

UNIVERSIDADE PAULISTA – UNIP

***MARCAÇÃO IMUNOISTOQUÍMICA DA RESPOSTA
ASTROCITÁRIA DE EXPRESSÃO DE GFAP
(PROTEÍNA GLIAL FIBRILAR ÁCIDA E DE
VIMENTINA NO SISTEMA NERVOSO CENTRAL DE
CÃES COM CINOMOSE***

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária da Universidade Paulista – UNIP para a obtenção do título de mestre em Medicina Veterinária.

HELOÍSA ORSINI DE SOUZA

**SÃO PAULO
2006**

Livros Grátis

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

UNIVERSIDADE PAULISTA – UNIP

***MARCAÇÃO IMUNOISTOQUÍMICA DA RESPOSTA
ASTROCITÁRIA DE EXPRESSÃO DE GFAP
(PROTEÍNA GLIAL FIBRILAR ÁCIDA E DE
VIMENTINA NO SISTEMA NERVOSO CENTRAL DE
CÃES COM CINOMOSE***

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária da Universidade Paulista – UNIP para a obtenção do título de mestre em Medicina Veterinária.

Orientador: Prof. Dr. Eduardo Fernandes Bondan

HELOÍSA ORSINI DE SOUZA

**SÃO PAULO
2006**

Souza, Heloísa Orsini de

Marcação imunoistoquímica da resposta astrocitária de expressão de GFAP (proteína glial fibrilar ácida) e de vimentina no sistema nervoso central de cães com cinomose/Heloísa Orsini de Souza – São Paulo: H. Orsini, 2006.

57 f.

Dissertação (mestrado) – Universidade Paulista. Faculdade de Medicina Veterinária. São Paulo, 2006.

Programa de Pós-graduação: Medicina Veterinária.

Área de concentração: Imunopatologia.

Orientador: Prof. Dr. Eduardo Fernandes Bondan.

1. Astrócitos
2. Desmielinização do SNC
3. Cinomose canina
4. GFAP
5. Vimentina.

UNIVERSIDADE PAULISTA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA VETERINÁRIA

A COMISSÃO EXAMINADORA, ABAIXO ASSINADA, APROVA A DISSERTAÇÃO

MARCAÇÃO IMUNOISTOQUÍMICA DA RESPOSTA ASTROCITÁRIA DE EXPRESSÃO
DE GFAP (PROTEÍNA GLIAL FIBRILAR ÁCIDA) E DE VIMENTINA NO SISTEMA
NERVOSO CENTRAL DE CÃES COM CINOMOSE

ELABORADA POR
HELOÍSA ORSINI DE SOUZA

COMO REQUISITO PARA OBTENÇÃO DO TÍTULO DE MESTRE EM MEDICINA
VETERINÁRIA

COMISSÃO EXAMINADORA:

Eduardo Fernandes Bondan – Orientador

Maria Anete Lallo

Sílvia Regina Kleeb

São Paulo, 15 de dezembro de 2006

Ao professor Eduardo por todos os ensinamentos,
confiança e amizade.

Aos meus pais, Pedro e Silvana, e ao Igor, pelo
carinho, dedicação e apoio.

AGRADECIMENTOS

Ao professor Dr. Eduardo Fernandes Bondan, pela orientação e dedicação durante estes anos de convivência.

Aos professores Drs. Maria Anete Lallo, Leoni Bonamin, Dominguita Luthers Graça, Selene Coutinho e Fernando Maiorino, por toda a atenção e colaboração na realização deste trabalho.

Ao professor Dr. Paulo César Maiorka e à professora Maria Lúcia Zaidan Dagli por toda a contribuição prestada.

À professora Melissa Sanchez, pela disponibilidade, atenção e auxílio.

A todos os funcionários e amigos que me ajudaram, de alguma forma, na realização deste trabalho.

À CAPES, pela concessão da bolsa de mestrado.

ORSINI, H. Marcação imunoistoquímica da resposta astrocitária de expressão de GFAP (proteína glial fibrilar ácida) e de vimentina no sistema nervoso central de cães com cinomose. 2006. 57f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) – Universidade Paulista, São Paulo, 2006.

Uma vez que muitos dos aspectos envolvidos na patogenia dos processos desmielinizantes do sistema nervoso central (SNC) são ainda pouco esclarecidos e que os astrócitos parecem estar envolvidos na mediação de tais processos, este estudo analisou morfológicamente a participação astrocitária na desmielinização do SNC por meio da marcação imunoistoquímica de duas proteínas dos filamentos intermediários astrocitários – a proteína glial fibrilar ácida (GFAP) e a vimentina (VIM) –, comparando amostras de cerebelo e de tronco encefálico de cães com cinomose e de cães normais. Cortes histológicos dos tecidos foram submetidos à marcação pelo método indireto da avidina-biotina-peroxidase (ABC) e a reatividade astrocitária, observada em microscopia de luz, foi quantificada em um sistema computacional de análise de imagens. Observou-se, na maioria dos cortes de animais doentes, a presença de lesões degenerativas compatíveis com desmielinização. A marcação para a GFAP e para a VIM foi mais intensa nos animais com cinomose do que nos animais normais, especialmente nas regiões circunventriculares e nas adjacentes às áreas de degeneração tecidual. O aumento da imunorreatividade dos astrócitos para a GFAP e a reexpressão de VIM nas áreas lesionais indicam o envolvimento astrocitário na resposta do tecido nervoso às lesões desmielinizantes induzidas pelo vírus da cinomose (CDV) no SNC.

Palavras-chaves: astrócitos, desmielinização do SNC, cinomose canina, GFAP, vimentina.

ORSINI, H. **Immunohistochemical staining of the astrocytic expression of GFAP (glial fibrillary acidic protein) and vimentin in the central nervous system of dogs with canine distemper.** 2006. 57p. Dissertation (Master's Degree Dissertation) – Universidade Paulista, São Paulo, 2006.

Considering that many aspects involved in the pathogenesis of the central nervous system (CNS) demyelinating diseases are still poorly understood and that astrocytes seem to mediate such processes, this study analyzed the participation of astrocytes in the demyelinating processes of CNS by using immunohistochemical staining of two astrocytic proteins – glial fibrillary acidic protein (GFAP) and vimentin (VIM) –, comparing samples of cerebellum and brainstem from dogs with canine distemper and from healthy dogs. Histological sections were submitted to the avidin-biotin-peroxidase indirect method of immunohistochemical staining (ABC) and the astrocytic reactivity, observed in light microscopy, was quantified in a computer system for image analysis. It was possible to notice, on most of the sections from sick animals, degenerative lesions that indicate demyelination. The immunostaining for GFAP and VIM was more intense on animals with canine distemper, specially around the ventricles and near degenerated sites. The increased immunoreactivity of astrocytes for GFAP and the VIM reexpression in injured areas indicate the astrocytic involvement on nervous tissue response to the demyelinating lesions induced by the canine distemper virus (CDV) in the CNS.

Key-words: astrocytes, CNS demyelination, canine distemper, GFAP, vimentin.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Área (em μm^2) de expressão da GFAP e da VIM no cerebelo de animais normais e com cinomose pág. 36

Tabela 2 - Área (em μm^2) de expressão da GFAP e da VIM na região perivascular da substância branca do cerebelo de animais normais e com cinomose, nas situações de presença de infiltração inflamatória e de ausência de infiltração inflamatória pág. 36

Tabela 3 - Área (em μm^2) de expressão da GFAP e da VIM na substância branca do cerebelo de animais normais e com cinomose, nas situações de presença de degeneração tecidual e de ausência de degeneração tecidual..... pág. 37

Tabela 4 - Área (em μm^2) de expressão da GFAP e da VIM no tronco encefálico de animais normais e com cinomose pág. 37

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1A e B – Representação esquemática da localização das regiões selecionadas do cerebelo (R-1, R-2 e R-3) e do tronco encefálico (r-I e r-II)..... pág. 26
- Figura 2A e B – Microcavitações teciduais e infiltração inflamatória perivascular no SNC de animais com cinomose..... pág. 31
- Figura 3A e B – Marcação imunoistoquímica da GFAP na substância branca do cerebelo de animais normais e com cinomose pág. 32
- Figura 4A e B – Marcação imunoistoquímica da VIM na substância branca do cerebelo de animais normais e com cinomose pág. 33
- Figura 5A, B e C – Marcação imunoistoquímica da GFAP e da VIM na região perivascular de vasos com infiltração inflamatória no SNC de cães com cinomose pág. 34
- Figura 6A e B – Expressão de GFAP e de VIM no cerebelo de animais normais e com cinomose pág. 38
- Figura 7A e B – Expressão de GFAP e de VIM na região perivascular da substância branca do cerebelo de animais normais e com cinomose pág. 39
- Figura 8A e B - Expressão de GFAP e de VIM na substância branca do cerebelo de animais normais e com cinomose, nas condições de presença de degeneração tecidual e de ausência de degeneração tecidual..... pág. 40
- Figura 9A e B – Expressão de GFAP e de VIM no tronco encefálico de animais normais e com cinomose pág. 41

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	1
2 REVISÃO DE LITERATURA.....	3
2.1 CONSIDERAÇÕES GERAIS SOBRE O SNC	3
2.1.1 Estrutura e Função	3
2.1.2 Integridade do tecido nervoso.....	4
2.2 MIELINA, DESMIELINIZAÇÃO E REMIELINIZAÇÃO DO SNC.....	6
2.3 CONSIDERAÇÕES GERAIS SOBRE A CINOMOSE.....	8
2.3.1 Conceitos iniciais.....	8
2.3.2 Agente etiológico	8
2.3.3 Epidemiologia	9
2.3.4 Patogenia e Sinais Clínicos.....	9
2.3.5 Patogenia da afecção do SNC	10
2.3.5.1 Desmielinização na cinomose.....	11
2.4 OS ASTRÓCITOS.....	16

2.4.1 Considerações iniciais.....	16
2.4.2 Reatividade astrocitária	17
2.4.3 Proteínas do citoesqueleto e reatividade astrocitária	19
3 MATERIAL E MÉTODO	22
3.1 MATERIAL EXPERIMENTAL	22
3.2 MARCAÇÃO IMUNOISTOQUÍMICA DA GFAP E DA VIMENTINA	22
3.2.1 Desparafinização e hidratação.....	23
3.2.2 Bloqueio da peroxidase endógena	23
3.2.3 Recuperação antigênica	23
3.2.4 Incubação com anticorpo primário	23
3.2.5 Incubação com anticorpo secundário	24
3.2.6 Revelação.....	24
3.2.7 Desidratação.....	24
3.3 INTERPRETAÇÃO IMUNOISTOQUÍMICA.....	25
3.3.1 Avaliação dos cortes em microscopia de luz.....	25

3.3.2	Quantificação da reatividade astrocitária	26
3.3.3	Análise estatística.....	26
4	RESULTADOS	28
4.1	AVALIAÇÃO DOS CORTES EM MICROSCOPIA DE LUZ	28
4.1.1	Análise histopatológica.....	28
4.1.2	Análise imunoistoquímica	28
4.2	QUANTIFICAÇÃO DA REATIVIDADE ASTROCITÁRIA E ANÁLISE ESTATÍSTICA	35
5	DISCUSSÃO	42
6	CONCLUSÕES	49
7	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	50

1 INTRODUÇÃO

A desmielinização do sistema nervoso central (SNC) é uma alteração freqüentemente encontrada, em homens e outros animais, após a ocorrência de uma ampla variedade de eventos patológicos (BONDAN *et al.*, 1998, BONDAN; LALLO, 1998; RAINE, 1989b). Caracteriza-se por lesões teciduais geralmente severas que, ao contrário do que acontece no sistema nervoso periférico (SNP), não contam com reposição mielínica (remielinização) eficiente (BONDAN *et al.*, 1998, BONDAN; LALLO, 1998).

No SNC, muitos dos fatores envolvidos nos processos de perda e reparo mielínico são ainda pouco esclarecidos (MITCHELL *et al.*, 1991; SUMMERS *et al.*, 1978; VANDEVELDE; ZURBRIGGEN, 2005; ZURBRIGGEN *et al.*, 1993, 1998). Diversos estudos, com o objetivo de elucidar tais fatores e buscar o desenvolvimento de estratégias terapêuticas que solucionem ou previnam os danos gerados, têm sido realizados (BONDAN *et al.*, 1998; BONDAN; LALLO, 1998) e contam com a utilização de modelos experimentais (MITCHELL *et al.*, 1991; SUMMERS *et al.*, 1978, 1979; VANDEVELDE; ZURBRIGGEN, 2005; ZURBRIGGEN *et al.*, 1998).

A cinomose canina, que cursa com o desenvolvimento de um provável processo desmielinizante imunomediado, pode servir como modelo para o estudo da fisiopatologia de várias doenças desmielinizantes humanas, tais como a esclerose múltipla (BOTTERON *et al.*, 1992; SUMMERS *et al.*, 1978, 1979; VANDEVELDE; ZURBRIGGEN, 2005; ZURBRIGGEN *et al.*, 1993, 1998) e a panencefalite esclerosante subaguda (JONES *et al.*; 2000; OBEID *et al.*, 1995).

Tanto na cinomose como em outras afecções do SNC, a desmielinização conta com a participação de elementos do sistema imunológico (ALLDINGER *et al.*, 1996; BOTTERON *et al.*, 1992; BRADL, 1996; BRUGGER *et al.*, 1992; BURGE *et al.*, 1989; TIPOLD *et al.*, 1999, 2001; VANDEVELDE *et al.*, 1981; VANDEVELDE; ZURBRIGGEN, 1995; WUNSCHMANN *et al.*, 1999, 2000) e de células constituintes do próprio SNC, tais como os astrócitos (DONG;

BENVENISTE, 2001; GLAUS *et al.*, 1990; VANDEVELDE *et al.*, 1981; ZURBRIGGEN *et al.*, 1986).

Os astrócitos são células que respondem prontamente às lesões provocadas no tecido nervoso (BENVENISTE, 1992; BONDAN *et al.*, 2003; DONG; BENVENISTE, 2001; MONTGOMERY, 1994; SHIMADA *et al.*, 1998; VANDEVELDE *et al.*, 1983). Além de desempenharem diversas funções na manutenção da homeostasia, apresentam propriedades imunológicas que podem ser importantes na mediação dos processos de desmielinização e de remielinização do SNC (BENVENISTE, 1992; DONG, BENVENISTE, 2001; MONTGOMERY, 1994; VANDEVELDE *et al.*, 1983).

Neste contexto, o objetivo do presente trabalho foi o de investigar morfologicamente a resposta dos astrócitos frente ao processo infeccioso e desmielinizante do SNC de cães com cinomose, por meio da marcação imunoistoquímica da reatividade de proteínas astrocíticas (proteína glial fibrilar ácida e vimentina), na intenção de inferir aspectos relativos ao comportamento destas células na patogenia das doenças desmielinizantes do SNC.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 CONSIDERAÇÕES GERAIS SOBRE O SNC

2.1.1 Estrutura e função

O SNC, composto pelo encéfalo (cérebro, cerebelo e tronco encefálico) e pela medula espinhal, é uma subdivisão anatômica do sistema nervoso (DYCE *et al.*, 1997; MACHADO, A., 1999). Em conjunto com o sistema nervoso periférico (SNP), que estabelece a comunicação entre os órgãos centrais e os demais órgãos, constitui o principal centro de controle do organismo, responsável pela organização e coordenação da maioria das funções orgânicas (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 1999). É formado por tecidos nervosos, constituídos basicamente por neurônios (unidade fundamental do sistema nervoso) e outros tipos celulares denominados coletivamente de neuróglia ou glia, essenciais à sua sustentação e manutenção (MACHADO, C., 1999).

No SNC, a neuróglia compreende astrócitos, oligodendrócitos, microgliócitos e células endoteliais que revestem as cavidades do encéfalo (ventrículos) e o canal medular. As células de Schwann também compõem a glia, entretanto encontram-se presentes apenas no SNP, envolvendo axônios neuronais (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 1999; MACHADO, C., 1999).

O conjunto de microgliócitos é denominado micróglia (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 1999; MACHADO, C., 1999), e corresponde a células da linhagem monocítica fagocitária residentes no SNC (ALOISI, 2001; HICKEY, 1999). Acredita-se que tais células sejam originárias do mesoderma, partindo de monócitos hematógenos que penetram no tecido nervoso durante a embriogênese ou nos processos de injúria do SNC (GIULIAN *et al.*, 1989; HICKEY, 1999). Em condições normais, encontram-se na forma quiescente e quando ativadas, por algum processo patológico, desempenham funções semelhantes às dos macrófagos, fagocitando substâncias e desencadeando reações imunológicas (ALOISI, 2001; ALLDINGER *et al.*, 1996; GIULIAN *et al.*, 1989; HICKEY, 1999).

Os astrócitos e os oligodendrócitos são denominados, conjuntamente, de macróglia (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 1999; MACHADO, C., 1999) e suas funções serão discutidas mais adiante neste trabalho.

2.1.2 Integridade do tecido nervoso

Devido à alta sensibilidade dos componentes do tecido nervoso, o SNC apresenta características anatômicas e fisiológicas que visam à sua proteção (BAUER *et al.*, 2001; HICKEY, 2001). Além dos compartimentos ósseos que o abrigam, o SNC é envolvido pelas meninges (dura-máter, aracnóide e pia-máter), que, em conjunto com o líquido cefalorraquidiano (LCR), realizam, entre outras funções, a proteção mecânica dos centros nervosos (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 1999).

O SNC é também protegido pelo isolamento contra patógenos e elementos sistêmicos capazes de lesá-lo ou alterar seu funcionamento (HICKEY, 2001; PACHNER, 1996; SELMAJ, 1996). Assim, os sistemas de irrigação tecidual e monitoração imunológica presentes são diferenciados. Os capilares que penetram o parênquima nervoso possuem uma permeabilidade diferente dos demais observados no resto do organismo (PRAT *et al.*, 2001; SELMAJ, 1996). Além de serem completamente envolvidos por processos astrocitários (BENVENISTE, 1992; MONTGOMERY, 1994), apresentam junções muito íntimas entre as células endoteliais (*tight junctions*), formando uma barreira de isolamento entre o SNC e a circulação sistêmica. Tal barreira, denominada barreira hematoencefálica (BHE), é importante na seleção de macromoléculas e células que penetram no tecido nervoso, impedindo a entrada de elementos hematógenos que possam provocar danos (PACHNER, 1996; PRAT *et al.*, 2001; SELMAJ, 1996), tais como as células do sistema imunológico (BRADL, 1996; HICKEY, 1999, 2001). A atividade dos elementos do sistema imunológico no SNC é, portanto, limitada, sendo a vigilância imunológica ali desempenhada inferior à de outros órgãos (HICKEY, 1999, 2001; NEUMANN, 2001).

A entrada de células sistêmicas também é desfavorecida pelas condições microambientais presentes no SNC íntegro (HICKEY, 2001; PENDER; RIST, 2001). Em situações de normalidade, altos níveis de moléculas antiinflamatórias, tais como o fator de crescimento transformante beta (TGF- β), encontram-se presentes no parênquima nervoso (BRADL, 1996; HICKEY, 2001). Há também baixa expressão de elementos que auxiliam no desenvolvimento e na progressão das reações imunológicas, tais como as moléculas do complexo de histocompatibilidade principal (MHC) (ALLDINGER *et al.*, 1996; BRADL, 1996; PACHNER, 1996; VILAFRANCA *et al.*, 1996) e as moléculas de adesão (HICKEY, 1999, 2001; SELMAJ, 1996), que promovem, respectivamente, a ativação de linfócitos e a migração transendotelial de leucócitos provenientes da circulação sistêmica (ABBAS *et al.*, 2000). A apoptose ou morte celular programada (ABBAS *et al.*, 2000; DUVALL, 1985) de células infiltrantes também é observada (BRADL, 1996; DONG; BENVENISTE, 2001; PENDER; RIST, 2001).

No entanto, apesar do complexo sistema desenvolvido para preservar a integridade dos tecidos nervosos, algumas situações permitem o seu acometimento. A BHE, por exemplo, não é impermeável a todas as substâncias e não está presente em todas as regiões do SNC. Os plexos coróides, o corpo pineal, a área prostrema e a neuro-hipófise possuem fenestrações nos seus capilares que permitem a troca de substâncias entre o sangue e os tecidos nervosos (PRAT *et al.*, 2001). Além disso, infecções e inflamações sistêmicas promovem a liberação de moléculas pró-inflamatórias com capacidade de estimular reações imunológicas no interior do parênquima nervoso (HICKEY, 1999, 2001), tais como o fator de necrose tumoral alfa (TNF- α), o interferon gama (IFN- γ) e a interleucina 1 (IL-1), que podem penetrar pela BHE intacta e causar dano tecidual como, por exemplo, a desmielinização (BENN *et al.*, 2001; HICKEY, 2001; PROBERT; AKASSOGLU, 2001).

2.2 MIELINA, DESMIELINIZAÇÃO E REMIELINIZAÇÃO DO SNC

A mielina, material isolante composto principalmente por lipídios, é uma estrutura membranosa, característica dos tecidos nervosos, que tem por função aumentar a velocidade de transmissão de estímulos entre neurônios e seus alvos (RAINE, 1989a). Consiste na deposição em espiral de membranas de células mielinogênicas ao redor de axônios neuronais (KIRSCHNER *et al.*, 1989), formando segmentos, denominados internodos, que se intercalam com regiões do axônio desprovidas de mielina (nodos de Ranvier), onde ocorre atividade eletrogênica (RAINE, 1989a). É produzida por oligodendrócitos e células de Schwann, respectivamente, no SNC e no SNP. Cada oligodendrócito é capaz de mielinizar diversos internodos (abrangendo inclusive axônios de neurônios diferentes), enquanto cada célula de Schwann mieliniza apenas um (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 1999; MACHADO, C., 1999; RAINE, 1989a).

Diversos eventos patológicos, tais como intoxicações, desordens metabólicas e funcionais, infecções, lesões mecânicas e inflamações, têm como resultado final a perda mielinica, conhecida como desmielinização (RAINE, 1989b). Independentemente da causa, a desmielinização se deve a dois processos principais: o dano direto da mielina ou das células mielinogênicas (desmielinização primária) e a lesão axonal, que promove a degeneração mielinica como efeito secundário (desmielinização secundária) (RAINE, 1989b).

A desmielinização pode ser encontrada tanto no SNC quanto no SNP. Entretanto, o SNP termina o processo com a reposição completa das bainhas de mielina perdidas. No SNC, o reparo mielinico ou remielinização é, na maioria das vezes, ineficiente ou abortivo (BONDAN *et al.*, 1998, BONDAN; LALLO, 1998).

Sabe-se que a severidade da desmielinização está relacionada, entre outros fatores, ao agente etiológico, à região acometida e à resposta desenvolvida pelo organismo (APPEL, 1969; APPEL *et al.*, 1982; SUMMERS, 1984), entretanto, muitos dos aspectos relacionados à neuropatogenia das doenças desmielinizantes do SNC, tais como as bases celulares e moleculares

envolvidas, são ainda pouco esclarecidos (MITCHELL *et al.*, 1991). Nesse sentido, estudos acerca dos processos de desmielinização e remielinização do SNC tornam-se essenciais e a cinomose canina, que se assemelha em muitos aspectos às doenças imunomediadas humanas, pode ser considerada como um importante modelo para o esclarecimento de tais questões (BOTTERON *et al.*, 1992; GLAUS *et al.*, 1990; VANDEVELDE; ZURBRIGGEN, 2005; ZURBRIGGEN *et al.*, 1992).

2.3 CONSIDERAÇÕES GERAIS SOBRE A CINOMOSE

2.3.1 Conceitos iniciais

A cinomose é uma doença viral severa e altamente contagiosa, que acomete cães e outros carnívoros de forma multissistêmica (BIRCHARD; SHERDING, 1998). É causada por um morbilivírus, da família *Paramixoviridae*, que foi descrito pela primeira vez em 1905 por Carré (JONES *et al.*, 2000). Trata-se de uma das mais importantes enfermidades infecciosas dos cães, apresentando alta morbidade e mortalidade (BIRCHARD; SHERDING, 1998; HOSKINS, 2004) e promovendo um processo de desmielinização similar ao gerado na esclerose múltipla (BOTTERON *et al.*, 1992; SUMMERS *et al.*, 1978, 1979; VANDEVELDE; ZURBRIGGEN, 2005; ZURBRIGGEN *et al.*, 1993) e na panencefalite esclerosante subaguda dos humanos (JONES *et al.*; 2000; OBEID *et al.*, 1995).

2.3.2 Agente etiológico

O vírus da cinomose (CDV) é atualmente descrito como um RNA-vírus de fita simples, grande (150 a 350 nm), de simetria helicoidal, envelopado (LAMB; KOLAKOFSKY, 1996; PARDO *et al.*, 2005) e antigenicamente relacionado ao vírus do sarampo humano (YANAGI *et al.*, 2006) e ao da peste bovina (HOSKINS, 2004). Morfologicamente, é constituído por, além de outras moléculas não-estruturais, seis proteínas estruturais: três internas (L, N e P), envolvidas na transcrição e na replicação do RNA viral, e três inseridas no envelope (M, H e F) (LAMB; KOLAKOFSKY, 1996). As proteínas H e F desempenham papéis importantes na patogenia da doença, sendo a H responsável pela adsorção (OBEID *et al.*, 1995; YANAGI *et al.*, 2006) e a F pela fusão do vírus à célula hospedeira (ALLDINGER *et al.*, 1993; LAMB; KOLAKOFSKY, 1996; OBEID *et al.*, 1995; PARDO *et al.*, 2005). A glicoproteína H, por ser bastante variável, é a principal responsável pela diversidade antigênica observada no vírus da cinomose (PARDO *et al.*, 2005) e, conseqüentemente, pelo curso clínico e severidade da doença (ALLDINGER *et al.*, 1993; SUMMERS *et al.*, 1984).

2.3.3 Epidemiologia

A cinomose apresenta distribuição mundial. Acomete diversas espécies de carnívoros domésticos e selvagens, tais como os das famílias *Canidae* (raposas, lobos, chacais, coiotes etc.), *Mustelidae* (lontras, ferrets, furões etc.), *Procyonidae* (quatis, guaxinins etc.) (BIRCHARD; SHERDING, 1998; GESE *et al.*, 2004; JONES *et al.*, 2000; KELLY; SLEEMAN, 2003; MESSLING *et al.*, 2003; ZARNKE *et al.*, 2004) e alguns indivíduos da família *Felidae* (gatos domésticos e selvagens, leões, tigres etc.) (BIRCHARD; SHERDING, 1998; ENDO *et al.*, 2004; JONES *et al.*, 2000), além de outras espécies nas quais foi induzida experimentalmente (JONES *et al.*, 2000). Moléstias semelhantes, causadas por vírus antígenicamente relacionados ao CDV, foram descritas em focas (JONES *et al.*, 2000; RIJKS *et al.*, 2005; STANTON *et al.*, 2004) e golfinhos (JONES *et al.*, 2000; SALIKI *et al.*, 2002). Anticorpos contra o CDV também foram encontrados em ursos polares (CATTET *et al.*, 2004). Nos cães domésticos, a cinomose aparece como a principal enfermidade viral, não apresentando predileção por raça ou sexo, e acometendo principalmente indivíduos jovens ainda não vacinados (BIRCHARD; SHERDING, 1998; HOSKINS, 2004). A transmissão se dá principalmente pela via aérea, por meio da inalação de aerossóis provenientes de secreções corporais dos animais acometidos (HOSKINS, 2004).

2.3.4 Patogenia e sinais clínicos

A inalação das partículas virais leva a uma infecção inicial das tonsilas palatinas e dos linfonodos brônquicos (APPEL; 1969; BIRCHARD; SHERDING, 1998). Os vírus iniciam a sua replicação nesses tecidos e mais tarde, por meio da infecção de células migratórias mononucleares (macrófagos e linfócitos), disseminam-se para outros órgãos linfáticos, tais como baço, timo, linfonodos e medula óssea, onde infectam, além de linfócitos maduros, células virgens, promovendo apoptose (KUMAGAI *et al.*, 2004) e, conseqüentemente, imunossupressão (APPEL, 1969; VANDEVELDE *et al.*, 1982; VANDEVELDE; ZURBRIGGEN, 2005; WUNSCHMANN *et al.*, 2001). Antígenos virais são detectados em todos os órgãos e tecidos do organismo em seis a nove dias após a infecção (APPEL, 1969), desencadeando as manifestações

clínicas mais comuns da doença – alterações gastrointestinais, respiratórias, oculares, dérmicas e neurológicas (HOSKINS, 2004; JONES *et al.*, 2000).

A presença de sintomas, assim como a sua severidade, parece estar associada ao nível de anticorpos anti-CDV produzidos pelo hospedeiro. Os animais que desenvolvem títulos de anticorpos mais cedo limitam a dispersão viral pelos tecidos, recuperando-se mais facilmente após a infecção. Animais que sofrem algum atraso ou falha na formação de tais anticorpos são mais susceptíveis à infecção dos tecidos epiteliais e do SNC, sendo as lesões geradas mais severas (APPEL, 1969; APPEL *et al.*, 1982).

A infecção dos tecidos epiteliais promove sinais e sintomas clínicos que variam de moderados a severos. Os animais acometidos podem apresentar diarreia, vômitos, anorexia, desidratação, descarga nasal e ocular, bronquite, pneumonia, hiperqueratose de coxins, erupções cutâneas e pústulas abdominais, entre outras alterações (BIRCHARD; SHERDING, 1998; HOSKINS, 2004; JONES *et al.*, 2000; KOUTINAS *et al.*, 2004). O acometimento do SNC gera ataxia, tremores intencionais de cabeça, movimentos mastigatórios crônicos, andar em círculos, convulsões e, menos frequentemente, cegueira e paralisia (ALLDINGER *et al.*, 1993; HIGGINS *et al.*, 1982; HOSKINS, 2004). Em alguns animais, o CDV persiste nos tecidos nervosos e ocasiona uma encefalite tardia, chamada encefalite do cão velho, que se assemelha à panencefalite esclerosante subaguda desenvolvida em humanos adultos infectados na infância pelo vírus do sarampo (JONES *et al.*, 2000). As lesões do SNC correspondem às alterações mais graves da doença e geralmente culminam com o óbito dos animais (APPEL *et al.*, 1982; JONES *et al.*, 2000).

2.3.5 Patogenia da afecção do SNC

O mecanismo pelo qual o CDV penetra e se dispersa pelo SNC é ainda especulativo (HIGGINS *et al.*, 1982). Acredita-se que o CDV adentra o tecido nervoso por meio de células mononucleares infectadas vindas da circulação sistêmica (SUMMERS *et al.*, 1978;

VANDEVELDE; ZURBRIGGEN, 2005). O suporte para essa teoria vem da observação de que existe migração de linfócitos e monócitos hematógenos para o interior do parênquima nervoso e que antígenos virais são identificados nestas células (SUMMERS *et al.*, 1978).

Em 1969, Appel descreveu a trajetória do CDV no SNC. Inicialmente, o vírus foi identificado em células mononucleares presentes na piamáter. Em seguida, células mononucleares infectadas foram encontradas no LCR e nas regiões perivasculares do tecido nervoso. Posteriormente, células endimárias e gliais foram infectadas e, por fim, houve o acometimento de neurônios. A presença de antígenos virais também foi constatada em células do plexo coróide (ALLDINGER *et al.*, 1993; HIGGINS *et al.*, 1982; MITCHELL *et al.*, 1991; SUMMERS *et al.*, 1978).

2.3.5.1 Desmielinização na cinomose

A desmielinização causada pelo vírus da cinomose pode ser encontrada em diferentes regiões do SNC. Acomete principalmente a substância branca do cerebelo e do mesencéfalo (ALLDINGER *et al.*, 1993; VANDEVELDE *et al.*, 1982; VANDEVELDE; ZURBRIGGEN, 2005), os pedúnculos cerebelares (HIGGINS *et al.*, 1982) e outras regiões do cérebro e da medula espinhal (VANDEVELDE *et al.*, 1982), sendo mais intensamente observada nas regiões perivasculares (VANDEVELDE; ZURBRIGGEN, 2005), subependimárias e subpiaais, e ao redor do quarto ventrículo (APPEL *et al.*, 1982; SUMMERS *et al.*, 1979; VANDEVELDE; ZURBRIGGEN, 2005), além das áreas adjacentes às células infectadas (MITCHELL *et al.*, 1991).

Histologicamente, as lesões desmielinizantes caracterizam-se por vacuolização e perda multifocal de mielina (ZURBRIGGEN *et al.*, 1998) e, no SNC, podem apresentar-se sob duas formas distintas: uma aguda, inicial, não acompanhada por processo inflamatório, e uma crônica, posterior, na qual a inflamação torna-se presente (TIPOLD *et al.*, 1999; VANDEVELDE *et al.*, 1982; VANDEVELDE; ZURBRIGGEN, 1995, 2005; WUNSCHMANN *et al.*, 1999, 2000;

ZURBRIGGEN *et al.*, 1993). A forma aguda se correlaciona com a imunossupressão inicial gerada pelo vírus e a crônica com o restabelecimento do número de linfócitos na circulação periférica (ALLDINGER *et al.*, 1996; VANDEVELDE *et al.*, 1982; VANDEVELDE; ZURBRIGGEN, 2005; WUNSCHMANN *et al.*, 2000).

A desmielinização aguda é caracterizada pelo desenvolvimento de lesões na ausência de infiltração mononuclear (GLAUS *et al.*, 1990; VANDEVELDE *et al.*, 1981, 1982; VANDEVELDE; ZURBRIGGEN, 1995, 2005; ZURBRIGGEN *et al.*, 1993). Apresenta vacuolização da mielina e uma extensa proliferação e hipertrofia de astrócitos, nos quais se observam inclusões virais no núcleo e no citoplasma (GLAUS *et al.*, 1990; VANDEVELDE *et al.*, 1982; VANDEVELDE; ZURBRIGGEN, 2005).

Na forma crônica, além da desmielinização severa e da reação astrocitária intensa, observa-se dispersão de células inflamatórias pelo parênquima nervoso (VANDEVELDE *et al.*, 1982, VANDEVELDE; ZURBRIGGEN, 2005; WUNSCHMANN *et al.*, 1999, 2000) e presença de manguitos perivasculares (ALLDINGER *et al.*, 1996; BOTTERON *et al.*, 1992; VANDEVELDE; ZURBRIGGEN, 1995), constituídos por plasmócitos, monócitos e linfócitos (BAUER *et al.*, 2001; BOTTERON *et al.*, 1992; VANDEVELDE; ZURBRIGGEN, 1995, 2005). Observa-se também diminuição na expressão de proteínas virais pelas células infectadas, que pode estar relacionada ao *clearance* viral, gerado pela resposta imunológica do hospedeiro (ALLDINGER *et al.*, 1993; MITCHELL *et al.*, 1991; ZURBRIGGEN *et al.*, 1993).

As causas da desmielinização, tanto na forma aguda como na crônica, são ainda pouco esclarecidas (BOTTERON *et al.*, 1992; MITCHELL *et al.*, 1991; VANDEVELDE; ZURBRIGGEN, 1995, 2005). Alguns mecanismos poderiam ser sugeridos como promotores da perda de mielina, como, por exemplo, a ação direta dos vírus sobre os oligodendrócitos, matando-os ou alterando suas funções mielinogênicas (MITCHELL *et al.*, 1991).

A afecção viral direta dos oligodendrócitos, entretanto, não é observada em nenhuma das duas formas de desmielinização (HIGGINS *et al.*, 1982). Com exceção de raras células (1 a 2 %), nas quais nucleocapsídeos virais foram encontrados durante a infecção pelo CDV, estudos ultra-

estruturais e imunoistoquímicos não demonstram a presença de antígenos virais no interior de oligodendrócitos, mesmo nos que apresentam sinais de degeneração (GLAUS *et al.*, 1990; ZURBRIGGEN *et al.*, 1993). Apesar de Zurbriggen *et al.* (1993) terem constatado a presença de seqüências de ácidos nucleicos virais em diversos oligodendrócitos, tais células não continham partículas virais completas, indicando que, apesar da infecção evidente, a replicação viral não ocorre nesse tipo celular e, portanto, a degeneração dessas células não se deve à infecção pelo CDV.

Uma vez descartada a ação viral direta sobre os oligodendrócitos (GLAUS *et al.*, 1990; ZURBRIGGEN *et al.*, 1993) e devido à alta sensibilidade dessas células à ação de alguns elementos do sistema imunológico (BENN *et al.*, 2001), as reações imunomediadas têm sido sugeridas como promotoras da desmielinização (MITCHELL *et al.*, 1991; VANDEVELDE; ZURBRIGGEN, 1995). Assim, a destruição da mielina poderia ser desencadeada ou por um processo indireto (*bystander*) – devido à ação de fatores tóxicos, citocinas e anticorpos liberados durante a resposta imune antiviral (BOTTERON *et al.*, 1992; BRUGGER *et al.*, 1992; BURGE *et al.*, 1989; MITCHELL *et al.*, 1991; VANDEVELDE *et al.*, 1981) – ou pela sensibilização do sistema imunológico contra porções da mielina semelhantes a componentes virais (BRADL, 1996; MITCHELL *et al.*, 1991; WUNSCHMANN *et al.*, 1999).

A desmielinização imunomediada é fundamentada por diversos estudos que demonstram a presença de células inflamatórias e elementos do sistema imunológico no parênquima nervoso durante o processo de desmielinização. Macrófagos (BOTTERON *et al.*, 1992; BRUGGER *et al.*, 1992; BURGE *et al.*, 1989; HICKEY, 1999; 2001), linfócitos B e seus anticorpos (VANDEVELDE *et al.*, 1981; WÜNSCHMANN *et al.*, 1999), linfócitos T auxiliares (CD4+) e citotóxicos (CD8+), entre outras células, já foram descritos, exercendo suas funções no interior do SNC (TIPOLD *et al.*, 2001; VANDEVELDE *et al.*, 1982; VANDEVELDE; ZURBRIGGEN, 1995, 2005; WÜNSCHMANN *et al.*, 2000).

Sabe-se que o CDV, assim como outros vírus que codificam proteínas capazes de se integrar à membrana celular, atrai elementos do sistema imunológico para o interior do SNC (NEUMANN, 2001; SHEK *et al.*, 1980), entretanto, os mecanismos pelos quais tais células

conseguem adentrar o tecido nervoso são pouco esclarecidos. Acredita-se que o sistema imunológico monitore o SNC de forma semelhante à realizada em outros tecidos (ALOISI, 2001; HICKEY, 1999, 2001), visando à eliminação de agentes potencialmente deletérios (BRADL, 1996). Assim, linfócitos T e B, independentemente da sua especificidade, penetram o parênquima nervoso, após ativação periférica, em busca de antígenos específicos (BRADL, 1996; HICKEY, 1999, 2001). Os macrófagos, por sua vez, já estão presentes em algumas regiões do SNC, como nas meninges, nos plexos coróides e nos espaços perivasculares (ALOISI, 2001; WILLIAMS *et al.*, 2001), e são recrutados da circulação sistêmica nos processos de infecção do tecido nervoso por quimiocinas e citocinas pró-inflamatórias liberadas (ALOISI, 2001; TIPOLD *et al.*, 1999). A presença de antígenos no SNC promove a ação de linfócitos (WUNSCHMANN *et al.*, 1999, 2000) e macrófagos (APPEL *et al.*, 1984; BAUER *et al.*, 2001; BOTTERON *et al.*, 1992; BRUGGER *et al.*, 1992; BURGE *et al.*, 1992), podendo causar degeneração mielínica (VANDEVELDE; ZURBRIGGEN, 1995).

Os mecanismos descritos, de degeneração mielínica mediada pelo sistema imunológico, podem ser aplicáveis no desencadeamento da forma crônica de desmielinização, visto que células inflamatórias e seus produtos encontram-se presentes em grandes quantidades nessa fase (BOTTERON *et al.*, 1992; TIPOLD *et al.*, 1999). A desmielinização da fase aguda, no entanto, parece não apresentar natureza imunomediada. Apesar de linfócitos T (TIPOLD *et al.*, 1999, 2001; WUNSCHMANN *et al.*, 1999, 2000) e B (VANDEVELDE *et al.*, 1981) serem identificados durante a fase desmielinizante inicial, tais células não se encontram em quantidades suficientes para produzir lesões (VANDEVELDE *et al.*, 1982; WUNSCHMANN *et al.*, 1999). Na fase aguda, portanto, acredita-se que a desmielinização seja gerada pela ação direta dos vírus sobre outros tipos celulares, como os neurônios ou as células da neurógliia (MITCHELL *et al.*, 1991), que poderiam promover destruição dos oligodendrócitos como efeito secundário (GLAUS *et al.*, 1990; SUMMERS *et al.*, 1979; VANDEVELDE *et al.*, 1982; VANDEVELDE; ZURBRIGGEN, 1995; ZURBRIGGEN *et al.*, 1998).

Alguns experimentos foram realizados para verificar a possível participação das células nervosas no desencadeamento da desmielinização inicial. Observou-se que a infecção neuronal direta pode resultar em degeneração axonal e conseqüente perda de mielina. Entretanto, a maioria

dos neurônios infectados pelo CDV permanece intacta e, portanto, não pode, por si só, desencadear a perda maciça de mielina observada nas lesões desmielinizantes (HIGGINS *et al.*, 1982).

A replicação dos vírus nas células gliais também é sugerida como causa de desmielinização aguda (ALLDINGER *et al.*, 1993; GLAUS *et al.*, 1990; ZURBRIGGEN *et al.*, 1986).

A micróglia, capaz de responder prontamente a uma ampla variedade de estímulos (ALOISI, 2001), desenvolvendo funções inflamatórias tais como a apresentação de antígenos e a liberação de toxinas e citocinas (ALLDINGER *et al.*, 1996; ALOISI, 2001; BURGE *et al.*, 1989; GIULIAN *et al.*, 1989), constitui um exemplo de célula glial que pode estar envolvida no desencadeamento das lesões desmielinizantes.

Os astrócitos parecem também desempenhar importantes funções na desmielinização (GLAUS *et al.*, 1990; ZURBRIGGEN *et al.*, 1986). Tais células constituem os principais alvos do CDV (WUNSCHMANN *et al.*, 1999; ZURBRIGGEN *et al.*, 1986) e reagem vigorosamente a uma ampla variedade de insultos ao SNC, ativando genes para a produção e liberação de uma diversidade de elementos, como proteínas, citocinas e fatores tróficos (SHIMADA *et al.*, 1998). Além disso, as lesões desmielinizantes iniciais são simultâneas à replicação dos vírus nos astrócitos (VANDEVELDE *et al.*, 1983).

Num experimento realizado por Zurbriggen *et al.* (1986), no qual os autores promoveram a infecção de uma cultura mista de oligodendrócitos e astrócitos pelo CDV, observou-se que a infecção acometia os astrócitos, porém eram os oligodendrócitos que sofriam degeneração. Sugeriu-se, então, uma correlação entre a perda oligodendrogliar e as alterações provocadas pelos vírus nos astrócitos, provavelmente devida à liberação de substâncias tóxicas pelos últimos.

Apesar de a associação entre as alterações astrocitárias e a desmielinização ainda não ser clara, os astrócitos parecem desempenhar papéis fundamentais em vários aspectos das doenças nervosas (MONTGOMERY, 1994; VANDEVELDE *et al.*, 1983).

2.4 OS ASTRÓCITOS

2.4.1 Considerações iniciais

Os astrócitos são células componentes da macróglia, caracterizadas pela presença de numerosos prolongamentos e responsáveis por diversas funções de suporte ao SNC (MACHADO, C., 1999; MONTGOMERY, 1994). Constituem as maiores e mais numerosas células gliais presentes no SNC dos mamíferos, excedendo o número de neurônios na proporção de 10:1 (BENVENISTE, 1992; JUNQUEIRA; CARNEIRO, 1999).

Morfológicamente, podem ser classificados em protoplasmáticos (encontrados predominantemente na substância cinzenta do SNC) e fibrosos (encontrados na substância branca) (BENVENISTE, 1992; MONTGOMERY, 1994). Os protoplasmáticos distinguem-se por apresentar prolongamentos mais espessos e curtos, de ramificação profusa. Os fibrosos apresentam uma menor ramificação, sendo seus prolongamentos mais finos e longos (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 1999; MACHADO, C., 1999).

Os astrócitos são provenientes de duas linhagens progenitoras, também utilizadas como método de classificação (MACHADO, C., 1999). Os astrócitos do tipo I correspondem àqueles que se desenvolvem de células comprometidas apenas com a linhagem astrocitária, e os astrócitos do tipo II derivam de progenitoras bipotenciais (células O2-A), que podem diferenciar-se tanto em astrócitos como em oligodendrócitos (BENVENISTE, 1992; MONTGOMERY, 1994), dependendo da influência ambiental (BENVENISTE, 1992). De forma geral, os astrócitos do tipo I são considerados análogos aos astrócitos protoplasmáticos e os do tipo II, aos fibrosos (BENVENISTE, 1992; MONTGOMERY, 1994).

Os prolongamentos, ou processos astrocitários, encontram-se diretamente relacionados a outros componentes celulares e estruturais do SNC (MONTGOMERY, 1994), como os neurônios e os oligodendrócitos (MACHADO, C., 1999). Em algumas regiões, tais processos formam uma rede funcional subependimária, e ao redor de todo o SNC, denominada *glia limitans*, que

acompanha os capilares sanguíneos que penetram o SNC, envolvendo-os e ajudando-os a barrar a entrada de substâncias externas no tecido nervoso (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 1999). Os pés astrocitários, expansões dos prolongamentos astrocitários, envolvem capilares sanguíneos e sinapses neuronais (MACHADO, C., 1999; MONTGOMERY, 1994), promovendo, além de suporte físico, funções vitais para o funcionamento normal do SNC (MONTGOMERY, 1994).

Durante o desenvolvimento, os astrócitos são responsáveis pelo suporte físico e pela orientação da migração dos neurônios até o seu destino final dentro do SNC (BENVENISTE, 1992). São também responsáveis pelo suporte mecânico dos oligodendrócitos, durante a mielinização, e pela produção de fatores neurotróficos, necessários para o crescimento e metabolismo energético dos neurônios. Servem ainda como a maior fonte de produção de proteínas da matriz extracelular e de moléculas de adesão, importantes para o desenvolvimento e a manutenção do SNC (MONTGOMERY, 1994).

Em relação ao ambiente extracelular, os astrócitos desempenham funções regulatórias do pH, da osmolaridade e da concentração de íons e metabólitos (BENVENISTE, 1992; MONTGOMERY, 1994). Além disso, promovem a detoxificação do SNC, prevenindo o acúmulo de substâncias potencialmente neurotóxicas, tais como alguns neurotransmissores e metais pesados (MONTGOMERY, 1994; VAREA *et al.*, 2006).

A indução e a manutenção da BHE também é função astrocitária. Tais células parecem ser responsáveis pela formação das *tight junctions*, presentes entre as células endoteliais, barrando a entrada de muitas substâncias hidrossolúveis vindas do sangue para o interior do parênquima nervoso (BENVENISTE, 1992; MONTGOMERY, 1994; SELMAJ, 1996).

2.4.2 Reatividade astrocitária

Frente às agressões do tecido nervoso, os astrócitos respondem prontamente, tornando-se reativos (SHIMADA *et al.*, 1998; VANDEVELDE *et al.*, 1983). A reatividade astrocitária é

definida pela proliferação (astrocitose) e pela hipertrofia (astrogliose) celular (BENVENISTE, 1992; MONTGOMERY, 1994; SHIMADA *et al.*, 1998; VANDEVELDE *et al.*, 1983). A função desse comportamento é ainda desconhecida (SHIMADA *et al.*, 1998), entretanto, observa-se que tal processo acompanha as lesões desmielinizantes iniciais do tecido nervoso (VANDEVELDE *et al.*, 1983) e pode promover a formação de cicatrizes gliais que restringem as funções neuronais (DONG; BENVENISTE, 2001; GIULIAN *et al.*, 1989).

Apesar da associação da reação astrocitária com a desmielinização ainda não ser clara, sabe-se que os astrócitos desempenham algumas funções imunológicas (BENVENISTE, 1992) similares às dos macrófagos, liberando substâncias tóxicas (ZURBRIGGEN *et al.*, 1986) que poderiam contribuir para a iniciação e para a propagação da resposta imunológica e da desmielinização no interior do SNC (BENVENISTE, 1992).

A estimulação astrocitária faz com que essa célula expresse moléculas de MHC (ALLDINGER *et al.*, 1996; BRADL, 1996; VILAFRANCA *et al.*, 1996) e secrete substâncias que facilitam a resposta imunológica (BENVENISTE, 1992; MONTGOMERY, 1994), tais como citocinas (IL-1, IL-6, TNF- α e IFN- γ) (SELMAJ, 1996) e fatores estimuladores de colônias (CSFs), que induzem o crescimento e a diferenciação de macrófagos e linfócitos (BENVENISTE, 1992). O TNF- α e o IFN- γ promovem ações pró-inflamatórias, induzindo a expressão de MHC (ALLDINGER *et al.*, 1996; VILAFRANCA *et al.*, 1996) e moléculas de adesão por células endoteliais e do tecido nervoso, recrutando leucócitos da circulação sistêmica e aumentando a permeabilidade da BHE (HICKEY, 1999, 2001). Promovem também vacuolização da mielina e apoptose de oligodendrócitos (BENN *et al.*; PROBERT; AKASSOGLU, 2001).

Outras funções pró-inflamatórias, como a fagocitose e a apresentação de antígenos, também são desempenhadas pelos astrócitos (BRADL, 1996; MONTGOMERY, 1994; SELMAJ, 1996; VANDEVELDE *et al.*, 1981; VILAFRANCA *et al.*, 1996). Os astrócitos, porém, não expressam algumas moléculas co-estimuladoras necessárias à ativação completa dos linfócitos T CD4⁺ (responsáveis pelo início da reação imunológica) (ABBAS *et al.*, 2000), promovendo apoptose (NEUMANN, 2001) ou anergia de tais células (DONG; BENVENISTE, 2001; SELMAJ, 1996). Os astrócitos também possuem a habilidade de secretar substâncias

antiinflamatórias, como o TGF- β e a prostaglandina E, que contradizem a função inflamatória dessas células (ALOISI, 2001; DONG; BENVENISTE, 2001).

De qualquer forma, acredita-se que os astrócitos desempenhem papéis fundamentais em vários aspectos da neurodegeneração e prevalece o interesse em se correlacionar a função astrocitária com as doenças nervosas (MONTGOMERY, 1994; VANDEVELDE *et al.*, 1983).

2.4.3 Proteínas do citoesqueleto e reatividade astrocitária

A astrogliose observada durante os processos de injúria do SNC, especialmente na desmielinização (VANDEVELDE *et al.*, 1983), inclui o aumento na quantidade dos filamentos intermediários que compõem os astrócitos (MONTGOMERY, 1994).

Os filamentos intermediários, assim como os microtúbulos e os microfilamentos, são proteínas estruturais que compõem o citoesqueleto. Condicionam a forma celular e, em conjunto com proteínas motoras, possibilitam a movimentação de estruturas citoplasmáticas e da própria célula (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 1999). Nos astrócitos, tais proteínas são chamadas de fibrilas gliais, sendo a proteína glial fibrilar ácida (GFAP) e a vimentina (VIM), dois importantes representantes dos filamentos intermediários astrocitários (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 1999; TAKAMIYA *et al.*, 1988).

A GFAP é o principal componente estrutural dos astrócitos de indivíduos adultos (BENVENISTE, 1992; MONTGOMERY, 1994). A vimentina, por outro lado, é predominante no período embrionário, sendo perdida conforme o amadurecimento celular, à medida que a expressão da GFAP aumenta. Segundo Pixley e Vellis (1984), a positividade para a VIM parece estar relacionada ao contato das células com espaços extracelulares. Desta forma, durante o amadurecimento e a proliferação celular pós-natal – quando os astrócitos tomam contato com outros tipos celulares e o espaço extracelular, conseqüentemente, diminui – a VIM deixa de ser expressa e é gradualmente substituída pela GFAP. A GFAP, portanto, correlaciona-se com

astrócitos maduros enquanto a VIM está vinculada a astrócitos ainda em fase de desenvolvimento (PIXLEY; VELLIS, 1984; TAKAMIYA *et al.*, 1988).

O aumento na expressão de GFAP e VIM pós-injúria indica reatividade astrocitária (BENVENISTE, 1992; PEKNY *et al.*, 1999; TAKAMIYA *et al.*, 1988). Nas lesões do SNC, a expressão de GFAP pelos astrócitos torna-se muito intensa, inclusive em regiões afastadas dos focos de lesão (BONDAN *et al.*, 2003; VANDEVELDE *et al.*, 1983), e a VIM, antes perdida, volta a se expressar (TAKAMIYA *et al.*, 1988). A função exata do aumento das fibrilas gliais astrocitárias durante os processos de injúria do SNC é ainda desconhecida (PEKNY *et al.*, 1999); entretanto, tais mudanças nos filamentos intermediários dos astrócitos são úteis na avaliação de alterações reativas destas células após agressões (BONDAN *et al.*, 2003).

A imunistoquímica (IHQ) é o principal método utilizado na identificação da reatividade astrocitária, possibilitando, por meio da aplicação de anticorpos contra moléculas específicas do tecido experimental, a caracterização das células estudadas (TOTTERDELL *et al.*, 1992). Neste processo, a marcação para GFAP é relativamente específica para astrócitos (MONTGOMERY, 1994). A VIM, por outro lado, acaba identificando também células de origem mesenquimal, tais como macrófagos, microgliócitos e células endoteliais, endimárias, do plexo coróide e das meninges.

Diversos estudos têm avaliado a reatividade astrocitária, durante os processos de injúria do SNC, pela marcação imunistoquímica das proteínas gliais. Lemos e Alessi (1999) identificaram hipertrofia astrocitária pela marcação imunistoquímica da GFAP, no SNC de cavalos com leucoencefalomalácia. Headley *et al.* (2001) observaram imunorreatividade astrocitária aumentada para a GFAP no cerebelo de cães com cinomose. Estudos de desmielinização focal do tronco encefálico de ratos Wistar, pela injeção intracisternal do agente gliotóxico brometo de etídio, constataram astrogliose evidenciada pelo aumento de expressão de GFAP e pela reexpressão de VIM em astrócitos da periferia lesional (BONDAN *et al.*, 2003; SANCHEZ *et al.*, 2006). Por essa razão, e uma vez que o aumento na quantidade de fibrilas gliais pós-injúria já foi referido em astrócitos infectados pelo vírus da cinomose (GLAUS *et al.*, 1990),

a avaliação morfológica, por meio da reação imunoistoquímica, do comportamento astrocitário frente à infecção e à desmielinização do SNC pelo CDV torna-se importante.

3 MATERIAL E MÉTODO

3.1 Material Experimental

Para a realização deste estudo, o material utilizado foi obtido de arquivos de necropsia do Departamento de Patologia da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM). Foram comparadas amostras de cerebelo e de tronco encefálico de animais que vieram a óbito com diagnóstico histopatológico de cinomose e de animais clinicamente normais (sem alterações observáveis no SNC). Foram selecionadas para análise somente amostras que se adequavam aos seguintes critérios: amostras que não permaneceram por mais de uma semana em formol tamponado a 10% e, no caso dos animais doentes, que apresentavam vacuolização tecidual e algum grau de infiltração inflamatória perivascular (desmielinização crônica). Após seleção, oito amostras de cerebelo e cinco de tronco encefálico de animais com cinomose e duas amostras, dessas mesmas regiões, de animais normais foram utilizadas. Tais amostras foram previamente fixadas em formol a 10% e incluídas em parafina.

3.2 Marcação Imunoistoquímica da GFAP e da Vimentina

A marcação imunoistoquímica da GFAP e da vimentina foi realizada pelo método indireto do complexo avidina-biotina-peroxidase (ABC) (HSU *et al.*, 1981; HSU; RAINE, 1981). Para tal, anteriormente à realização da técnica, foram realizados cortes transversais (de 5µm) das amostras recebidas para montagem de lâminas histológicas. De cada amostra, um corte foi submetido à coloração por hematoxilina e eosina (HE), servindo como controle histopatológico, e dois cortes foram coletados em lâminas silanizadas¹, para submissão à marcação imunoistoquímica da GFAP e da vimentina, respectivamente. A prova imunoistoquímica foi realizada no laboratório do Departamento de Patologia Veterinária da Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade de

¹ Starfrost®-Objekträger, Medite Medizintechnik

São Paulo (FMVZ-USP), seguindo o protocolo utilizado por BONDAN *et al.* (2003) e SANCHEZ *et al.* (2006):

3.2.1 Desparafinização e Hidratação: Os cortes colhidos em lâminas silanizadas foram submetidos à desparafinização em xilol e à hidratação em uma seqüência de etanol absoluto, etanol a 95%, etanol a 70% e água destilada.

3.2.2 Bloqueio da Peroxidase Endógena: Apesar de a maioria das enzimas endógenas ser destruída durante o processo de fixação do material, algumas enzimas presentes no tecido experimental podem reagir ao processo, formando produtos que também são marcados durante a prova imunohistoquímica. Para prevenir a marcação inespecífica dos tecidos, realiza-se o bloqueio da peroxidase endógena (TOTTERDELL *et al.*, 1992). Desta forma, após a hidratação, os cortes foram banhados por 30 minutos em uma solução contendo 3% de peróxido de hidrogênio e 10% de metanol. Posteriormente foram lavados em solução salina tamponada com fosfato (PBS, pH 7,4), diluída 1:10 em água destilada.

3.2.3 Recuperação antigênica: A recuperação antigênica, preparando as fibrilas gliais (mascaradas pelos processos de fixação e parafinização) para ligação com anticorpos específicos, foi efetuada pelo método de irradiação por microondas (LEONG *et al.*, 1985; LOGIN; DVORACK, 1988, 1993) em amostras imersas em solução ácida (CATTORETTI *et al.*, 1993). Para tal, as lâminas com os cortes aderidos foram imersas em tampão citrato 0,01M (ácido cítrico 0,01M e citrato de sódio 0,01M, em água destilada, 1:3, pH 6,0) e submetidas a três fervuras, de cinco minutos cada uma, em forno de microondas convencional (potência máxima). Posteriormente, as lâminas foram resfriadas por 20 minutos e lavadas em PBS.

3.2.4 Incubação com anticorpo primário: Todos os cortes foram incubados em câmara úmida, a 4° C, por 24 horas, com 200 µl de anticorpo primário policlonal anti-GFAP² ou com anticorpo monoclonal anti-VIM³, padronizados, respectivamente, nas diluições 1:1000 e 1:200, que, por titulação prévia, foram consideradas as mais adequadas (BONDAN *et al.*, 1993; SANCHEZ *et*

² Rabbit anti-cow GFAP, code number ZO334, DAKO

³ Mouse anti-swine VIM, code number MO725, DAKO

al., 2006). Para a diluição foi utilizada solução contendo soro-albumina bovina a 5% em água destilada (1,25 ml), azida sódica a 5% em água destilada (2,5 ml) e PBS (59 ml). As lâminas foram, então, lavadas em PBS e submetidas à incubação com o anticorpo secundário.

3.2.5 Incubação com anticorpo secundário: Os cortes foram incubados, durante uma hora em câmara úmida a 4° C, com 200 µl do anticorpo secundário biotilado anti-imunoglobulinas de coelho e anti-imunoglobulinas de camundongo⁴ na diluição 1:100 em PBS. Após a lavagem das lâminas em PBS, 200 µl do conjugado estreptavidina-biotina-peroxidase⁵, diluído 1:100 em PBS, foram aplicados sobre as lâminas, as quais permaneceram por mais uma hora incubadas em câmara úmida a 4° C.

3.2.6 Revelação: Após a lavagem das lâminas com PBS, aplicaram-se sobre os cortes 200µl de uma solução substrato-cromógeno⁶, constituída de 20 µl de cromógeno DAB (3,3' – diaminobenzidina em solução de cromógeno) e 1 ml de substrato tamponado (tampão HCl-imidazol, pH 7,5, contendo peróxido de hidrogênio), preparada imediatamente antes do uso. A reação da peroxidase forma um precipitado castanho visível à microscopia de luz, que corresponde à revelação dos antígenos (TOTTERDELL *et al.*, 1992). Os cortes foram lavados em água destilada e contracolorados com hematoxilina por 30 segundos.

3.2.7 Desidratação: Após as reações de coloração, as lâminas foram submetidas à desidratação em uma bateria de álcoois (etanol a 70%, etanol a 95% e etanol absoluto) e à diafanização em xilol, sendo posteriormente montadas com resina sintética sob lamínula.

Todas as reações foram acompanhadas por lâminas de controle negativo, que foram submetidas a todas as etapas do procedimento, com exceção da aplicação do anticorpo primário.

⁴ Novostain Super ABC Kit, Novocastra

⁵ Novostain Super ABC Kit, Novocastra

⁶ Sistema Substrato-Cromógeno (DAB+ Líquido DakoCytomation®), DAKO

3.3 Interpretação Imunoistoquímica

3.3.1 Avaliação dos cortes em microscopia de luz: Todos os cortes submetidos à prova imunoistoquímica foram analisados, em microscopia de luz (com objetiva de 10X), para identificação e avaliação da distribuição e do comportamento morfológico das células marcadas para GFAP ou vimentina (coradas em castanho), comparando-se também tais observações com as obtidas na leitura das lâminas coradas por HE. Áreas de 302.952,5 μm^2 do cerebelo e do tronco encefálico, dos animais com cinomose e dos animais normais, foram selecionadas para análise e comparação. A seleção das áreas do cerebelo seguiu o mesmo critério utilizado por Headley *et al.* (2001). De cada animal, foram selecionadas três regiões: R-1 (constituída apenas pela substância branca abaixo das folias cerebelares), R-2 (composta pela base das folias, contendo, além da substância branca, as camadas granular e molecular) e R-3 (contendo as mesmas estruturas de R-2, mas tomada da extremidade distal das folias cerebelares). De cada região, três medidas foram tomadas (Figura 1A). Além disso, áreas de 302.952,5 μm^2 da substância branca do cerebelo também foram analisadas quanto à imunorreatividade para a GFAP e para a VIM nas regiões com e sem infiltração inflamatória perivascular e nas regiões com e sem degeneração tecidual, comparando-se, além de animais normais e doentes (comparação intergrupos), a diferença de resposta entre as duas regiões nos indivíduos doentes (comparação intragrupo). Para a análise da imunorreatividade perivascular para a GFAP e para a VIM, três medidas foram tomadas dos animais normais e uma medida foi tomada dos animais com cinomose. Na análise da integridade tecidual da substância branca do cerebelo, três medidas foram tomadas dos animais normais e duas dos animais com cinomose. Do tronco encefálico, duas regiões foram selecionadas: uma imediatamente abaixo do epêndima (r-I) e outra mais interna, na região mais ventral do tronco encefálico (r-II). Duas medidas, do tronco encefálico, foram tomadas de cada região dos animais normais (Figura 1B) e uma medida foi tomada de cada região dos animais com cinomose. Comparações inter e intragrupo foram estabelecidas também para esse local.

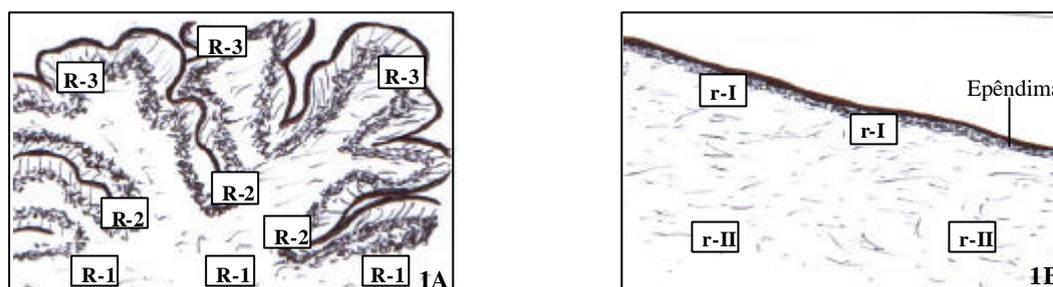


Figura 1 Representação esquemática da localização A) das três regiões cerebelares selecionadas (R-1, R-2 e R-3) e B) das duas regiões selecionadas do tronco encefálico (r-I e r-II).

3.3.2 Quantificação da Reatividade Astrocitária: Visto que a reatividade astrocitária se expressa com o aumento do nível de fibrilas gliais no interior dos astrócitos (BENVENISTE, 1992; TAKAMIYA *et al.*, 1988), tal processo foi determinado por colorimetria, quantificando, em μm^2 , a área corada em castanho contida em uma área total de $302.952,5 \mu\text{m}^2$. Para tal, utilizou-se um sistema computacional de análise de imagens, o Image-Pro Plus 4.5⁷, considerado um eficiente sistema de quantificação de elementos marcados por reação imunoistoquímica (FRANCISCO *et al.*, 2004). Os resultados numéricos obtidos no *software* foram submetidos à análise estatística.

3.3.3 Análise Estatística: Para verificar se as observações mensuradas seguiam ou poderiam ser aproximadas da distribuição normal, empregou-se a prova estatística de Shapiro-Wilk, seguida da inspeção do gráfico de quantis (qq-plot). Posteriormente, métodos não-paramétricos foram utilizados na análise estatística da amostragem, sendo a mediana utilizada como estimador da medida de posição e o intervalo interquartil – diferença entre os valores dos percentis 75 e 25 – empregado como estimador da medida de dispersão. Na análise da imunorreatividade para a GFAP e para a VIM nas regiões perivasculares (com infiltração e sem infiltração), da substância branca do cerebelo (com degeneração e sem degeneração) e do tronco encefálico (r-I e r-II), empregou-se a prova estatística de Mann-Whitney, verificando a significância das diferenças intra e intergrupos. A significância da diferença intragrupo da imunorreatividade para a GFAP e

⁷ Media Cybernetics, Silver Spring, EUA

para a VIM, nas regiões R-1, R-2 e R-3 do cerebelo, foi estimada pela prova estatística de Kruskal-Wallis. A significância das diferenças observadas, nessas mesmas regiões, entre os animais normais e os animais com cinomose, foi avaliada pela prova de Mann-Whitney. A significância estatística para todas as provas foi aceita em $\alpha = 0,05$.

4 RESULTADOS

4.1 Avaliação dos cortes em microscopia de luz

4.1.1 Análise histopatológica

Na análise histopatológica, cortes corados por HE foram avaliados em microscopia de luz. De forma geral, observou-se, nas lâminas dos animais doentes, a presença de degeneração (caracterizada por microcavitações teciduais) em todas as amostras, variando em intensidade e extensão. Observou-se que lesões degenerativas mais intensas ocorreram na substância branca (Figura 2A) e nas regiões circunventriculares do cerebelo e do tronco encefálico. A infiltração de células inflamatórias foi observada em todos os cortes, especialmente nas regiões perivasculares (Figura 2B); entretanto, os manguitos formados apresentavam um número variável de camadas de células inflamatórias. Em alguns cortes foram observados, conjuntamente, infiltrados variando de uma até quatro camadas de células inflamatórias. Corpúsculos de inclusão eosinofílicos intranucleares foram encontrados em astrócitos. Nas amostras obtidas de animais normais, não foram observadas alterações estruturais nem anormalidades celulares nos tecidos.

4.1.2 Análise imunoistoquímica

A análise dos cortes marcados para GFAP e VIM, tanto dos animais doentes quanto dos animais normais, foi realizada em microscopia de luz, avaliando-se a distribuição e o comportamento morfológico das células positivas para ambas as proteínas. Foram consideradas como positivas, para GFAP ou VIM, as células cujo citoplasma apresentou-se corado em marrom intenso.

Em relação à GFAP, os cortes provenientes dos animais com cinomose apresentaram marcação difusa por toda a extensão dos tecidos, especialmente na substância branca e nas áreas

circunventriculares, do cerebelo e do tronco encefálico, e nas proximidades das áreas de degeneração. Dentre as regiões selecionadas para a quantificação computacional da reatividade astrocitária, R-1 do cerebelo (composta apenas pela substância branca) e r-I do tronco encefálico (composta pela região imediatamente abaixo do epêndima) obtiveram marcação mais intensa. A imunorreatividade astrocitária foi maior no grupo de animais doentes do que no de animais normais (Figura 3A e B). As células marcadas para a GFAP nos animais com cinomose apresentaram aumento no volume do citoplasma e na extensão dos prolongamentos celulares, além de coloração mais intensa do citoplasma. Os animais normais apresentaram menor marcação para a GFAP – apesar de presentes em todo o tecido, as células positivas para a GFAP não se apresentaram intensamente coradas, sendo o seu citoplasma também mais escasso do que o das células dos animais doentes.

A marcação imunoistoquímica da VIM nos cortes provenientes de animais doentes revelou que as células positivas para a proteína estavam presentes em grandes quantidades nas regiões com degeneração e nas proximidades do quarto ventrículo. As regiões sem alterações teciduais visíveis não apresentaram marcação ou a marcação foi escassa. Outros tipos celulares, tais como células endoteliais, ependimárias, meníngeas, glia de Bergmann no cerebelo e células monocíticas fagocitárias (caracterizadas pelo seu citoplasma volumoso e espumoso) nos animais que continham infiltração inflamatória, apresentaram-se marcados para a VIM. Da mesma forma que a marcação para a GFAP, a marcação para a VIM foi maior nos animais com cinomose do que nos animais normais (Figura 4A e B). Nos animais normais, apenas alguns astrócitos apresentaram marcação positiva para a VIM. Tais astrócitos estavam presentes predominantemente na região subependimal e, em comparação aos animais com cinomose, o citoplasma de tais células mostrou-se muito menos abundante, assim como a extensão dos seus prolongamentos.

Nas regiões do cerebelo com infiltração inflamatória, especialmente ao redor de manguitos perivasculares com mais de cinco camadas de células inflamatórias, a marcação para a GFAP foi menos intensa do que em outras regiões da substância branca (Figura 5A). Por outro lado, e ao contrário do observado na marcação da GFAP, as regiões próximas a manguitos perivasculares apresentaram células morfologicamente compatíveis com astrócitos marcadas para

a VIM, especialmente quando os manguitos continham um número maior de camadas de células inflamatórias. Nestas condições, o citoplasma das células positivas também se mostrou mais volumoso (Figura 5B e C); entretanto, apesar da presença de células positivas, a intensidade da marcação astrocitária ao redor dos vasos foi menor do que a apresentada nas áreas de degeneração.

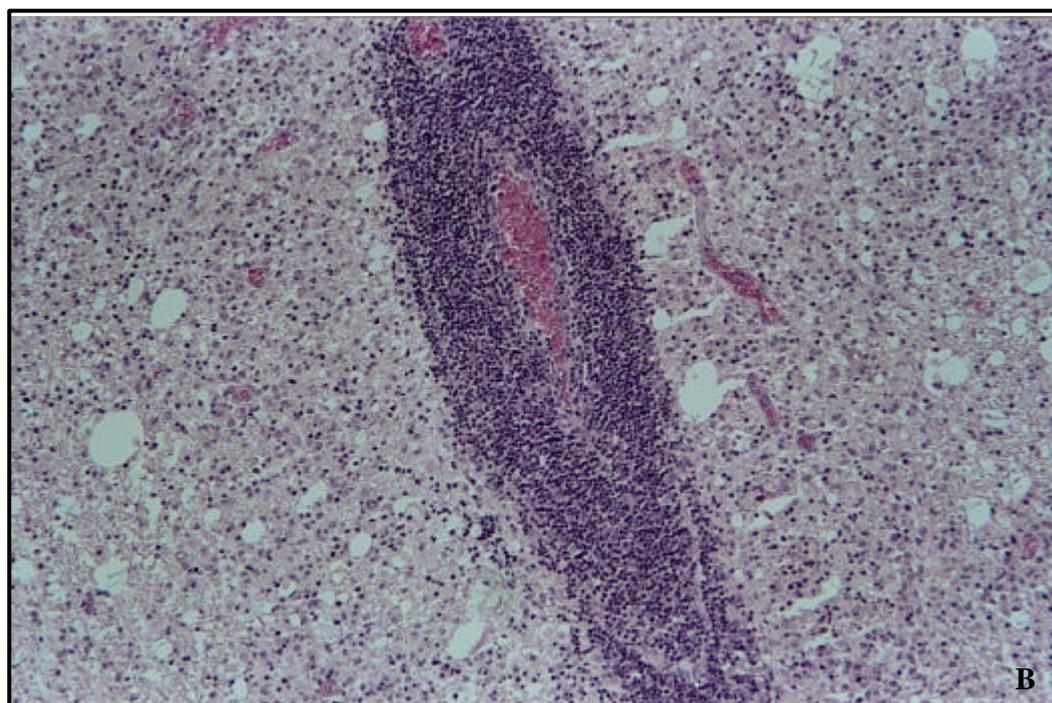
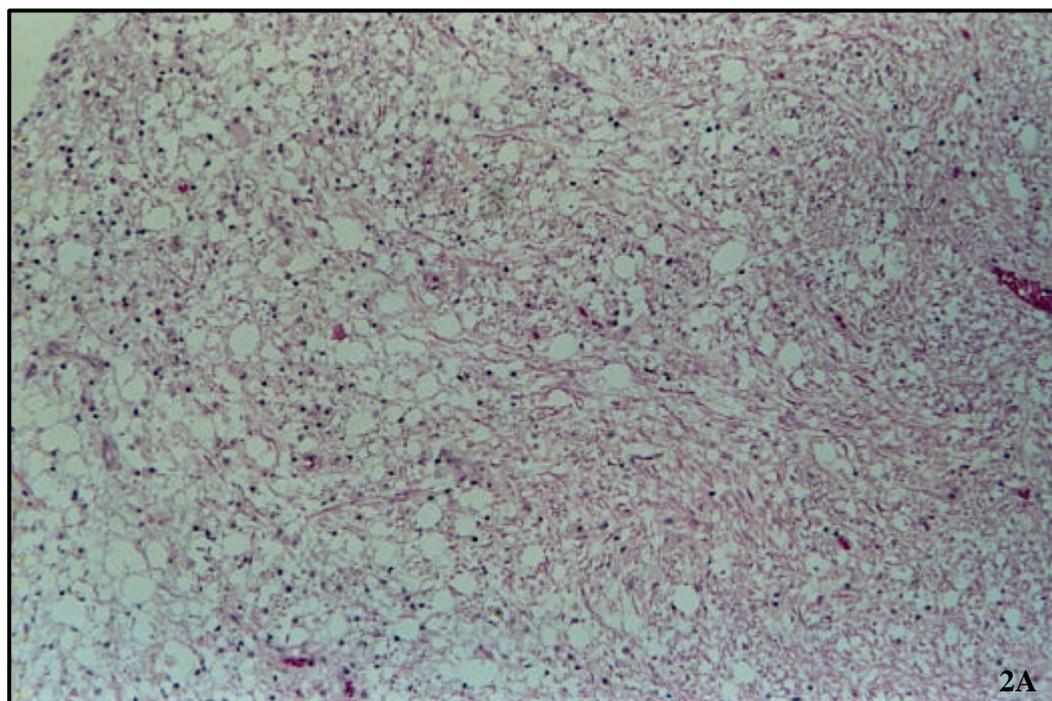


Figura 2 A e B. A) Microcavitações teciduais compatíveis com desmielinização na substância branca do cerebelo de um cão com cinomose. Obj. 10x. B) Infiltração inflamatória perivascular no SNC de um cão com cinomose. Obj. 10x.

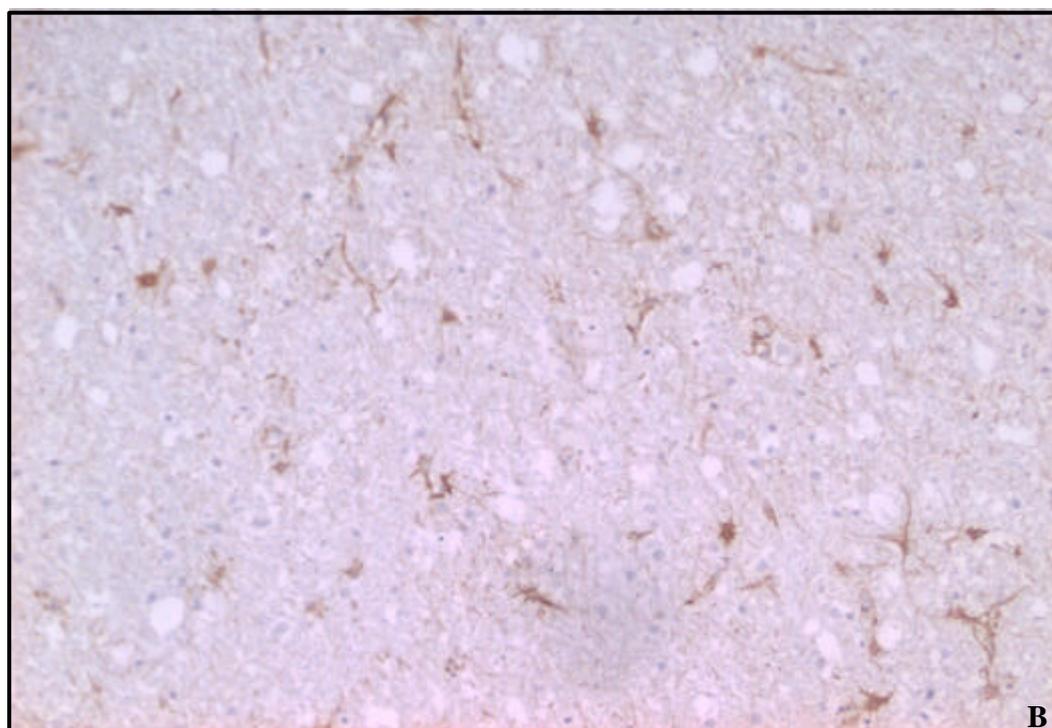
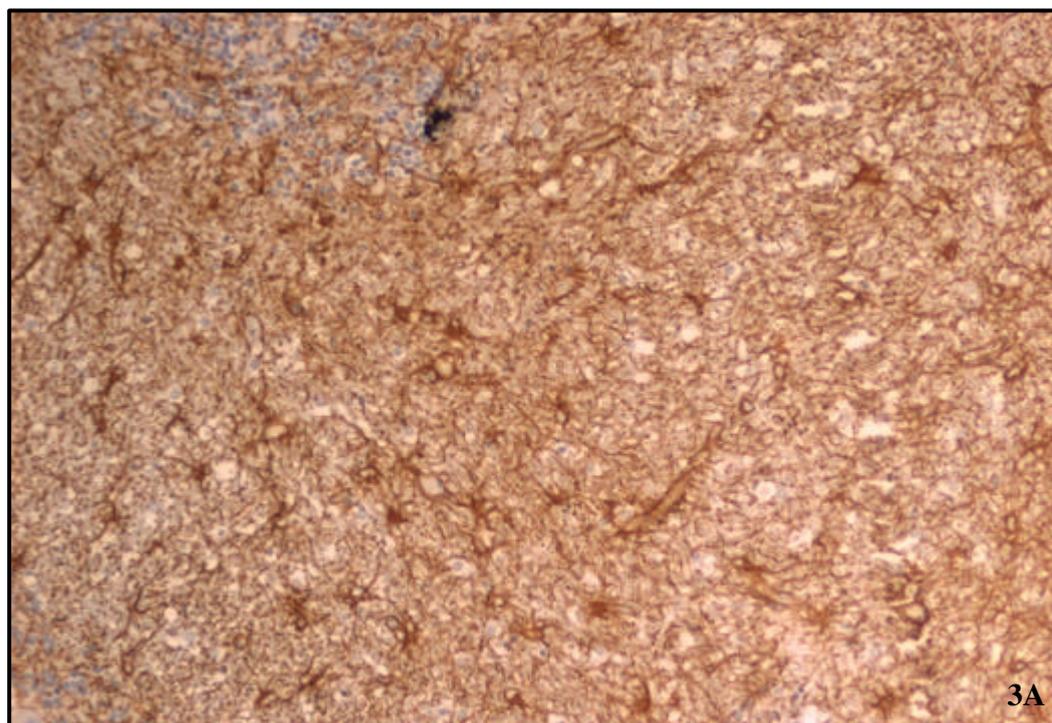


Figura 3 A e B Marcação imunistoquímica da GFAP na substância branca do cerebelo de animais com cinomose (A) e de animais normais (B). Obj. 10x.

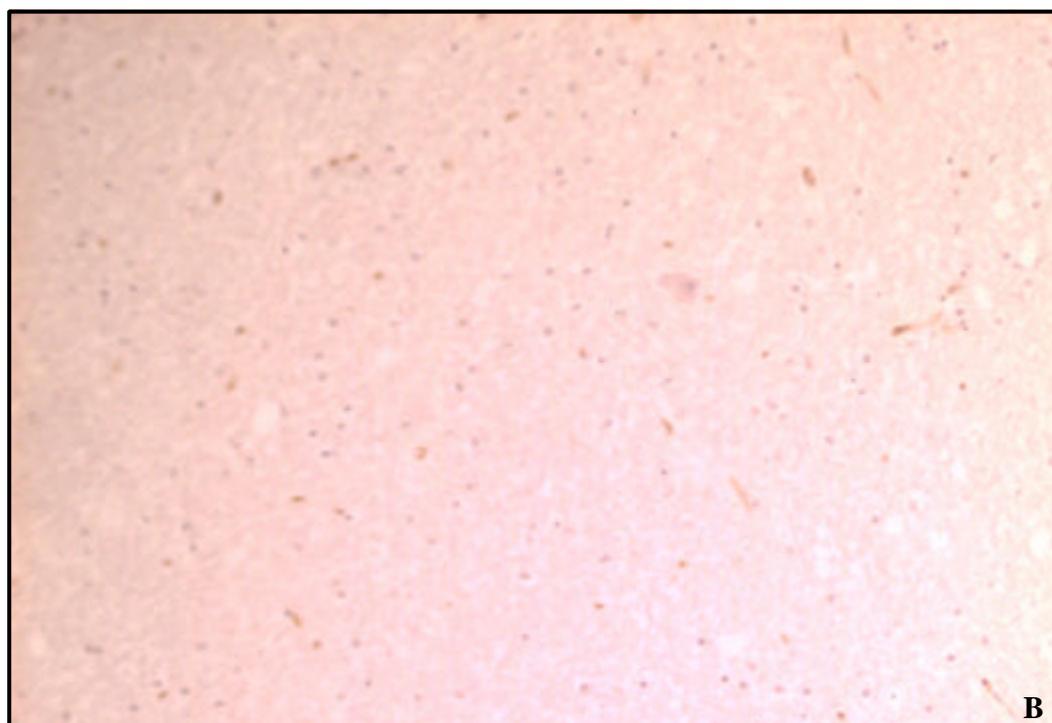


Figura 4 A e B Marcação imunohistoquímica da VIM na substância branca do cerebelo de animais com cinomose (A) e de animais normais (B). Obj. 10x.

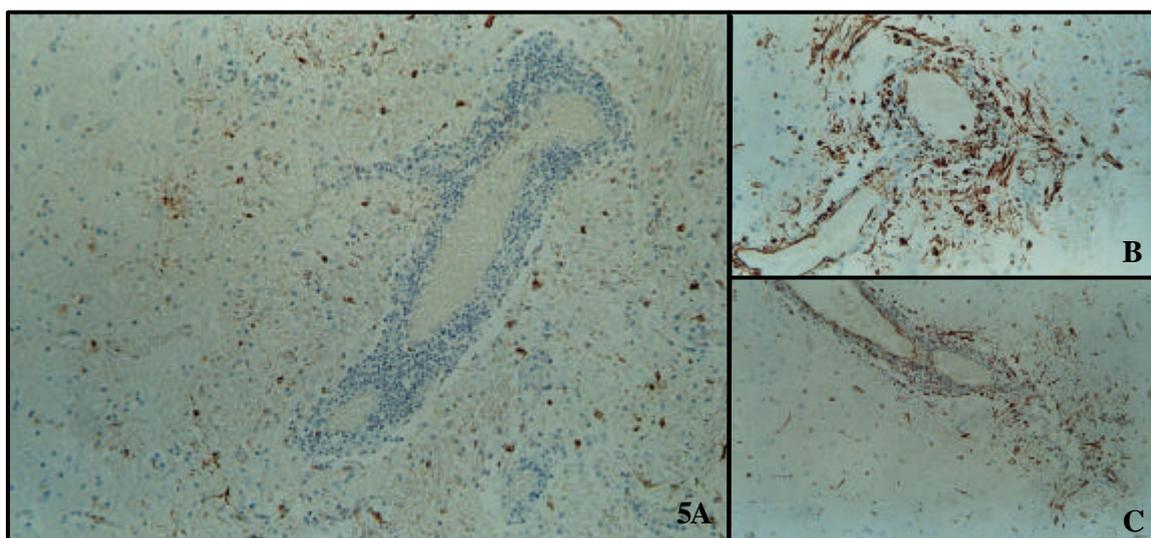


Figura 5 A, B e C Expressão da GFAP (A) e da VIM (B e C) na região perivascular de vasos com infiltração inflamatória no SNC de cães com cinomose. Obj. 10x (A e C). Obj. 20x (B).

4.2 Quantificação da reatividade astrocitária e análise estatística

A avaliação estatística do resultado numérico obtido na quantificação computacional da área ocupada pelas células marcadas para a GFAP e a VIM encontra-se discriminada a seguir.

A análise estatística das regiões cerebelares (R-1, R-2 e R-3) revelou diferença significativa ($P < 0,0010$) entre os animais com cinomose e os animais normais, sendo os valores obtidos, na marcação para a GFAP e para a VIM, menores nos animais normais (Tabela 1; Figura 6A e B). Observou-se, ainda nessa análise, diferenças importantes ($P = 0,0160$) entre as regiões R-1 e R-3 em relação à VIM, sendo a marcação para a VIM maior em R-1 do que em R-3. Na análise da substância branca do cerebelo quanto à presença ou não de infiltração inflamatória, constatou-se que os animais normais apresentaram menor marcação para a GFAP e para a VIM ($P < 0,0001$) do que os animais doentes, independentemente de, nestes, o tecido apresentar ou não infiltração inflamatória (Tabela 2; Figura 7A e B). Na comparação intragrupo (animais doentes com e sem infiltração inflamatória), nenhuma diferença considerada significativa foi observada. A análise da substância branca do cerebelo quanto à marcação para a GFAP e para a VIM, na presença ou ausência de degeneração tecidual, demonstrou que tal marcação foi significativamente menor ($P < 0,0001$) nos animais normais, independentemente da presença ou não de degeneração nos doentes (Tabela 3; Figura 8A e B). Além disso, a marcação para a VIM indicou diferença entre as situações com e sem degeneração – a marcação foi significativamente maior ($P = 0,0033$) nas regiões com degeneração. Em relação às regiões selecionadas do tronco encefálico (r-I e r-II), observou-se que a marcação para a GFAP e para a VIM foi significativamente menor ($P < 0,0010$) nos animais normais em comparação aos animais doentes (Tabela 4; Figura 9A e B). Nenhuma diferença significativa foi encontrada na análise intragrupo (comparação das regiões r-I e r-II) da marcação para a GFAP e para a VIM no tronco encefálico dos animais com cinomose e dos animais sadios.

Tabela 1 Área (em μm^2) de expressão da GFAP e da VIM no cerebelo de animais normais e com cinomose

Variável	Animais normais	Animais com cinomose	Geral
GFAP			
R-1	5148,21 (1222,62)	103690,50 (69027,03)	76574,77 (94278,63)
R-2	8870,50 (13625,38)	90482,20 (60431,07)	78130,25 (75201,46)
R-3	4856,03 (13929,11)	48268,38 (61327,67)	39427,80 (40492,94)
Geral	5148,21 (9226,40) ^a	80655,27 (82310,44)	-
VIM			
R-1	40,84 (140,00)	16770,93 (25760,27)	13393,83 (26183,99)
R-2	278,21 (196,55)	4219,08 (10794,27)	2417,41 (9677,48)
R-3	108,66 (179,95)	1310,75 (2187,02)	635,48 (2285,71) ^b
Geral	162,31 (247,77) ^a	4219,08 (16393,60)	-

Os dados são apresentados na forma de mediana (intervalo interquartil).

R-1 - substância branca abaixo das folias cerebelares; R2 - base das folias, contendo a substância branca e as camadas granular e molecular do cerebelo; R-3 - extremidade distal das folias, contendo a substância branca e as camadas granular e molecular do cerebelo.

^a indica diferença, com grau de significância em $P < 0,0010$, em relação aos animais com cinomose, independentemente do local mensurado.

^b indica diferença, com grau de significância em $P = 0,0160$, em relação ao local R1, independentemente do grupo avaliado.

Tabela 2 Área (em μm^2) de expressão da GFAP e da VIM na região perivascular da substância branca do cerebelo de animais normais e com cinomose

Variável	Animais normais	Animais com cinomose
GFAP		
Ausência de infiltração inflamatória	4058,24 (3692,10) ^a	85493,77 (104515,71)
Presença de infiltração inflamatória	-	86757,39 (27583,08)
VIM		
Ausência de infiltração inflamatória	237,79 (342,72) ^a	3538,77 (7635,34)
Presença de infiltração inflamatória	-	10371,51 (43253,03)

Os dados são apresentados na forma de mediana (intervalo interquartil).

^a indica diferença, com grau de significância em $P < 0,0001$, em relação aos animais com cinomose, independentemente da situação.

Tabela 3 Área (em μm^2) de expressão da GFAP e da VIM na substância branca do cerebelo de animais normais e com cinomose

Variável	Animais normais	Animais com cinomose
GFAP		
Ausência de degeneração	5148,21 (1222,62) ^a	76278,91 (71222,20)
Presença de degeneração	-	57910,53 (104425,78)
VIM		
Ausência de degeneração	40,84 (140,00) ^a	9648,34 (24637,97)
Presença de degeneração	-	58082,18 (53449,24) ^b

Os dados são apresentados na forma de mediana (intervalo interquartil).

^a indica diferença, com grau de significância em $P < 0,0001$, em relação aos animais com cinomose, independentemente da situação.

^b indica diferença, com grau de significância em $P = 0,0033$, em relação à situação sem degeneração, intragrupo.

Tabela 4 Área (em μm^2) de expressão da GFAP e da VIM no tronco encefálico de animais normais e com cinomose

Variável	Animais normais	Animais com cinomose	Geral
GFAP			
r-I	24888,89 (26237,17)	95907,55 (97893,38)	48488,43 (72968,92)
r-II	9960,99 (4633,26)	87978,17 (43478,54)	59618,21 (85219,96)
Geral	12557,10 (8676,01) ^a	95802,90 (90214,70)	-
VIM			
r-I	610,92 (1052,07)	13047,90 (40633,60)	2002,82(17559,37)
r-II	47,70 (41,59)	2330,32 (1774,43)	1741,16 (2460,36)
Geral	101,60 (372,92) ^a	2722,37 (8627,00)	-

Os dados são apresentados na forma de mediana (intervalo interquartil).

r-I - região do tronco encefálico imediatamente abaixo do epêndima; r-II - região mais ventral do tronco encefálico.

^a indica diferença, com grau de significância em $P < 0,0010$, em relação aos animais com cinomose, independentemente da região mensurada.

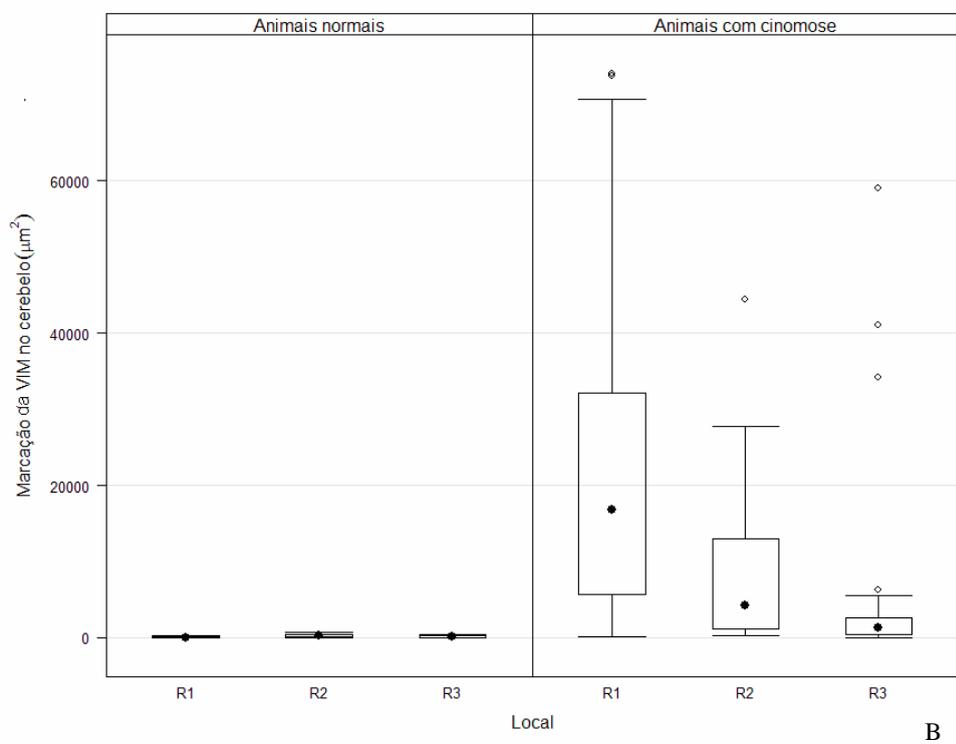
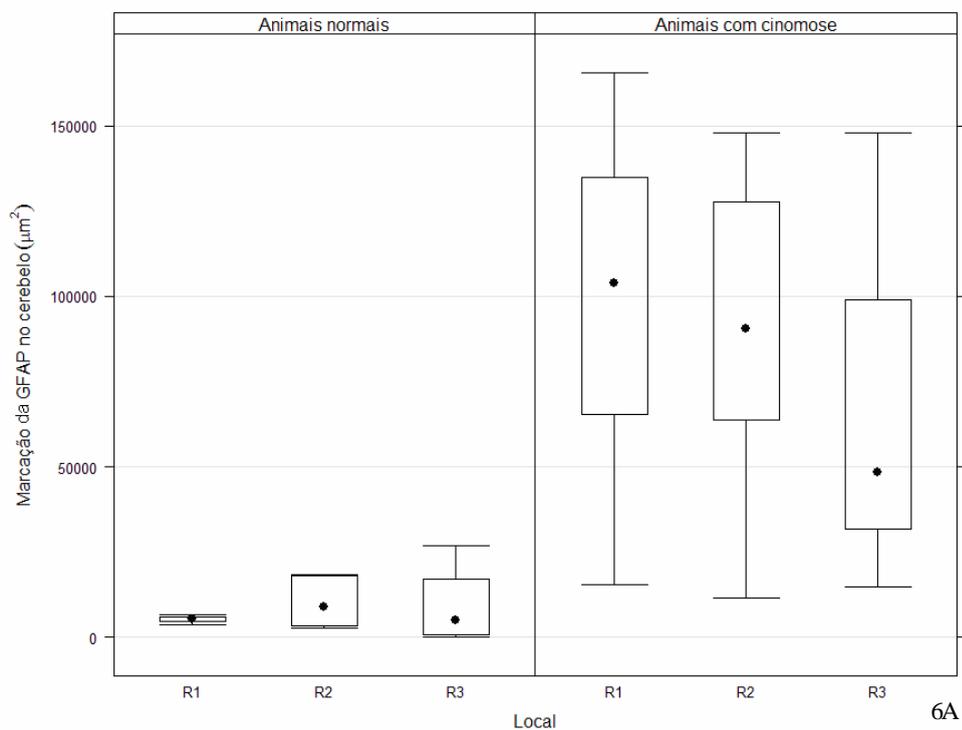
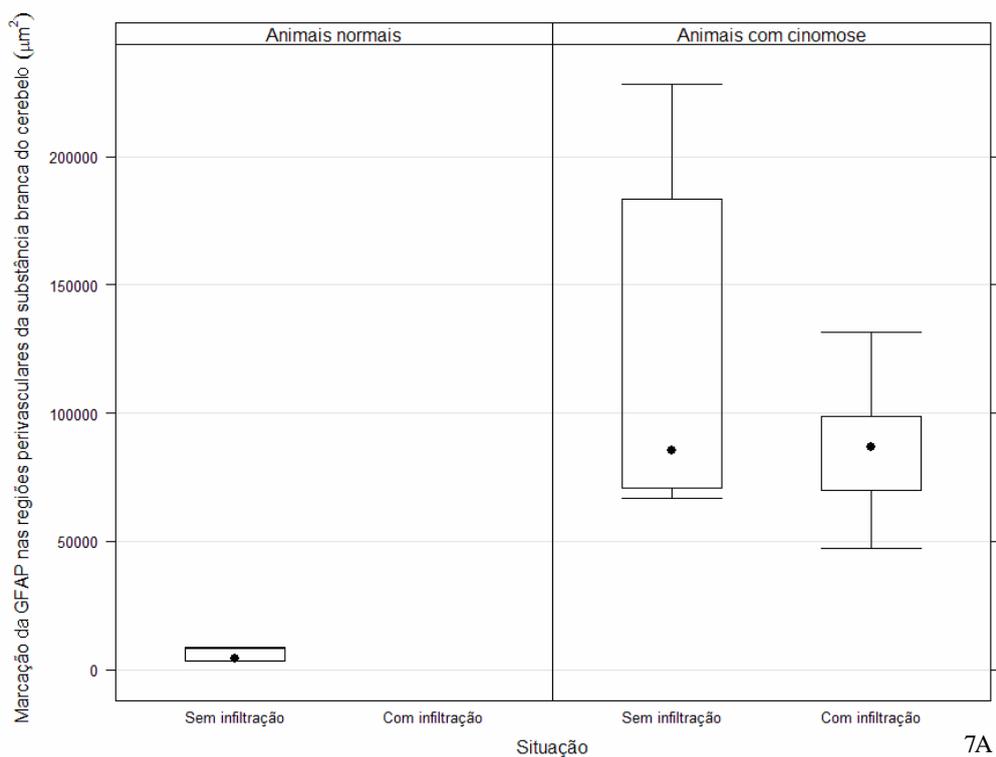
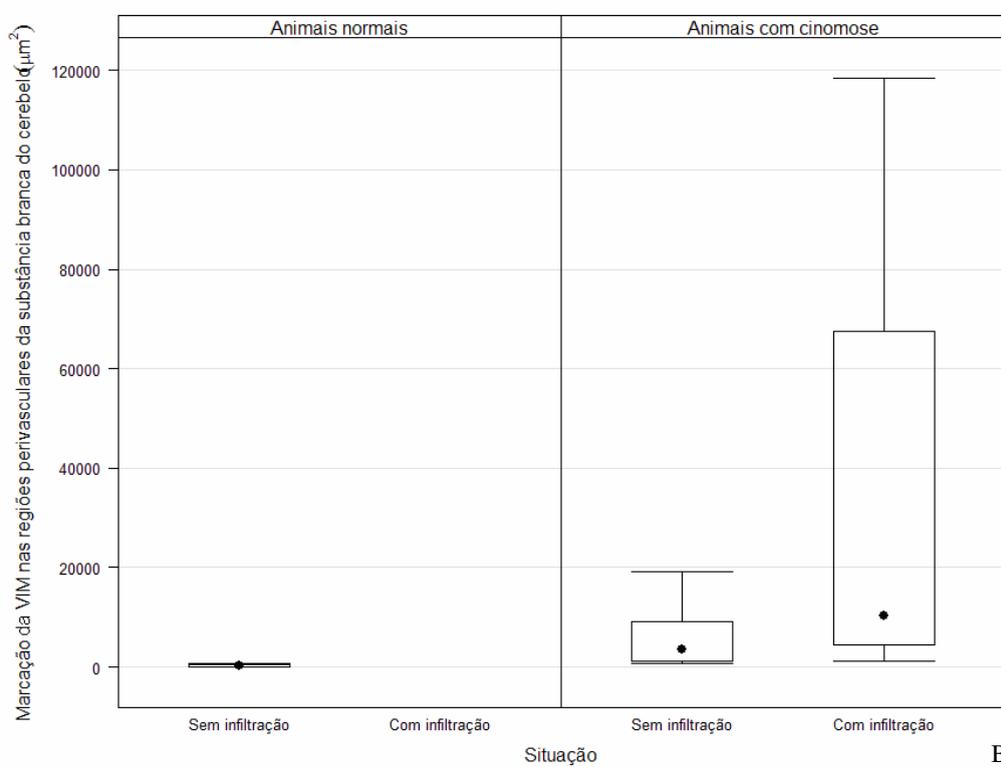


Figura 6 A e B Expressão de GFAP (A) e de VIM (B) no cerebello de animais normais e com cinomose.



7A



B

Figura 7 A e B Expressão de GFAP (A) e de VIM (B) na região perivascular da substância branca do cerebelo de animais normais e com cinomose.

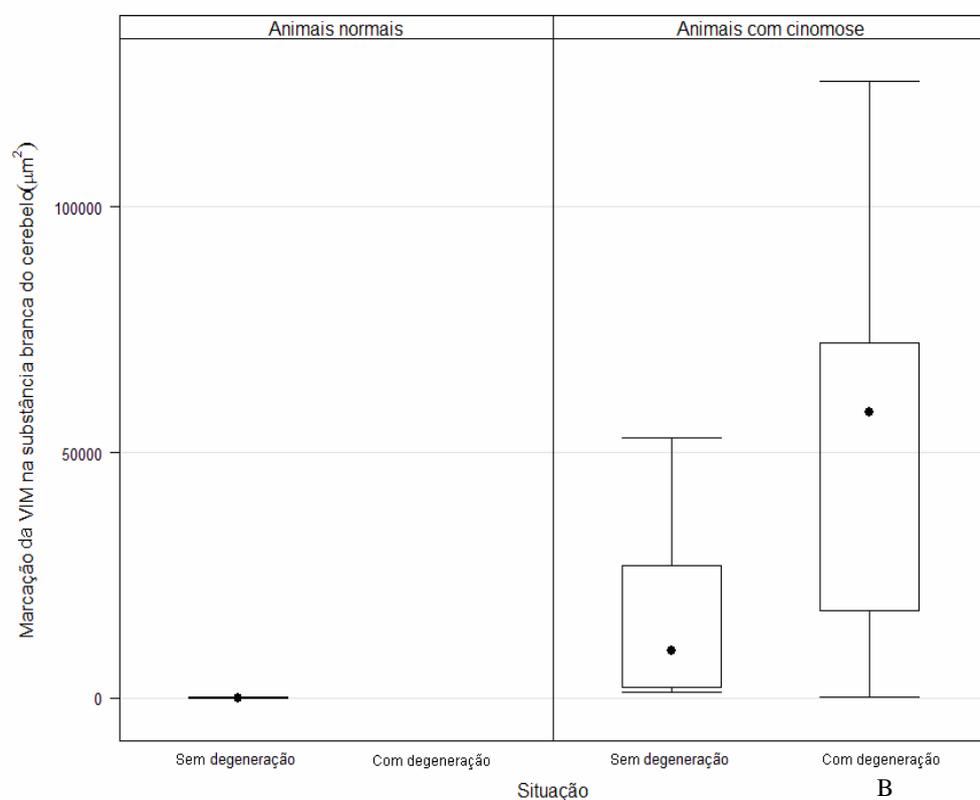
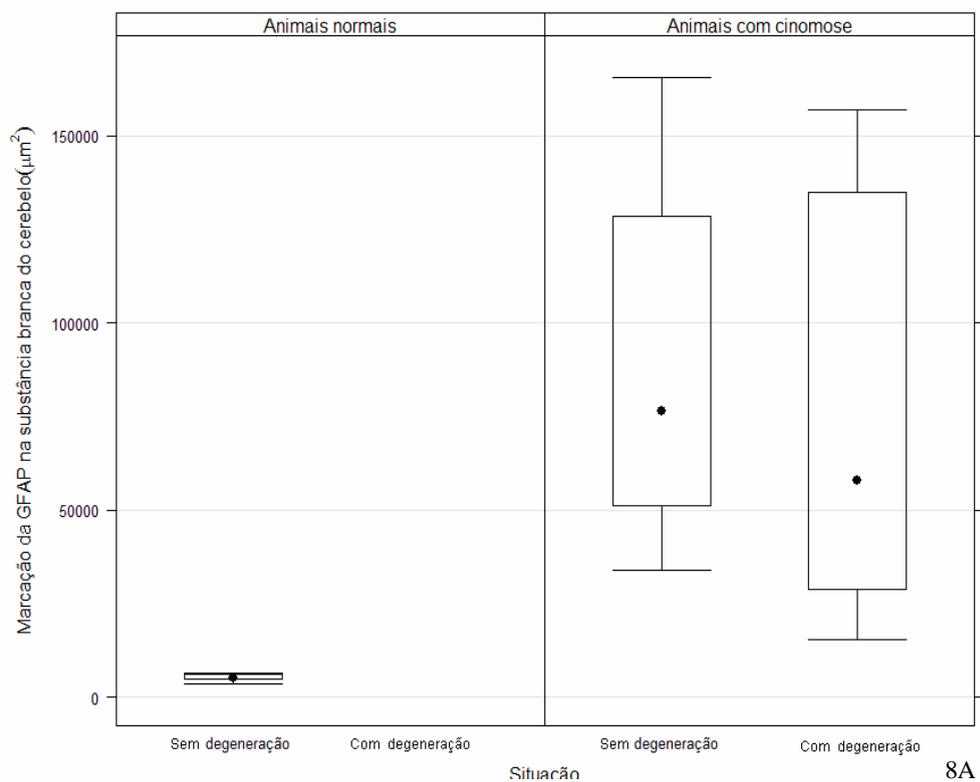


Figura 8 A e B Expressão de GFAP (A) e de VIM (B) na substância branca do cerebelo de animais normais e com cinomose na ausência e na presença de degeneração tecidual.

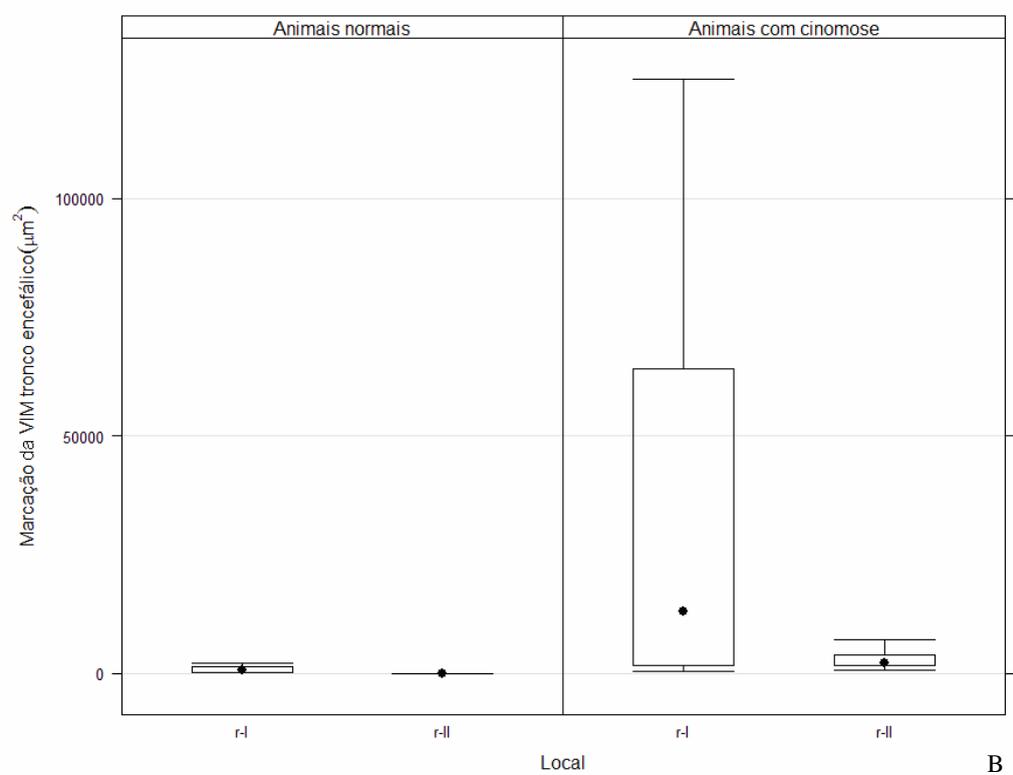
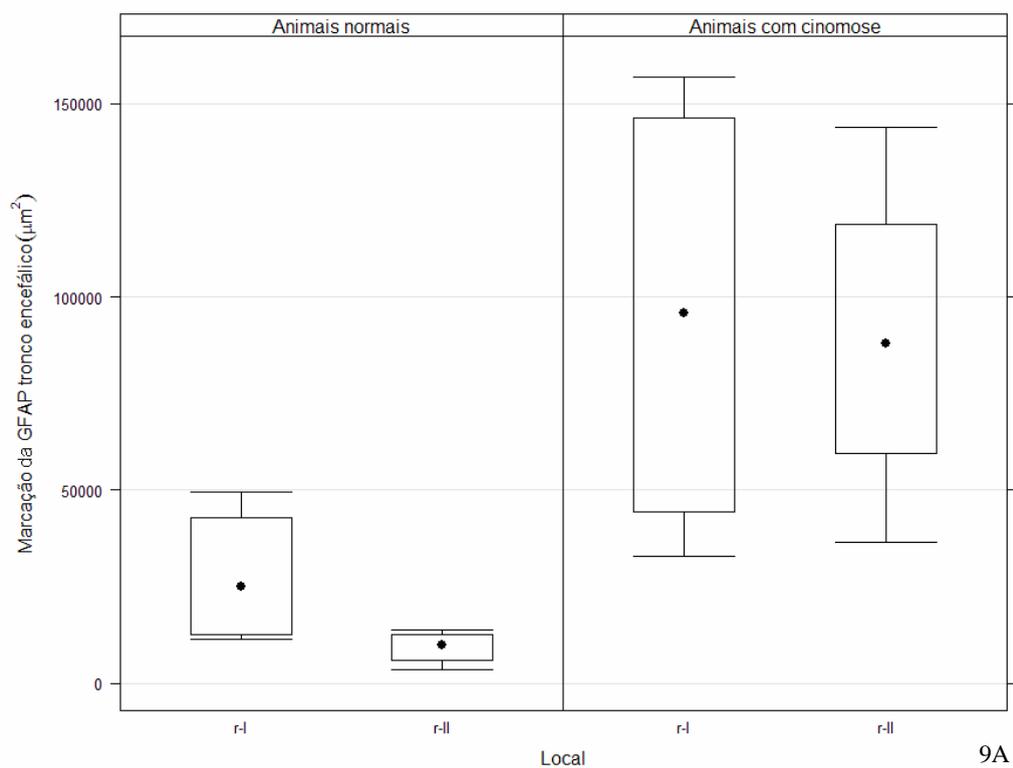


Figura 9 A e B Expressão de GFAP (A) e de VIM (B) no tronco encefálico de animais normais e com cinomose.

5 DISCUSSÃO

Dada a importância da elucidação dos eventos celulares envolvidos na patogenia das doenças desmielinizantes do SNC, este estudo teve por objetivo avaliar a resposta morfológica e a distribuição de astrócitos no SNC de cães infectados pelo vírus da cinomose (CDV) – importante doença infecciosa de cães e outros carnívoros cuja desmielinização promovida no SNC se assemelha, em vários aspectos, à desenvolvida em diversas doenças desmielinizantes humanas.

Uma vez que os astrócitos são células responsáveis por numerosas funções de suporte ao SNC e que respondem prontamente a uma ampla variedade de insultos ao tecido nervoso (proliferando e aumentando suas dimensões) (BENVENISTE, 1992; DONG; BENVENISTE, 2001; MONTGOMERY, 1994; PEKNY *et al.*, 1999; TAKAMIYA *et al.*, 1988; VANDEVELDE *et al.*, 1983), o estudo do comportamento dos astrócitos nas lesões desmielinizantes do SNC é importante, especialmente na inferência de possíveis funções dessas células na mediação do processo inflamatório relacionado à desmielinização. Funções astrocitárias na liberação de substâncias pró-inflamatórias e anti-inflamatórias já foram descritas por diversos autores (ALOISI, 2001; BENVENISTE, 1992; DONG; BENVENISTE, 2001; MONTGOMERY, 1994; SELMAJ, 1996) e os astrócitos correspondem à principal célula infectada pelo CDV (WUNSCHMANN *et al.*, 1999; ZURBRIGGEN *et al.*, 1986).

Neste estudo, amostras de cerebelo e de tronco encefálico de animais que vieram a óbito por cinomose foram utilizadas. A escolha de tais regiões baseou-se em informações anteriores de que o cerebelo é considerado um dos locais de escolha para a pesquisa de lesões histopatológicas promovidas pelo CDV. O mesencéfalo (componente do tronco encefálico), por sua vez, é também descrito como uma das principais regiões acometidas por lesões desmielinizantes na cinomose (ALLDINGER *et al.*, 1993; VANDEVELDE *et al.*, 1982; VANDEVELDE; ZURBRIGGEN, 2005). Além disso, estudos sobre o comportamento astrocitário na desmielinização do SNC foram desenvolvidos no tronco encefálico de ratos Wistar, servindo

como parâmetro para a comparação de resultados (BONDAN *et al.*, 2003; SANCHEZ *et al.*, 2006).

A análise do comportamento astrocitário foi realizada por meio da marcação imunoistoquímica de duas importantes proteínas componentes dos filamentos intermediários dos astrócitos – a GFAP e a VIM – cujo aumento durante os processos de injúria dos tecidos nervosos sinaliza a reatividade astrocitária (BENVENISTE, 1992; PEKONY *et al.*, 1999; TAKAMIYA *et al.*, 1988). A prova imunoistoquímica evidenciou as células procuradas por meio de uma reação de coloração, pela ligação de moléculas presentes no interior dos astrócitos (GFAP e VIM) com anticorpos específicos marcados, promovendo, como efeito final, a coloração em castanho do citoplasma das células positivas para as proteínas procuradas. Em comparação às técnicas tradicionais de coloração tecidual, como, por exemplo, a coloração de cortes por hematoxilina e eosina (HE), a marcação imunoistoquímica representa um método mais eficiente de identificação celular (BRASILEIRO FILHO *et al.*, 1998; TOTTERDELL *et al.*, 1992). Apesar de a coloração por HE conseguir identificar a reatividade astrocitária em microscopia de luz (pelo aumento da eosinofilia celular), há dificuldade na distinção entre os astrócitos e outros tipos celulares, como alguns pequenos neurônios (MONTGOMERY, 1994).

O método imunoistoquímico utilizado neste estudo foi o de marcação indireta, empregando-se anticorpos primários contra os antígenos teciduais e anti-anticorpos conjugados a moléculas marcadoras. A técnica indireta de marcação imunoistoquímica é representada por dois métodos principais: o da peroxidase anti-peroxidase (PAP) e o da avidina-biotina-peroxidase (ABC) (BRASILEIRO FILHO *et al.*, 1998; TOTTERDELL *et al.*, 1992). Segundo Hsu e Raine (1981) e Hsu *et al.* (1981), dentre os métodos disponíveis, o ABC é o que apresenta maior eficiência. Ao contrário do PAP, que consiste na reação em cadeia de três anticorpos (BRASILEIRO FILHO *et al.*, 1998), o método ABC faz uso de anticorpos primários e de anticorpos secundários conjugados à biotina que reagem com o complexo avidina-biotina-peroxidase e promovem a marcação antigênica de forma mais sensível e específica (BRASILEIRO FILHO *et al.*, 1998; TOTTERDELL *et al.*, 1992). A marcação pelo método ABC foi usada com grande eficiência nos estudos de Bondan *et al.* (2003) e Sanchez *et al.* (2006), que avaliaram o comportamento astrocitário em lesões desmielinizantes induzidas no tronco

encefálico de ratos Wistar. O mesmo método foi utilizado por Headley *et al.* (2001) na análise do cerebelo de cães infectados pelo CDV.

Neste estudo, o método utilizado para a marcação das proteínas gliais foi o ABC, seguindo o mesmo protocolo utilizado por Bondan *et al.* (2003) e Sanchez *et al.* (2006). Os anticorpos primários foram diluídos nas proporções 1:1000 (anti-GFAP) e 1:200 (anti-VIM), demonstrando a possibilidade de utilização de quantidades menores de anticorpos com alta eficiência de marcação. Headley *et al.* (2001) utilizaram anticorpos primários anti-GFAP na diluição 1:400. Lemos e Alessi (1999), por sua vez, utilizaram a diluição de 1:300 na marcação imunoistoquímica, pelo método PAP, da GFAP no SNC de cavalos com leucoencefalomalácia (LEM).

Segundo Totterdell *et al.* (1992), a escolha da diluição a ser utilizada dos anticorpos primários na marcação imunoistoquímica de tecidos depende do método de fixação e do de reativação antigênica. Neste caso, a diluição utilizada se adequou perfeitamente ao objetivo do trabalho. A fixação dos tecidos foi realizada em formol a 10% e a reativação antigênica seguiu a técnica de irradiação de microondas sobre os cortes imersos em solução ácida, conforme realizado por Bondan *et al.* (2003), Sanchez *et al.* (2006) e Headley *et al.* (2001) em seus experimentos. Segundo Leong *et al.* (1985) e Login e Dvorack (1988; 1993), a recuperação antigênica pelo forno de microondas é importante por preservar a citomorfologia e aumentar a antigenicidade das moléculas mascaradas pelo processo de fixação. A associação desta técnica à imersão das lâminas em solução ácida promove grande eficiência na reativação de antígenos teciduais, reduzindo a marcação de estruturas não-específicas e melhorando a visualização celular na análise histopatológica (CATTORETTI *et al.*, 1993). Neste trabalho utilizou-se o tampão citrato como solução ácida.

A reatividade astrocitária foi estipulada pela análise dos cortes no *software* Image Pro-Plus 4.5, avaliando-se o nível de marcação para GFAP ou VIM (dada em μm^2 , pela quantificação da área corada em castanho contida em uma área total de $302.952,5 \mu\text{m}^2$). A reatividade astrocitária foi estimada com base na hipertrofia astrocitária, visto que em experimentos anteriores a hiperplasia astrocitária observada durante os processos de desmielinização foi

mínima – os astrócitos aumentavam em tamanho, mas não em número (BONDAN *et al.*, 2005; HEADLEY *et al.*, 2001; SANCHEZ *et al.*, 2006).

Segundo Francisco *et al.* (2004), o Image Pro-Plus 4.5 é uma alternativa válida na quantificação da imunorreatividade de moléculas teciduais. Headley *et al.* (2001) utilizaram a contagem em gráticula como sistema de quantificação da reatividade astrocitária, aplicando uma gráticula com 100 quadrinhos sobre os cortes e estabelecendo uma relação entre o número de quadrinhos que apresentavam positividade para células marcadas para a GFAP e o número total de quadrinhos. Lemos e Alessi (1999), por sua vez, quantificaram a reatividade astrocitária em um sistema computacional, contornando com o mouse a área do corpo celular e o comprimento dos três maiores prolongamentos citoplasmáticos dos astrócitos. Com base na metodologia empregada nestes dois estudos, a quantificação da reatividade astrocitária pelo *software* Image Pro-Plus 4.5 parece apresentar maior eficiência, visto que a área total ocupada pelos astrócitos em um corte é estimada por colorimetria e, portanto, qualquer aumento na espessura das fibrilas gliais pode ser quantificado, indicando a reatividade astrocitária.

Os resultados numéricos obtidos na análise computacional, neste estudo, foram submetidos à análise estatística para verificação da sua significância. Uma vez que os resultados obtidos na análise das amostras foram extremamente variáveis, ou seja, não seguiam a distribuição normal, os métodos escolhidos para avaliação foram os não-paramétricos de Mann-Whitney e Kruskal-Wallis.

Na análise das três regiões cerebelares (R-1, R-2 e R-3), uma diferença significativa ($P < 0,0010$) em relação à imunorreatividade astrocitária foi encontrada entre os animais com cinomose e os animais normais, sendo menor nos últimos. Diferença significativa ($P = 0,0160$) também foi encontrada entre as regiões R-1 e R-3 na marcação para a VIM, sendo R-1 mais marcada do que R-3. Observou-se na microscopia de luz que R-1 se apresentava sempre mais marcada, tanto para a GFAP quanto para a VIM, sendo seguida por R-2 e, por fim, R-3. Apesar dessas observações não terem apresentado importância estatística, a mesma constatação foi feita por Headley *et al.* (2001) em seu trabalho, com significância estatística.

Diversos autores descreveram a substância branca do cerebelo como um local importante de replicação viral e de desmielinização (ALLDINGER *et al.*, 1993; VANDEVELDE *et al.*, 1982; VANDEVELDE; ZURBRIGGEN, 2005). Uma vez que R-1 corresponde apenas à substância branca do cerebelo, conclui-se que o aumento da reatividade astrocitária, demonstrado nesta região, acompanha o processo desmielinizante do SNC na cinomose. Essa constatação pode ser embasada pela observação feita, nos animais doentes, de que regiões da substância branca com áreas de degeneração compatíveis com desmielinização apresentavam marcação significativamente superior para a VIM ($P = 0,0033$) do que as áreas sem degeneração. Na análise dos cortes em microscopia de luz, a marcação para a GFAP no cerebelo dos animais doentes também se apresentou mais evidente nas regiões com degeneração tecidual do que nas regiões sem degeneração, apesar de não se ter obtido significância estatística. A reatividade astrocitária (observada pelo aumento na expressão dessas proteínas gliais) pode, portanto, estar relacionada à desmielinização. A liberação de fatores tóxicos e citocinas (tais como o IFN- γ e o TNF- α), potencialmente deletérias à mielina ou aos oligodendrócitos, já foi descrita em astrócitos (BENVENISTE, 1992; DONG; BENVENISTE, 2001; MONTGOMERY, 1994; SELMAJ, 1996). Desta forma, a infecção do SNC, ou apenas dos próprios astrócitos, pelo CDV poderia ativar funções inflamatórias astrocitárias, que causariam a desmielinização do SNC como efeito secundário à tentativa de combate ao vírus por essas células.

A correlação entre a reatividade dos astrócitos presentes nas regiões perivasculares da substância branca do cerebelo dos animais doentes com os diferentes graus de infiltração de células inflamatórias, vindas da circulação sistêmica, também foi realizada neste estudo. Apesar de as observações feitas em microscopia de luz terem revelado que a marcação da GFAP era menor ao redor dos vasos com grandes quantidades de infiltração inflamatória e que a marcação da VIM era mais evidente ao redor destes mesmos vasos, a análise estatística desses resultados não obteve significância. Tal fato pode ter ocorrido devido à alta variabilidade de resultados encontrados nas amostras. No entanto, com base na ocorrência do aumento de expressão da VIM nesta região, pode-se especular a respeito da reatividade astrocitária frente à infecção do SNC pelo CDV ou ainda sobre a sua ação no processo inflamatório do tecido nervoso. Sabe-se que o CDV é um vírus que se dissemina pelo sangue (SUMMERS *et al.*, 1978; VANDEVELDE; ZURBRIGGEN, 2005) e que a penetração de células inflamatórias no SNC também se dá pela

circulação sanguínea (VANDEVELDE *et al.*, 1982, VANDEVELDE; ZURBRIGGEN, 2005; WUNSCHMANN *et al.*, 1999, 2000). Uma vez que os astrócitos desempenham diferentes funções de proteção do tecido nervoso (BENVENISTE, 1992; DONG; BENVENISTE, 2001; MONTGOMERY, 1994), o aumento da reatividade astrocitária, observada pelo aumento na marcação para a VIM nos astrócitos perivascularres, poderia estar relacionado à função de proteção do SNC por essas células (mediando o processo inflamatório) ou à ativação dessas células por elementos do sistema imunológico ou pelo próprio vírus. A comunicação entre os elementos do sistema imunológico e os astrócitos é sugerida por alguns autores como mediadora dos processos inflamatórios (BRADL, 1996; SELMAJ, 1996) e poderia estar relacionada também à desmielinização.

Na avaliação dos cortes do tronco encefálico, observou-se uma diferença significativa ($P < 0,0010$), na marcação da GFAP e da VIM, entre os animais normais e os doentes, sendo que os doentes apresentavam maior marcação. Na microscopia de luz, observou-se nos animais doentes que uma marcação maior, tanto para a GFAP como para a VIM, aparecia nas regiões subependimárias (r-I); entretanto, nenhuma diferença estatisticamente significante foi verificada entre r-I e a região mais ventral do tronco encefálico (r-II), o que poderia ser devido à grande variabilidade encontrada entre as amostras dos indivíduos de um mesmo grupo. O maior nível de degradação tecidual também se apresentou, na microscopia de luz, na região subependimária. Alguns autores relataram em seus experimentos a possibilidade de o CDV se dispersar por meio do líquido (ALLDINGER *et al.*, 1993; HIGGINS *et al.*, 1982; MITCHELL *et al.*, 1991; SUMMERS *et al.*, 1978). O aumento da reatividade astrocitária, bem como da degeneração tecidual, nas regiões subependimárias, que apresentam contato com o líquido, poderia indicar uma relação entre a presença do vírus, a ação astrocitária e a desmielinização dessa região.

Segundo Pixley e Vellis (1984) e Takamiya *et al.* (1988), a VIM presente nos astrócitos é característica dos períodos embrionário e pós-natal, sendo perdida conforme ocorre o amadurecimento dos indivíduos. Nas lesões do SNC, no entanto, a VIM volta a se expressar (TAKAMIYA *et al.*, 1988). A reexpressão de VIM seguida à injúria foi referida nos experimentos de Bondan *et al.* (2003) e Sanchez *et al.* (2006) nas regiões adjacentes às lesões desmielinizantes induzidas no tronco encefálico de ratos Wistar. No presente trabalho, a

reexpressão da VIM em células morfológicamente compatíveis com astrócitos foi observada, não apenas nos sítios imediatos às lesões degenerativas, mas em diferentes locais por toda a extensão do tecido. Observou-se também aumento na expressão de GFAP fora dos sítios imediatos de lesão nos animais doentes. Nos cavalos com LEM do estudo de Lemos e Alessi (1999), a reatividade astrocitária extralesional para a GFAP foi observada em regiões sem alterações teciduais visíveis, sugerindo a participação astrocitária na patogenia da LEM. Headley *et al.* (2001) também relataram a possibilidade de participação astrocitária na patogenia da desmielinização do SNC em cães com cinomose (observada pelo aumento na expressão da GFAP nestes animais).

Uma vez que os astrócitos possuem a habilidade de liberar mediadores pró-inflamatórios (BENVENISTE, 1992; DONG; BENVENISTE, 2001; MONTGOMERY, 1994; SELMAJ, 1996), a ação deste tipo celular no desencadeamento de uma reação inflamatória seguida à infecção do SNC pelo CDV, com conseqüente desmielinização do tecido nervoso, pode ser sugerida. Por outro lado, ações antiinflamatórias também são descritas em astrócitos (ALOISI, 2001; SELMAJ, 1996). Assim, da mesma forma que a micróglia, os astrócitos poderiam exercer funções mediadoras da resposta inflamatória antiviral, realizando fagocitose e liberando citocinas pró-inflamatórias, tais como o TNF- α e o IFN- γ , que promovem como efeito indireto a destruição das bainhas de mielina (BENVENISTE, 1992; ZURBRIGGEN *et al.*, 1986), assim como liberando mediadores antiinflamatórios (TGF- β , por exemplo) como mecanismo de contra-regulação inflamatória, na tentativa de promover o retorno à homeostasia (ALOISI, 2001).

Com base na acentuada diferença encontrada na imunorreatividade astrocitária entre os animais doentes e os normais, independentemente de se definir qual a função exata do aumento da reatividade astrocitária na cinomose, é possível afirmar que existe participação astrocitária no desencadeamento e no desfecho das lesões desmielinizantes promovidas pelo CDV no SNC de cães com cinomose.

6 CONCLUSÕES

- A marcação imunistoquímica pelo método ABC, assim como os métodos de fixação e reativação antigênica e as diluições utilizadas para os anticorpos neste estudo foram eficientes na caracterização morfológica dos astrócitos.
- A quantificação da reatividade astrocitária por colorimetria é um método eficiente para a verificação do comportamento morfológico de tais células frente às agressões do SNC.
- A infecção do SNC pelo CDV promove aumento na expressão astrocitária da GFAP e reexpressão da VIM.
- A imunorreatividade astrocitária é evidenciada não apenas nas áreas de lesão tecidual, mas difusa por toda a extensão do tecido.
- Microcavitações teciduais, sugestivas de desmielinização, e infiltração inflamatória são encontradas no SNC de animais acometidos pelo CDV.
- A astrogliose (evidenciada pelo aumento de diâmetro do corpo celular e dos prolongamentos astrocitários) acompanha o processo desmielinizante da cinomose.
- As alterações morfológicas dos astrócitos, tanto em regiões com desmielinização quanto naquelas sem aparente perda mielínica, sugerem a participação astrocitária na patogenia da cinomose.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABBAS, A. K.; LITCHMAN, A. H.; POBER, J. S. Ativação dos linfócitos T e reconhecimento dos antígenos. In: ____ **Imunologia Celular e Molecular**. 3. ed. Rio de Janeiro: Revinter, 2000. p. 142-173.

ALLDINGER, S.; BAUMGARTNER, W.; ORVELL, C. Restricted expression of viral surface proteins in canine distemper encephalitis. **Acta Neuropathologica**, Berlin, v. 85, n. 6, p. 635-645, 1993.

ALLDINGER, S.; WUNSCHMANN, A.; BAUMGARTNER, W.; VOSS, C.; KREMMER, E. Up-regulation of major histocompatibility complex class II antigen expression in the central nervous system of dogs with spontaneous canine distemper virus encephalitis. **Acta Neuropathologica**, Berlin, v. 92, n. 3, p. 273-280, 1996.

ALOISI, F. Immune function of microglia. **Glia**, New York, v. 36, n. 2, p. 165-179, 2001.

APPEL, M. J. G. Pathogenesis of canine distemper. **American Journal of Veterinary Research**, Chicago, v.30, n. 7, p. 1167-1182, 1969.

APPEL, M. J. G.; SHEK, W. R.; SUMMERS, B. A. Lymphocyte-mediated immune cytotoxicity in dogs infected with virulent canine distemper virus. **Infection and Immunity**, Bethesda, v. 37, n. 2, p. 592-600, 1982.

APPEL, M. J. G.; MENDELSON, S. G.; HALL, W. W. Macrophage Fc receptors control infectivity and neutralization of canine distemper virus-antibody complexes. **Journal of Virology**, Washington, v. 51, n. 3, p. 643-649, 1984.

BAUER, J.; RAUSCHKA, H.; LASSMANN, H. Inflammation in the nervous system: the human perspective. **Glia**, New York, v. 36, n. 2, p. 235-243, 2001.

BENN, T.; HALFPENNY, C.; SCOLDING, N. Glial cells as targets for cytotoxic immune mediators. **Glia**, New York, v. 36, n. 2, p. 200-211, 2001.

BENVENISTE, E. N. Cytokines: influence on glial cell gene expression and function. In: BLALOCK, J. E. **Neuroimmunology**. 2. ed. Basel: Karger, v. 52, 1992. p. 106-153.

BIRCHARD, S. J.; SHERDING, R. G. Cinomose canina. In: ____ **Manual Saunders: Clínica de Pequenos Animais**. 1. ed. São Paulo: Roca, 1998. p. 120.

BONDAN, E. F.; LALLO, M. A., GRAÇA, D. L. Desmielinização experimental por brometo de etídio no sistema nervoso central. **Revista Universidade Guarulhos - Ciências Biológicas e da Saúde**, São Paulo, v. 5, n. 1, p. 19-32, 1998.

BONDAN, E. F.; LALLO, M. A. Mielinização, desmielinização e remielinização no sistema nervoso central (SNC)-parte I. Aspectos histofisiológicos relevantes à formação e à integridade

da mielina central. **Revista do Instituto de Ciências e Saúde**, São Paulo, v. 16, n. 2, p. 103-111, 1998.

BONDAN, E. F.; LALLO, M. A.; DAGLI, M. L. Z.; SANCHEZ, M.; GRAÇA, D. L. Estudo da imunorreatividade astrocitária para GFAP e vimentina no tronco encefálico de ratos Wistar submetidos ao modelo gliotóxico do brometo de etídio. **Arquivos de Neuropsiquiatria**. São Paulo: Editora Médica, v. 61, n. 3A, p. 642-649, 2003.

BOTTERON, C.; ZURBRIGGEN, A.; GRIOT, C.; VANDEVELDE, M. Canine distempervirus-immune complexes induce bystander degeneration of oligodendrocytes. **Acta Neuropathologica**, Berlin, v. 83, n. 4, p. 402-407, 1992.

BRADL, M. Immune control of the brain. **Springer Seminars in Immunopathology**, New York, v. 18, n. 1, p. 35-49, 1996.

BRASILEIRO FILHO, G.; BRABOSA, A. J. A.; MIRANDA, D. Métodos de estudo em Patologia. In: BRASILEIRO FILHO, G. **Bogliolo Patologia Geral**. 2. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1998. p. 6-18.

BRUGGER, M.; JUNGI, T. W.; ZURBRIGGEN, A.; VANDEVELDE, M. Canine distemper virus increases procoagulant activity of macrophages. **Virology**, New York, v. 190, n. 2, p. 616-623, 1992.

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

CATTET, M. R., DUIGNAN, P. J., HOUSE, C. A., AUBIN, D. J. Antibodies to canine distemper and phocine distemper viruses in polar bears from the Canadian arctic. **Journal of Wildlife Diseases**, Ames, v. 40, n. 2, p. 338-342, 2004.

CATTORETTI, G.; PILERI, S.; PARRAVICINI, C.; BECKER, M. H.; POGGI, S.; BIFULCO, C.; KEY, G.; D'AMATO, L.; SABATTINI, E.; FEUDALE, E. Antigen unmasking on formalin-fixed, paraffin-embedded tissue sections. **The Journal of Pathology**, Edinburgh, v. 171, n. 2, p. 83-98, 1993.

DONG, Y.; BENVENISTE, E. N. Immune function of astrocytes. **Glia**, New York, v. 36, n. 2, p. 180-190, 2001.

DUVALL, E.; WYLLIE, A. H.; MORRIS, R. G. Macrophage recognition of cells undergoing programmed cell death (apoptosis). **Immunology**, Oxford, v. 56, n. 2, p. 351-358, 1985.

DYCE, K. M.; SACK, W. O.; WENSING, C. J. G. O sistema nervoso. In: ____ **Tratado de Anatomia Veterinária**. 2. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1997. p. 206-257.

ENDO, Y., UEMA, M., MIURA, R., TSUKIYAMA-KOHARA, K., TSUJIMOTO, H., YONEDA, K., KAI C. Prevalence of canine distemper virus, feline immunodeficiency virus and

feline leukemia virus in captive African lions (*Panthera leo*) in Japan. **The Journal of Veterinary Medical Science**, Tokyo, v. 66, n. 12, p. 1587-1589, 2004.

FRANCISCO, J. S.; MORAES, H. P.; DIAS, E. P. Evaluation of the Image-Pro Plus 4.5 software for automatic counting of labeled nuclei by PCNA immunohistochemistry. **Brazilian Oral Research**, São Paulo, v. 18, n. 2, p. 100-104, 2004.

GESE, E. M.; KARKI, S. M., KLAVETTER, M. L., SCHAUSTER, E. R., KITCHEN, A. M. Serologic Survey for Canine Infectious Diseases among Sympatric Swift Foxes (*Vulpes velox*) and Coyotes (*Canis latrans*) in Southeastern Colorado. **Journal of Wildlife Diseases**, Ames, v. 40, n.4, p. 741-748, 2004.

GIULIAN, D.; CHEN, J.; INGEMAN, J. E.; GEORGE, J. K.; NAPONEN, M. The role of mononuclear phagocytes in wound healing after traumatic injury to adult mammalian brain. **The Journal of Neuroscience**, Baltimore, v. 9, n. 12, p. 4416-4429, 1989.

GLAUS, T.; GRIOT, C.; RICHARD, A.; ALTHAUS, U.; HERSCHKOWITZ, N.; VANDEVELDE, M. Ultrastructural and biochemical findings in brain cell cultures infected with canine distemper virus. **Acta Neuropathologica**, Berlin, v. 80, n. 1, p. 59-67, 1990.

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**, Edinburgh, v. 125, n. 2-3, p. 90-97, 2001.

HICKEY, W. F. Leukocyte traffic in the central nervous system: the participants and their roles. **Seminars in Immunology**, London, v. 11, n. 2, p. 125-137, 1999.

HICKEY, W. F. Basic principles of immunological surveillance of the normal central nervous system. **Glia**, New York, v. 36, n. 2, 118-124, 2001.

HIGGINS, R. J.; KRAKOWKA, S. G.; METZLER, A. E.; KOESTNER, A. Experimental canine distemper encephalomyelitis in neonatal gnotobiotic dogs. **Acta Neuropathologica**, Berlin, v. 57, n. 4, p. 287-295, 1982.

HOSKINS, J. D. Cinomose canina. In: ETTINGER, S. J.; FELDMAN, E. C. **Tratado de Medicina Interna Veterinária – Doenças do Cão e do Gato**. 5. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2004. 2v. v. 1, p. 440-441.

HSU, S. M.; RAINE, L. Protein A, avidin, and biotin in immunohistochemistry. **Journal of Histochemistry Cytochemistry**, Baltimore, v. 29, n. 11, p. 1349-1353, 1981.

HSU, S. M.; RAINE, L.; FANGE, H. The use of antiavidinantibody and avidin-biotin-peroxidase complex in immunoperoxidase technics. **American Journal of Clinical Pathology**, Baltimore, v. 75, n. 6, p. 816-821, 1981.

JONES, T. C.; HUNT, R. D.; KING, N. W. Moléstias causadas por morbilivírus. In: ____ **Patologia Veterinária**. 6. ed. São Paulo: Manole, 2000. p. 319-324.

JUNQUEIRA, L. C.; CARNEIRO, J. Tecido nervoso. In: ____ **Histologia Básica**. 9. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1999. p. 159-178.

KELLY, T. R., SLEEMAN, J. M. Morbidity and mortality of red foxes (*Vulpes vulpes*) and gray foxes (*Urocyon cinereoargenteus*) admitted to the Wildlife Center of Virginia, 1993-2001. **Journal of Wildlife Diseases**, Ames, v. 39, n. 2, p. 467-469, 2003.

KIRSCHNER, D. A.; GANSER, A. L.; CASPAR, D. L. D. Diffraction studies of molecular organization and membrane interactions in myelin. In: MORELL, P. **Myelin**. 2. ed. New York: Plenum Press, 1989b. p. 51-96.

KOUTINAS, A. F., BAUMGARTNER, W., TONTIS, D., POLIZOPOULOU, Z., SARIDOMICHELAKIS, M. N., LEKKAS, S. Histopathology and immunohistochemistry of canine distemper virus-induced footpad hyperkeratosis (hard Pad disease) in dogs with natural canine distemper. **Veterinary Pathology**, Lawrence, v. 41, n. 1, p. 2-9, 2004.

KUMAGAI, K., YAMAGUCHI, R., UCHIDA, K., TATEYAMA, S. Lymphoid apoptosis in acute canine distemper. **Journal of Veterinary Medical Science**, Tokyo, v. 66, n. 2, p. 175-181, 2004.

LAMB, R. A.; KOLAKOFSKY, D. Paramyxoviridae: The viruses and their replication. In: FIELDS, B. N. **Virology**. 3. ed. New York: Raven Press, 1996, p. 1177-1204.

LEMOS, K. R.; ALESSI, A. C. Astrócitos imunorreativos à proteína glial fibrilar ácida (GFAP) em sistema nervoso central de equinos normais e de equinos com leucoencefalomalácia. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, Rio de Janeiro, v. 19, n. 3-4, p. 104-108, 1999.

LEONG, A. S.; DAYMON, M. E.; MILIOS, J. Microwave irradiation as a form of fixation for light and electron microscopy. **The Journal of Pathology**, Edinburgh, v. 146, n. 4, p. 313-321, 1985.

LOGIN, G. R.; DVORAK, A. M. Microwave fixation provides excellent preservation of tissue, cells and antigens for light and electron microscopy. **The Histochemical Journal**, London, v. 20, n. (6-7), p. 373-387, 1988.

LOGIN, G. R.; DVORAK, A. M. A review of rapid microwave fixation technology: its expanding niche in morphologic studies. **Scanning**, Mahwah, v. 15, n. 2, p. 58-66, 1993.

MACHADO, A. Embriologia, divisões e organização geral do sistema nervoso. In: ____ **Neuroanatomia Funcional**. 2. ed. São Paulo: Atheneu, 1999. p. 7-16.

MACHADO, C. Tecido nervoso. In: MACHADO, A. **Neuroanatomia Funcional**. 2. ed. São Paulo: Atheneu, 1999. p. 17-34.

MESSENGER, V.; SPRINGFELD, C.; DEVAUX, P.; CATTANEO, R. A ferret model of canine distemper virus virulence and immunosuppression. **Journal of Virology**, Washington, v. 77, n. 23, p. 12579-12591, 2003.

MITCHELL, W. J.; SUMMERS, B. A.; APPEL, M. J. G. Viral expression in experimental canine distemper demyelinating encephalitis. **Journal of Comparative Pathology**, Edinburgh, v. 104, n. 1, p. 77-87, 1991.

MONTGOMERY, D. L. Astrocytes: form, functions, and roles in disease. **Veterinary Pathology**, Lawrence, v. 31, n. 2, p. 145-167, 1994.

NEUMANN, H. Control of glial immune function by neurons. **Glia**, New York, v. 36, n. 2, p. 191-199, 2001.

OBEID, E. O.; PARTIDOS, C. D.; HOWARD, C. R.; STEWARD, M. W. Protection against morbillivirus-induced encephalitis by immunization with rationally designed synthetic peptide vaccine containing B and T cell epitopes from de fusion protein of measles virus. **Journal of Virology**, Washington, v. 69, n. 3, p. 1420-1428, 1995.

PACHNER, A. R. The immune response to infectious diseases of the central nervous system: a tenuous balance. **Springer Seminars in Immunopathology**, New York, v. 18, n. 1, p. 25-34, 1996.

PARDO, I. D.; JOHNSON, G. C.; KLEIBOEKER, S. B. Phylogenetic characterization of canine distemper viruses detected in naturally infected dogs in North America. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v. 43, n. 10, p. 5009-5017, 2005.

PEKNEY, M.; JOHANSSON, C. B.; ELIASSON, C.; STAKEBERG, J.; WALLEN, A.; PERLMANN, T.; LENDAHL, U.; BETSHOLTZ, C.; BERTHOLD, C. H.; FRISEN, J. Abnormal reaction to central nervous system injury in mice lacking glial fibrillary acidic protein and vimentin. **The Journal of Cell Biology**, United States, v. 145, n. 3, p. 503-514, 1999.

PENDER, M. P.; RIST, M. J. Apoptosis of inflammatory cells in immune control of the nervous system: role of glia. **Glia**, New York, v. 36, n. 2, p. 137-144, 2001.

PIXLEY, S. K. R.; VELLIS, J. Transition between immature radial glia and mature astrocytes studied with monoclonal antibody to vimentin. **Developmental Brain Research**, Amsterdam, v. 15, n. 2, p. 201-209, 1984.

PRAT, A.; BIERNACKI, K.; WOSIK, K.; ANTEL, J. P. Glial cell influence on the human blood-brain barrier. **Glia**, New York, v. 36, n. 2, p. 145-155, 2001.

PROBERT, L.; AKASSOGLOU, K. Glial expression of tumor necrosis factor in transgenic animals: how do these models reflect the "normal situation"? **Glia**, New York, v. 36, n. 2, p. 212-219, 2001.

- RAINE, C. S. Morphology of myelin and myelination. In: MORELL, P. **Myelin**. 2. ed. New York: Plenum Press, 1989a. p. 1-50.
- RAINE, C. S. The neuropathology of myelin diseases. In: MORELL, P. **Myelin**. 2. ed. New York: Plenum Press, 1989b. p. 259-310.
- RIJKS, J. M., VAN de BILDT, M. W., JENSEN, T., PHILLIPPA, J. D. OSTERHAUS, A. D., KUIKEN, T. Phocine distemper outbreak, The Netherlands, 2002. **Emerging Infectious Diseases**, Atlanta, v. 11, n. 12, p. 1945-1948, 2005.
- SALIKI, J. T., COOPER, E. J., GUSTAVSON, J. P. Emerging morbillivirus infections of marine mammals: development of two diagnostic approaches. **Annals of the New York Academy of Sciences**, New York, v. 969, n. 1, p. 51-59, 2002.
- SANCHEZ, M., BONDAN, E. F., LALLO, M. A., SINHORINI, I. D., DAGLI, M. L. Z., MAIORKA, P. C., PEREIRA, L. A. V. D., GRAÇA, D. L. Immunohistochemical staining of the macrophagic and astrocytic response in the brainstem of Wistar rats submitted to the ethidium bromide gliotoxic model and treated with cyclophosphamide. **Arquivos de Neuropsiquiatria**, São Paulo, v. 64, n. 3B, p. 787-793, 2006.
- SELMAJ, K. Pathophysiology of the blood-brain barrier. **Springer Seminars in Immunopathology**, New York, v. 18, n. 1, p. 57-73, 1996.
- SHEK, W. R., SCHUKTZ, R. D.; APPEL, M. J. G. Natural and immune cytolysis of canine distemper virus-infected target cells. **Infection and Immunity**. Bethesda, v. 28, n. 3, p. 724-734, 1980.
- SHIMADA, A.; UEMURA, T.; YAMAMURA, Y.; KOIMA, S.; MORITA, T.; UMEMURA, T. Localization of metallothionein-I and II in hypertrophic astrocytes in brain lesions of dogs. **Journal of Veterinary Medical Science**, Tokyo, v. 60, n. 3, p. 351-358, 1998.
- STANTON, J. B., BROWN, C. C., POET, S., LIPSCOMB, T. P.; SALIKI, J.; FRASCA, S. Retrospective differentiation of canine distemper virus and phocine distemper virus in phocides. **Journal of Wild Life Diseases**, Ames, v. 40, n. 1, p. 53-59, 2004.
- SUMMERS, B. A.; GREISEN, H. A.; APPEL, M. J. Possible initiation of viral encephalomyelitis in dogs by migrating lymphocytes infected with distemper virus. **The Lancet**, London, v. 2, n. 8082, p. 187-189, 1978.
- SUMMERS, B.A.; GREISEN, H. A.; APPEL, M. J. Early events in canine distemper demyelinating encephalomyelitis. **Acta Neuropathologica**, Berlin, v. 46, n. 1 (1-2), p. 1-10, 1979.
- SUMMERS, B.A.; GREISEN, H. A.; APPEL, M. J. Canine distemper and experimental allergic encephalomyelitis in the dog: comparative patterns of demyelination. **Journal of Comparative Pathology**, Edinburgh, v. 94, n. 4, p. 575-589, 1984.

- TAKAMIYA, Y.; KOHSAKA, S.; TOYA, S.; OTANI, M.; TSUKADA, Y. Immunohistochemical studies on the proliferation of reactive astrocytes and the expression of cytoskeleton proteins following brain injury in rats. **Developmental Brain Research**, Amsterdam, v. 38, n. 2, p. 201-210, 1988.
- TIPOLD, A.; MOORE, P.; ZURBRIGGEN, A.; BURGNER, I.; BARBEN, G.; VANDELDELDE, M. Early T cell response in the central nervous system in canine distemper virus infection. **Acta Neuropathologica**, Berlin, v. 97, n. 1, p. 45-56, 1999.
- TIPOLD, A.; VANDELDELDE, M.; WITTEK, P.; MOORE, P.; SUMMERFIELD, A.; ZURBRIGGEN, A. Partial protection and intrathecal invasion of CD8+ T cells in acute canine distemper virus infection. **Veterinary Microbiology**, Amsterdam, v. 83, n. 3, p. 189-203, 2001.
- TOTTERDELL, S.; INGHAM, C. A.; BOLAM, J. P. Immunocytochemistry I: pré-embedding staining. In: BOLAM, J. P. **Experimental Neuroanatomy – A Practical Approach** 1. ed. Oxford: IRL Press, 1992. p. 103-128.
- VANDELDELDE, M.; FANKHAUSER, R.; KRISTENSEN, F.; KRISTENSEN, B. Immunoglobulins in demyelinating lesions in canine distemper encephalitis. **Acta Neuropathologica**, Berlin, v. 54, n. 1, p. 31-41, 1981.
- VANDELDELDE, M.; KRISTENSEN, F.; KRISTENSEN, B.; STECK, A. J.; KIHM, U. Immunological and pathological findings in demyelinating encephalitis associated with canine distemper virus infection. **Acta Neuropathologica**, Berlin, v. 56, n. 1, p. 1-8, 1982.
- VANDELDELDE, M.; BICHSEL, P.; CERRUTI-SOLA, S.; STECK, A.; KRISTENSEN, F.; HIGGINS, R. J. Glial proteins in canine distemper virus-induced demyelination. **Acta Neuropathologica**, Berlin, v. 59, n. 4, p. 269-276, 1983.
- VANDELDELDE, M.; ZURBRIGGEN, A. The neurobiology of canine distemper virus infection. **Veterinary Microbiology**, Amsterdam, v. 44, n. (2-4), p. 271-280, 1995.
- VANDELDELDE, M.; ZURBRIGGEN, A. Demyelination in canine distemper virus infection: a review. **Acta Neuropathologica**, Berlin, v. 109, n. 1, p. 56-68, 2005.
- VAREA, E., ALONSO-LLOSA, G., MOLOWNY, A., LOPEZ-GARCIA, C., PONSODA, X. Capture of extracellular zinc ions by astrocytes. **Glia**, New York, v. 54, n. 4, p. 304-315, 2006.
- VILAFRANCA, M.; TELLO, M.; PUMAROLA, M.; DOMINGO, M. Neural cells from dogs with spontaneous distemper encephalitis express class II major histocompatibility complex molecules. **Journal of Comparative Pathology**, Edinburgh, v. 114, n. 1, p. 43-50, 1996.
- WILLIAMS, K.; ALVAREZ, X.; LACKNER, A. Central nervous system perivascular cells are immunoregulatory cells that connect the CNS with the peripheral immune system. **Glia**, New York, v. 36, n. 2, p. 156-164, 2001.

WUNSCHMANN, A.; ALLDINGER, S.; KREMMER, E.; BAUMGARTNER, 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**, Amsterdam, v. 67, n. 2, p. 101-116, 1999.

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

YANAGI, Y., TAKEDA, M., OHNO, S., SEKI, F. Measles virus receptors and tropism. **Journal of Infectious Diseases**, Chicago, v. 59, n. 1, p. 1-5, 2006.

ZARNKE, R. L., VER HOEF, J. M., DELONG, R. A. Serologic survey for selected disease agents in wolves (*Canis lupus*) from Alaska and the Yukon Territory, 1984-2000. **Journal of Wildlife Diseases**, Ames, v. 40, n. 4, p. 632-638, 2004.

ZURBRIGGEN, A.; VANDEVELDE, M.; DUMAS, M. Secondary degeneration of oligodendrocytes in canine distemper virus infection *in vitro*. **Laboratory Investigation**, New York, v. 54, n. 4, p. 424-431, 1986.

ZURBRIGGEN, A.; YAMAWAKI, M.; VANDEVELDE, M. Restricted canine distemper virus infection of oligodendrocytes. **Laboratory Investigation**, New York, v. 68, n. 3, p. 277-284, 1993.

ZURBRIGGEN, A.; SCHMID, I.; GRABER, H. U.; VANDEVELDE, M. Oligodendroglial pathology in canine distemper. **Acta Neuropathologica**, Berlin, v. 95, n. 1, p. 71-77, 1998.

Livros Grátis

(<http://www.livrosgratis.com.br>)

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)
[Baixar livros de Matemática](#)
[Baixar livros de Medicina](#)
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)
[Baixar livros de Meteorologia](#)
[Baixar Monografias e TCC](#)
[Baixar livros Multidisciplinar](#)
[Baixar livros de Música](#)
[Baixar livros de Psicologia](#)
[Baixar livros de Química](#)
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)
[Baixar livros de Serviço Social](#)
[Baixar livros de Sociologia](#)
[Baixar livros de Teologia](#)
[Baixar livros de Trabalho](#)
[Baixar livros de Turismo](#)