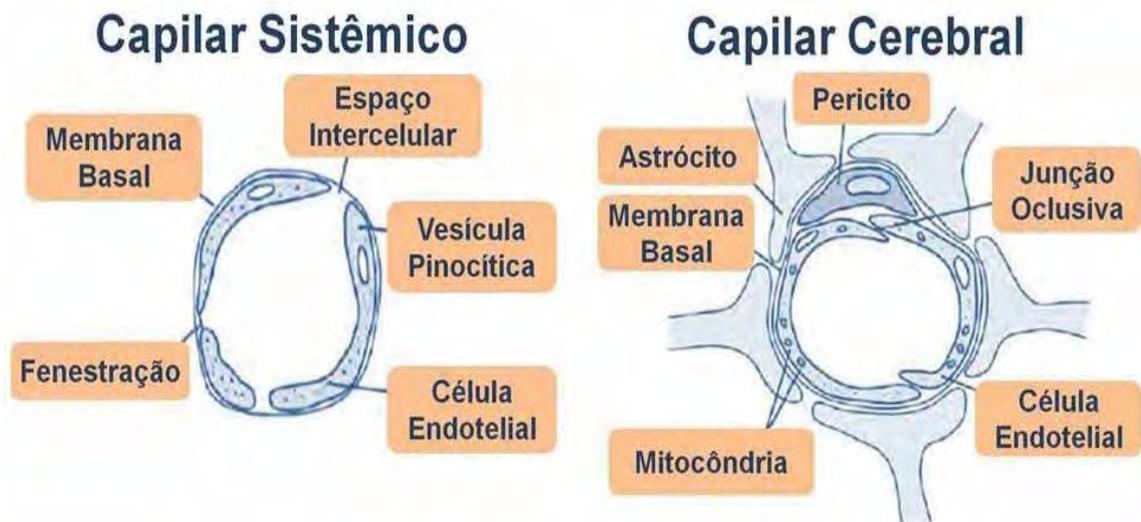


FIGURA 5. Representação esquemática comparativa entre capilar sistêmico e capilar cerebral, constituinte da barreira hematoencefálica.

A maioria dos autores acredita que a principal explicação para a seletividade da barreira está associada ao capilar cerebral. Este tem um grande número de mitocôndrias e é constituído de três elementos principais: o endotélio, a membrana basal e o astrócito. O astrócito contribui na formação de uma camada quase completa de células gliais em forma de podócitos terminais e em torno do capilar, e a membrana basal apresenta-se como uma fina película que reveste o endotélio (CUNNINGHAM, 1999; MACHADO, 2002). O endotélio é apontado, por uma série de pesquisas, como o principal elemento, e apresenta características básicas que o diferencia dos demais capilares. Dentre elas, destacam-se a falta de contratilidade de suas células, pois estas não possuem filamentos que, quando na presença de histamina, se contraem, separam suas células e tornam o capilar permeável; o fato das células endoteliais, ao contrário dos demais capilares, serem unidas por junções íntimas e estreitas, que dificultam a penetração de macromoléculas e as tornam justapostas; e, por fim, a característica de não possuírem fenestrações e vesículas pinocíticas, que nos demais capilares contribuem para o transporte de substâncias. Ainda a BHE também é constituída de pericitos, células que possuem potencial de diferenciação e que são responsáveis pela produção da

membrana basal, reparo após lesões e regulação do tônus capilar, contribuindo também para a eficiência da seletividade da barreira (CUNNINGHAM, 1999; GUYTON; HALL, 2006; MACHADO, 2002).

Esta seletividade é realizada quando, ao tentar atravessar a BHE, a substância em questão utiliza-se de proteínas transmembranas (claudinas, moléculas de adesão juncional, ocludinas) das células (BEINEKE et al., 2009). Quando em um processo inflamatório, a produção e expressão de citocinas, moléculas de adesão, serina, proteases, óxido nítrico, derivados do ácido aracdônico e matriz metaloproteinases são responsáveis pelo afrouxamento das junções ocludentes da BHE, tornando-a menos seletiva. Com isto, há a possibilidade da passagem de quaisquer elementos sanguíneos e substâncias nocivas ao SNC (WEBB; MUIR, 2000).

8.2. Matriz metaloproteinase

A estabilidade da BHE pode ser alterada por diversos processos patológicos, soluções hipertônicas, traumatismos e infecções, que levam a ruptura parcial ou completa da mesma (MACHADO, 2002). A matriz extracelular (ME), componentes da BHE, desempenha um importante papel complexo na manutenção e função do SNC (GRÖTERS et al., 2005). Os dois principais sistemas que modificam a ME no SNC são o sistema de matriz metaloproteinases (MMPs) e os ativadores de plasminogênio (PAs) (MIAO et al., 2003; GRÖTERS et al., 2005).

MMPs representam uma família de enzimas neutras (endopeptidases) dependentes de zinco, com pelo menos 25 MMPs distintas. Possuem diversas importantes funções como participação no processo de embriogênese, reparo de feridas, inflamação, artrite e neoplasias. No SNC, estas enzimas podem atuar na remodelação de tecidos durante o seu desenvolvimento e a capacidade de modular a neuroinflamação. Além disso, são capazes de desestabilizar a BHE por clivagem dos componentes da ME, favorecendo a migração de células inflamatórias para o interior do SNC, desencadeando a

liberação de TNF- α e desintegrando a bainha de mielina (GRÖTERS et al., 2005; MIAO et al., 2003). Estas atividades tornam-se possíveis pelo fato de que as MMPs são responsáveis pela hidrólise dos componentes da ME e pelo controle dos sinais suscitados por suas moléculas, permitindo, assim, a regulação da sua diferenciação, proliferação e morte celular (BEINEKE et al., 2009).

As MMPs são classificadas de acordo com a especificidade ao substrato a ser degradado, e são divididas em quatro classes principais (Tabela 1). Além disso, a MMP-12, também chamada de metaloelastase, e a MMP-19 não pertencem a qualquer grupo específico (MIAO et al., 2003; GRÖTERS et al., 2005). Com relação à sua organização estrutural, as MMPs, em geral, são constituídas de três elementos: um pró-peptídeo amino-terminal; um domínio catalítico; e um domínio “hemopexin-like” que se localiza na extremidade carboxi-terminal. Assim, o N-terminal mantém as MMPs inativas sob forma de zimogênios (próMMP-2 (72 kDa) e próMMP-9 (92 kDa)) (Figura 6), pois contém cisteína que funciona como quelante dos íons de zinco do centro catalítico. Quando ocorre a quebra da cisteína, haverá a ativação intermediária das MMPs. Para a ativação completa das enzimas, é necessário que ocorra a clivagem autocatalítica do pró-peptídeo do núcleo da proteína. Sabe-se que, uma vez ativada por completo, as MMPs perdem peso molecular (MMP-2 (66 kDa), MMP-9 (86 kDa)) (ROSEMBERG, 2002).

Tabela 1. Descrição das principais classes de MMPs e seus constituintes.

Classes	MMPs
Gelatinases	Gelatinase A – MMP-2 Gelatinase B – MMP-9
Colagenases	MMPs -1, -8, -3 e -18
Estromelisinases	MMPs -13, -10 e -11
Matrilisinases	MMPs -7 e -26
Tipo membrana (MT-MMPs)	MMPs -14, -15, -16, -17, -24 e -25

A maioria destas MMPs é expressa em nível baixo ou até mesmo indetectável no SNC na maioria das espécies, e podem ter seus níveis alterados quando estimuladas por citocinas, eicosanoides, fatores de crescimento e componentes de patógenos infecciosos. Em processos patológicos do SNC, podem se destacar, como fontes celulares de MMPs, infiltrados linfocíticos, macrófagos e células intrínsecas do SNC, como é o caso da micróglia, astrócitos, células ependimárias, oligodendrócitos, neurônios, além de células endoteliais (GRÖTERS et al., 2005). Porém, sabe-se que, para cada tipo de célula envolvida, o tipo de MMP e o estímulo que a induz são diferentes (ROSEMBERG, 2002). As células endoteliais possuem principalmente MMP-9, mas esta enzima também pode ser produzida por pericitos e está estreitamente relacionada a processos inflamatórios. A MMP-2 é encontrada predominantemente em podócitos terminais de astrócitos (que recobrem as células endoteliais), e é considerada uma MMP constitutiva (CANDELARIO JALIL et al., 2009).

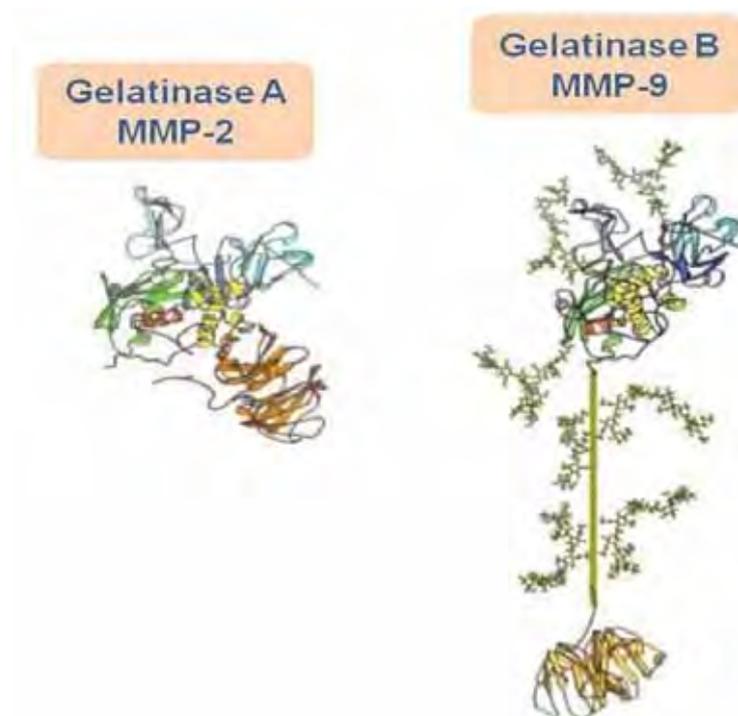


FIGURA 6. Representação esquemática comparativa entre as constituições estruturais da Gelatinase A (MMP-2) e Gelatinase B (MMP-9).

Em virtude da importância de sua ação, a atividade das MMPs deve ser intensamente controlada, visto que, se houver uma proteólise alterada, o desenvolvimento pode ser afetado ou pode ocorrer uma excessiva degradação dos componentes da ME, como no caso das condições patológicas (ROSEMBERG, 2002). O controle da atividade destas enzimas geralmente é realizado em diferentes níveis:

- I. Regulação em nível transcricional, onde as MMPs somente serão transcritas posterior à ativação celular, não sendo consideradas constitutivas. Esta ativação dá se, principalmente, pela ação de interações entre a ME e a célula, ou célula a célula; citocinas; estresse oxidativo; fatores de crescimento e neuro-hormônios (YOUNG et al., 2001).
- II. Regulação por ativação dos zimogênios. Nesta, a regulação ocorre com a quebra do resíduo de cisteína, que se liga ao íon zinco presente no sítio catalítico, promovendo a ruptura da ligação cisteína/zinco e permitindo a ativação pela remoção do domínio pró-peptídeo. Neste caso, a ativação ocorre pela ação de radicais livres, plasmina e proteinases (do tecido, do plasma e oportunistas) (ROSEMBERG, 2002).
- III. Regulação pela interação de MMPs ativas e inibidores teciduais de MMPs (TIMPs). Estes inibidores possuem a capacidade de inativar as enzimas se ligando ao sítio catalítico (Tabela 2) (YOUNG et al., 2001).

Tabela 2. Descrição dos principais inibidores de MMPs.

Principais TIMPs	Características
TIMP-1	Molécula de 28 kDa Capacidade de ligação à MMP-9
TIMP-2	Molécula de 21 kDa Capacidade de ligação à MMP-2 Em baixas concentrações, facilita a sua ativação; e em altas concentrações, poder inibitório
TIMP-3	Molécula de 24 kDa Afeta a ativação da MMP-2 por meio da redução da ativação de MT1-MMP (CANDELARIO-JALIL et al., 2009)

Para que haja o rompimento satisfatório da BHE, é necessário que as MMPs degradem os componentes da lâmina basal das células endoteliais, permitindo que ocorra, então, a abertura das junções ocludentes, o que permite a passagem de patógenos, células de defesa e componentes tóxicos ao SNC. Para isto, pode se destacar a ação do grupo gelatinase (MMP-2 e MMP-9) que consegue interagir eficientemente com macromoléculas da lâmina basal (heparan-sulfato, laminina, fibronectina, colágeno tipo IV) por possuir, em suas estruturas, regiões de ligação com a fibronectina (ROSEMBERG, 2002).

No caso de doenças desmielinizantes humanas, como a esclerose múltipla, acredita-se que as MMPs desempenham um papel essencial no desencadeamento da doença, visto que possuem a capacidade de romper a BHE, favorecer a migração de células inflamatórias para o interior do SNC, desencadear a liberação de citocinas pró-inflamatórias, e de promover a desmielinização pela degradação direta da bainha de mielina pela clivagem da sua proteína básica (GRÖTERS et al., 2005). Nesta enfermidade, foi observado um aumento de MMP-9 em leucócitos e elevados níveis de MMP-9 no soro, o

que facilitaria a transferência de leucócitos para o interior do SNC e favoreceria a liberação de MMPs por astrócitos e pericitos (ROSEMBERG, 2002).

Em infecções pelo vírus do Nilo Ocidental, estudos apontaram a capacidade da MMP-9 de facilitar a sua neuroinvasão pelo aumento da permeabilidade da BHE (WANG et al., 2008). Outros trabalhos também associam a produção de MMPs e a lesão da BHE, como o caso de modelos experimentais de meningite bacteriana (LEIB et al., 2000), e infecção do SNC por morbilivírus (KHUTH et al., 2001). Em cães, o aumento de MMP-2 e MMP-9 tem sido relatado em várias desordens neurológicas, como em injúrias traumáticas (LEVINE et al., 2006) e neoplasias de SNC (TURBA et al., 2007). É sabido também que a MMP-2 pode ser detectável no líquido de cães clinicamente saudáveis, o que não ocorre com a MMP-9 (BEINEKE et al., 2009).

9. Neuropatogenia da cinomose

Com a desestabilização efetiva da BHE, o CDV livre, ou associado à plaquetas, ou linfócitos, penetra nas células endoteliais vasculares das meninges, células do plexo coroide do quarto ventrículo e células endodimárias lineares do sistema ventricular (GREENE; APPEL, 2006) e, assim, causa lesões principalmente em cerebelo e substância branca da medula espinhal (Figura 7). As lesões são classificadas de acordo com esta aparência morfológica, estando provavelmente relacionadas com o tempo de evolução da lesão, e possuem grande variedade de aparência morfológica, o que dificulta a padronização das mesmas (SEEHUNSEN et al., 2007).

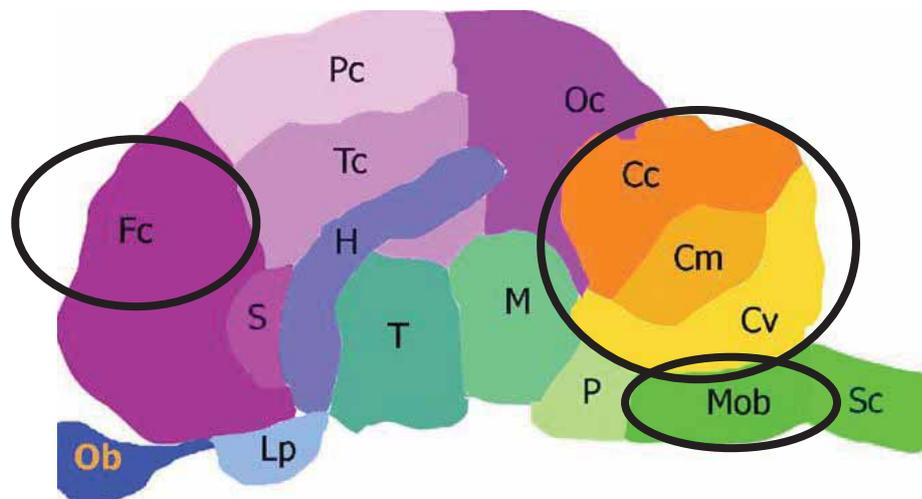


FIGURA 7. Representação esquemática das principais regiões do SNC de cães acometidos pelo CDV, evidenciando cerebelo (Cc, Cm, Cv); córtex frontal (Fc); ponte (P) e medula oblonga (Mob).

As lesões iniciais causadas pelo CDV em SNC são caracterizadas por um aumento da regulação do complexo de histocompatibilidade principal de classe II (MHC II) e por uma alta expressão de proteínas virais (GRÖTERS et al., 2005). Normalmente, as primeiras alterações observadas são degenerativas, e pouca, ou nenhuma, inflamação tem sido relatada nestas lesões (MORO et al., 2003), o que se deve ao fato de que os animais nesta fase apresentam leucopenia severa e imunossupressão generalizada, associadas à infecção pelo CDV (RUDD et al., 2010). Nas lesões agudas, a replicação viral ocorre predominantemente em astrócitos e está associada à produção de fator de necrose tumoral alfa (TNF- α), o que coincide com o início da desmielinização. Portanto, acredita-se que a desmielinização é mediada não apenas pela presença do vírus, mas também pela produção local de TNF- α , enquanto que a progressão da lesão parece ser um processo imunopatológico (SEEHUSEN et al., 2007).

No processo agudo da cinomose, há um marcante envolvimento de oligodendrócitos sugerido pela regulação negativa da transcrição de genes da mielina; a inibição da atividade enzimática específica nos oligodendrócitos, a

degeneração de oligodendrócitos, e a redução da população destas células (MORO et al., 2003). Pode-se associar, também, ao início do processo de desmielinização e a redução da população de oligodendrócitos, um suporte mediado por citocinas como o TNF- α (MIAO et al., 2003).

O mecanismo imunológico e inflamatório estabelecido em fases posteriores está associado à tentativa de eliminação do vírus do SNC (MORO et al., 2003). Entretanto, mesmo a depuração viral sendo eficaz em lesões inflamatórias, o vírus tem a capacidade de se disseminar para outras áreas do SNC, desencadeando novas lesões. Pode-se afirmar, portanto, que a persistência viral é a força motriz para a progressão das lesões pelo CDV (WYSS-FLUEHMANN et al., 2010). Lesões desmielinizantes crônicas apresentam uma manifestação menos frequente, com incidência natural baixa, o que dificulta o entendimento da patogênese e a precisão da relação CDV-hospedeiro, em virtude da escassez de estudos de casos espontâneos na literatura veterinária (HEADLEY et al., 2009). Sabe-se que nesta fase as lesões são caracterizadas pela redução ou perda de proteínas virais e mRNA, que apresentam uma alta regulação de MHC II, e uma infiltração maciça de linfócitos B e subpopulações de linfócitos T CD4+ e CD8+ (MIAO et al., 2003; GRÖTERS et al., 2005).

9.1. Desmielinização na cinomose canina

O entendimento do mecanismo da desmielinização é imprescindível para se compreender o acometimento clínico do animal infectado e para se orientar a conduta terapêutica ideal. Este mecanismo foi objeto de vários estudos que buscam esclarecer a relação entre o CDV e a destruição da mielina (MORO et al., 2003). A desmielinização é um processo bifásico (SEEHUSEN et al., 2007), e seu início é atribuído a uma ação direta do vírus. A progressão da lesão acredita-se ser um processo imunopatológico (GRÖTERS et al., 2005). Além disso, diversos fatores contribuem para a lesão adicional da mielina como a persistência viral, as reações imunológicas associadas, a indução da citólise

neuronal e a apoptose (MORO et al., 2003). A apoptose age como uma resposta inata celular à infecção com o objetivo de limitar a maquinaria celular disponível na tentativa de prejudicar a replicação viral. Há duas principais vias de apoptose: a morte mediada por receptor externo e sinalizada por uma via extrínseca; e a morte mediada pela mitocôndria e sinalizada pela via intrínseca (BREGANO et al., 2010). Os astrócitos são os principais alvos do CDV no SNC e a infecção destas células desempenha um importante papel no mecanismo de desmielinização (MORO et al., 2003). Nos focos de desmielinização da substância branca, geralmente são observados hipertrofia astrocitária, sincícios astrocíticos, gemistocíticos reativos e gliose isomórfica (SEEHUSEN et al., 2007).

As citocinas são mediadores essenciais na comunicação das células, estão envolvidas nos processos de inflamação, e desempenham papel na progressão da doença (BEINEKE et al., 2008). O papel das citocinas na patogênese das perturbações neurológicas por CDV ainda é pouco esclarecido, não se determinando ser benéfico ou prejudicial para as células do SNC. Os estudos que buscam entender esta patogênese são realizados em sangue periférico, líquido cefalorraquidiano (LCR) e SNC. Além disso, pesquisas que estudam doenças neurológicas humanas, como a esclerose múltipla, a panencefalite esclerosante subaguda e a síndrome da imunodeficiência adquirida também buscam compreender o papel destas moléculas no desenvolvimento de suas lesões (BEINEKE et al., 2008). No LCR, a detecção de diferentes citocinas em animais com lesões crônicas induzidas pelo CDV indicam que a resposta imune local exacerbada pode contribuir para a progressão da doença (RUDD et al., 2010). Em sangue periférico, estudo recente demonstrou que a falta de citocinas pode estar associada à depleção de células que produzem estas moléculas ou a uma baixa regulação induzida pelo vírus associada aos leucócitos infectados. Istose associa à viremia do CDV e com o efeito direto induzido pelo vírus, que prejudica a reação imunológica em fase mais precoce da enfermidade (WÜNSCHMANN et al., 2000).

9.1.1. Desmielinização aguda

O acometimento agudo do SNC pelo CDV ocorre mais frequentemente em cães jovens e geralmente é acompanhado de sinais clínicos sistêmicos (BEINEKE et al., 2009). As alterações iniciais, na grande maioria, são de caráter degenerativo, e se apresentam como uma encefalite desmielinizante multifocal aguda, grave e com necrose da substância branca (GEBARA et al., 2004). Com a evolução das lesões, um componente inflamatório pode ser adquirido (MORO et al., 2003). Dentre os principais sítios de predileção do CDV nesta fase, destacam-se os pedúnculos cerebelares, véu medular anterior, tratos ópticos, fórnix do hipocampo, assoalho do quarto ventrículo, substância branca da medula espinhal (MORO et al., 2003).

A desmielinização aguda é atribuída, por diversos autores, à replicação do CDV em células gliais, sendo os astrócitos as principais células acometidas (SEEHUNSEN et al., 2007). Além disso, deve se destacar a participação dos astrócitos nesta fase da doença, em virtude de que estas células, tanto nas lesões agudas quanto nas lesões subagudas não inflamatórias, possuem a capacidade de produzir fator de necrose tumoral alfa (TNF- α). Esta característica pode indicar que o acometimento neuronal e a quebra da bainha de mielina não são apenas associados à replicação viral (vírus-mediado), mas também como resultado da produção local de TNF- α (SEEHUNSEN et al., 2007). Alguns autores associam a ação direta do CDV sobre neurônios e células da neuroglia como promotor de degeneração de oligodendrócitos, agindo nestas células como efeito secundário (VANDEVELDE; ZURBRIGGEN, 2005).

O envolvimento de oligodendrócitos no processo de desmielinização da cinomose aguda é sugerido por observações como a aparente redução da população deste tipo celular nas áreas de maior acometimento da desmielinização; a inibição da atividade enzimática específica destas células; a

degeneração de oligodendrócitos; e a regulação negativa da transcrição do gene de mielina (MORO et al., 2003).

Apesar de terem sido identificados linfócitos T e B em amostras de SNC de cães durante a fase inicial de desmielinização, esta fase aguda parece não apresentar uma natureza imunomediada, em virtude de tais células não terem sido encontradas em quantidade suficiente para induzir lesões desmielinizantes. Atribuindo-se, então, principalmente as lesões nesta fase como resultado da replicação viral e da liberação de TNF- α (WUNSCHMANN et al., 1999).

9.1.2. Desmielinização crônica

No caso da desmielinização crônica, normalmente as lesões são encontradas em animais com idade superior a 12 meses, e se apresentam como uma encefalite multifocal de caráter crônico e grave, com intensa desmielinização, e geralmente associada a corpúsculo eosinofílicos intracitoplasmáticos em astrócitos (BEINEKE et al., 2008). Os animais acometidos normalmente apresentam aumento no título de anticorpos anti CDV, e não há a manifestação frequente da doença sistêmica (HEADLEY; GRAÇA, 2000; GEBARA et al, 2004). Diversos autores apontam que, neste tipo de desmielinização, há uma ação considerável de células e elementos do sistema imune, e que esta possa ser a principal causa da desmielinização crônica (BEINEKE et al., 2009).

O processo inflamatório presente nas áreas de desmielinização, que se instala com a progressão da doença, induz a fase crônica da cinomose. Este fenômeno inflamatório está correlacionado com a tentativa de eliminação do CDV do SNC (VANDEVELDE; ZURBRIGGEN, 2005), e associa-se também à restrição da expressão de proteínas de superfície do CDV (proteína de fusão e da matriz, hemaglutinina) (ALLDINGER et al, 1993). Sabe-se, então, que nesta fase, as proteínas virais mais expressas são as proteínas centrais do CDV, como a nucleoproteína (MORO et al., 2003). Este comportamento viral contribui

para a resposta imune anti-viral, também conhecida como mecanismo “*bystander*”, para a progressão da doença crônica e para a persistência do vírus (MORO et al., 2003). Esta última contribui para a manutenção da lesão, em virtude de provocar uma injúria imune associada, e colaborando para o aumento da destruição da mielina (VANDEVELDE; ZURBRIGGEN, 2005).

Além disso, o quadro inflamatório instalado provoca o aumento da intensidade da lesão, pela ação danosa de fatores liberados por macrófagos, como o caso dos radicais reativos do oxigênio (BEINEKE et al., 2009). A citotoxicidade celular, que se direciona às células infectadas pelo CDV, também contribui para o agravamento da lesão (MORO et al., 2003). Deve-se destacar que a atividade macrofágica é, neste momento, uma das principais causas de desmielinização do SNC (BEINEKE et al., 2009). Além dos macrófagos, linfócitos B e T também são detectados na fase crônica de desmielinização, principalmente em locais onde ocorre a replicação viral (TIPOLD et al., 1992; WUNSCHMANN et al., 1999). Estas células também são responsáveis pela liberação de fatores que levam, como efeito final, à degradação da mielina. O TNF- α e o IFN- γ , liberados durante o processo inflamatório, são exemplos de fatores lesivos aos oligodendrócitos e que contribuem para a vacuolização da mielina e apoptose destas células (BEINEKE et al., 2009).

9.2. Células envolvidas no processo desmielinizante

Sabe-se que diversos tipos celulares presentes no SNC participam do processo desmielinizante e são acometidos pelo CDV (ALLDINGER et al., 1993; VANDEVELDE; ZURBRIGGEN, 2005). Recentemente, células denominadas *aldynoglia*, altamente especializadas da macroglia e que pertencem ao grupo de células gliais promotoras do crescimento, foram descritas como susceptíveis a replicação do CDV (BAUMGÄRTNER; ALLDINGER, 2005).

9.2.1. Infecção de oligodendrócitos

Os oligodendrócitos são considerados células extremamente sensíveis a alguns dos elementos do sistema imune e, em virtude disso, têm uma maior probabilidade de morte, superior a de neurônios, pela ação destes elementos. Ainda são escassos e controversos os resultados sobre o papel da infecção do CDV em oligodendrócitos, sendo um processo ainda pouco compreendido e que, aparentemente, depende do estágio de diferenciação celular no momento da infecção (ALLDINGER et al., 1993). Alguns autores citam que a infecção oligodendrogial direta pelo CDV é um evento raro ou não observado em quaisquer das duas formas de desmielinização (BEINEKE et al., 2009). Há relatos de que, apesar de nucleocapsídeos virais terem sido encontrados nestas células durante a infecção pelo CDV, partículas virais completas ainda não foram identificadas, podendo se demonstrar uma infecção restrita de oligodendrócitos (VANDEVELDE; ZURBRIGGEN, 2005).

Com isso, apesar destas células não apresentarem sinais de replicação viral, sabe-se que possuem uma considerável importância no processo de desmielinização. Cita-se, então, que haja a possibilidade da participação dos oligodendrócitos não ser causada por uma ação direta do vírus, e sim pela interação com outros mediadores (ORSINI et al., 2007). É sabido que há uma relação importante entre oligodendrócitos e astrócitos, por estes últimos terem um efeito positivo na sobrevivência tanto de oligodendrócitos quanto de neurônios (MORO et al., 2003). Portanto se houver morte considerável de astrócitos infectados, é possível que haja uma produção insuficiente de fatores nutritivos e tróficos requeridos pelos oligodendrócitos, e uma carência de fatores de estimulam a manutenção mielínica, podendo, assim, influenciar na desmielinização (MORO et al., 2003).

Semelhante aos dados encontrados no estudo da infecção de oligodendrócitos, a infecção de neurônios parece ser restrita. Da mesma forma, a doenças desmielinizantes, como a panencefalite esclerosante subaguda, a quantidade de proteínas virais detectadas nestas células é extremamente

reduzida, o que indicaria fraca participação direta das mesmas no processo (BEINEKE et al., 2009).

9.2.2. Infecção astrocítica

Os astrócitos são células que participam da macroglia e desempenham diversas funções imunológicas no interior do SNC, destacando-se a fagocitose, a apresentação de antígenos, e a liberação de fatores tóxicos e de citocinas (pró e anti-inflamatórias) (ALLDINGER et al., 1993). Como principais citocinas pró-inflamatórias podem ser citadas a IL-1, IL-6, TNF- α e IFN- γ ; dentre as citocinas antiinflamatórias mais relevantes, destacam-se a prostaglandina E e TGF- β . Além disso, os astrócitos também são responsáveis pela expressão de moléculas MHC de classes I e II (MIAO et al., 2003). A manutenção da homeostasia no interior do SNC também é uma das funções relevantes dos astrócitos, que participam da regulação da osmolaridade, da concentração iônica e do pH (VANDEVELDE; ZURBRIGGEN et al., 2005).

Como descrito anteriormente, a indução e manutenção da BHE também é realizada pelos astrócitos que produzem e secretam proteínas da matriz extracelular, promovem a síntese de molecular de adesão, além de fatores neutróficos (VANDEVELDE; ZURBRIGGEN, 2005). Estas células respondem prontamente a uma ampla variedade de estímulos agressores ao SNC, podendo ser sugerido que estas servem como mediadores dos processos de desmielinização (BEINEKE et al., 2009). Por isto, é imprescindível o estudo do comportamento de astrócitos em lesões desmielinizantes do SNC, buscando avaliar a interferência das funções destas células na mediação do processo inflamatório instalado na desmielinização (ORSINI et al., 2007).

A comunicação entre elementos do sistema imune e os astrócitos é indicativa de que estas células participam ativamente do processo inflamatório (GREENE; APPEL, 2006). Quando há reatividade astrocitária, a mesma pode ser manifestada pela proliferação (astrocitose) e hipertrofia (astrogliose) (BEINEKE et al., 2009). Além disso, muitos estudos avaliam a atividade de

astrócitos pela mensuração da quantidade de filamentos intermediários e suas proteínas constituintes contidas no citoplasma celular, como o caso da proteína glial fibrilar ácida (GFAP) e a vimentina (VIM) (ORSINI et al., 2007).

Em relação à infecção pelo CDV, sabe-se que os astrócitos são a principal população de células acometida, sendo que, em lesões não inflamatórias, esta população pode representar cerca de 95% das células infectadas (MORO et al., 2003). Alguns trabalhos afirmam que a incapacidade de algumas estirpes de CDV em produzir lesões desmielinizantes e persistir no SNC está correlacionada ao fato destas infectarem fracamente astrócitos (MORO et al., 2003).

10. Síndromes neurológicas associadas à cinomose canina

Os sinais neurológicos apresentados pelos animais infectados variam consideravelmente e são extremamente dependentes da região do SNC comprometida (GEBARA et al., 2004). Estes sinais neurológicos podem vir, em alguns casos, precedidos da infecção sistêmica (MORO et al., 2003). São descritas cinco formas clínicas principais de encefalite nestes animais:

1. Encefalite em Cães Jovens, de caráter grave e agudo, geralmente com sinais clínicos sistêmicos e neurológicos simultâneos;
2. Encefalite em Cães Adultos, de curso crônico e que normalmente não é acompanhada de transtornos sistêmicos;
3. Encefalite do Cão Velho;
4. Encefalite Recidivante Crônica, de ocorrência esporádica;
5. Encefalite Pós Vacinal (GEBARA et al., 2004).

Todas as síndromes clínicas associadas à cinomose em cães estão diretamente relacionadas à idade do animal afetado e à estirpe viral (HEADLEY et al., 2009). O desenvolvimento dos sinais pode ser rápido e evolui de tremores e andar em círculo a convulsões e paralisia em até 12 dias. A morte do animal pode ocorrer, em virtude do agravamento do quadro, dentro de 2 a 3 semanas após a infecção (RUDD et al., 2010). Em virtude das lesões serem

multifocais e mais evidentes do que o indicado pelo exame clínico, a correlação entre a desmielinização e a intensidade do distúrbio neurológico é falha (MORO et al., 2003). É possível estabelecer, entretanto, uma correlação entre a área acometida e o sinal apresentado, como sinais vestibulares de ataxia e nistagmo, sinais cerebelares de tremores e hipermetria, pela realização de exame clínico neurológico específico (GEBARA et al., 2004). Os sinais neurológicos mais evidentes, independente da fase de evolução e da localização das lesões, são apatia, estupor, distúrbios de comportamento, convulsões, ataxia, paraplegia, tetraparesia, tetraplegia, disfunção de propriocepção e nervos cranianos, atrofia muscular, hiperestesia, mioclonia, déficits ou reflexos anormais em coluna, incontinência urinária. O CDV é provavelmente a causa infecciosa mais comum de crises epiléticas em cães, e estas crises podem aparecer sem qualquer doença clínica visível ou se apresentar muito tempo após a resolução da doença clínica (BEINEKE et al., 2008). Vale destacar que nenhum dos sinais apresentados pode ser considerado patognomônico para a doença (MORO et al., 2003; BEINEKE et al., 2008).

11. Diagnóstico

O diagnóstico da cinomose canina é complexo e de difícil realização, sendo geralmente orientado pelos sinais clínicos do animal. Uma doença febril e catarral com síndrome neurológica associada em cães jovens é altamente sugestiva de cinomose canina (GEBARA et al., 2004). Entretanto, o diagnóstico clínico não pode ser considerado conclusivo e definitivo, fazendo-se necessária a utilização de exame complementar que deve se basear em diferentes técnicas laboratoriais como o isolamento viral, hibridização *in situ*, reação em cadeia da polimerase precedida de transcrição reversa (RT-PCR) e a imunistoquímica (SONNE et al., 2009). A identificação de corpúsculos de inclusão intracitoplasmáticos e intranucleares associada a exsudato, células epiteliais e neutrófilos favorece o estabelecimento do diagnóstico, porém a

ausência dos mesmos não exclui a infecção pelo CDV (GEBARA et al., 2004). A utilização de técnicas sorológicas tem valor diagnóstico limitado, visto que os animais que morrem por cinomose podem ou não apresentar títulos mensuráveis de anticorpos; e que a prática da vacinação, e consequente produção de anticorpos, pode tornar estes métodos menos confiáveis (GEBARA et al., 2004). O teste de anticorpo fluorescente indireto para o vírus da cinomose pode ser positivo em 60% a 82% dos cães com cinomose não inflamatória e inflamatória, respectivamente (BEINEKE et al., 2008). A técnica de isolamento viral em cultivo celular é considerada específica, porém trata-se de uma manobra demorada e que pode resultar em falsos negativos caso o animal não esteja na fase aguda da enfermidade (GEBARA et al., 2004). O diagnóstico histopatológico de lesões do SNC de cães infectados frequentemente envolve tanto a substância branca quanto a cinzenta (MORO et al., 2003). Entretanto, o grau de comprometimento do SNC é dependente da estirpe viral, da idade e da imunocompetência do animal acometido. Animais jovens ou cães imunodeficientes, por exemplo, com frequência desenvolvem necrose neuronal, ao passo que cães adultos e imunocompetentes tendem geralmente a apresentar desmielinização (GEBARA et al., 2004). Outra técnica que colabora para a determinação do diagnóstico é a imunoistoquímica, que permite a detecção de antígenos virais em diferentes tecidos fixados em formol como estômago, pulmão, bexiga, encéfalo, baço, linfonodos, rins, intestino e coxins digitais (SONNE et al., 2009). Recentemente, a técnica de RT-PCR vem sendo empregada com sucesso como manobra diagnóstica, tendo vantagens como poder ser realizada em diferentes tipos de amostras biológicas e em animais com sinais clínicos sistêmicos e neurológicos (GEBARA et al., 2004).

12. Profilaxia

Estudos priorizam a utilização de vacinas como forma eficiente de prevenção e redução da incidência da doença. A ausência de um programa de vacinação pode ser capaz de aumentar em até 100 vezes a ocorrência da

cinomose em uma população canina (MARTINS et al., 2009). Para indução do estado de imunidade dos animais, as vacinas produzidas a partir de amostras de CDV isoladas de cães naturalmente infectados e adequadamente atenuadas em culturas de células mostram-se eficazes. Imunocomprometimento do animal a ser vacinado, estresse, aplicação e armazenamento incorreto do produto e animais vacinados muito precocemente (anulação da capacidade da vacina pelo anticorpos maternos) são algumas das causas que podem determinar falha vacinal (MARTINS et al., 2009).

Além disso, algumas paramixoviroses, como o caso do CDV, apresentam diversidade genética relativamente constante, o que pode alterar a capacidade de proteção das vacinas que se utilizam de estirpes virais desatualizadas (NEGRÃO et al., 2006). Assim, a possibilidade de novas variantes virais permite a expansão do CDV para novos hospedeiros (MONTEIRO et al., 2010). Para indicar a evolução entre as amostras coletadas de diferentes regiões geográficas e para ajudar compreender as diferenças antigênicas entre as amostras biológicas, o sequenciamento genético e a análise filogenética subsequente são imprescindíveis (MARTINS et al., 2009).

Recentemente, novas pesquisas de vacinas com sequência de DNA têm sido desenvolvidas com o objetivo de minimizar os problemas pós-vacinais (MANGIA; PAES, 2008). Por fim, vale ressaltar que medidas adequadas de manejo são imprescindíveis para o controle da cinomose canina. O isolamento de filhotes e animais doentes, práticas adequadas de higienização do ambiente e ingestão satisfatória de anticorpos maternos por meio do colostro favorecem a profilaxia da enfermidade (BEINEKE et al., 2009).

13. Conclusão

Embora a cinomose canina seja uma enfermidade descrita e intensamente estudada há mais de cem anos, o esclarecimento dos mecanismos exatos de neuroinvasão, propagação viral, envolvimento celular e molecular, e outros relevantes aspectos da neuropatogênese ainda são

escassos. Além disso, protocolos efetivos de tratamento antiviral específico também são raros. Portanto, futuras investigações a respeito da interação celular/molecular e o CDV são extremamente necessárias para elucidar a complexidade do desenvolvimento das lesões desmielinizantes pela cinomose canina.

REFERÊNCIAS

- ALLDINGER, S.; BAUMGARTNER, W.; BVELL, C. Restricted expression of viral surface proteins in canine distemper encephalitis. *Acta Neuropathology*, v.85, n. 6, p.635-645, 1993.
- BAUMGÄRTNER, W.; ALLDINGER, S. *Experimental models of multiple sclerosis: the pathogenesis of canine distemper virus induced demyelination – a biphasic process*. New York: Springer, 2005, p. 871-887.
- BEINEKE, A.; MARKUS, S.; BORLAK, J.; THUM, T.; BAUMGÄRTNER, W. Increase of pro-inflammatory cytokine expression in non-demyelination early cerebral lesions in nervous canine distemper. *Viral Immunology*, v. 21, n. 4, p. 401-410, 2008.
- BEINEKE, A.; PUFF, C.; SEEHUNSEN, F.; BAUMGÄRTNER, W. Pathogenesis and immunopathology of systemic and nervous canine distemper. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, v. 127, n. 1-2, p. 1-18, 2009.
- BLANCOU, J. Dog distemper: imported into Europe from South America? *Historia Medicinae Veterinariae*, v.29, n.2, p.35-41, 2004.
- BLIXENKRONE-MØLLER, M.; SVANSSON, V.; HAVE, P.; ÖRVELL, C.; APPEL, M.; PEDERSEN, I.R.; DIETZ, H.H.; HENRIKSEN, P. Studies on manifestations of canine distemper virus infection in an urban dog population. *Veterinary Microbiology*, v.37, n. 1-2, p.163-173, 1993.
- BREGANO, L.C.; AGOSTINHO, S.D.; RONCATTI, F.T.L.B.; PIRES, M.C.; GARCIA, A.F.; GAMEIRO, R.; LUVIZOTTO, M.C.R.; CARDOSO, TC. Expression of pro-and-anti-apoptotic antigens in the cerebellum of dogs naturally infected with canine distemper vírus. *Brazilian Journal of Veterinary Pathology*, v. 3, n. 2, p. 80-85, 2010.
- CANDELARIO-JALIL, E.; YANG, V.; ROSENBERG, G.A. Diverse roles of matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases in neuroinflammation and cerebral ischemia. *Neuroscience*, v. 158, n. 3, p. 983-994, 2009.

- CUNNINGHAM, J. G. *Tratado de fisiologia veterinária: líquido cerebrospinal, barreira hematoencefálica*. 2 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1999. p. 88-91.
- DEZENGRINI, R.; WEIBLEN, R.; FLORES, E.F. Soroprevalência das infecções por parvovírus, adenovírus, coronavírus canino e pelo vírus da cinomose em cães de Santa Maria, Rio Grande do Sul, Brasil. *Ciência Rural*, v.37, n.1, p.183-189. 2007.
- EK-KOMMONEN C.; SIHVONEN, L.; PEKKANEN, K.; RIKULA, U.; NUOTIO, L. Outbreak of canine distemper in vaccinated dogs in Finland. *Veterinary Record*, v.141, n.15, p. 380-383, 1997.
- GEBARA, C.M.S.; WOSIACKI, S.R.; NEGRÃO, F.J.; ALFIERI, A.A.; ALFIERI, A.F. 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*, v. 56, n. 2, p. 168-174, 2004.
- GREENE, C.E.; APPEL, M. *Infectious diseases of the dog and cat: canine distemper*. St. Louis: Saunders Elsevier, 2006, p. 25-41.
- GRÖTERS, S.; ALLDINGER, S.; BAUMGÄRTNER, W. Up-regulation of mRNA for matrix metalloproteinases-9 and -14 in advanced lesions of demyelinating canine distemper leukoencephalitis. *Acta Neuropathology*, v. 110, n. 4, p. 369-382, 2005.
- GUYTON, A.C.; HALL, J.E. *Tratado de fisiologia médica: fluxo sanguíneo cerebral, líquido cefalorraquidiano, metabolismo cerebral*. 11 ed. Rio de Janeiro: Saunders Elsevier, 2006, p. 761-767.
- HEADLEY, S.A.; AMUDE, A.M.; ALFIERI, A.F.; BRACARENSE, A.P.F.R.L.; ALFIERI, A.A.; SUMMERS, B.A. 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*, v. 21, n. 5, p. 588-597, 2009.
- HEADLEY, S.A.; GRAÇA, D.L. Canine distemper: epidemiological findings of 250 cases. *Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science*, v.37, n.2, p.456-460, 2000.

JÓZWIK, A.; FRIMUS, T. Natural distemper in vaccinated and unvaccinated dogs in Warsaw. *The Journal of Veterinary Medical Science*, v.49, n. 9, p.413-414, 2002.

KHUTH, S.T.; AKAOKA, H.; PAGENSTECHER, A.; VERLAETEN, O.; BELIN, M.F.; GIRAUDON, P.; BERNARD, A. Morbillivirus infection of mouse central nervous system induces region-specific upregulation of MMPs and TIMPs correlated to inflammatory cytokine expression. *Journal of Virology*, v.75, n.17, p.8268-8282, 2001.

LEIB, S.L.; LEPPERT, D.; CLEMENTS, J.; TÄUBER, M.G. Matrix metalloproteinases contribute to brain damage in experimental pneumococcal meningitis. *Infection Immunology*, v.68, n.2, p.615-620, 2000.

LEVINE, J.M.; RUAUX, C.G.; BERGMAN, R.L.; COATES, J.R.; STEINER, J.M.; WILLIAMS, D.A. Matrix metalloproteinase-9 activity in the cerebrospinal fluid and serum of dogs with acute spinal cord trauma from intervertebral disk disease. *American Journal of Veterinary Research*, v.67, n.2, p.283-287, 2006.

MACHADO, A.B.M. Neuroanatomia funcional: vascularização do sistema nervoso central e barreiras encefálicas. 2 ed. São Paulo: Atheneu, 2002, p. 87-99.

MAES, R.K.; WISE A.G.; FITZGERALD, S.D.; RAMUDO, A.; KLINE, J.; VILNIS, A.; BENSON, C.A. Canine distemper outbreak in Alaska: diagnosis and strain characterization using sequence analysis. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, v.15, n. 3, p.213-220, 2003.

MANGIA, S.H.; PAES, A. C. Neuropatologia da cinomose. *Veterinária e Zootecnia*, v. 15, n. 3, p. 416-427, 2008.

MARTELLA, V.; ELIA, G.; LUCENTE, M.S.; DECARO, N.; LORUSSO, E.; BANYAI, K.; BLIXENKRONE-MOLLER, M.; LAN, N.T.; YAMAGUCHI, R.; CIRONE, F.; CARMICHAEL, L.E.; BUONAVOGLIA, C. Genotyping canine distemper virus (CDV) by a hemi-nested multiplex PCR provides a rapid approach for investigation of CDV outbreaks. *Veterinary Microbiology*, v. 122, n. 1-2, p. 32-42, 2007.

MARTINS, D.B.L.; LOPES, S.T.A.; FRANÇA, R.T. Cinomose canina – revisão de literatura. *Acta Veterinaria Brasílica*, v.3, n.2, p.68-76, 2009.

MIAO, Q.; BAUMGÄRTNER, W.; FAILING, K.; ALLDINGER, S. Phase-dependent expression of matrix metalloproteinases and their inhibitors in demyelinating canine distemper encephalitis. *Acta Neuropathology*, v. 106, n. 5, p. 486-494, 2003.

MONTEIRO, M.V.B.; SANTOS, M.P.; COSTA, C.T.C.; WHITEMAN, C.W.; MONTEIRO, F.O.B. Cinomose canina nos animais domésticos e silvestres. *Revista de Ciências Agrárias*, v.53, n.2, p. 216-223, 2010.

MORO, L.; MARTINS, A.S.; ALVES, C.M.; SANTOS, F.G.A.; PUERTO, H.L.D.; VASCONCELOS, A.C. Apoptosis in cerebellum of dogs with distemper. *The Journal of Veterinary Medical Science*, v. 50, n. 5, p. 221-225, 2003.

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

NORRIS J.M.; KROCKENBERGER, M.B.; BAIRD A.A.; KNUDSEN G. Canine distemper: re-emergence of an old enemy. *Australian Veterinary Journal*, v.84, n. 10, p.362-363, 2006.

ORSINI, H.; BONDAN, E.F.; SANCHEZ, M.; LALLO, M.A.; MAIORKA, P.C.; DAGLI, M.L.Z.; GRAÇA, D.L. Marcação imunoistoquímica da expressão astrocitária de proteína glial fibrilar ácida e de vimentina no sistema nervoso central de cães com cinomose. *Arquivo de Neuropsiquiatria*, v. 65, n. 4, p. 1070-1077, 2007.

ROSEMBERG, G.A. Matrix metalloproteinases and neuroinflammation in Multiple Sclerosis. *Neuroscientist*, v.8, n.6, p.586-595, 2002.

RUDD, P.A.; BASTIEN-HAMEL, L.E.; VON MESSLING, V. Acute canine distemper encephalitis is associated with rapid neuronal loss and local immune activation. *Journal of General Virology*, v. 91, p. 980-989, 2010.

SEEHUSEN, F.; ORLANDO, E.A.; WEWETZER, K.; BAUMGÄRTNER, W. Vimentina-positive astrocytes in canine distemper: a target for canine distemper

virus especially in chronic demyelinating lesions? *Acta Neuropathology*, v. 114, n. 6, p. 597-608, 2007.

SILVA, M.C.; FIGHERA, R.A.; BRUM, J.S.; GRAÇA, D.L.; KOMMERS, G.D.; IRIGOYEN, L.F.; BARROS, C.S.L. Aspectos clinicopatológicos de 620 casos neurológicos de cinomose em cães. *Pesquisa Veterinaria Brasileira*, v.27, n. 5, p.215-220, 2007.

SONNE, L.; OLIVEIRA, E.C.; PESCADOR, C.A.; SANTOS A.S.; PAVARINI, S.P.; CARISSIMI, A.S.; DRIEMEIER, D. Achados patológicos e imunohistoquímicos em cães infectados naturalmente pelo vírus da cinomose canina. *Pesquisa Veterinária Brasileira*, v. 29, n. 2, p. 143-149, 2009.

TIPOLD, A.; VANDEVELDE, M.; JAGGY, A. Neurological manifestations of canine distemper virus infection. *Journal of Small Animal Practice*, v.33, n. 10, p.466-470, 1992.

TURBA, M.E.; FORNI, M.; GANDINI, G.; GENTILINI, F. Recruited leukocytes and local synthesis account for increased matrix metalloproteinase-9 activity in cerebrospinal fluid of dogs with central nervous system neoplasm. *Journal of Neuro-Oncology*, v.81, n.2, p.123-129, 2007.

VANDEVELDE, M.; ZURBRIGGEN, A. Demyelination in canine distemper virus infection: a review. *Acta Neuropathology*, v. 109, n. 1, p. 56-58, 2005.

VON MESSLING, V.; SVITEK, N.; CATTANEO, R. Receptor (SLAM [CD150] recognition and the V protein sustain swift lymphocytebased invasion of mucosal tissue and lymphatic organs by a morbillivirus. *Journal of Virology*, v. 80, n. 12, p. 6084-6092, 2006.

WANG, P.; DAI, J.; BAI, F.; KONG, K.K.; WONG, S.J.; MONTGOMERY, R.R.; MADRI, J.A.; FIKRIG, E. Matrix metalloproteinase 9 facilitates West Nile Virus entry into brain. *Journal of Virology*, v. 82, n. 18, p. 8978-8995, 2008.

WEBB, A.A.; MUIR, G.D. The blood-brain barrier and its role in inflammation. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, v.14, n.4, p.399-411, 2000.

WÜNSCHMANN, A.; ALLDINGER, S.; KREMMER, E.; BAUMGÄRTNER, W. Identification of CD4+ and CD8+ T cell subsets and B cells in the brain of dogs with spontaneous acute, subacute-, and chronic-demyelinating distemper

encephalitis. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, v. 67, n. 2, p. 101-116, 1999.

WUNSCHMANN, A.; KREMMER, E.; BAUMGÄRTNER, W. Phenotypical characterization of T and B cells areas in lymphoid tissues of dogs with spontaneous distemper. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, v. 73, n. 1, p. 83-98, 2000.

WYSS-FLUEHMANN, G.; ZURBRIGGEN, A.; VANDEVELDE, M.; PLATTET, P. Canine distemper virus persistence in demyelinating encephalitis by swift intracellular cell-to-cell spread in astrocytes is controlled by the viral attachment protein. *Acta Neuropathology*, v. 119, n. 5, p. 617-630, 2010.

YONG, V.W.; POWER, C.; FORSYTH, P.; EDWARDS, D.R. Metalloproteinases in biology and pathology of the nervous system. *Neuroscience*, v.2, n.7, p. 502-511, 2001.

CAPÍTULO 2 – IMUNOMARCAÇÃO DE SUBPOPULAÇÕES DE LINFÓCITOS CD3+, CD4+ E CD8+ ASSOCIADA À EXPRESSÃO DE METALOPROTEINASES -2 E -9 EM CEREBELOS DE CÃES INFECTADOS NATURALMENTE COM VÍRUS DA CINOMOSE CANINA

RESUMO – No presente estudo foram avaliados 30 cerebelos de cães naturalmente infectados pelo vírus da cinomose canina, confirmados pela reação RT-PCR (*Reverse Transcriptase Polymerase Chain Reaction*) com segmentação do gene do nucleocapsídeo viral, e por análise microscópica das lesões teciduais após a coloração Hematoxilina-Eosina e coloração de Shorr. A distribuição das subpopulações de linfócitos T foi evidenciada pela técnica de imunistoquímica empregando-se anticorpos monoclonais CD3+, CD8+ e CD4+. Da mesma forma, a detecção da expressão das metaloproteinases (MMP) -2 e -9 também foi conduzida pela técnica de imunistoquímica e os resultados foram associados aos encontrados na imunofenotipagem. Foi possível evidenciar marcação mais expressiva de MMP-2 (86,67% de intensidade moderada a intensa) e uma alta proporção de linfócitos T CD4+ e CD8+. Nesse sentido, pode-se concluir que o vírus da cinomose canina se dispersa no sistema nervoso central, alterando a integridade estrutural da barreira hematoencefálica, provavelmente pela ação da MMP-2; e os infiltrados inflamatórios perivasculares presentes são constituídos predominantemente por subpopulações de linfócitos T CD4+ e CD8+.

Palavras-chave: Barreira hematoencefálica, CDV, interação vírus-hospedeiro

1. Introdução

A cinomose canina é uma enfermidade infectocontagiosa viral, de ocorrência mundial com amplo espectro de hospedeiros naturais, englobando todas as famílias da ordem *Carnivora* (BEINEKE et al., 2009). Geralmente induz à doença multissistêmica e os cães são os principais reservatórios (HEADLEY et al., 2009). O vírus da cinomose canina (CDV – *Canine Distemper Virus*) caracteriza-se por ser um RNA vírus, de sentido negativo, não segmentado, envelopado e relacionado estreitamente ao vírus do sarampo. Além disso, pertence à família *Paramyxoviridae* e gênero *Morbillivirus* (WYSS-FLUEHMANN et al., 2010).

Por apresentar semelhanças morfológicas nas alterações neuropatológicas, a cinomose canina representa um dos poucos modelos animais espontâneos para doenças desmielinizantes humanas, como a esclerose múltipla, contribuindo para o estudo da perda da mielina associada a mecanismos imune-mediados (WYSS-FLUEHMANN et al., 2010).

Não há entendimento exato do mecanismo pelo qual o CDV penetra e se dispersa pelo tecido nervoso (BEINEKE et al., 2008). Acredita-se que a entrada do vírus no sistema nervoso central (SNC) ocorra normalmente pela via hematogênica, a partir do epêndima ou espaço sub-ependimal da substância branca. Para isto, é necessário que haja a desestabilização da barreira hematoencefálica (BHE) por meio da degradação da membrana basal e perda das junções celulares (VANDEVELDE; ZURBRIGGEN, 2005).

Em encefalites humanas pelo *West Nile Virus* e pelo vírus da imunodeficiência humana adquirida, as matriz metaloproteinases (MMPs), também chamadas de collagenases, desempenham um papel fundamental na degradação dos componentes da matriz extracelular (ME) da BHE (WANG et al., 2008). As MMPs fazem parte do maior grupo de enzimas com similaridade estrutural entre os membros das famílias e com subclasses definidas (SULIK; CHYCZEWSKI, 2008). A maioria das MMPs são expressas em nível baixo ou até mesmo indetectável no SNC da maioria das espécies, e podem ter seus

níveis alterados com fontes celulares como infiltrados linfocíticos, macrófagos e células intrínsecas do SNC, como é o caso da micróglia, astrócitos, células endodimárias, oligodendrócitos, neurônios, além de células endoteliais (GRÖTERS et al., 2005). Dentre as MMPs que contribuem para a desestabilização da BHE podem se destacar a MMP-2 (gelatinase A) e MMP-9 (gelatinase B) (GRÖTERS et al., 2005). Elas possuem atividade colagenolítica, sendo diferenciadas pelas estruturas envolvidas no mecanismo de clivagem e pelas suas atividades de degradação (SULIK; CHYCZEWSKI, 2008). A MMP-2 tem a capacidade de degradar colágeno do tipo IV, V, VII, X e XI, gelatina, proteoglicanos, elastina, vitronectina, laminina e outros constituintes da ME (CANDELAREIO-JALIL et al., 2009). A gelatinase B, MMP-9, é armazenada em grânulos de neutrófilos e eosinófilos, e possui a capacidade de degradar substratos como colágeno do tipo IV, V e XIV, gelatina, elastina, proteoglicanos, α 2-macroglobulina e vitronectina (WANG et al., 2008).

Em um modelo de encefalomielite experimental auto-imune, foi demonstrado que MMP-2 e MMP-9, além de terem a capacidade de interferir na membrana basal, alterando sua constituição e eficiência de suas junções, possuem a propriedade de aumentar a infiltração de leucócitos no SNC (CARDOSO et al., 2010).

Além disso, o CDV também possui a capacidade de atrair constituintes do sistema imunológico, como linfócitos, para o interior do SNC (VANDEVELDE; ZURBRIGGEN, 2005). Linfócitos T e B, independentemente da sua especificidade, são exemplos de células periféricamente ativadas que desenvolvem uma resposta imune local contra antígenos específicos, juntamente com as demais células inflamatórias, recrutam e proliferam as células da circulação sistêmica (MORO et al., 2003).

A presente investigação objetiva colaborar para o entendimento da patogênese da encefalite desmielinizante pelo CDV empregando-se a técnica de imunistoquímica (IHQ) para MMP-2 e MMP-9, além da caracterização fenotípica de subpopulações de linfócitos T nos infiltrados inflamatórios perivasculares.

2. Material e Métodos

2.1. Preocupações éticas

Toda a manipulação dos animais e os procedimentos de coleta das amostras foram realizados em conformidade com as recomendações do Colégio Brasileiro em Experimentação Animal (COBEA), e todos os experimentos foram aprovados pela Instituição de Ética e Comitê de Bem-Estar Animal.

2.2. Amostras

Para o presente estudo, foram selecionadas 30 amostras de SNC, compostas pela porção cerebelar, de cães naturalmente infectados pelo CDV. Este material, gentilmente cedido pelo acervo do setor de Patologia Animal da FMVA, UNESP, Araçatuba/SP, foi proveniente de necropsias realizadas no período de 1995-2009, com diagnóstico clínico e histopatológico conclusivos para a enfermidade, sendo esta a *causa mortis* do animal. As amostras foram previamente fixadas em formol e incluídas em parafina. Os animais controle (n = 20) foram cedidos por clínicas veterinárias particulares e os mesmos tiveram como *causa mortis* por enfermidades decorrentes de traumas.

2.3. Análise histopatológica

Em um primeiro momento, a presença do RNA viral foi confirmada pela técnica de RT-PCR, de acordo com Bregano et al. (2011). Em seguida, os cortes histológicos foram submetidos à coloração pelo método de Hematoxilina e Eosina (HE) e coloração de Shorr, e realizada a análise microscópica. Para tanto, utilizou-se classificação pré-estabelecida (SEEHUSEN et al., 2007), que diferencia as lesões em (a) agudo, (b) subagudo e (c) crônico, conforme seu

grau de severidade. O Grupo (a) foi definido por apresentar vacuolização focal, moderada gliose com astrócitos e micróglia ativados, e células positivas para CDV. O Grupo (b) foi subdividido em subagudo não-inflamatório e inflamatório. O primeiro incluiu lesões caracterizadas por desmielinização; moderada gliose com gemistocíticos; macrófagos e micróglia ativados. No segundo, subagudo inflamatório, observou-se a presença de moderada a severa desmielinização, células *gitter*, e também infiltrados inflamatórios perivasculares com uma ou duas camadas de células mononucleares. Por fim, o Grupo (c) consistiu por lesões similares ao grupo anterior, entretanto apresentaram infiltrados inflamatórios perivasculares mais evidentes, com mais de duas camadas de células mononucleares. A visualização de corpúsculos de inclusão citoplasmáticos e intranucleares do CDV foi efetuada pela coloração de Shorr (MORO et al., 2003).

2.4. *Reação de imunoistoquímica*

A técnica de imunomarcagem foi aplicada na detecção de MMP-2 e MMP-9 nos cortes histológicos, bem como para a caracterização das células inflamatórias dos infiltrados perivasculares presentes, diferenciando-as em CD3+ e subpopulações de linfócitos CD4+ e CD8+. Para isto, o método padrão avidina-biotina-peroxidase (ABC, DakoCytomation®, USA) foi preconizado. Os cortes histológicos de 4- μ m foram submetidos ao processo de desparafinização com banhos consecutivos em diferentes concentrações de xilol e álcool, reidratados e lavados em tampão salina com 0,1% Tween 80. A reativação antigênica foi necessária em decorrência do longo período de arquivo das peças. Para tanto, as lâminas foram submersas em solução tampão de 0.01M de citrato de sódio (pH 6.0) e submetidas a três ciclos consecutivos 70W no microondas e deixadas à temperatura ambiente até o manuseio. O bloqueio da peroxidase endógena, comumente encontrada nas reações inflamatórias, foi conduzido com uma solução de peróxido de hidrogênio 50% (30V) por 30 minutos. Em seguida, os cortes histológicos foram lavados por 5 vezes de 10

min. cada, com solução tampão para a remoção de resíduos. Para o bloqueio de ligações não específicas, os cortes foram incubados em 15% de leite em pó desnatado por 2 h a 37°C em câmara úmida. A marcação foi realizada com a adição primária dos anticorpos monoclonais (Sigma-Aldrich®). Os cortes histológicos foram cobertos por 200µl de anticorpos monoclonais diluídos (Tabela 3) e o período de incubação foi durante toda a noite a 4°C em câmara umidificada. Depois de 5 lavagens consecutivas, a segunda reação foi realizada com anticorpos secundários biotinizados da DakoCytomation®, com 100µl estreptavidina-peroxidase complexo (DakoCytomation®) adicionado a cada corte, e incubados por 1 a 37°C. Os substratos foram AEC (Sigma-Aldrich®) e DAB (Sigma-Aldrich®), que apresentaram colorações vermelha e marrom, respectivamente. A omissão do anticorpo primário foi utilizada como controle negativo para os diferentes anticorpos.

A análise semi-quantitativa da intensidade de imunomarcação foi padronizada adotando-se o seguinte critério: leve ($\geq 0-25\%$) para marcação focal, localizada predominantemente na porção duramater, aracnoide e piamater; moderado ($\geq 25\%$) para a marcação na porção sub-pial, em espaços focais perivasculares e leve marcação em parênquima nervoso; intenso ($\geq 75\%$) para marcações anteriores acrescidas de marcação intensa em parênquima nervoso.

Tabela 3. Descrição dos anticorpos, fabricação e diluição utilizados pelo Laboratório de Virologia da FMVA, UNESP, Araçatuba/SP.

Sigla	Anticorpo	Diluição	Espécie	Fornecedor
MMP-2	Metaloproteinase 2	1:100	Coelho	Sigma-Aldrich®
MMP-9	Metaloproteinase 9	1:200	Coelho	Sigma-Aldrich®
CD3	Anti-CD3	1:200	Cabra	Sigma-Aldrich®
CD4	Anti-CD4	1:200	Cão	Sigma-Aldrich®
CD8	Anti-CD8	1:200	Cão	Sigma-Aldrich®

2.5. *Análise Estatística*

Os resultados das micrografias foram processados com SAS v. 8.2 (SAS Institute Inc. Cary, NC, EUA) e considerados estatisticamente significativos quando $P < 0,05$. O teste utilizado para a elaboração da análise estatística foi o Teste Exato de Fisher que calculou a probabilidade de associação das amostras em questão.

3. Resultados

3.1. *Achados histopatológicos*

A ocorrência do Grupo (a) foi de 26,7% (08/30). As alterações mais frequentes neste grupo foram a ausência de infiltrados inflamatórios, astrócitos gemistocíticos; 87,5% (07/08) de vacuolização e 50% (04/08) de astrocitose, ambas em grau leve de intensidade; e 62,5% (05/08) de satelitose moderada. No grupo (b), a ocorrência foi de 60% (18/30). Dentre as alterações, podem-se destacar 44,4% (08/18) de vacuolização, 50% (09/18) de astrocitose, 55,5% (10/18) de congestão, 50% (09/18) de satelitose e 50% (09/18) de necrose, todas estas em grau moderado de intensidade. Além disso, 44,4% (08/18) apresentaram infiltrados inflamatórios moderados, com uma ou duas camadas de células mononucleares. Por fim, o Grupo (c) teve uma ocorrência de 13,3% (04/30) e suas principais alterações histopatológicas foram 75% (03/04) de astrocitose e vacuolização moderadas; e 50% (02/04) de congestão intensa e satelitose leve. Todas as amostras apresentaram infiltrados inflamatórios de grau intenso com duas ou mais camadas de células mononucleares. As amostras negativas não mostraram qualquer lesão compatível com a infecção por CDV. Para facilitar a visualização dos corpúsculos de inclusão intranucleares e citoplasmáticos, a coloração de Shorr foi preconizada. No Grupo (a), 100% (08/08) das amostras apresentaram inclusões citoplasmáticas e

intra-nucleares; no Grupo (b), estas estavam presentes em 11,1% (02/18); e no Grupo (c), 25% (01/04) apresentaram inclusões virais (Figura 11).

3.2. *Achados imunoistoquímicos*

Os resultados revelaram que, para a marcação de MMP-9, os cortes histológicos classificados no Grupo (a) apresentaram 75% (06/08) em grau leve de imunomarcação e 25% (02/08) em grau moderado. No caso de cortes do Grupo (b), 83,3% (15/18) apresentaram imunomarcação em grau leve, 11,1% (02/18) em grau moderado e 5,6% (01/18) em grau intenso. Por fim, nos cortes classificados no Grupo (c), 75% (03/04) apresentaram grau leve e 25% (01/04) grau moderado de intensidade de marcação para MMP-9 (Figura 13). De maneira geral, 96,7% (29/30) dos cortes histológicos revelaram uma intensidade de leve a moderada de imunomarcação para MMP-9 (Figura 8 e 12).

Para a análise de expressão da MMP-2, observou-se que, nos cortes histológicos do Grupo (a), 75% (06/08) apresentaram marcação de intensidade moderada e 25% (02/08), marcação de intensidade intensa. Para Grupo (b), houve uma expressão da MMP-2 em grau leve em 11,1% (02/18), em grau moderado em 66,7% (12/18) e em grau intenso em 22,2% (04/18). No caso de cortes do Grupo (c), 25% (01/04) revelaram imunomarcação de grau leve, 50% (02/04) de grau moderado e 25% (01/04) de grau intenso (Figura 13). Por fim, pode-se observar que, excluindo a padronização histopatológica, 90% (27/30) dos cortes histológicos analisados apresentaram imunomarcação de grau moderado a intenso para MMP-2 (Figura 9 e 12).

Nos infiltrados inflamatórios perivasculares evidentes foi observada, referente à imunomarcação no citoplasma de coloração vermelha, uma maior proporção de linfócitos CD4+ e CD8+ em relação ao CD3+ (Figura 10). Além disso, nenhuma marcação inespecífica foi visualizada no grupo controle. Com relação à detecção do RNA viral por RT-PCR, todas as amostras positivas foram consideradas infectadas pelo CDV.

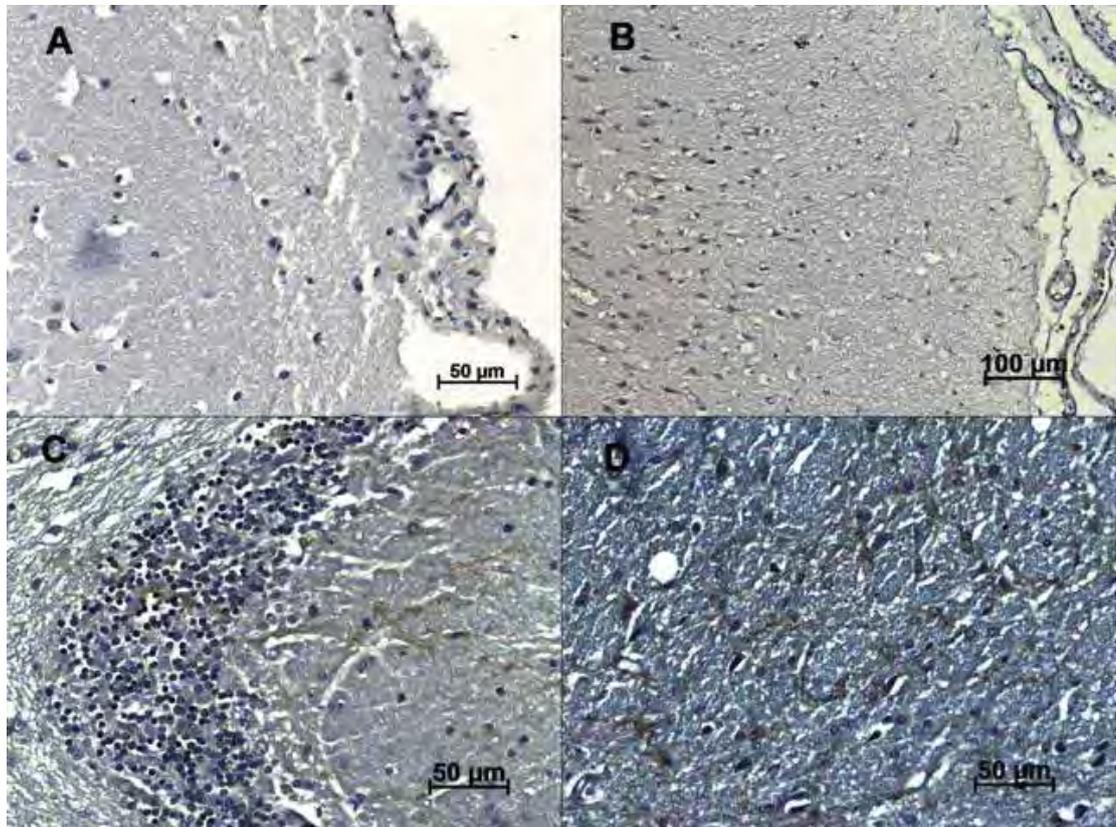


FIGURA 08. Fotomicrografias de cortes histológicos de cerebelos de cães naturalmente infectados para CDV imunomarcados para MMP-9, utilizando cromógeno DAB (Sigma-Aldrich®) e contracolorados em Hematoxilina. A) Discreta imunomarcção restrita à meninge. B) Imunomarcção de grau leve no parênquima cerebelar. C) Imunomarcção moderada em camada molecular e granular do cerebelo. D) Imunomarcção intensa no parênquima cerebelar.

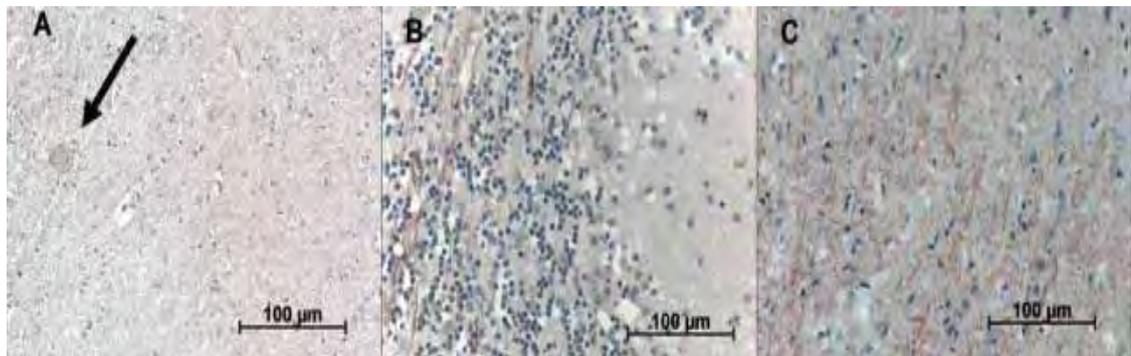


FIGURA 09. Fotomicrografia de cortes histológicos de cerebelos de cães naturalmente infectados para CDV imunomarcados para MMP-2, utilizando cromógeno AEC (Sigma-Aldrich®) e contracolorados em Hematoxilina. A) Imunomarcação focal no parênquima cerebelar (seta). B) Moderada marcação IHQ da camada granular do cerebello. C) Imunomarcação generalizada no neurópil do cerebello.

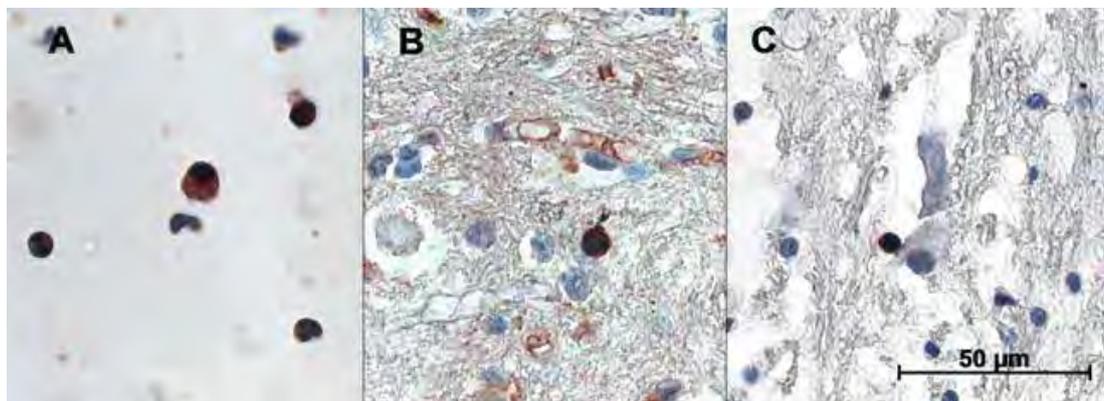


FIGURA 10. Fotomicrografia exibindo imunomarcação em cortes histológicos de cães naturalmente infectados para CDV. A) Marcação positiva para célula T CD3+. B) Marcação positiva para subpopulação de linfócitos T CD4+. C) Marcação positiva para subpopulação de linfócitos T CD8+.

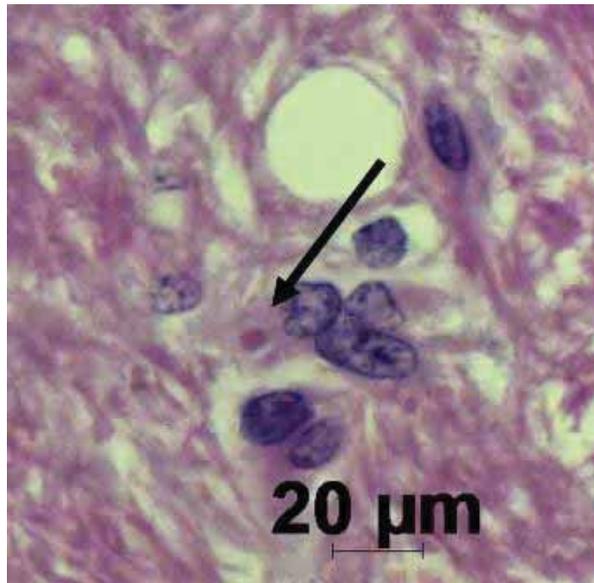


FIGURA 11. Fotomicrografia exibindo inclusão intracitoplasmática de CDV (seta) circundada por astrócitos em corte histológico de cerebelo de cão naturalmente infectado para CDV e corado com HE.

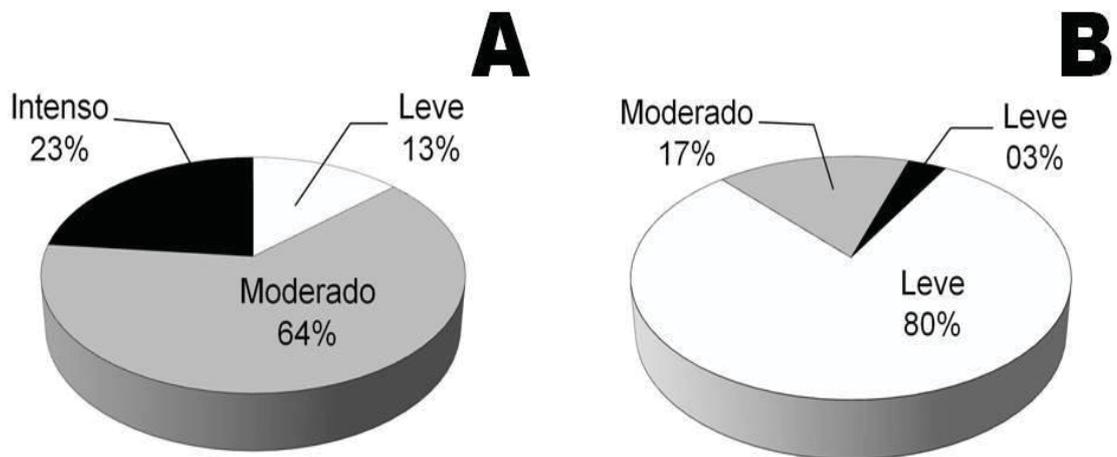


FIGURA 12. A) Frequência da detecção de MMP-2 independente dos estágios da encefalite desmielinizante de cães positivos para CDV. B) Frequência da detecção de MMP-9 independente dos estágios da encefalite desmielinizante de cães positivos para CDV.

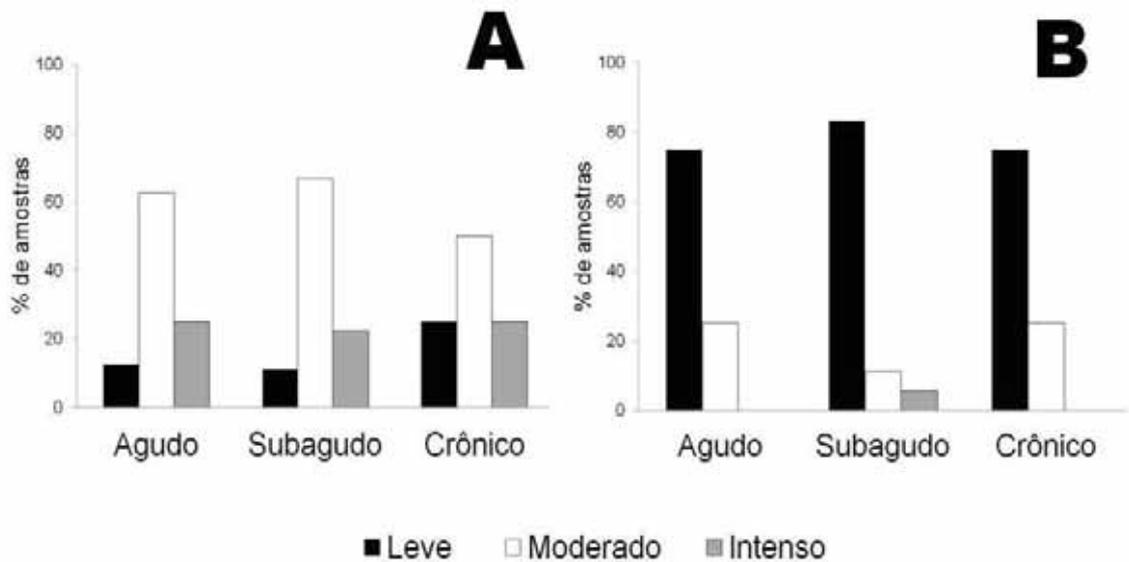


FIGURA 13. A) Frequência da detecção de MMP-2 nos diferentes estágios da encefalite desmielinizante de cães positivos para CDV. B) Frequência da detecção de MMP-9 nos diferentes estágios da encefalite desmielinizante de cães positivos para CDV.

4. Discussão

Pela importância clínica e epidemiológica da cinomose canina na medicina veterinária e pela similaridade desta enfermidade com doenças neurodegenerativas humanas, a compreensão da patogênese das lesões desmielinizantes causadas pelo CDV é de extrema relevância. O mecanismo exato pelo qual o CDV penetra e se dispersa pelo tecido nervoso ainda não é compreendido (BEINEKE et al., 2008). Além disso, correlações precisas entre a patogenia das lesões, abordagem clínica e possíveis protocolos terapêuticos são escassas. Este trabalho buscou contribuir para o entendimento de alguns aspectos desta patogênese.

A avaliação histopatológica permitiu a observação das alterações neuropatológicas e a classificação das mesmas de acordo com o grau de severidade e progressão das lesões. Com isto, observou-se uma maior ocorrência do Grupo (b) (60% - 18/30) em relação aos demais estágios da

enfermidade, em semelhança a valores encontrados por Seehunzen et al., 2007 (agudo [20,51% - 16/78]; subagudo [65,4% - 51/78]; crônico [14,1% - 11/78]). As alterações histopatológicas encontradas também foram compatíveis com as descritas pela literatura (BEINEKE et al., 2009; HEADLEY et al., 2009; SEEHUNZEN et al., 2007; SONNE et al., 2009).

Na investigação imunoistoquímica realizada no presente estudo, buscou-se a correlação entre os estágios de lesões na encefalite desmielinizante pelo CDV, expressão das MMP2 e MMP9 e possível quebra da integridade da BHE. A imunomarcagem para MMP-9 apresentou-se predominantemente em grau leve de intensidade (24/30), independente do estágio em que se encontravam as lesões, não havendo correlação estatisticamente significativa entre estas variáveis ($P = 0,6977$). Pode-se sugerir que haja, portanto, fraca contribuição desta colagenase no mecanismo de quebra da integridade da BHE. Miao et al., (2003) citam uma alta regulação desta enzima, principalmente nas fases aguda e subaguda não inflamatório nas lesões por CDV, o que difere dos dados encontrados por este trabalho. Estes mesmos autores ainda reforçam a especial importância da MMP-9 nos casos de esclerose múltipla em humanos. Os resultados também diferem de outras encefalites virais, como o Herpesvírus Bovino tipo 5 e Herpesvírus Humano tipo 4, nas quais a correlação com MMP-9 é mais evidente (CARDOSO et al., 2010).

Em relação à MMP-2, pode-se afirmar que esta tem relevante importância no controle e remodelação da matriz extracelular da BHE interferindo diretamente na sua permeabilidade (MIAO et al., 2003; CANDELARIO-JALIL, et al, 2009). Foi evidenciada uma forte expressão da MMP-2 nas lesões causadas pelo CDV, sendo que esta se apresentou predominantemente em grau moderado a intenso na maioria dos cortes avaliados (26/30), evidenciando sua importância na patogênese destas lesões. Referindo-se aos estágios das lesões, MMP-2 também não apresentou correlação estatisticamente significativa ($P = 0,9585$). Infelizmente, são escassos os dados de literatura referentes a esta colagenase em comparação a MMP-9. Entretanto Miao et al. (2003) citam uma regulação predominante nas fases

iniciais de lesão por CDV e em casos de esclerose múltipla. Estes autores ainda citam a relação entre a MMP-2 e a estimulação com TNF- α e IL-1.

A investigação da caracterização fenotípica das células inflamatórias presentes nos infiltrados perivasculares evidenciou uma proporção de linfócitos CD4+ e CD8+ superior quando comparada a CD3+. Esta desproporção entre CD3+ em relação a CD4+ e CD8+ pode estar correlacionada à diferença de especificidade dos anticorpos utilizados. Wünschmann et al. (1999) evidenciaram que a resposta imune intracerebelar na doença desmielinizante pelo CDV espontânea é dominada por células T. Além disso, estes autores associaram a forte infiltração de células CD4+ e CD8+ a lesões subagudas inflamatórias e crônicas, nas quais os infiltrados perivasculares são mais evidentes; e, em lesões agudas e subagudas não inflamatórias, relataram a ocorrência de escassas células, destacando que, possivelmente, as primeiras células a adentrarem o SNC seriam os linfócitos T CD8+. A ocorrência de um menor número de células inflamatórias nas fases iniciais da encefalite desmielinizante está associada à depleção linfoide generalizada causada pelo CDV.

O presente trabalho vem contribuir para o estudo da patogênese da encefalite desmielinizante causada pelo CDV, de maneira a evidenciar que os infiltrados inflamatórios perivasculares na doença desmielinizante do CDV são constituídos predominantemente por subpopulações de linfócitos T CD4+ e CD8+ e que a invasão do SNC pelo CDV, associada com a alteração da integridade da BHE, provavelmente ocorre por ação da MMP-2.

Agradecimentos

O projeto foi financiado pela Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) (2008/11534-8). Os autores gostariam de agradecer à Prof^a. Dr^a. Maria Cecília Rui Luvizotto e Prof^a. Dr^a. Silvia Helena Venturoli Perri pela assistência.

REFERÊNCIAS

- BEINEKE, A.; MARKUS, S.; BORLAK, J.; THUM, T.; BAUMGÄRTNER, W. Increase of pro-inflammatory cytokine expression in non-demyelination early cerebral lesions in nervous canine distemper. *Viral Immunology*, v. 21, n. 4, p. 401-410, 2008.
- BEINEKE, A.; PUFF, C.; SEEHUNSEN, F.; BAUMGÄRTNER, W. Pathogenesis and immunopathology of systemic and nervous canine distemper. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, v. 127, n. 1-2, p. 1-18, 2009.
- BREGANO, L.C.; AGOSTINHO, S.D.; RONCATTI, F.L.B.T.; PIRES, M.C.; RIVA, H.G.; LUVIZOTTO, M.C.R.; CARDOSO, T.C. Immunohistochemical detection of metalloproteinase-9 (MMP-9), anti-oxidante like 1 protein (AOP-1) and synaptosomal-associated protein (SNAP-25) in the cerebella of dogs naturally infected with spontaneous canine distemper. *Folia histochemica et Cytobiologica*, v. 49, n. 1, p. 41-48, 2011.
- CANDELARIO-JALIL, E.; YANG, V.; ROSENBERG, G.A. Diverse roles of matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases in neuroinflammation and cerebral ischemia. *Neuroscience*, v. 158, n. 3, p. 983-994, 2009.
- CARDOSO, T.C.; FERRARI, H.F.; GARCIA, A.F.; BREGANO, L.C.; ANDRADE, A.L.; NOGUEIRA, A.H.C. Immunohistochemical approach to the pathogenesis of clinical cases of Bovine Herpesvirus type 5 infections. *Diagnostic Pathology*, v. 5, n. 57, p. 1-8, 2010.
- GRÖTERS, S.; ALLDINGER, S.; BAUMGÄRTNER, W. Up-regulation of mRNA for matrix metalloproteinases-9 and -14 in advanced lesions of demyelinating canine distemper leukoencephalitis. *Acta Neuropathology*, v. 110, n. 4, p. 369-382, 2005.
- HEADLEY, S.A.; AMUDE, A.M.; ALFIERI, A.F.; BRACARENSE, A.P.F.R.L.; ALFIERI, A.A.; SUMMERS, B.A. 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*, v. 21, n. 5, p. 588-597, 2009.

MIAO, Q.; BAUMGÄRTNER, W.; FAILING, K.; ALLDINGER, S. Phase-dependent expression of matrix metalloproteinases and their inhibitors in demyelinating canine distemper encephalitis. *Acta Neuropathology*, v. 106, n. 5, p. 486-494, 2003.

MORO, L.; MARTINS, A.S.; ALVES, C.M.; SANTOS, F.G.A.; PUERTO, H.L.D.; VASCONCELOS, A.C. Apoptosis in cerebellum of dogs with distemper. *The Journal of Veterinary Medical Science*, v. 50, n. 5, p. 221-225, 2003.

SEEHUSEN, F.; ORLANDO, E.A.; WEWETZER, K.; BAUMGÄRTNER, W. Vimentin-positive astrocytes in canine distemper: a target for canine distemper virus especially in chronic demyelinating lesions? *Acta Neuropathology*, v. 114, n. 6, p. 597-608, 2007.

SONNE, L.; OLIVEIRA, E.C.; PESCADOR, C.A.; SANTOS A.S.; PAVARINI, S.P.; CARISSIMI, A.S.; DRIEMEIER, D. Achados patológicos e imunohistoquímicos em cães infectados naturalmente pelo vírus da cinomose canina. *Pesquisa Veterinária Brasileira*, v. 29, n. 2, p. 143-149, 2009.

SULIK, A.; CHYCZEWSKI, L. Immunohistochemical analysis of MMP-9, MMP-2 and TIMP-1, TIMP-2 expression in the central nervous and bacterial meningitis. *Folia Histochemica et Cytobiologia*, v. 46, n. 4, p. 437-442, 2008.

VANDEVELDE, M.; ZURBRIGGEN, A. Demyelination in canine distemper virus infection: a review. *Acta Neuropathology*, v. 109, n. 1, p. 56-58, 2005.

WANG, P.; DAI, J.; BAI, F.; KONG, K.K.; WONG, S.J.; MONTGOMERY, R.R.; MADRI, J.A.; FIKRIG, E. Matrix metalloproteinase 9 facilitates West Nile Virus entry into brain. *Journal of Virology*, v. 82, n. 18, p. 8978-8995, 2008.

WÜNSCHMANN, A.; ALLDINGER, S.; KREMMER, E.; BAUMGÄRTNER, W. Identification of CD4+ and CD8+ T cell subsets and B cells in the brain of dogs with spontaneous acute, subacute-, and chronic-demyelinating distemper encephalitis. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, v. 67, n. 2, p. 101-116, 1999.

WYSS-FLUEHMANN, G.; ZURBRIGGEN, A.; VANDELDELDE, M.; PLATTET, P.
Canine distemper virus persistence in demyelinating encephalitis by swift
intracellular cell-to-cell spread in astrocytes is controlled by the viral attachment
protein. *Acta Neuropathology*, v. 119, n. 5, p. 617-630, 2010.