



**PROGRAMA DE DE PÓS-GRADUAÇÃO STRICTO SENSU
MESTRADO EM BIOCÊNCIA ANIMAL**

PRISCILA FERREIRA MELO LEÃO

**AVALIAÇÃO IMUNO-HISTOQUÍMICA DE ASTRÓCITOS EM CÃES
NATURALMENTE INFECTADOS PELO VÍRUS DA CINOMOSE**

PRISCILA FERREIRA MELO LEÃO

**AVALIAÇÃO IMUNO-HISTOQUÍMICA DE ASTRÓCITOS EM CÃES
NATURALMENTE INFECTADOS PELO VÍRUS DA CINMOSE**

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-graduação em Biociência Animal, da Universidade de Cuiabá – UNIC como requisito parcial para obtenção do Título de Mestre.

Orientador: Prof. Dr. Selwyn Arlington Headley.

Cuiabá
2016

FICHA CATALOGRÁFICA
Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

L576a Leão, Priscila Ferreira Melo.
Avaliação imuno-histoquímica de astrócitos em cães naturalmente infectados pelo vírus da cinomose / Priscila Ferreira Melo Leão. – Cuiabá, 2016.
36 f. : il.; 30 cm.

Dissertação (Mestrado) – Programa de Mestrado em Biociência Animal, Universidade de Cuiabá, 2016.
Orientador: Prof. Dr. Selwyn Arlington Headley.

1. Medicina Veterinária. 2. Doenças de Cães. 3. Doenças Virais. 4. Astrócitos. 5. Cinomose Canina. 6. Neuropatologia I. Título.

CDU 616:591.2

Normalização e Ficha Catalográfica
Valéria Oliveira dos Anjos
Bibliotecária CRB1/1713

PRISCILA FERREIRA MELO LEÃO

**AVALIAÇÃO IMUNO-HISTOQUÍMICA DE ASTRÓCITOS EM CÃES
NATURALMENTE INFECTADOS PELO VÍRUS DA CINOMOSE**

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-graduação em Biociência Animal, da Universidade de Cuiabá – UNIC como requisito parcial para obtenção do Título de Mestre.

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Selwyn Arlington Headley - UNIC
Orientador

Prof. Dr. Alexandre Mendes Amude - UNIC

Prof. Dr. Werner Okano - UNOPAR

Cuiabá, 27 de Outubro de 2016

Conceito Final: _____

Dedico esta dissertação aos meus pais José Eurípedes Leão e Eliete da Graça Ferreira Leão, que foram fundamentais para minha formação. Aos meus filhos Miguel Leão Gomes e Manuela Leão Gomes pela ausência necessária no decorrer dos dois anos e finalização deste trabalho. E aqueles amigos que sempre estiveram do meu lado, me apoiando e dando força.

AGRADECIMENTOS

A Deus pela sua infinita bondade e pela oportunidade de estar neste plano conquistando mais uma vitória na minha vida.

A minha família, que esteve ao meu lado em todos os momentos, que ajudou na minha formação acadêmica e em especial aos meus pais que sempre me apoiaram e cuidaram dos meus filhos nos dias que estive ausente.

Aos meus professores orientador Selwyn Arlington Headley e coorientador Alexandre Mendes Amude que colaboraram com seus conhecimentos.

Ao coordenador da pós-graduação em Biociência Animal Marcelo Diniz que colaborou com seus conhecimentos.

À mestre e Médica Veterinária da Universidade de Cuiabá (UNIC), Andréia Janaina de Mello que me ajudou dando auxílio no acompanhamento dos cães com cinomose.

À Residente da Universidade Estadual de Londrina (UEL), Jéssica Regina Moreira, por toda dedicação e auxílio na realização dos procedimentos de imuno-histoquímica.

Aos professores e residentes do Hospital Veterinário da UEL pela coleta das amostras utilizadas no trabalho.

“O tempo é muito lento para os que esperam, muito rápido para os que têm medo, muito longo para os que lamentam, muito curto para os que festejam, mas, para os que amam, o tempo é eterno.”

Shakespeare

LEÃO, P. F. M. **Avaliação imuno-histoquímica de astrócitos em cães naturalmente infectados pelo vírus da cinomose.** 2016. 36 f. Dissertação (Mestrado em Biociência Animal) - Faculdade de Medicina Veterinária, Universidade de Cuiabá, Cuiabá, 2016.

RESUMO

A cinomose canina é causada pelo vírus da cinomose (CDV) um *morbillivirus* da família Paramyxoviridae e corresponde a uma das principais doenças infecciosas dos cães. A doença resulta em elevada morbidade e mortalidade em cães e produz diferentes manifestações clínicas (neurológicas, respiratórias, gastrointestinais, oculares e cutâneas), e muitas vezes resulta na morte do animal afetado. Os astrócitos são células alongadas ou estreladas com processos que são distribuídos ao longo do SNC e são células alvo para CDV. O objetivo deste estudo foi avaliar a resposta astrocítica em cães naturalmente infectados por CDV e determinar a relação imuno-histoquímica entre a proliferação astrocítica e a resposta imunorreativa de astrócitos à proteína ácida fibrilar glial (GFAP). Um total de 26 cães com morte espontânea e diagnóstico clínico de cinomose, confirmados por biologia molecular, três cães sem manifestações clínicas de cinomose foram incluídos como controles negativos. O cerebelo de cada animal foi analisado para as lesões histopatológicas típicas associadas à infecção por CDV e depois utilizadas em ensaios imuno-histoquímicos (IHC), projetados para avaliar a possível relação entre a proliferação de astrócitos imunorreativos ao GFAP (GFAP +) e ao antígeno de CDV (CDV +). Dos 26 cães, 20 (80,8%) apresentaram encefalite desmielinizante aguda, 4 (11,5%) encefalite desmielinizante subaguda e 2 (7,7%) com encefalite desmielinizante crônica. Estatisticamente, não houve diferença ($P > 0,05$) entre o número médio de astrócitos GFAP-R e + CDV em cães com encefalite desmielinizante aguda e subaguda. As lesões histopatológicas sugestivas de encefalite moleta não foram observadas no cerebelo dos cães sem manifestação clínica da cinomose, e os antígenos de CDV não foram identificados no cerebelo desses cães. No entanto, houve diferença significativa ($P < 0,01$) pelo teste F entre o número médio de astrócitos GFAP + ($11,3 \pm 4,8$) e astrócitos CDV + ($5,6 \pm 3,9$) na encefalite demielinante crônica. Os resultados deste estudo mostraram que a manifestação aguda da cinomose neurológica é provavelmente a ocorrência mais frequente em populações normais de cães nas cidades brasileiras. Além disso, não houve diferença na proliferação astrocítica e astrócitos infectados nos estágios iniciais da cinomose neurológica; Enquanto havia mais astrócitos GFAP + em comparação com astrócitos infectados pelo CDV na fase crônica.

Palavras-chave: Astrócitos. Imuno-histoquímica. Neuropatologia. Proteína glial fibrilar ácida. Vírus da cinomose.

LEÃO, P. F. M. **Immunohistochemical evaluation of astrocytes in dogs naturally infected by canine distemper virus**. 2016. 36 f. Dissertation (Master Science in Animal Bioscience) - Faculty of Veterinary Medicine, University of Cuiaba, Cuiaba, 2016.

ABSTRACT

Canine distemper is caused by canine virus distemper (CDV) a *morbillivirus* of the Paramyxoviridae family, and corresponds to one of the major infectious diseases of dogs. The disease results in elevated morbidity and mortality in dogs, and produces different clinical manifestations (neurological, respiratory, gastrointestinal, ocular, and cutaneous), and often resulting in the death of the affected animal. Astrocytes are elongated or stellate cells with processes that are distributed throughout the CNS and are the target cell for CDV. The aim of this study was to evaluate the astrocytic response in dogs naturally infected by CDV and determine the immunohistochemical relationship between astrocytic proliferation and the immunoreactive response of astrocytes to glial fibrillary acidic protein (GFAP). A total of 26 dogs with spontaneous death and clinical diagnosis of distemper, confirmed by molecular biology; three dogs without clinical manifestations of distemper were included as negative controls. The cerebellum from each animal was analyzed for the typical histopathological lesions associated with infection by CDV and then used in immunohistochemical assays (IHC) designed to assess the possible relationship between proliferation of astrocytes immunoreactive to GFAP (GFAP+) and to the antigen of CDV (CDV +). Of the 26 dogs, 20 (80.8%) had acute demyelinating encephalitis, 4 (11.5%) subacute demyelinating encephalitis, and 2 (7.7%) with chronic demyelinating encephalitis. Statistically there was no difference ($P > 0.05$) between the average number of astrocyte GFAP-R and + CDV in dogs with acute and subacute demyelinating encephalitis. Histopathological lesions suggestive of distemper encephalitis were not observed in the cerebellum of the dogs without clinical manifestation of distemper, and antigens of CDV were not identified in the cerebellum of these dogs. However, there was significant difference ($P < 0.01$) by F test between the average number of GFAP+ astrocytes (11.3 ± 4.8) and CDV+ (5.6 ± 3.9) astrocytes in chronic demyleinating encephalitis. The results of this study showed that the acute manifestation of neurological distemper is probably the most frequently occurring in normal populations of dogs in Brazilian cities. Additionally, there was no difference in astrocytic proliferation and astrocytes infected in the early stages of neurological distemper; while there were more astrocytes GFAP+ compared to astrocytes infected by CDV in the chronic phase.

Keywords: Astrocytes. Immunohistochemistry. Neuropathology. Glial Fibrillary Acidic Protein. Canine Distemper Virus.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Comparação da imunorreatividade a proteína fibrilar ácida (GFAP) e o vírus da cinomose (CDV) em cães.....	29
--	----

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1 - Esquema ilustrativo da progressão da infecção sistêmica para a infecção nervosa na cinomose canina.....16
- Figura 2 - Marcação inumistoquímica da GFAP na substância branca do cerebelo de um cão com cinomose. Immunoperoxidase, barra=20 μ m..... 18
- Figura 3 - Cão, demonstração da proliferação de astrócitos imunoreativos ao vírus da cinomose na encefalite aguda. Immunoperoxidase, Barra, 50 μ m.....30
- Figura 4 - Cão, demonstração da proliferação de astrócitos imunorreativos ao vírus da cinomose na encefalite crônica. Immunoperoxidase, Barra= 50 μ m.30
- Figura 5 - Cão, demonstração normal do controle da proliferação de astrócitos imunorreativos ao vírus da cinomose. Immunoperoxidase, Barra=100 μ m.31
- Figura 6 - Cão, demonstração da proliferação de astrócitos com vacuolização da substância branca, imunorreativos ao vírus da cinomose na encefalite aguda. Immunoperoxidase, Barra, 50 μ m.31

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

CDV	Canine distemper vírus (vírus da cinomose canina)
RIFI	Reação de Imunofluorescência Indireta
SRD	Sem raça definida
LCR	Líquido cefalorraquidiano
PCR	reação em cadeia pela polimerase
RT-PCR	reação em cadeia pela polimerase precedida de transcrição reversa
SNC	Sistema nervoso central

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	13
2	REVISÃO DE LITERATURA.....	15
2.1	CINOMOSE EM CÃES	15
2.1.1	Formas Evolutivas e Transmissão do vírus da Cinomose.....	15
2.2	CÉLULAS ASTROCITÁRIA E SUA PARTICIPAÇÃO NA CINOMOSE NERVOSA	17
	REFERÊNCIAS	19
3	OBJETIVOS	22
3.1	OBJETIVO GERAL.....	22
3.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	22
4	ARTIGO 1 - IMUNORREATIVIDADE À PROTEÍNA GLIAL FIBRILAR ÁCIDA E O VIRUS DA CINOMOSE EM CASOS ESPONTÂNEOS DE ENCEFALITE INDUZIDA VÍRUS DA CINOMOSE	23
	RESUMO	24
	INTRODUÇÃO	26
	MATERIAL E MÉTODOS.....	27
	RESULTADOS	28
	CONCLUSÕES	32
	REFERÊNCIAS	33
5	CONCLUSÕES GERAIS.....	36

1 INTRODUÇÃO

A cinomose é uma doença multissistêmica viral, causada por um *Morbillivirus* da família Paramixoviridae, e representa a principal enfermidade infecciosa que acomete cães no Brasil e em outros países (SUMMERS; APPLE, 1994). A cinomose também acomete outros carnívoros, tais como raposas, lobos, furões, guaxinins, quatis e já tem descrição em alguns felinos silvestres (SUMMERS; APPLE, 1994). A doença apresenta alta morbidade e mortalidade, podendo causar diferentes alterações (oculares, respiratórias, gastrointestinais e dérmicas), o óbito dos animais se relaciona principalmente à infecção do sistema nervoso central (SNC) pelo vírus da cinomose CDV (SUMMERS; APPLE, 1994).

O CDV foi isolado pela primeira vez por Carré em 1905 (APPEL; SUMMERS, 1995), e é antigenicamente semelhante ao vírus da peste dos pequenos ruminantes, da peste bovina e do sarampo dos humanos. Atualmente o vírus provoca doenças em todos os membros da família Canidae, Procyonidae e Mustelidae, bem como nos grandes membros da família Felidae (LAMB; KOLAKOFSKY, 1996; MACLACHLAN; DUBOVI, 2011).

Várias formas de manifestações nervosas já foram descritas, essas geralmente são fatais, ocorrendo principalmente em animais jovens sendo, em muitos casos, complicadas por infecções secundárias de origem bacteriana (CHVALA et al., 2007; HEADLEY et al., 2009b). Frequentemente, existe a manifestação de outras doenças virais concomitantes (CHVALA et al., 2007; GABRIEL et al., 2008; HEADLEY; SAITO 2003), ou infecções secundárias de origem parasitária (HEADLEY et al., 2009b), rickettsíase (MORETTI et al., 2006) e protozoária por *Toxoplasma gondii* (MORETTI et al., 2006).

Estudos têm demonstrando que na maioria dos casos onde ocorre a infecção secundária, o animal infectado já sofria de imunodepressão induzida pelo CDV através da ligação do CD 150 (signaling lymphocyte activation molecule; SLAM) com a proteína H viral (BEINEKE et al., 2009). A molécula SLAM é expressa nas células tímicas imaturas, nas células T de memória, nas células dendríticas maduras e nos monócitos ativados (BEINEKE et al., 2009; MACLACHLAN; DUBOVI, 2011), e o CDV tem tropismo para essas células. Acredita-se que a destruição seletiva dessas células apresentadoras de SLAM pelo CDV seria o principal mecanismo de imunodepressão (BEINEKE et al., 2009; MACLACHLAN; DUBOVI, 2011).

Na cinomose, a desmielinização é acompanhada por hipertrofia astrocitária na substância branca (SUMMERS; APPEL, 1994), e às vezes, por sincícios astrocitários (SUMMERS et al., 1984). As inclusões intranucleares ou intracitoplasmáticas, características da infecção pelo CDV, são mais frequentemente encontradas em astrócitos do que qualquer outro tipo celular (APPEL, 1995; BRAUND, 1994; DUNGWORTH, 1993).

Os processos astrocitários são diretamente relacionados com outros componentes celulares e estruturais do sistema nervoso. Eles se encontram ao redor da bainha de mielina, os neurônios e seus processos, os nódulos de Ranvier e os vasos sanguíneos; promovem o desenvolvimento da glia limitante, e através dos espaços juncionais, produzem uma rede funcional desde o epêndima até a membrana pial facilitando a troca de moléculas nas células gliais (BIGNAMI; DAHL, 1994) histologicamente os astrócitos são classificados em astrócitos fibrosos e protoplasmáticos, sendo que o primeiro tipo é encontrado principalmente na substância branca e o outro com maior frequência na substância cinzenta (MONTGOMERY, 1994; ROOTS, 1986).

Na microscopia ótica os astrócitos protoplasmáticos são pouco corados apresentando núcleo ovóide a arredondado (MONTGOMERY, 1994) e com muitos prolongamentos ramificados (ROOTS, 1986), enquanto os fibrosos são lobulados com citoplasma escasso (MONTGOMERY, 1994) e processos estreitos, finos e pouco ramificados (ROOTS, 1986). Objetivo do trabalho foi avaliar a resposta astrocitária em cães naturalmente infectados pelo vírus da cinomose e determinar a relação imunohistoquímica entre a proliferação de astrócitos infectados pelo vírus e imunorreativos à proteína glial fibrilar ácida (GFAP) e vírus da cinomose (CDV).

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 CINOMOSE EM CÃES

Cinomose é uma doença viral altamente contagiosa que afeta o sistema respiratório, o sistema gastrointestinal e o sistema nervoso central (SNC). É causada pelo vírus da cinomose canina (canine distemper virus, CDV), um *Morbillivirus* da família Paramyxoviridae. Além dos cães domésticos, a cinomose já foi diagnosticado em outros carnívoros como dingos, raposas, furões, leões, leopardos, guepardos e tigres (SUMMERS; APPLE, 1994). O cão representa o principal reservatório para o vírus da cinomose e serve como fonte de infecção para os animais selvagens (SILVA et al. 2007).

Os *Morbillivirus* receberam esse nome do diminutivo “morbus”, que significa praga, e historicamente, o termo foi utilizado para diferenciar o sarampo da varíola e da escarlatina. Como um dos seis gêneros da família Paramyxoviridae, os *Morbillivirus* são responsáveis por várias doenças graves em humanos e animais (RIMA; DUPREX, 2006).

Os cães infectados pelo CDV desenvolvem sinais clínicos e lesões respiratórias, gastrintestinais, dermatológicas, oftalmológicas e neurológicas, que podem ocorrer sequencialmente, simultaneamente ou isoladamente (SILVIA et al., 2009).

Os sinais neurológicos mais comumente observados em cães com cinomose são: cegueira, convulsões, ataxias cerebelar, vestibular ou sensorial e mioclonias (VANDEVELDE; CACHIM, 1992). Estas mioclonias são constatadas mais comumente nos músculos faciais, mastigatórios e apendiculares e foram consideradas como sendo da cinomose (BRAUND, 1994). Vandeveld e Cachin (1992) mencionaram que ocorrem em 33% a 50% dos cães com encefalomielite por cinomose.

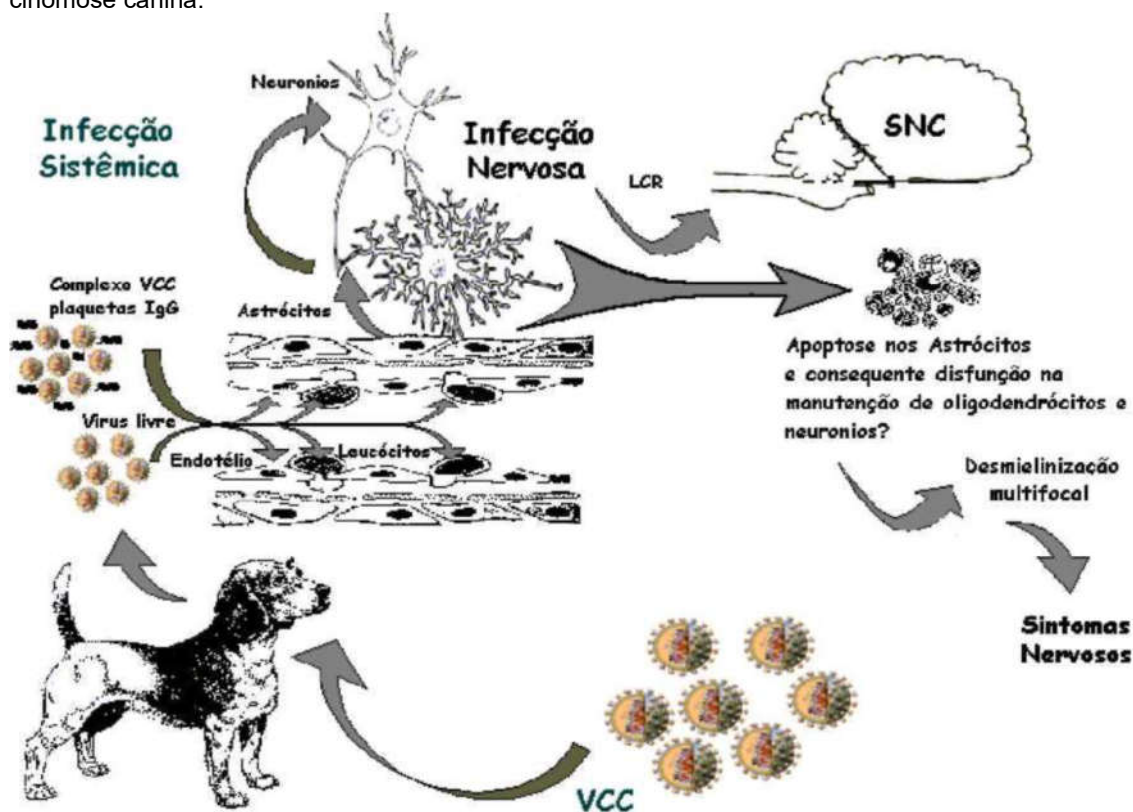
2.1.1 Formas Evolutivas e Transmissão do vírus da Cinomose

A transmissão da doença ocorre principalmente por aerossóis (microgotículas contaminadas com o vírus e que são eliminadas pelo trato respiratório dos animais infectados) e contato direto entre cães infectados e susceptíveis, no entanto, o vírus pode estar presente em todos os materiais biológicos dos animais doentes, o que

pode ser comprovado por sua habilidade em causar infecção sistêmica, contaminando virtualmente qualquer tecido ou fluidos/secreções corporais. A eliminação do vírus pode ocorrer por um período de até 3 meses após a infecção.

As infecções no sistema nervoso central decorrem de uma fraca resposta humoral. O vírus geralmente penetra pelo endotélio vascular das meninges (livre ou infectando leucócitos). O desenvolvimento das lesões neuronais varia e é decorrente de uma série de fatores, como idade imunocompetência, tempo de exposição e capacidade imunossupressora do vírus. Encefalite aguda da substância branca e cinza é um achado normal de cães jovens e imunossuprimidos. A infecção do vírus nos astrócitos e macrófagos está associado a desmielinização não inflamatória (MORO et al., 2004), como mostra na Figura 1.

Figura 1 - Esquema ilustrativo da progressão da infecção sistêmica para a infecção nervosa na cinomose canina.



Fonte: MORO et al. (2004).

2.2 CÉLULAS ASTROCITÁRIA E SUA PARTICIPAÇÃO NA CINOMOSE NERVOSA

Os astrócitos são células estreladas ou alongadas com processos que se encontram distribuídos pelo SNC e na medula espinhal, contribuindo de 25 a 50% com o volume total do tecido nervoso (MONTGOMERY, 1994). Esses são o segundo tipo celular mais frequentemente encontrado no SNC (PRIVAT et al., 1995). Os astrócitos são as células alvo na cinomose (WISNIEWSKI et al., 1972), sendo caracterizados pela expressão do filamento intermediário, proteína ácida fibrilar glial (GFAP) dentro do citoplasma. A resposta dos astrócitos a disfunção do SNC é melhor demonstrada nas avaliações imuno-histoquímica por aumento a expressão de GFAP, e pela proliferação de astrócitos (MONTGOMERY, 1994; HEADLEY et al., 2001).

Na figura 2 mostra que os astrócitos são células gliais mais abundantes no SNC, e constituem aproximadamente metade das células do cérebro humano, os astrócitos desempenham uma série de funções essenciais para a homeostase do SNC, incluindo manutenção dos níveis iônicos do meio extracelular, alterados com a descarga de potenciais de ação dos neurônios (GOMES, 2013).

Em virtude de suas relações com o sistema vascular, com os mastócitos ocorre a transferência de substâncias nutritivas para os neurônios (“pela movimentação de seus pés vasculares os astrócitos modulam a dilatação e constrição das arteríolas...”); ou seja, os astrócitos têm papel essencial na manutenção dos tónus vascular, através da síntese e secreção de uma série de moléculas vasoativas (ORSINI, 2007).

Estudos imuno-histoquímicos confirmam que entre 30% (VANDEVELDE et al., 1985) a 65% (MUTINELLI et al., 1988) dos astrócitos apresentam antígenos do vírus da cinomose. Além disso, um estudo constatou que as células GFAP+ contribuíram para 95% das células infectadas (MUTINELLI et al., 1988). Esse número elevado de astrócitos infectados na cinomose levou alguns autores a postular em que essas células estão envolvidas na patogenia da desmielinização observada nessa enfermidade (BOTTERON et al., 1992; GRIOT et al., 1989; MUTINELLI et al., 1988; VANDEVELDE et al., 1985).

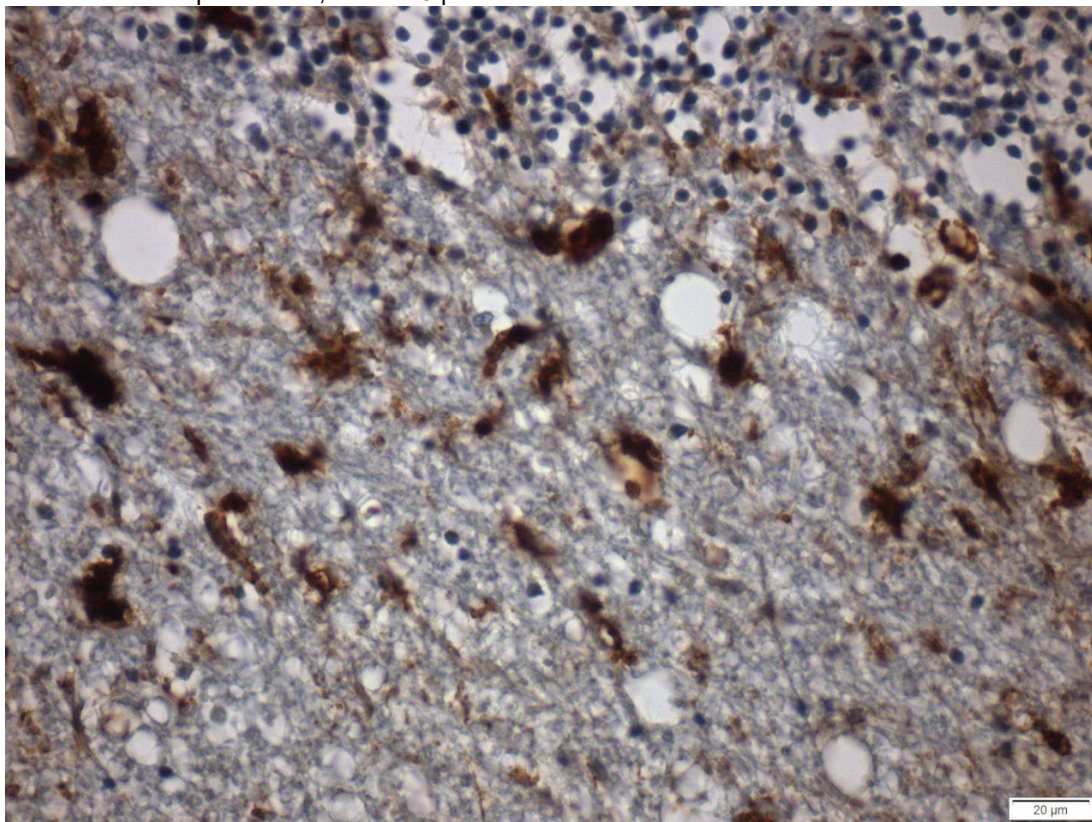
Uma classificação morfológica e imuno-histoquímica divide os astrócitos em duas categorias baseada na linhagem progenitora: astrócitos tipo I e tipo II. As células progenitoras dos astrócitos tipo I estão relacionadas com o desenvolvimento de células da linhagem astrocitária, enquanto as células do tipo II são derivadas de células progenitórias bi-potenciais que poderão desenvolver em astrócitos tipo II ou

em oligodendrócitos (MONTGOMERY, 1994; SUMMERS et al., 1994). Porém, numa maneira geral, os astrócitos tipo I são considerados análogos aos astrócitos protoplasmáticos, e os do tipo II como os astrócitos fibrosos (SUMMERS et al., 1994).

Os filamentos intermediários (as fibrilas gliais), são considerados mais proeminentes nos astrócitos fibrosos do que nos astrócitos protoplasmáticos (MONTGOMERY, 1994) e são divididos com base nas diferenças antigênicas e bioquímicas, em cinco subgrupos principais de proteínas: citoqueratina, desmina, vimentina, neurofilamento e a GFAP (KALNINS et al., 1986; BIGNAMI; DAHL, 1994).

Sendo assim, a GFAP é considerada como o marcador imunológico específico para os astrócitos em estudos de desenvolvimento embriológico, cultivo celular e na patologia (DAHL et al., 1986; KALNINS et al., 1986; ROOTS, 1986; BIGNAMI; DAHL, 1994; MONTGOMERY, 1994), por ter maior distribuição do que vimentina no sistema nervoso de adultos, associado ao fato que somente algumas células da glia e do nervo óptico são marcadas por anticorpos contra a vimentina (KALNINS et al., 1986; BONDAN et al., 1998). Assim, os astrócitos são considerados como sendo células GFAP positivas (GFAP+) (BIGNAMI; DAHL, 1994).

Figura 2 - Marcação inumistoquímica da GFAP na substância branca do cerebelo de um cão com cinomose. Imunoperoxidase, barra=20 µm.



REFERÊNCIAS

- APPEL, M. J. G.; SUMMERS, B. A. Pathogenicity of morbilliviruses for terrestrial carnivores. **Veterinary Microbiology**, v. 44, p. 187-91, 1995.
- BEINEKE, A. et al. Pathogenesis and immunopathology of systemic and nervous canine distemper. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 127, 1-18, 2009.
- BIGNAMI, A.; DAHL, D. D. **Glial cells in the central nervous system and their reaction to injury**. Austin: Landes, 1994. 109 p.
- BONDAN, E. et al., GFAP and vimentin coexpression on rat astrocytes following local ethidium bromide injection. In: XXII International Congress of the International Academy of Pathology and 13th World Congress of Academic and Environmental Pathology, 1998. Nice, France. **Procedure...** International Academy of Pathology, October 18-23, 1998, p. 1020.
- BOTTERON, C. et al., Canine distemper virus-immune complexos induce bystander degeneration of oligodendrocytes. **Acta Neuropathologica**, v. 83, p. 402-7, 1992.
- BRAUND, K. G. **Clinical syndromes in veterinary neurology**. 2. ed. St. Louis: Mosby, 1994. 477 p.
- CHAVAL, S. et al. Simultaneous canine distemper virus, canine adenovirus Type 2, and Mycoplasma cynos infection in a dog with pneumonia. **Veterinary Pathology**, v. 44, p. 508-12, 2007.
- DAHL, D.; BJÖRKLUND, H.; BIGNAMI, A. Immunological markers in astrocytes. In: FEDOROFF, S.; VERNADAKIS, A. (Eds). **Astrocytes: cell biology and pathology of astrocytes**. Orlando: Academic Press, 1986. v. 3. 472 p. p. 1-26.
- DUNGWORTH, D. L. The respiratory system. In: JUBB, K. V. F.; KENNEDY, P. C.; PALMER, N., (Eds). **Pathology of domestic animals**. 4. ed. San Diego: Academic Press, 1993. v. 2. cap. 6. p. 617-624.
- GABRIEL, A. L.; MASUDA, E. K.; RAMOS, A. T. Canine adenovirus type-2 and canine distemper virus pulmonary co-infection in two Chow-Chow puppies with Candida sp esophagitis. **Brazilian Journal of Veterinary Pathology**, v. 1, p. 45-7, 2008.
- GOMES, F. C. A.; TORTELLI, V. P.; DINIZ, L. Glia: dos velhos conceitos às novas funções de hoje e as que ainda virão. **Estudos Avançados**, v. 27, n. 77, 2013.
- GRIOT, C. et al. Antibody-induced generation of reactive oxygen radicals by brain macrophages in canine distemper encephalitis: a mechanism for bystander demyelination. **Acta Neuropathologica**, v. 78, p. 396-403, 1989.
- HEADLEY, S. A. et al. Diagnostic exercise: Tyzzer's disease, distemper, and coccidiosis in a pup. **Veterinary Pathology**, v. 46, p. 151-4, 2009b.
- HEADLEY, S. A.; SAITO, T. B. Simultaneous canine distemper encephalitis and

canine parvovirus infection with distemper-associated cardiac necrosis in a pup. **Ciência Rural**, v. 33, p. 1149-51, 2003.

HEADLEY, S. A.; SOARES, I. C.; GRAÇA, D. L. Glial fibrillary acidic protein (GFAP)-immunoreactive astrocytes in dogs infected with canine distemper virus. **Journal of Comparative Pathology**, v. 125, p. 90-7, 2001.

KALNINS, V. I.; SUBRAHMANYAN, L.; OPAS, M. The cytoskeleton. In: FEDOROFF, S.; VERNADAKIS, A. *Astrocytes: cell biology and pathology of astrocytes*. Orlando: Academic Press, 1986. p. 472, p. 27-60.

LAMB, R. A.; KOLAKOFSKY, D. Paramyxoviridae: the viruses and their replication. In: FIELDS, D. M. et al. **Fields Virology**. 3. ed, Philadelphia: Lippincott-Raven, 1996. v. 1. cap. 40. p. 1177-204.

MACLACHAN, N. J., DUBOVI, E. J. **Paramyxoviridae**: fenner's veterinary virology. 4. ed. Academic Press, San Diego, California, pp. 299-325, 2011.

MONTGOMERY, D. L. Astrocytes: form, functions, and roles in disease. **Veterinary Pathology**, v. 31, p. 145-67, 1994.

MORETTI, L. A.; SILVA, A. V.; RIBEIRO, M. G. Toxoplasma gondii genotyping in a dog co-infected with distemper virus and ehrlichiosis rickettsia. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 48, p. 359-63, 2006.

MORO, L. Apoptose na desmielinização da cinomose canina (revisão de literatura). **Journal of Biosciences**, v. 20, n. 2, p. 171-8, 2004.

MUTINELLI, F. et al. Astrocytic infection in canine distemper virus-induced demyelination. **Acta Neuropathologica**, v. 77, p. 333-5, 1988.

ORSINI, H. et al. Marcação imunoistoquímica da expressão astrocitária de proteína glial fibrilar ácida e de vimentina no sistema nervoso central de cães com cinomose. **Arquivos de Neuro-Psiquiatria**, v. 65, n. 4-A, p. 1070-7, 2007.

PRIVAT, A.; GIMENEZ-RIBOTTA, M.; RIDET, J. L. **Morphology of astrocytes**. In: KETTENMANN, H.; RANSON, B. R. (eds). **Neuroglia**, 1995. New York: Oxford University Press. p. 3-43.

RIMA, B. K.; DUPREX, W. P. Morbilivirus and human disease. **Journal of Pathology**, v. 208, p. 199-214, 2006.

ROOTS, B. I. Phylogenetic development of astrocytes. In: FEDOROFF, S., VERNADAKIS, A. (Eds.). **Astrocytes**: development, morphology, and regional specialization of astrocytes. Orlando: Academic Press, 1986, p. 1-27, v. 1.

SILVA, M. C. et al. Aspectos clinicopatológicos de 620 casos neurológicos de cinomose em cães. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 27, n. 5, p. 215-220, maio 2007.

SILVA, M. C. et al. Neuropatologia da cinomose canina: 70 casos (2005-2008). **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 29, n. 8, p. 643-52, 2009.

SUMMERS, B. A.; APPEL, M. J. G. Aspects of canine distemper virus and measles virus encephalomyelitis. **Neuropathol Applied Neurobiology**, v. 20, p. 525-34, 1994.

SUMMERS, B. A.; GREISEN, H. A.; APPEL, M. J. G. Canine distemper encephalomyelitis: variation with virus strain. **Journal of Comparative Pathology**, v. 94, p. 65-75, 1984.

VANDEVELDE, M. et al. Canine distemper virus does not infect oligodendrocytes in vitro. **Journal of the Neurological Sciences**, v. 69, p. 133-7, 1985.

VANDEVELDE, M., CACHIN, M. The neurological form of canine distemper. In: KIRK, R.W., BONAGURA, J.D. Current veterinary therapy XI. **Small animal practice**. Philadelphia: Saunders, 1992. p. 1003-7.

WISNIEWSKI, H.; COBLENTZ, J. M.; TERRY, R. D. Pick's disease. A clinical and ultrastructural study. **Archives of neurology**, v. 26, p. 97-108, 1972.

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar a resposta astrocitária em cães naturalmente infectados pelo vírus da cinomose.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Determinar a relação imuno-histoquímica entre a proliferação de astrócitos infectados pelo vírus e imunorreativos à proteína glial fibrilar ácida (GFAP).
- Descrever o padrão de lesão histopatológica observada em cães naturalmente infectados pelo vírus da cinomose (CDV).

**4 ARTIGO 1 - IMUNORREATIVIDADE À PROTEÍNA GLIAL FIBRILAR ÁCIDA E O
VÍRUS DA CINOMOSE EM CASOS ESPONTÂNEOS DE ENCEFALITE INDUZIDA
VÍRUS DA CINOMOSE**

IMUNORREATIVIDADE À PROTEÍNA GLIAL FIBRILAR ÁCIDA E O VIRUS DA CINOMOSE EM CASOS ESPONTÂNEOS DE ENCEFALITE INDUZIDA VÍRUS DA CINOMOSE

Immunoreactivity of mature astrocytes to glial fibrillary acidic protein and canine distemper virus in spontaneous distemper encephalitis

Priscila Ferreira Melo LEÃO
Selwyn Arlington HEADLEY

RESUMO

A cinomose canina é causada pelo vírus da cinomose (CDV) um *morbillivirus* da família Paramyxoviridae e corresponde a uma das principais doenças infecciosas dos cães. A doença resulta em elevada morbidade e mortalidade em cães e produz diferentes manifestações clínicas (neurológicas, respiratórias, gastrointestinais, oculares e cutâneas), e muitas vezes resulta na morte do animal afetado. Os astrócitos são células alongadas ou estreladas com processos que são distribuídos ao longo do SNC e são células alvo para CDV. O objetivo deste estudo foi avaliar a resposta astrocítica em cães naturalmente infectados por CDV e determinar a relação imuno-histoquímica entre a proliferação astrocítica e a resposta imunorreativa de astrócitos à proteína ácida fibrilar glial (GFAP). Um total de 26 cães com morte espontânea e diagnóstico clínico de cinomose, confirmados por biologia molecular, três cães sem manifestações clínicas de cinomose foram incluídos como controles negativos. O cerebelo de cada animal foi analisado para as lesões histopatológicas típicas associadas à infecção por CDV e depois utilizadas em ensaios imuno-histoquímicos (IHC), projetados para avaliar a possível relação entre a proliferação de astrócitos imunorreativos ao GFAP (GFAP +) e ao antígeno de CDV (CDV +). Dos 26 cães, 20 (80,8%) apresentaram encefalite desmielinizante aguda, 4 (11,5%) encefalite desmielinizante subaguda e 2 (7,7%) com encefalite desmielinizante crônica. Estatisticamente, não houve diferença ($P > 0,05$) entre o número médio de astrócitos GFAP-R e + CDV em cães com encefalite desmielinizante aguda e subaguda. As lesões histopatológicas sugestivas de encefalite moleta não foram observadas no cerebelo dos cães sem manifestação clínica da cinomose, e os antígenos de CDV não foram identificados no cerebelo desses cães. No entanto, houve diferença significativa ($P < 0,01$) pelo teste F entre o número médio de astrócitos GFAP + ($11,3 \pm 4,8$) e astrócitos CDV + ($5,6 \pm 3,9$) na encefalite demileinante crônica. Os resultados deste estudo mostraram que a manifestação aguda da cinomose neurológica é provavelmente a ocorrência mais freqüente em populações normais de cães nas cidades brasileiras. Além disso, não houve diferença na proliferação astrocítica e astrócitos infectados nos estágios iniciais da cinomose neurológica; Enquanto havia mais astrócitos GFAP + em comparação com astrócitos infectados pelo CDV na fase crônica.

Palavras - Chave: Astrócitos. Imuno-histoquímica. Neuropatologia. Proteína glial fibrilar ácida. Vírus da cinomose

ABSTRACT

Canine distemper is caused by canine virus distemper (CDV) a *morbillivirus* of the Paramyxoviridae family, and corresponds to one of the major infectious diseases of dogs. The disease results in elevated morbidity and mortality in dogs, and produces

different clinical manifestations (neurological, respiratory, gastrointestinal, ocular, and cutaneous), and often resulting in the death of the affected animal. Astrocytes are elongated or stellate cells with processes that are distributed throughout the CNS and are the target cell for CDV. The aim of this study was to evaluate the astrocytic response in dogs naturally infected by CDV and determine the immunohistochemical relationship between astrocytic proliferation and the immunoreactive response of astrocytes to glial fibrillary acidic protein (GFAP). A total of 26 dogs with spontaneous death and clinical diagnosis of distemper, confirmed by molecular biology; three dogs without clinical manifestations of distemper were included as negative controls. The cerebellum from each animal was analyzed for the typical histopathological lesions associated with infection by CDV and then used in immunohistochemical assays (IHC) designed to assess the possible relationship between proliferation of astrocytes immunoreactive to GFAP (GFAP+) and to the antigen of CDV (CDV +). Of the 26 dogs, 20 (80.8%) had acute demyelinating encephalitis, 4 (11.5%) subacute demyelinating encephalitis, and 2 (7.7%) with chronic demyelinating encephalitis. Statistically there was no difference ($P > 0.05$) between the average number of astrocyte GFAP-R and + CDV in dogs with acute and subacute demyelinating encephalitis. Histopathological lesions suggestive of distemper encephalitis were not observed in the cerebellum of the dogs without clinical manifestation of distemper, and antigens of CDV were not identified in the cerebellum of these dogs. However, there was significant difference ($P < 0.01$) by F test between the average number of GFAP+ astrocytes (11.3 ± 4.8) and CDV+ (5.6 ± 3.9) astrocytes in chronic demyleinating encephalitis. The results of this study showed that the acute manifestation of neurological distemper is probably the most frequently occurring in normal populations of dogs in Brazilian cities. Additionally, there was no difference in astrocytic proliferation and astrocytes infected in the early stages of neurological distemper; while there were more astrocytes GFAP+ compared to astrocytes infected by CDV in the chronic phase.

Key words: astrocytes; immunohistochemistry; neuropathology; glial fibrillary acidic protein; canine distemper virus.

INTRODUÇÃO

A cinomose é uma doença multissistêmica viral, causada por um *Morbillivirus* da família Paramixoviridae, e representa a principal enfermidade infecciosa que acomete cães no Brasil e em vários outros países (SUMMERS; APPLE, 1994). A cinomose também acomete outros carnívoros, tais como raposas, lobos, furões, guaxinins, quatis e já tem descrição em alguns felinos silvestres (Summers & Apple, 1994). A doença apresenta alta morbidade e mortalidade, podendo causar diferentes alterações (oculares, respiratórias, gastrointestinais e dérmicas), o óbito dos animais se relaciona principalmente à infecção do sistema nervoso central (SNC) pelo vírus da cinomose, CDV (SUMMERS; APPLE, 1994).

O CDV produz aguda a encefalite desmielinizante crônica em cães e outros carnívoros (HEADLEY, 2012). CDV é um vírus mais frequente e importante do cão (DUNGWORTH, 1993), e é o principal agente infeccioso responsável pela morte de cães mantidos em algumas ur no Brasil (HEADLEY; GRAÇA, 2000).

CDV afeta o sistema nervoso, replica em neurônios e células gliais da matéria branca durante um período de imunossupressão (VANDEVELDE, 1995). A desmielinização ocorre em áreas infectadas na ausência de inflamação. O mecanismo de desmielinização é aparente porque não há evidência de ultra-estrutural da replicação viral nos oligodendrócitos (VANDEVELDE, 1995).

Os astrócitos são considerados como células alvo do vírus da cinomose (SEEHUSEN, 2007), e são reconhecidos na imuno-histoquímica através da imunorreatividade à proteína glial fibrilar ácida (GFAP), que é o filamento intermediário principal nos astrócitos maduros (Montgomery, 1994). Adicionalmente, os astrócitos imaturos são preferencialmente imunorreativos a vimentina (SEEHUSEN, 2007), e a transição de imunorreatividade à GFAP ocorre durante mielinização (Summers et al. 1995).

Estudos imunohistoquímicos demonstraram que entre 30% (VANDEVELDE et al., 1985) e 65% (MUTINELLI et al., 1988) dos astrócitos apresentam antígenos do vírus da cinomose.

Dentro das lesões agudas e sub agudas, a resposta astrocitária foi principalmente composto de GFAP e células CDV positivos. Em contraste os astrócitos estavam presentes em lesões avançadas (crônicas), o que representou o principal tipo de células portadores do agente patogénico, indicando susceptibilidade das células gliais durante a progressão da doença (SEEHUSEN, 2007).

O p75NTR é um marcador protótipo de células de Schwann imaturos, esta constatação sugere que a remielinização por células de Schwann pode representar um mecanismo endógeno até agora subestimado da regeneração do tecido nervoso, embora essa hipótese ainda precisa ser comprovada (LEMPP, 2014). Objetivo do trabalho foi avaliar a resposta astrocitária em cães naturalmente infectados pelo vírus da cinomose e determinar a relação imuno-histoquímica entre a proliferação de astrócitos infectados pelo vírus e imunorreativos à GFAP e CDV.

MATERIAL E MÉTODOS

Foram utilizados cães necropsiados do Hospital Veterinário, Universidade Estadual de Londrina, entre eles foram selecionados 26 animais, sendo todos diagnosticados com cinomose. O método de inclusão dos casos neste estudo foi a presença do vírus da cinomose no animal, sendo que quando o animal dava entrada no hospital com a doença de cinomose, era feito um exame confirmatório para o vírus da cinomose, com isso levando-se às lesões patológicas no SNC que se caracteriza pela infecção pelo VCC (SILVA, 2009).

Local de estudo, animais, e critério de inclusão

Foram utilizados cães, de raças, sexos e idades diferentes, necropsiados no Hospital Veterinário, Universidade Estadual de Londrina, com manifestações clínicas sugestivas de encefalite por CDV (AMUDE, 2007), e confirmados pela detecção do RNA do CDV através da feita a partir de fragmentos do tecido nervoso. Somente fragmentos do cerebelo foram utilizados. Todos esses animais foram eutanisados ou morrem espontaneamente, e os seus proprietários concordaram para a utilização desses em estudos. Vinte seis cães foram selecionados; os fragmentos de cerebelos de três cães, sem manifestação clínica de cinomose ou de qualquer doença neurológica, foram utilizados como controles negativos.

Análises histopatológico e imuno-histoquímica (IHQ)

O padrão histopatológico encontrado a partir da avaliação histopatológica dos cerebelos de cada animal foi observado e descrito. Posteriormente, esses dados foram tabulados, analisados estatisticamente e classificados nos tipos de encefalite associada a CDV (VANDEVELDE et al., 1981; HEADLEY et al., 2001). Essa classificação incluiu encefalite aguda (desmielinização com pequenos manguitos

perivasculares e infiltrado de células inflamatórias, e discreta astrogliose), encefalite desmielinizante subaguda (desmielinização com pequenos manguitos perivasculares formados por duas a três camadas de células mononucleares, moderada astrogliose e astrocitose), e encefalite desmielinizante crônica (desmielinização com manguitos formados por extensas camadas de células mononucleares, moderada a acentuada astrogliose e astrocitose com infiltrado de macrófagos).

Duas avaliações de IHQ foram realizadas em cada fragmento cerebelar dos animais. Uma para avaliar a imunorreatividade da proteína N do CDV (VMRD, Washington, USA) e a outra para detectar a presença de GFAP (VMRD, Washington, USA), utilizando protocolos já existentes (HEADLEY et al. 2001; HEADLEY; SUKURA, 2009).

Controles positivos consistiram de secções cerebelares de cães com diagnóstico IHQ de CDV de outros estudos (HEADLEY et al., 2009). Três cães sem manifestação clínica, histopatológica ou outras alterações neurológicas foram usados como controles negativos.

Interpretação imuno-histoquímica

Com a microscopia de luz, os astrócitos imunorreativos à GFAP (GFAP+) e CDV (CDV+) foram identificados na substância branca do cerebelo de cada animal. Dez campos do cerebelo de cada animal foram escolhidos aleatoriamente, analisados e a média do número de astrócitos imunorreativos aos dois antígenos foi obtido. As informações obtidas foram utilizadas para comparar as diferenças em números médios de astrócitos imunorreativos ao CDV e GFAP.

Análise estatística

Os resultados obtidos foram tabulados e analisados estatisticamente, utilizando as médias das variáveis estudadas e foram comparadas utilizando o Teste F.

RESULTADOS

Caracterização histopatológica das alterações neurológicas

Dos 26 cães com manifestação clínica de infecção pelo CDV utilizados nesse estudo, 80,8% (20/26) foram caracterizadas por encefalite aguda associada a CDV, 7,7%(2/26) demonstraram a lesão característica de encefalite subaguda e em 11,5% (4/26) havia a encefalite crônica por CDV (Tabela 1). Adicionalmente, não foram

observadas manifestações de alguma alteração neurológica no encéfalo dos três cães sem manifestação clínica de doença neurológica.

Imunorreatividade à GFAP e CDV

As células GFAP+ e CDV+, foram facilmente identificadas pela sua coloração citoplasmática marrom intensa, sendo observadas mais frequentemente dentro da substância branca do que nas camadas granular e moleculares da matéria cinzenta. Não houve diferença estatisticamente significativa entre os astrócitos GFAP+ e CDV+ ($p > 0,05$) nos animais com encefalite desmielinizante aguda e subaguda. No entanto, havia menos astrócitos imunorreativos a GFAP e CDV na fase crônica da doença com os animais com encefalite aguda e subaguda induzida por CDV (Tabela 1).

Tabela 1 - Comparação da imunorreatividade a proteína fibrilar ácida (GFAP) e o vírus da cinomose (CDV) em cães.

# Cães	Tipo de encefalite	Imunorreatividade	
		GFAP	CDV
20	Encefalite desmielinizante aguda	15,9 ± 7,7 ^a	16,7 ± 12,5 ^a
4	Encefalite desmielinizante subaguda	19,6 ± 6,5 ^a	22,4 ± 10,1 ^a
2	Encefalite desmielinizante crônica	11,3 ± 4,8 ^b	5,6 ± 3,9 ^b

Letras minúsculas diferentes na mesma coluna são significativa ($p < 0,01$) pelo teste F.

Figura 3 - Cão, demonstração da proliferação de astrócitos imunoreativos ao vírus da cinomose na encefalite aguda. Imunoperoxidase, Barra, 50µm.

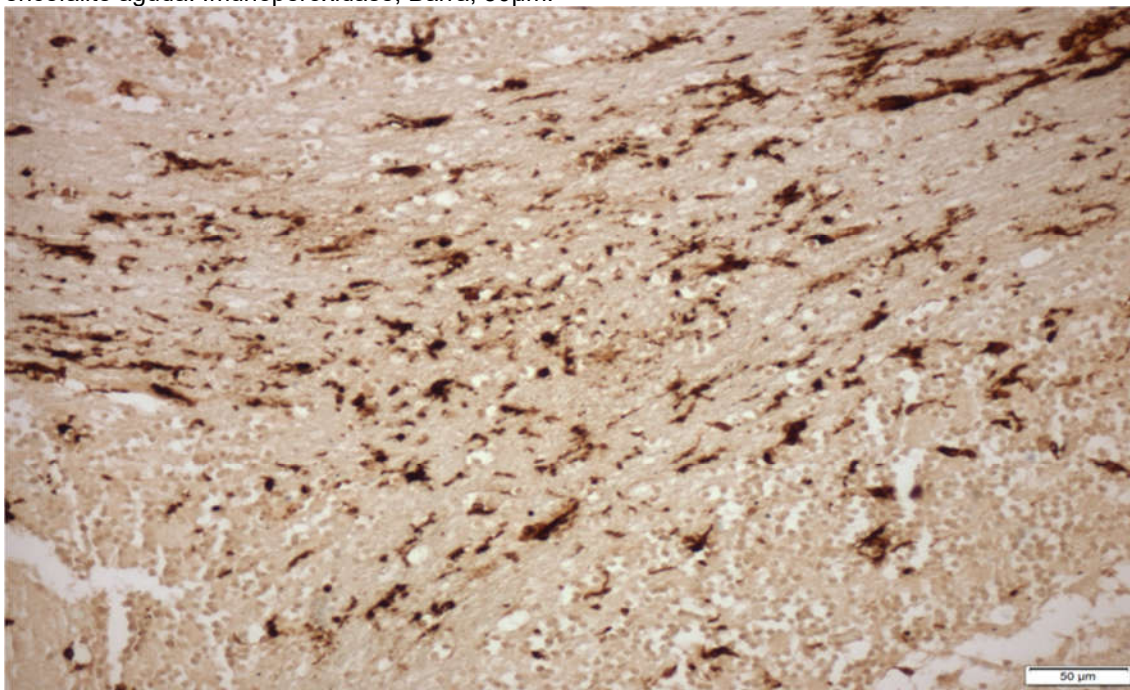


Figura 4 - Cão, demonstração da proliferação de astrócitos imunoreativos ao vírus da cinomose na encefalite crônica. Imunoperoxidase, Barra= 50µm.

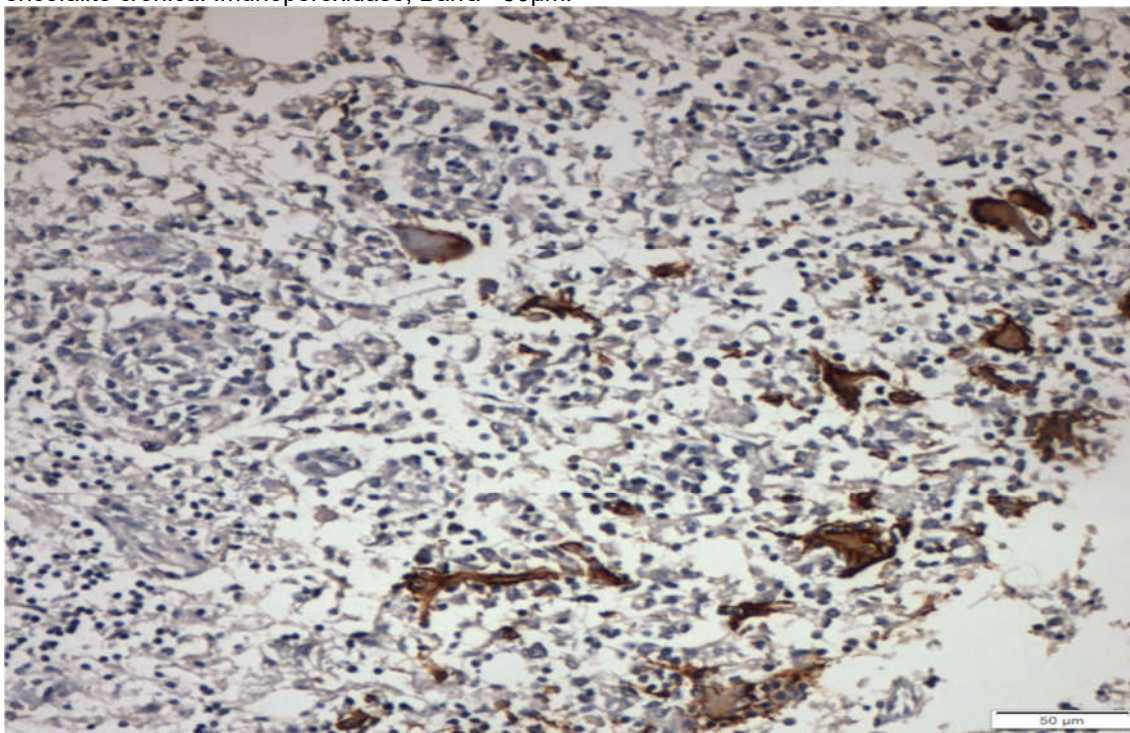


Figura 5 - Cão, demonstraco normal do controle da proliferao de astrócitos imunorreativos ao vírus da cinomose. Imunoperoxidase, Barra=100µm.

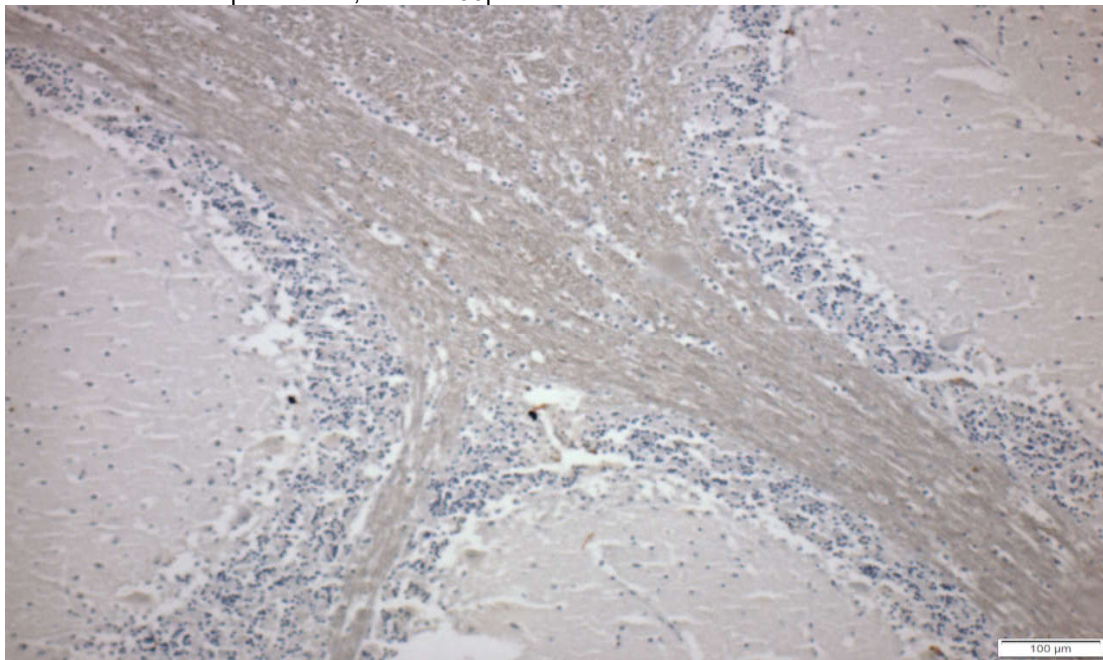
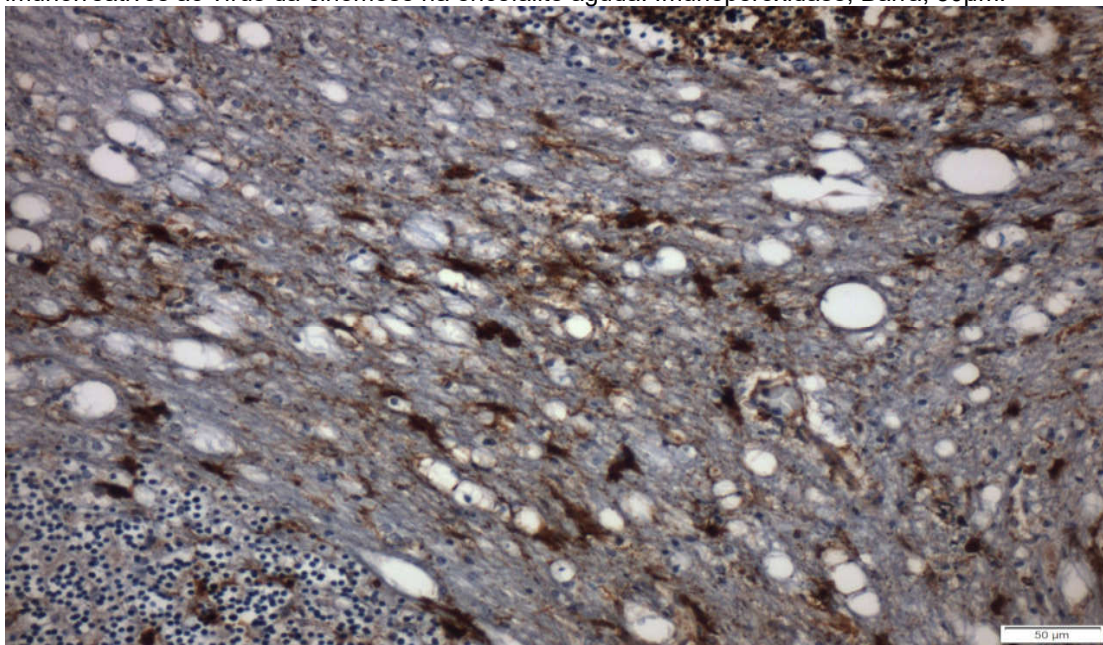


Figura 6 - Cão, demonstraco da proliferao de astrócitos com vacuolizao da substância branca, imunorreativos ao vírus da cinomose na encefalite aguda. Imunoperoxidase, Barra, 50µm.



CONCLUSÕES

No presente estudo, os casos de desmielinização agudas e subaguda apresentaram maior ($p < 0,05$) número médio de astrócitos imunorreativos ao GFAP em relação a fase crônica. Sabe-se que na fase crônica existe uma resposta exuberante pelos astrócitos; porém recentemente foi demonstrado que os astrócitos na fase crônica da cinomose perdem o grau máximo de diferenciação celular, tornam-se mais imaturos e deixam de expressar a proteína glial GFAP, passando a expressar um novo filamento glial chamado de vimentina (SEEHUSEN et al., 2007). Isso pode ter contribuído para uma menor marcação por GFAP nessa fase, mesmo sabendo do papel dos astrócitos reativos na fase crônica.

Devido à grande variação dos sinais neurológicos no início da infecção pelo CDV, houve a correlação clínico patológico (MUTINELLI, 1988), o nosso estudo foi avaliar a resposta morfológica e a distribuição dos astrócitos na desmielinização do SNC na cinomose. Sendo que às lesões do SNC ocorre um aumento na expressão astrocitária de GFAP, presente nos astrócitos apenas durante os períodos embrionário e pós-natal, podendo voltar a sua expressão (TAKAMIYA, 1988; PIXLEY, 1984). A resposta dos astrócitos a disfunção do sistema nervoso é melhor demonstrada e avaliados imuno-histoquimicamente por um aumento na expressão de GFAP, hipertrofia de astrócitos e proliferação de astrócitos restrita (HEADLEY, 2001).

Não houve diferença significativa ($p > 0,05$) entre as células que expressaram imunoreatividade ao GFAP e CDV, nas fases agudas e sub-agudas respectivamente. Contudo houve diferença ($p < 0,01$) entre os respectivos marcadores na fase crônica, sendo observando menor número de células imunorreativas ao CDV. Esse achado pode vir de encontro com resultados demonstrados previamente que nas fases crônicas a carga viral diminui no tecido nervoso, pois o vírus pode ser limpo das placas desmielinizantes pela resposta imunopatológica, embora o vírus possa ser encontrado persistindo em células nervosas na periferia desses sítios inflamados (VANDELVELDE et al., 1985; BAUMGUARTNER et al., 1989; LEMPP et al., 2014).

Essa diferença entre a imunoreatividade a marcadores gliais, no caso o GFAP, e a imunoreatividade a proteínas do CDV, poderia ainda ser maior se fosse realizado uma dupla marcação para células gliais, como por exemplo, avaliando também a imunoreatividade a vimentina, já que os astrócitos na fase crônica da cinomose diminuem a expressão da proteína glial GFAP e passam a expressar a vimentina - um filamento glial inicialmente produzido pelos astrócitos imaturos do tecido nervoso

embrionário que deixa de ser expresso durante o processo de diferenciação celular (SEEHUSEN et al., 2007).

A ocorrência de números elevados de astrócitos em casos agudos e subagudos pela cinomose pode ser explicada pela maior preservação da matéria branca em alguns casos (HEADLEY, 2001). A reação dos astrócitos nas lesões do SNC é variável, no entanto, são consideradas alterações precoces, que se tornam menos pronunciadas como doenças graves (MONTGOMERY, 1994; SUMMERS et al., 1994). Isto se explica o elevado número de astrócitos observados nas lesões agudas e, em certa medida nas lesões subagudas neste estudo.

Em resumo, este estudo demonstrou que a resposta dos astrócitos em encefalite induzida pelo CVV variou com o padrão de lesão histopatológica, indicando que os astrócitos participaram activamente na encefalite desmielinizante da cinomose. Adicionalmente, foi demonstrado que nas lesões crônicas com os marcadores GFAP e CDV obtiveram valores significativo, e que para as lesões agudas e subagudas houveram resultados não significativos.

REFERÊNCIAS

AMUDE, A. M.; ALFIERI, A. A., ALFIERI, A. F. Clinicopathological findings in dogs with distemper encephalomyelitis presented without characteristic signs of the disease. **Research in Veterinary Science**, v. 82, n. 3, p. 416-22, Jun. 2007.

APPEL, M. J. G.; SUMMERS, B. A. Pathogenicity of morbilliviruses for terrestrial carnivores. **Veterinary Microbiology**, v. 44, p. 187-91, 1995.

BIGNAMI, A.; DAHL, D. D. **Glial cells in the central nervous system and their reaction to injury**. Austin: Landes, 1994. p. 109.

BRAUND, K. G. **Clinical syndromes in veterinary neurology**. 2. ed. St. Louis: Mosby, 1994. p. 477.

DUNGWORTH, D. L. The respiratory system. In: JUBB, K. V. F.; KENNEDY, P. C.; PALMER, N. (Eds). **Pathology of domestic animals**. 4. ed. San Diego: Academic Press 1993. v. 2. cap. 6. p. 617-24.

FIGHERA, R. A. et al. Causas de morte e razões para eutanásia de cães da Mesoregião do Centro Ocidental Rio-Grandense (1965-2004). **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 28, p. 223-30, 2008.

HEADLEY, S. A. et al. Epidemiological features and the neuropathological manifestations of canine distemper virus-induced infections in Brazil: a review. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 33, n. 5, p. 1945-78, Set./Out. 2012.

- HEADLEY, S. A.; GRAÇA, D. L. Canine distemper: epidemiological findings of 250 cases. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, v. 3, p. 136-40, 2000.
- HEADLEY, S. A.; SOARES, I. C.; GRAÇA, D. L. Glial fibrillary acidic protein (GFAP)-immunoreactive astrocytes in dogs infected with canine distemper virus. **Journal of Pathology**, v. 125, p. 90-7, 2001.
- HEADLEY, S. A.; SUKURA, A. Naturally occurring systemic canine distemper virus infection in a pup. **Brazilian Journal of Veterinary Pathology**, v. 2, p. 95-101, 2009.
- LEMPP, C. et al. New Aspects of the Pathogenesis of Canine Distemper Leukoencephalitis. **Viruses**, v. 6, p. 2571-2601, 2014.
- MONTGOMERY, D. L. Astrocytes: form, functions, and roles in disease. **Veterinary Pathology**, v. 31, p. 145-67, 1994.
- MUTINELLI, F. et al. Astrocytic infection in canine distemper virus-induced demyelination. **Acta Neuropathologica**, v. 77, p. 333-5, 1988.
- ORSINI, H. et al. Marcação imunoistoquímica da expressão astrocitária de proteína glial fibrilar ácida e de vimentina no sistema nervoso central de cães com cinomose. **Arquivo Neuropsiquiatria**, v. 65, n. 4-A, p. 1070-7, 2007.
- PIXLEY SK, DE VELLIS J. Transition between radial glia and mature astrocytes studied with a monoclonal antibody to vimentin. **Dev Brain Res.**, v. 15, p. 201-9, 1984.
- ROOTS, B. I. Phylogenetic development of astrocytes. In: FEDOROFF, S., VERNADAKIS, A. (Eds.). **Astrocytes: development, morphology, and regional specialization of astrocytes**. Orlando: Academic Press, 1986. p. 1-27. v. 1.
- SEEHUSEN, F. et al. **Vimentin-positive astrocytes in canine distemper: a target for canine distemper virus especially in chronic demyelinating lesions?** Outubro/2007.
- SILVA, M. C. et al. Neuropatologia da cinomose canina: 70 casos (2005-2008). **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 29, n. 8, p. 643-52, 2009.
- SUMMERS, B.A., APPEL., M.J.G. Aspects of canine distemper virus and measles virus encephalomyelitis. **Neuropathol Applied Neurobiology**, v. 20, p. 525-34, 1994.
- TAKAMIYA, Y. et al. Immuno-histochemical studies on the proliferation of reactive astrocytes and the expression of cytoskeletal proteins following brain injury. **Dev Brain Res.**, v. 38, p. 201-10, 1988.
- TIPOLD, A.; VANDEVELDE, M.; JAGGY, A. Neurological manifestations of canine distemper virus infection. **Journal of Small Animal Practice**, v. 33, n. 10, p. 466-70, 1992.
- VANDEVELDE M, ZURBRIGGEN A. Demyelination in canine distemper virus infection: a review. **Acta Neuropathol.**, v. 109, p. 56-68, 2005.

VANDEVELDE M. , ZURBRIGGEN A. , The neurobiology of canine distemper virus infection. **Veterinary Microbiology**, v. 44, p. 271-80, 1995.

VANDEVELDE, M. et al. Canine distemper virus does not infect oligodendrocytes in vitro. **Journal of the Neurological Sciences**, v. 69, p. 133-7, 1985.

WISNIEWSKI, H.; COBLENTZ, J. M.; TERRY, R. D. Pick's disease. A clinical and ultrastructural study. **Archives of neurology**, v. 26, p. 97-108, 1972.

5 CONCLUSÕES GERAIS

Concluimos nesse estudo que a manifestação aguda da cinomose neurológica provavelmente seja a forma mais frequentemente encontrada em populações normais de cães nas cidades brasileiras. Adicionalmente, não havia diferença na proliferação astrocitária e astrócitos infectados nas fases iniciais da cinomose neurológica; enquanto havia mais astrócitos GFAP-R em relação a astrócitos infectados pelo CDV na fase crônica.