UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"

FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA

CÂMPUS ARAÇATUBA

MORTE CELULAR PROGRAMADA EM CÉLULAS MONONUCLEARES PERIFÉRICAS INFECTADAS COM O VÍRUS DA CINOMOSE

Flávio Trigueiros Lins Britzky Roncatti

Médico Veterinário

Araçatuba – SP

2012

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"

FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA

CÂMPUS ARAÇATUBA

MORTE CELULAR PROGRAMADA EM CÉLULAS MONONUCLEARES PERIFÉRICAS INFECTADAS COM O VÍRUS DA CINOMOSE

Dissertação de Mestrado apresentada junto ao curso de Pós-graduação em Ciência Animal, área Medicina Veterinária Preventiva para obtenção do título de Mestre.

Flávio Trigueiros Lins Britzky Roncatti

Orientadora: Tereza Cristina Cardoso Silva

Araçatuba – SP

2012

Catalogação na Publicação(CIP)
Serviço de Biblioteca e Documentação – FMVA/UNESP

Roncatti, Flávio Trigueiros Lins Britzky

R769i Morte celular programada em células mononucleares periféricas infectadas com o vírus da cinomose / Flávio Trigueiros Lins Britzky Roncatti. -- Araçatuba: [s.n], 2012.

42 f.: il.; CD-ROM.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Medicina Veterinária, 2012.

Orientador: Prof[a.] Tereza Cristina Cardoso Silva

1. Apoptose. 2. Imunossupressão. 3. Cão. 4. Morbillivirus. 5. Linfopenia.

CDD 636.089

DADOS CURRICULARES DO AUTOR

FLÁVIO TRIGUEIROS LINS BRITZKY RONCATTI – Nascido em Rio Branco – Acre, no dia 04 de novembro de 1984. Possui Graduação em Medicina Veterinária pela Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho" (UNESP), Câmpus de Araçatuba-SP, em 2010. Realizou estágio de iniciação científica na área de virologia animal nos anos de 2007 a 2010, através de bolsas de estudo (PIBIC/CNPq e FAPES). Ingressou no programa de Mestrado em Ciência Animal em Março de 2010. Em 2012 realizou estágio de pesquisa no exterior através de bolsa de estudo da modalidade BEPE da FAPESP na instituição DUKE-NUS Graduate Medical School em Cingapura sob a supervisão Veronika Von Messling.

“Hoje levantei cedo pensando no que tenho a fazer antes que o relógio marque meia noite”. É minha função escolher que tipo de dia eu vou ter hoje. Posso reclamar porque está chovendo ou agradecer às águas por lavarem a poluição. Posso ficar triste por não ter dinheiro ou me sentir encorajado para administrar minhas finanças, evitando o desperdício. Posso reclamar sobre minha saúde ou dar graças por estar vivo. Posso me queixar dos meus pais por não terem me dado tudo o que eu queria ou posso ser grato por ter nascido. Posso reclamar por ter que ir trabalhar ou agradecer por ter trabalho. Posso sentir tédio com o trabalho doméstico ou agradecer a Deus. Posso lamentar decepções com amigos ou me entusiasmar com as novas amizades. Se as coisas não saíram como planejei posso ficar feliz por ter hoje para recomeçar. O dia está na minha frente esperando para ser o que eu quiser. E aqui estou eu, o escultor que pode dar forma. “Tudo depende só de mim.”

(Charles Chaplin)

AGRADECIMENTOS

“A gratidão é o único tesouro dos humildes”

(William Shakespeare)

Agradeço aos meus pais Carlos Alberto Roncatti e Edite Trigueiros Lins Britzky Roncatti pelo apoio incondicional e irrestrito em todas as minhas atividades, passadas e vindouras, seus conselhos, amor, resiliência e exemplo são itens que me tornaram um ser humano melhor e me tornam melhor a cada dia, me guiando através de alegrias e tristezas, é por sua causa que estou aqui. Meu amor e admiração por vocês são incondicionais e imensuráveis.

À minha irmã Bruna Trigueiros Lins Britzky Roncatti pela proteção, passeios, orientação e companheirismo nessa jornada, está sempre em meu coração e em minhas orações.

À minha irmã Ana Carolina Borsanelli e sua filha Mia, pelo apoio, conversas, presença e companheirismo e conselhos. Aqui se criou um laço que jamais se quebrará.

À Fernanda Paes, pela sua cumplicidade, compreensão, companheirismo, seu amor, seus conselhos, suas broncas, seu incentivo, sua companhia e seu exemplo foram o pilar para que conseguisse atravessar e concluir essa fase, sem você nada disso seria possível e nunca aconteceria, é minha estrela-guia. A vida seria muito melhor se no mundo existissem mais pessoas como você.

Aos meus amigos e padrinhos, Fernando Paes e Laurinda Ribeiro Paes, pela orientação, seus cuidados, sua companhia, seu enorme coração e carinho, me sustentaram e me sustentam, são meus exemplos e não há um dia que passe em que não pense em vocês.

À equipe do laboratório de virologia animal da UNESP-Araçatuba, Ana Carolina Guedes Rosa, Talita Fontes Antello, Natielle Wajima, pela ajuda e apoio para que esse projeto se tornasse realidade e para sua conclusão.

À minha orientadora Profª. Adjª Tereza Cristina Cardoso Silva, pela oportunidade da concretização desse projeto, sua orientação, trabalho e conhecimento adquiridos em sua companhia.

À Faculdade de Medicina Veterinária – UNESP – campus de Araçatuba, pelos ensinamentos e amizades que me proporcionou ao longo de 7 anos durante a Graduação e Pós-Graduação.

À Profª. Ass. Drª Sílvia Helena Venturolli Perri, pela colaboração na realização da análise estatística.

Às funcionárias da biblioteca pela ajuda e apoio durante a elaboração do projeto.

À Fundação de Amparo e Pesquisa do Estado de São Paulo, pelo suporte financeiro para a realização desse trabalho.

Ao orelha, pela alegria, brincadeiras e carinho que sempre me jogavam pra cima quando estava pra baixo.

À todos os meus amigos que seja de forma direta ou indireta, pessoal ou profissional, me ajudaram e contribuíram para que conseguisse concluir essa etapa, serei eternamente grato pelas palavras, suporte e companhia de vocês.

À Deus, por te me dado a saúde, sanidade, força e motivação necessários para o término dessa jornada.

Ao meu avô Alexandre por todos os seus anos de amor incondicional, cuidado, ensinamentos que levarei pra vida inteira e exemplo que foi pra mim. Minhas saudades serão eternas. Bom descanso vô, Te amo!!!

TRABALHO REALIZADO NO LABORATÓRIO DE VIROLOGIA ANIMAL, FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA, CAMPUS DE ARAÇATUBA COM O APOIO DA FUNDAÇÃO DE AMPARO À PESQUISA DO ESTADO DE SÃO PAULO (2010/12722-2 e 2012/06169-4)

EXPRESSÃO DE FATORES LIGADOS À VIA INTRÍNSECA DA MORTE CELULAR PROGRAMADA EM CÉLULAS MONONUCLEARES PERIFÉRICAS INFECTADAS COM O VÍRUS DA CINOMOSE CANINA.

RESUMO - Morte celular programada (MCP) ou apoptose é um fenômeno correspondente a resposta do hospedeiro a uma infecção viral, envolvida na morte e/ou sobrevivência da célula infectada. O vírus da cinomose, *canine distemper virus* (CDV) é capaz de induzir a apoptose em células linfoides circulantes, tecidos linfóides e cerebelo de cães naturalmente infectados. O CDV também afeta as células Vero e linhagens de células de tumor cervical modulando várias etapas da MCP. Além disso, a fase de imunossupressão, estabelecida a partir da infecção pelo CDV, nem sempre está associada à detecção de partículas virais nas células infectadas. No presente estudo, células mononucleares de sangue periférico de cães (CMSP) foram coletadas, cultivadas e infectadas com a estirpe vacinal de CDV (Onderstepoort) e após 24 h da infecção os eventos iniciais da apoptose foram evidenciados pela marcação e quantificação das proteínas anexina v™ e ApoTrace™. A expressão do RNA mensageiro relacionado ao gene Bax, BCl-2, caspase-3, 8 e 9 e *survivin* foi realizada em culturas de CMPC infectadas e não infectadas após 24h pela reação de cadeia de polimerase em tempo real. A infecção viral foi responsável pela perda da viabilidade CMPC com expressão da anexina™ V FITC e Apo-Trace ™ FITC em mais de 80% das células infectadas em comparação ao grupo controle ($p < 0,001$) após 24 h. Os valores elevados da anexina™ V FITC e Apo-Trace ™ FITC encontrados estão em contraste com a maior expressão do mRNA do *survivin* e da BCl-2, considerados marcadores anti-apoptotic ($p < 0,0002$). Além disso, Bax, caspase 3, 8 e 9 foram expressos na mesma proporção nas CMPC infectado e não infectado, sem diferenças entre elas ($p < 0,005$). Em síntese, as células infectadas pelo CDV aumentaram a expressão de *survivin* e transcrição de gene BCL-2, um mediador de anti-apoptotic, concomitante com a redução de Bax, caspase 3, 8 e 9. A replicação viral parece também regular os estágios iniciais do MCP, com a presença de mediadores relacionados à via intrínseca, apesar da via extrínseca já está ativada. Este estudo corresponde a primeira descrição da expressão do gene *survivin*, um mediador anti-apoptotico, induzida pela infecção do CDV em CMPC.

Palavras-Chave: apoptose; imunossupressão; *Morbillivirus*; linfopenia; canídeos.

EXPRESSION OF INSTRISIC FACTORS RELATED TO PROGRAMMED CELL DEATH IN PERIPHERAL BLOOD MONONUCLEAR CELLS INFECTED WITH CANINE DISTEMPER VIRUS

ABSTRACT - Programmed cell death or apoptosis is a central axis of the host response to virus infection involved in cell survival and death. In this respect, several responses are developed by host cells that may control virus replication and infection. On the other hand, viruses have developed strategies to counteract host responses. Canine distemper virus (CDV) has been described to induce apoptosis in lymphoid tissues, lymphoid cells and cerebellum of naturally infected dogs. It has been also described affecting Vero cells and cervical tumor derived cells line by modulating programmed cell death pathways. In addition, the immunosuppression stage established from CDV infection is not always associated to virus detection in damaged cells. Examining the host response at early stages of immunosuppression, especially the expression of activators and/or inhibitors of apoptosis processes can provide important understanding of how the immune responses to CDV are orchestrated. For this purpose, canine peripheral blood mononuclear cells (PBMC) collected from healthy dogs were cultured and infected by CDV vaccine strain (Onderstepoort) and after 24 h post-infection (p.i.) early events of apoptosis were detected by search for annexin V™ and ApoTrace™ markers. The expression of mRNA of Bax, BCl-2, caspase-3, 8 and 9 and also survivin genes was performed in infected and uninfected canine PBMC at 24 h post-infection by real time polymerase chain reaction. The vaccine strain induced loss of PBMC viability with expression of annexin™ V FITC and Apo-Trace™ FITC in more than 80% of infected cells in comparison to control group ($p<0.001$) at 24h post-infection. The initial of early apoptosis after 24h post-infection is in contrast with higher expression of mRNA of surviving and BCl-2, two major anti-apoptotic proteins ($p < 0.0002$). In addition, Bax, caspase 3, 8 and 9 were expressed in both infected and uninfected PBMC, with no differences between them ($p<0.005$). PBMC infected by CDV increased survivin and BCL-2 gene transcription, an anti-apoptotic mediator, concomitant to a reduce level of Bax, caspase 3, 8, and 9. The viral replication also seems to regulate early stages of programmed cell death mediators related to intrinsic pathway, in spite of extrinsic pathway is already activated. This is the first description of survivin expression, an anti-apoptotic mediator, induced by CDV infection on *in vitro* cultured canine PBMC.

Keywords: apoptosis; immunosuppression; *Morbillivirus*; dog; distemper.

SUMÁRIO

1. CONSIDERAÇÕES GERAIS **1**

1.1. Aspectos gerais **1**

1.2. Mediadores da morte celular programada **6**

1.3. Mitocôndria e imunidade nata **13**

2. OBJETIVO GERAL **16**

2.1. Objetivos específicos **16**

3. CONCLUSÕES **17**

4. REFERÊNCIAS **18**

5. ARTIGO CIENTÍFICO: CANINE DISTEMPER VIRUS INDUCES EARLY STAGES OF APOPTOSIS IN *IN VITRO* CULTURE OF CANINE PERIPHERAL BLOOD MONONUCLEAR CELLS **28**

5.1. ABSTRACT **29**

5.2. INTRODUCTION **30**

5.3. MATERIAL AND METHODS **32**

5.4. RESULTS AND DISCUSSION **35**

5.5. REFERENCES **37**

1. CONSIDERAÇÕES GERAIS

1.1. Aspectos gerais

A cinomose canina é uma doença infecciosa que ocorre mundialmente e infecta todas as famílias da ordem Carnivora (APPEL & SUMMERS, 1999; DEEM et al., 2000). O vírus da cinomose é classificado como pertencente à família *Paramyxoviridae,* relacionado intimamente, em termos antigênicos e bioquímicos, ao vírus do sarampo nos seres humanos e o vírus da peste bovina nos ruminantes (BEINEKE et al., 2008). Os três vírus são grupados em conjunto em um único gênero, o *Morbillivirus.* Os *Morbilivirus* são vírus relativamente grandes (150 – 250 nm de diâmetro), contendo RNA com simetria helicoidal e possuem um envelope de lipoproteína (VAN REGENMORTEL et al., 2000).

As principais características bioquímicas da partícula viral são o envelope, o RNA (ácido ribonucleico) sentido negativo e a fita simples (LAMB & KOLAKOFSKY, 2001), que contém seis genes, que codificam as proteínas virais estruturais e não estruturais: o Nucleocapsídeo (N), a Phosphoproteina (P), Large (L), a Matriz (M), a Hemaglutinina (H), e a proteína de Fusão (F) (MARTELLA et al., 2008; LAMB & KOLAKOFSKY, 2001). No envelope lipídico estão localizadas as duas glicoproteínas de superfície (F e H) que promovem a entrada e saída do vírus das células do hospedeiro e conferem a variabilidade genética, além de serem importantes em conferir a produção de anticorpos

neutralizantes pela imunização ativa (LAMB & KOLAKOFSKY, 2001). Nos Estados Unidos da América, a doença se mostrou prevenida e controlada pela vacinação (NORRIS et al., 2006; PARDO et al., 2005). Porém, há relatos esporádicos de emergência do vírus nos Estados Unidos entre 2004 e 2006, talvez por alterações genéticas dos vírus circulantes na população canina e/ou em reservatórios não correspondentes aos vírus utilizados nas vacinas comerciais (PARDO et al., 2005; MARTELLA et al., 2007; SCHWAB et al., 2007).

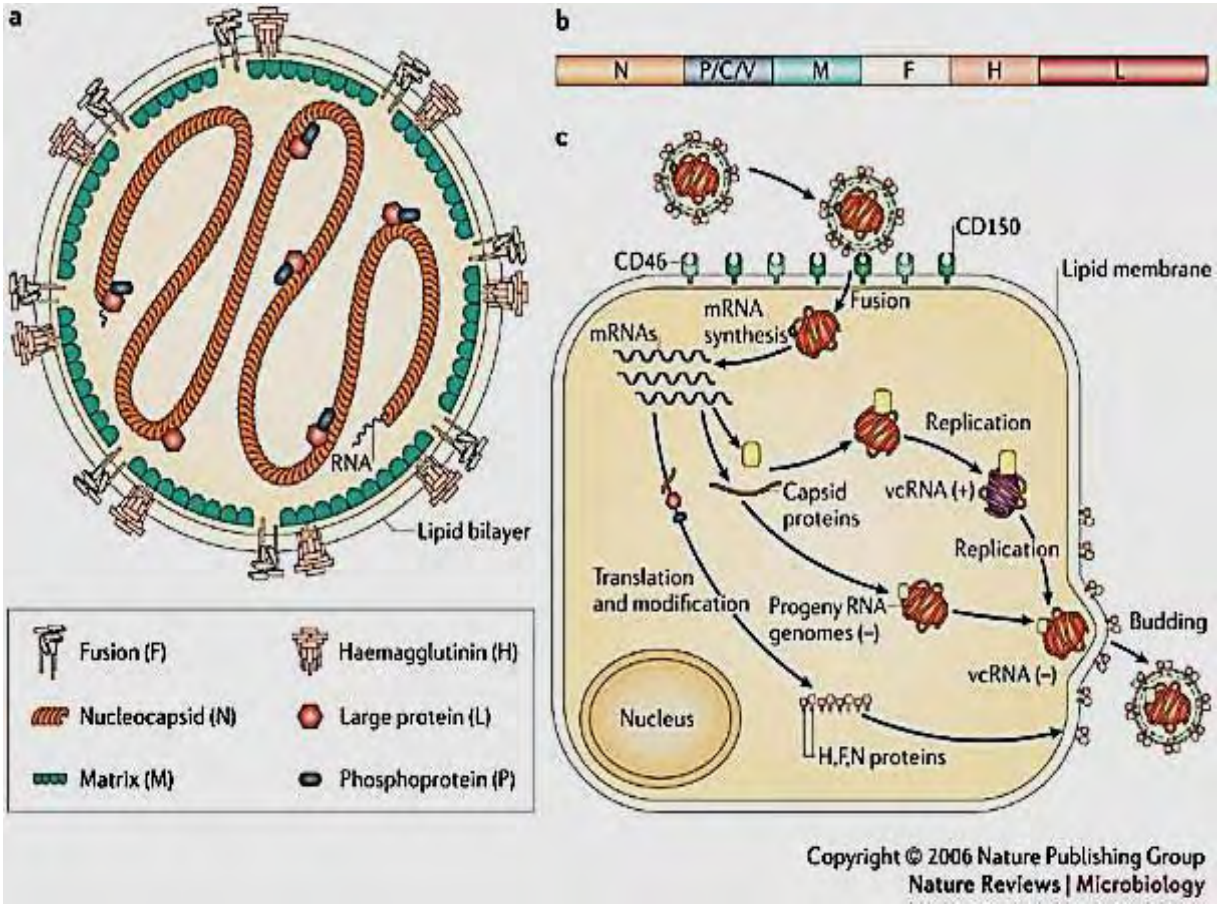


Figura 1- a) Esquema ilustrado da partícula viral do vírus da cinomose canina, família *Paramyxoviridae*, gênero *Morbillivirus*. Morfologia circular, variando a pleiomórfica, com envelope viral, fita simples de ácido ribonucleico (RNA), com as principais proteínas virais denominadas fusão (F), nucleocapsideo (N), matrix (M), hemaglutinina (H), proteína maior (L), fosfoproteína (P); b) representação esquemática da localização de cada locus gênico para transcrição proteica; c) Dinâmica da replicação viral com receptores celulares CD46 (linfócitos B) e CD150 (receptor de linfócitos ativados), a adsorção viral ocorre pela fusão celular seguida da síntese de cópias do RNA mensageiro (mRNA) e no citoplasma novas partículas são formadas com a liberação por brotamento (budding).

Em relação ao tropismo celular, o vírus da cinomose canina apresenta uma variedade de órgãos e tecidos que são susceptíveis à replicação viral (SEEHUSEN et al., 2007). Diversos são os tipos celulares, de origem primária ou de linhagem que já foram utilizados no estudo da replicação deste vírus, incluindo *African Green Monkey Kidney cell* (células Vero), marmoset lymphoid cells (células B95a), *Madin-Darby Canine Kidney cells* (células MDCK), macrófagos caninos e linfócitos (SULTAN et al., 2009; TECHANGAMSUWAN et al., 2009).

Na tentativa de elucidar os eventos celulares envolvidos nos processos de desmielinização e remielinização do sistema nervoso central (SNC), e de ampliar estratégias terapêuticas que visam à resolução ou impedimento da evolução dos danos gerados, como nas doenças neurodegenerativas que acometem os seres humanos, estudos têm sido desenvolvidos com o emprego em modelos experimentais de desmielinização com a infecção pelo vírus da cinomose (VANDELVELDE et al., 1985; VANDELVELDE & ZURBRIGGEN, 2005; BAUMGÄRTNER et al., 2005).

As lesões desmielinizantes são as mais características, causadas pela infecção viral, em muitos aspectos, semelhantes às geradas em doenças desmielinizantes humanas, tais como a esclerose múltipla e a panencefalite esclerosante subaguda (VANDELVELDE et al., 1985). Diversos tipos celulares têm sido descritos nos estudos dos mecanismos envolvidos nos processos de desmielinização e remielinização do SNC e as mais importantes são as células

de Schwann (RUDD et al., 2010). Alguns desses estudos revelaram que apesar da existência de infecção viral no SNC, este fato não pode ser atribuído diretamente como causador das lesões em si, visto que já fora descrito a presença destas lesões sem a presença viral (HEADLEY et al., 2001; PEKNY & PEKNA, 2004; SCHWAB et al., 2007).

Entretanto, os astrócitos parecem exercer um papel importante no processo de inflamação, com expressão de filamentos intermediários (FI) como *glial fribrilar acidic protein* (GFAP) e vimentina (VIM) observados em peças anatômicas por imunomarcação nos casos confirmados de cinomose canina (SEEHUSEN et al., 2007). Ademais, os astrócitos são responsáveis, entre outras funções, por responder a estímulos agressores no SNC, por meio de sua proliferação (astrocitose) e hipertrofia (astrogliose), expressando um aumento na quantidade de proteínas constituintes de filamentos intermediários, tais como GFAP e a VIM (SEEHUSEN et al., 2007). A GFAP está presente na estrutura dos astrócitos de organismos adultos e a VIM predomina no desenvolvimento embrionário, diminuindo a sua expressão com o amadurecimento celular (WYS-FLUEHMANN et al., 2010). As lesões no SNC provocam intensa expressão do GFAP, e a reexpressão de VIM, fenômeno observado nos casos positivos de meningoencefalite canina ocasionado pela infecção do vírus da cinomose (BAUMGÄRTNER et al., 1989; VANDEVELDE & ZURBRIGGEN, 2005).

1.2. Mediadores da morte celular programada

O processo de morte celular programada ou também conhecido como apoptose, se caracteriza por uma forma de destruição celular pela ativação de uma série, coordenada e programada internamente, de eventos executados por um conjunto exclusivo de proteases celulares (MORO et al., 2003; PILLET et al., 2009). Este processo representa um importante papel na homeostasia de todos os organismos multicelulares, eliminando células alteradas, tais como células com mutações genéticas ou infectadas por vírus (PILLET & VON MESSLING, 2009). Os fragmentos celulares também conhecidos como corpos apoptóticos são rapidamente fagocitados por células especializadas ou células vizinhas aos fragmentos, evitando assim o início do processo inflamatório (BEST, 2008). O processo de apoptose pode ser iniciado por estímulos fisiológicos e patológicos e está presente em diversas doenças imunossupressivas, em humanos e animais, e na maioria das infecções virais (BEST, 2008).

A morte celular programada pode desempenhar um papel importante no mecanismo imunossupressor do vírus do sarampo (ITO et al., 1997) e também foi descrita em estudos *in vitro* da infecção do vírus da cinomose (GUO et al., 2000). Este estudo concluiu que as estirpes virais utilizadas na formulação de vacinas podem induzir ao processo de morte celular programada, neste caso particular nas células Vero, e este fenômeno seria dependente da replicação celular do vírus da cinomose. Outros estudos

descreveram a importância desse processo na patogenia da degeneração oligodendrocítica na cinomose clínica (BEINEKE et al., 2008).

Em relação aos estudos realizados *in vitro*, foi demonstrado que a estirpe viral Yanaka do vírus da cinomose canina, isolada em 1996 no Japão, produz efeito citopático caracterizado por sincícios (NISHI et al., 2004). Neste mesmo estudo, passagens seriadas em monocamadas de células B95a originaram uma variante viral denominada de Yanaka-BP, que não induzia a formação sincicial. Na tentativa de associar a formação sincicial ao processo de morte celular programada o teste TUNEL (*terminal deoxynucleotidyl transferase-TdT reaction*) e o teste da anexina-V foram empregados. Os respectivos resultados revelaram que a formação sincicial da estirpe Yanaka está intimamente relacionada à fragmentação da cromatina e a translocação da fosfatidilserina da membrana nuclear, expondo a anexina-V. Entretanto, a ausência de sincícios decorrentes de diversas passagens em células B95a foi associada à modulação do processo de apoptose, provavelmente levando a persistência viral (NISHI et al., 2004; PAROLI et al., 2000; SCHWARTZMAN & CIDLOWSKI, 1993).

O processo de apoptose é induzido por uma cascata de eventos moleculares que podem ser iniciados de estímulos distintos, culminando na ativação das caspases (*cysteine aspartic acid-specific proteases*) (KAJITA et al., 2006). Essas enzimas apresentam papel fundamental e efetivo na resposta do hospedeiro ao processo de morte celular. Os diferentes estímulos são

considerados essenciais no mecanismo de apoptose, visto que são indispensáveis para a ocorrência de condensação da cromatina e fragmentação do DNA (KAJITA et al., 2006). Ademais, estudos descreveram a ativação da caspase 3, 8 e 9 no processo de infecção viral, associando este mecanismo ao processo de morte celular programada no caso da cinomose canina (KAJITA et al., 2006; PILLET et al., 2009; DEL PUERTO et al., 2010)

Alterações da membrana plasmática, com translocação da fosfatidilserina do interior da célula para a superfície externa da membrana plasmática é um indício de estágios iniciais de apoptose (RUGGIERI et al., 2007). Essa condição pode ser detectada por marcação do tecido com anexina V, a qual possibilita identificar e quantificar células apoptóticas das células necróticas (HU et al., 2008). As anexinas pertencem às classes de proteínas dependentes de Ca++ para sua ligação, normalmente envolvidas nos processos de exocitose, inibição da proteína kinase C, canais de cálcio das células eucariotas (HU et al., 2008; SCOTT, 2010). Durante os estágios iniciais da morte celular programada, os compostos de phosphatidylserine, normalmente encontrados no lado citoplasmático das membranas celulares, são translocados da face interior para a face exterior, expondo dessa forma a anexina V. A anexina V juntamente com o teste de TUNEL, são as metodologias mais empregadas no estudo dos processos de morte celular geradas pela infecção viral em seus momentos iniciais (PILLET et al., 2009).

Em relação à interação vírus-células, especificamente células mononucleares, existe descrição da participação direta e indireta do processo de infecção viral na destruição celular no caso da cinomose canina (SCHOBESBERGER et al., 2005). A participação viral no processo de linfopenia é um evento inicial e a severidade da destruição celular está intimamente correlacionada com a evolução do quadro infeccioso com a consequente persistência viral nos tecidos linfoides e no sistema nervoso central (SCHOBESBERGER et al., 2005).

Estudos recentes demonstraram que alguns vírus desenvolveram mecanismos de prevenir, ou pelo menos controlar, alguns aspectos ligados ao processo de apoptose (BEST, 2008; HAY & KANNOURAKIS, 2002). Neste sentido, a estirpe viral 5804Pell do vírus da cinomose, considerada virulenta, foi utilizada para verificar a ação direta da infecção viral na depleção do sistema imunológico (PILLET & VON MESSLING, 2009). Esses autores concluíram que, em monocamadas de células MDCK a infecção pelo vírus da cinomose resultou em um aumento não significativo do processo de apoptose. Em contrapartida, em furões experimentalmente infectados pela mesma estirpe viral, foi possível concluir que uma extensiva infecção viral está associada à morte celular programada e á alterações do ciclo celular. Entretanto, a infecção viral não pode ser considerada a causa principal da leucopenia observada neste modelo biológico (PILLET & VON MESSLING, 2009).

No mecanismo de apoptose existem proteínas inibidoras do processo, também conhecidas como *inhibitors of apoptosis* (IAPs) (HAY & KANNOURAKIS, 2002). O mediador denominado *survivin* é conhecido por induzir diretamente os componentes da família IAPs estando em grande quantidade expresso em células tumorais e células com alta capacidade de proliferação (ALTIERI, 2006). Entretanto, o papel do *survivin* na inibição da morte celular programada é controverso. Inicialmente postulou-se que sua ligação fosse seletiva e promovia a degradação das caspases efetoras 3, 7 e 9 (ALTIERI, 2006). Porém, experimentos indicaram que o *survivin* inibe a caspase-9, mas não as caspases-3 e 7, e ainda para exercer essa função, necessita de um co-fator, inibindo assim o processo apoptótico (MARUSAWA *et al.,* 2003).

Nos modelos virais, o *survivin* foi descrito como importante promotor, quando expresso, da replicação do vírus Varicela-Zooster com graves lesões na pele (SEN et al., 2012). Em outro estudo recente, a expressão do gene *survivin* preveniu a apoptose por se ligar diretamente a caspase 3 efetora em astrócitos infectados com o *Theiler´s murine encephalomyelitis virus* (RUBIO et al., 2012). Escassos são os estudos, evolvendo a expressão *survivin* em infecções virais, entretanto diversas são as descrições da associação com processos tumorais induzidos por vírus oncogênicos.

Recentemente, a infecção *in vitro* da estirpe viral Lederle em monocamadas de células Vero, demonstrou que houve um aumento do

receptor ligante de Fas, responsável pela ativação da via extrínseca do processo de apoptose (DEL PUERTO et al., 2011). Este aumento da expressão do mRNA (ácido ribonucleico mensageiro) relacionado ao gene ligante de Fas foi descrito como expresso 15 h post-infecção, revelando a ativação extrínseca do mecanismo de morte celular programada decorrente da infecção pelo vírus da cinomose (DEL PUERTO et al., 2011). A mesma estirpe viral também induziu em células tumorais HeLa a expressão de mRNA relacionado ao gene da caspase -3, diferentemente entre as células infectadas e não infectadas. Em relação à caspase-8, nenhuma diferença foi descrita entre as células infectadas e não infectadas (DEL PUERTO et al., 2011).

Diante do exposto, podemos concluir que a mesma estirpe viral pode ativar tanto a via extrínseca quanto a via intrínseca do processo de apoptose dependendo do tipo celular envolvido. Ademais, nenhum estudo, até a presente data, avaliou os eventos iniciais do processo de morte celular programada em células mononucleares periféricas cultivadas *in vitro* e subsequentemente infectadas com o vírus da cinomose

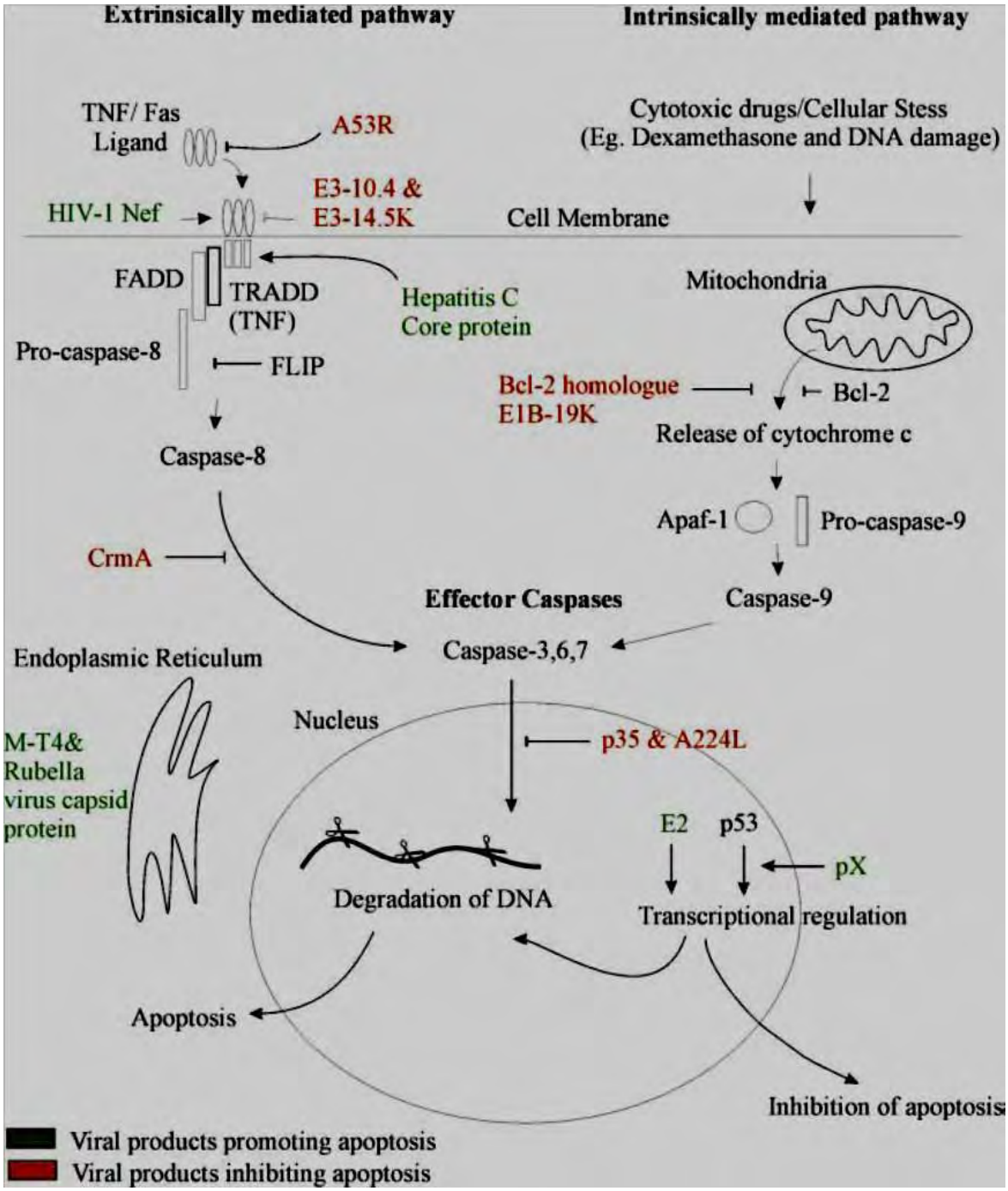


Figura 2- Esquema dos principais mecanismos ativos e defensivos relacionados ao processo de morte celular programada.

1.3. Mitocôndria e imunidade nata

A mitocôndria é uma organela celular e está envolvida em uma variedade de processos metabólicos incluindo a produção de ATP, homeostase do cálcio, proliferação celular, morte celular programada e síntese de aminoácidos, nucleotídeos e lipídeos (CASTANIER & ARNOULT, 2011).

Embora cada mitocôndria tenha seu próprio genoma, a maioria das proteínas mitocondriais é codificada pelo DNA do núcleo da célula hospedeira (WEST et al., 2011). A distribuição, forma e funcionamento destas organelas são regulados por estímulos intrínsecos e extrínsecos da morte celular programada, os quais em alguns casos incluem os vírus (OHATA & NISHIYAMA, 2011). O mecanismo de imunossupressão induzido pelo CDV permanece não elucidado. Sabe-se que após a infecção por aerossóis, a replicação viral tem início nos tecidos linfoides do trato respiratório superior e as alterações decorrentes desta infecção incluem atrofia do timo, depleção de células T e B, além de corpúsculos de inclusão em células linfáticas e reticulares (WUNSCHMANN et al., 2000). Ainda, tem sido demonstrado que a produção de citocinas do sangue periférico é diminuída em estágios clínicos da doença (LAMB & KOLAKOFSKY, 2001).

Recentemente, diversas proteínas foram descritas como participantes ativas do processo de morte celular programada, ativando ou bloqueando o processo, induzidas diretamente pela infecção viral (Figura 3). Ademais, trabalhos documentando o papel da mitocôndria em induzir a morte

celular programada após a infecção é um atual conceito, em que esta organela representa um ponto convergente com a imunidade nata do hospedeiro e a morte celular programada (TIEDE et al., 2011; CASTANIER & ARNOULT, 2011). A eliminação das células infectadas do organismo humano ou animal pelo processo de apoptose é um dos mecanismos mais antigos de resposta ao processo de infecção (MOORE & TING, 2008). O sequestro de proteínas pro-apoptoticas, por meio de bloqueio direto ou de homólogos, representa um passo vital para sucesso da replicação viral (SCOTT, 2010). Em contrapartida, o processo de morte celular, em alguns processos infecciosos virais, auxiliam na disseminação de partículas virais para células adjacentes, ou promovem a eliminação de células não infectadas do sistema imunológico, favorecendo o processo de imunossupressão (SCOTT, 2010).

Em síntese, até a presente data, a infecção pelo vírus da cinomose parece ter uma ligação com o processo de morte celular programada diretamente ligada a funcionalidade da mitocôndria. A ativação das caspases, de proteínas pró e anti-apoptóticas em diversos tecidos e/ou cultivos *in vitro* de células primárias e de linhagem, revelam uma diversidade de alternativas da família *Paramyxoviridae* em modular a resposta do hospedeiro favorecendo a produção de novas partículas virais.

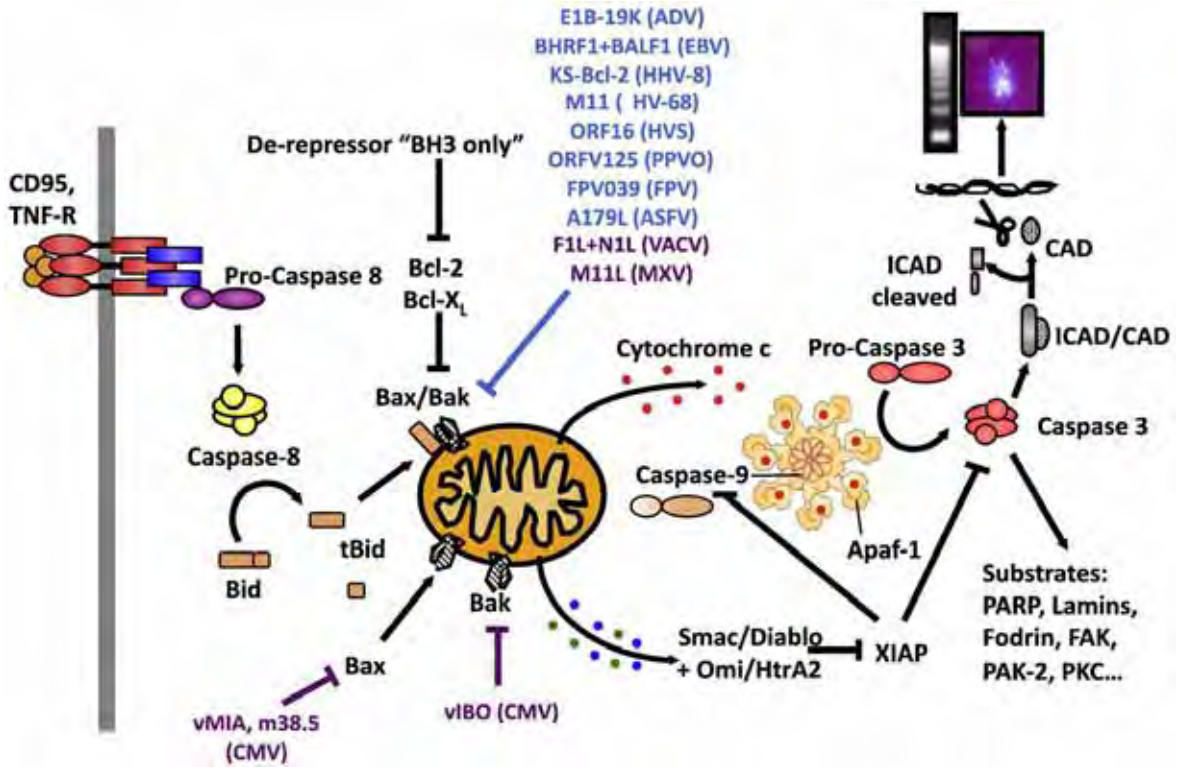


Figura 3- A ilustração revela o papel principal da mitocôndria no processo de apoptose e a modulação por proteínas virais. As proteínas pro-apoptoticas da família BCl-2 (Bax e Bak) promovem a liberação no citosol de fatores indutores da apoptose (citocromo c, Smac/Diablo, Omi/HtrA2) envolvidos diretamente na ativação da caspase. As proteínas pro-apoptose como Bax e Bak são antagonizadas pelas proteínas da família BCl-2 (BCl-2 e BCl-xL). Em azul, as proteínas virais homólogas à família BCl-2 que inibem a apoptose em células infectadas. Em roxo, proteínas virais vBCL-2 com estrutura homóloga à BCl-2 celular (CASTANIER & ARNOULT, 2011). ADN, Adenovirus; EBV, Epstein-Barr vírus; HHV-8, human herpesvirus 8; γHV-68, murine γherpesvirus 68; HVS, herpesvirus saimiri; PPVO, parapoxvirus ORF; FPV, fowlpox vírus; ASFV, African swine fever vírus; VACV, vaccínia vírus; MXV, myxoma vírus; CMV, cytomegalovirus.

2. OBJETIVO GERAL

Avaliar a expressão de proteínas ligadas a morte celular programada na infecção *in vitro* do vírus vacinal da cinomose canina em células mononucleares periféricas caninas, relacionados ao mecanismo intrínseco de ativação e inibição após 24 h de exposição viral.

2.1. OBJETIVOS ESPECIFICOS

2.1.1. Promover o cultivo *in vitro* de células mononucleares periféricas caninas saudáveis para realizar a infecção com a estirpe viral vacinal (CDV-Onderstrepoort) no período 24 h post-infecção;

2.1.2. Avaliar parâmetros como viabilidade celular e fatores ligados aos períodos iniciais do processo de morte celular programada como a detecção da anexina V e ApoTrace™ por citometria de fluxo e imunocitoquímica;

2.1.3. Avaliar a expressão em tempo real de genes survivin, caspase 3, caspase 8, caspase 9, BCl-2 e Bax em monócitos caninos infectados e não infectados com CDV 24 h post-infecção; o gene GADPH canino será utilizado para normalizar os resultados.

3. CONCLUSÕES

3.1. A técnica de cultivo utilizada para as células mononucleares periféricas se mostrou eficiente no presente estudo.

3.2. A infecção de células mononucleares de sangue periférico canino apresentou uma redução na viabilidade celular ($p < 0.005$) entre os dois grupos estudados (CDV + e CDV -) no período de 24 h post-infecção;

3.3. O grupo CDV + apresentou uma expressão maior dos marcadores inicias de morte celular programada annexin™ V FITC e Apo-Trace™ FITC em comparação ao grupo CDV-, que foi considerado negativo para os dois marcadores;

3.4. A expressão de mRNA relacionados aos genes codificadores de Bax, BCl-2, caspase-3, caspase-8 e caspase-9 foi considerada estatisticamente superior no grupo CDV + quando comparados aos mesmos no grupo CDV-.

4. REFERÊNCIAS

ALTIERI, D.C. The case for survivin as a regulator of microtubule dynamics and cell-death decisions. Current Opinion Cell Biology. v.18, p.609-615. 2006.

APPEL, M.J.G; SUMMERS, B.A. Canine distemper: current status. In: CARMICHAEL, L.E. Recent advances in canine infectious diseases. Ithaca, NY: International Veterinary Information Service, p.6. 1999.

BAUMGÄRTNER, W; ALLDINGER, S. The pathogenesis of canine distemper virus induced demyelination—a biphasic process. Experimental models of multiple sclerosis. Springer, New York. Lavi E., Constantinescu, C.S. (Eds) .p. 871–887. 2005.

BAUMGÄRTNER, W; ÖRVELL, C; REINACHER, M. Naturally occurring canine distemper virus encephalitis: distribution and expression of viral polypeptides in nervous tissues. Acta Neuropathologica, V.78, N.5, p.504-512. 1989.

BEINEKE A; PUFF C; SEEHUSEN, F; BAUMGÄRTNER, W. Pathogenesis and immunopathology of systemic and nervous canine distemper. Veterinary

Immunology and Immunopathology. doi:10.1016/j.vetimm.2008.09.023. 18 p. 2008.

BEST, M.S. Viral subversion of apoptotic enzymes: escape from death row. Annual Review Microbiology, v.62, p. 171-192, 2008.

CASTANIER, C., ARNOULT, D. Mitochondrial localization of viral proteins as a means to subvert host defense. Biochimica et Biophysica Acta, v. 1813, p.575-583, 2011.

DEEM, S.L; SPELMAN, L.H; YATES, R.A; MONTALI, R.J. Canine Distemper in terrestrial carnivores: a review. Journal Zoo Wildlife Medicine, V.31, p. 441 – 451, 2000.

DEL PUERTO, H.L., MARTINS, A.S., MILSTED, A., FAGUNDES, E.M.S., BRAZ, G.F., HISSA, B., ANDRADE, L.O., ALVES, F., RAJÃO, D.S., LEITE, R.C., VASCONCELOS, A.C. canine distemper virus induces apoptosis in cervical tumor derived cell lines. Virology Journal, v. 8, N.334, 2011.

DEL PUERTO, H.L., MARTINS, A.S., MORO, L., MILSTED, A., ALVES, F., BRAZ, G.F., VASCONCELOS, A.C. caspase 3/8/9, bax and Bcl-2

expression in the cerebellum, lymph nodes and leucocytes of dogs naturally infected with canine distemper virus. Genetics and Molecular Research, v.9, p.151-161, 2010.

DEL PUERTO, HL., MARTINS, A.S., BRAZ, G.F., ALVES, F., HEINEMANN, M.B., RAJÃO, D.S., ARAÚJO, E.C., MARTINS, S.F., NASCIMENTO, D.R., LEITE, R.C., VASCONCELOS, A.C. Vero cells infected with Lederle strain of canine distemper virus have increased Fas receptor signaling expression at 15 h post-infection. Genetics and Molecular Research, v. 10, p. 2527-2533, 2011.

GUO, A; C. P. LU. Canine distemper virus causes apoptosis of Vero cells. Journal Veterinary Medicine, V.47, p.183–190, 2000.

HAY, S.; KANNOURAKIS, G. A time to kill: viral manipulation of the cell death program. *Journal General Virology,* v.83, p.1547-64, 2002.

HEADLEY, SA., SOARES, I.C., GRAÇA, D.L. Glial fribrillary acidic protein (GFAP) immunoreactive astrocytes in dogs infected with canine distemper virus. Journal Comparative Pathology, v. 125, p.90-97, 2001.

HU, T., SHI, J., JIAO, X., ZHOU, J., YIN, X. Measurement of annexin V uptake and lactadherin labeling for the quantification of apoptosis in adherent Tca8113 and ACC-2 cells. Brazilian Journal of Medical and Biological Research, v. 41, p.750-757, 2008.

ITO, M; WATANABE, M; IHARA ,T; KAMIYA, H; SAKURAI, M. Measles virus induces apoptotic cell death in lymphocytes activated with phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA) calcium ionophore. Clinical Experimental Immunology, V.108. p.266–271, 1997.

KAJITA, M; KATAYAMA, H; MURATA, T; KAI, C; HORI, M; OZAKI, H. Canine Distemper Virus induces apoptosis through Caspase-3 and -8 activation in Vero cells. Journal Veterinary Medicine, v. 53, p.273 – 277, 2006.

LAMB, R.A; KOLAKOFSKY, D. Paramyxoviridae: the viruses and their replication. Fields of Virology. 4.ed, vol.1. p. 1305 – 1443. Philadelphia, 2001.

MARUSAWA, H.; MATSUZAWA, S.; WELSH, K. HBXIP functions as a cofactor of survivin in apoptosis suppression. EMBO Journal v 22, p.2729-2740, 2003.

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

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

MOORE, CB., TING, JP-Y. Regulation of mitochondrial ativiral signaling pathways. Immunity, v. 28, p.735-739, 2008.

MORO, L., MARTINS, A.S., ALVES, C.M., SANTOS, F.G.A., DEL PUERTO, H.L., VASCONCELOS, A.C. Apoptosis in the cerebellum of dogs with distemper. Journal Veterinary Medicine B, v. 50, p. 221-225, 2003.

NISHI, T., TSUKIYAMA-KOHARA, K., TOGASHI, K., KOHRIYAMA, N., KAI, C. Involvement of apoptosis in syncytial cell death induced by canine distemper virus. Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Disease, v. 27, p.445-455, 2004.

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

OHATA, A., NISHIYAMA, Y. Mitochondria and viruses. Mitochondrion, v.11, p.1-12, 2011.

PARDO, I.D.R; JOHNSON, G.C; KLEIBOEKER, S.B. Phylogenetic characterization of canine distemper viruses detected in naturally infected dogs in North America Journal Clinical Microbiology, V.43. p. 5009–5017. 2005.

PAROLI, M.; SCHIAFELLA, E.; DI ROSA, F., BARNABA, V. Persisting viruses and autoimmunity. Journal Neuroimmunology, v.107, p.201-4, 2000.

PEKNY, M., PEKNA, M. Astrocyte intermediate filaments in CNS pathologies and regeneration. Journal of Pathology, v.204, p.428-437, 2004.

PILLET, S., VON MESSLING, V. canine distemper virus selectively inhibits apoptosis progression in infected immune cells. Journal Virology, v.83, p. 6279-6287, 2009.

RUBIO, N., GARCIA-SEGURA, L., AREVALO, M-A. Survivin prevents apoptosis by binding to caspase-3 in astrocytes infected with the BeAn strain of Theiler´s murine encephalomyelitis virus. Journal Neurovirology, doi:10.1007s13365-0112-3, 2012.

RUDD, PA.; BASTIEN-HAMEL, L-E.; VON MESSLING, V. Acute canine distemper encephalitis is associated with rapid neuronal loss and local immune activation. *J. Gen virol.* V.91, p.980-989. 2010.

RUGGIERI, A.; DI TRANI, L.; GATTO, I. Canine coronavirus induces apoptosis in cultured cells. Veterinary Microbiology, v. 121, p. 64-72, 2007.

SCHWAB, S; SEELIGER, H.F; PAPAIOANNOU, N; PSALLA, D; POLIZOPULOU, Z; BAUMGÄRTNER, W. Non-suppurative Meningoencephalitis of unknown origin in cats and dogs: an

immunohistochemical study. Journal Comparative Pathology, V.136. p. 96 – 110. 2007.

SCHWARTZMAN, R.A.; CIDLOWSKI, J.A. Apoptosis: molecular biology of programmed cell death. Endocrinology Review, v.14, p. 133-151, 1993.

SCOTT, I. The role of mitochondria in the mammalian antiviral defense system. Mitochondrion, v. 10, p. 316-320, 2010.

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

SEN, N., CHE, X., RAJAMANI, J., ZERBONI, L., SUNG, P., PTACEK, J., ARVIN, A.M. Signal transducer and activator of transcription 3 (STAT3) and surviving induction by varicella-zooster virus promote replication and skin pathogenesis. PNAS, v. 109, p.600-605, 2012.

SCHOBESBERGER, M., SUMMERFIELD, A., DOHERR, M.G., ZURBRIGGEN, A., GRIOT, C. canine distemper virus-induced depletion of uninfected

lymphocytes is associated with apoptosis. Veterinary Immunology and Immunopathology, v. 104, p. 33-44, 2005.

SULTAN, S., LAN, N.T., UEDA, T., YAMAGUCHI, R., MAEDA, K., KAI, K. Propagation of Asian isolates of canine distemper virus (CDV) in hamster cell lines. Acta Veterinaria Scandinavica, v.51, 38, 2009.

TECHANGAMSUWAN, S., HAAS, L., ROHN, K., BAUMGÄRTNER, W., WEWETZER, K. Distinct tropism of canine distemper virus strains to adult olfactory ensheathing cells and Schwann cells in vitro. Virus Research, v.144, p. 195-201, 2009.

TIEDE, LM., COOK, EA., FOX, HS. Oxygen matters: tissue culture oxygen levels affect mitochondrial function and structure as well as responses to HIV viroproteins. Cell Death and Disease, 2, e246, doi:10.1038/cddis.2011.128.

VAN REGENMORTEL, H.V.M., FAUQUET, C.M., BISHP, D.H.L., CARSTENS, E., ESTES, M.K., LEMON, S., MANILOFF, J., MAYO, M.A., McGREOCH, D. Virus taxonomy. In: Pringle, CR, Wickner, RB, (Eds), Proceedings of Seventh Report of International Committee on Taxonomy of Viruses. Academic Press, New York, NY, 2011.

VANDEVELDE, M; ZURBRIGGEN A. Demyelination in canine distemper virus infection: a review. Neuropathology, V.109. p.56–68, 2005.

VANDEVELDE, M; ZURBRIGGEN, A; HIGGINS, R.J; PALMER, D. Spread and distribution of viral antigen in nervous canine distemper. Acta Neuropathology, V.67. p.211–218, 1985.

WEST, A.P., SHADEL. G.S., GHOSH, S. Mitochondria in innate immume responses. Nature Reviews, v.11, p. 389-402, 2011.

WÜNSCHMANN, A.; KREMMER, E.; BAUMGÄRTNER, W. Phenotypical characterization of T and B cell areas in lymphoid tissues of dogs with spontaneous distemper. *Vet. Immunol. Immunopathol*. V.73, p.83-98. 2000.

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

5. ARTIGO CIENTÍFICO

Canine distemper virus induces early stages of apoptosis in *in vitro* culture of canine peripheral blood mononuclear cells

Flavio T. L. B. Roncatti, Talita F. Antello, Sabrina A. Donatoni, Natielle W. Rodrigues, Jessica K. L. Rossi, Tereza C. Cardoso

*Corresponding author: Tereza C Cardoso

E-mail address: tcardoso@fmva.unesp.br

Tel: +55 18 36361379

5.1 ABSTRACT

Programmed cell death or apoptosis is a central axis of the host response to virus infection involved in cell survival and death. In this respect, several responses are developed by host cells that may control virus replication and infection. On the other hand, viruses have developed strategies to counteract host responses. Canine distemper virus (CDV) has been described to induce apoptosis in lymphoid tissues, lymphoid cells and cerebellum of naturally infected dogs. It has been also described affecting Vero cells and cervical tumor derived cells line by modulating programmed cell death pathways. In addition, the immunosuppression stage established from CDV infection is not always associated to virus detection in damaged cells. Examining the host response at early stages of immunosuppression, especially the expression of activators and/or inhibitors of apoptosis processes can provide important understanding of how the immune responses to CDV are orchestrated. For this purpose, canine peripheral blood mononuclear cells (PBMC) collected from healthy dogs were cultured and infected by CDV vaccine strain (Onderstepoort) and after 24 h post-infection (p.i.) early events of apoptosis were detected by search for annexin V™ and ApoTrace™ markers. The expression of mRNA of Bax, BCl-2, caspase-3, 8 and 9 and also survivin genes was performed in infected and uninfected canine PBMC at 24 h post-infection by real time polymerase chain reaction. The vaccine strain induced loss of PBMC viability with expression of annexin™ V FITC and Apo-Trace™ FITC in more than 80% of infected cells in comparison to control group ($p<0.001$) at 24h post-infection. The initial of early apoptosis after 24h post-infection is in contrast with higher expression of mRNA of surviving and BCl-2, two major anti-apoptotic proteins ($p < 0.0002$). In addition, Bax, caspase 3, 8 and 9 were expressed in both infected and uninfected PBMC, with no differences between them ($p<0.005$).PBMC infected by CDV increased survivin and BCL-2 gene transcription, an anti-apoptotic mediator, concomitant to a reduce level of Bax, caspase 3, 8, and 9. The viral replication also seems to regulate early stages of programmed cell death mediators related to intrinsic pathway, in spite of extrinsic pathway is already activated. This is the first description of survivin expression, an anti-apoptotic mediator, induced by CDV infection on *in vitro* cultured canine PBMC.

Keywords: CDV; immunosuppression; programmed cell death; intrinsic pathway.

5.2- Introduction

Apoptosis, a programmed suicide cell death, characterized by chromatin condensation, DNA fragmentation, membrane blebbing and cell shrinkage, can be induced through intrinsic and extrinsic pathways (BEST, 2008). In the mitochondria-mediated pathway, mitochondria release several apoptotic factors, including cytochrome c, Smac/Diablo, and apoptosis-inducing factor (AIF) into the cytosol (SCOTT, 2010). In addition, mitochondrial apoptotic signaling and mitochondrial-outer-membrane permeabilization (MOMP) is controlled by the B-cell lymphoma 2 (BCL-2) family proteins (CASTANIER et al., 2011). The anti-apoptotic BCL-2 family proteins, such as BCL-2, BCL-w, BCL-xl and myeloid cell leukemia 1 (MCL1) are generally aggregated into the outer mitochondrial membrane. Under death stimuli, Bax, another member of the BCL-2 family, display a pro-apoptotic effect (CASTANIER & ARNOULT, 2011; MOORE & TING, 2008; SCHWARTZMAN & CIDLOWSKI, 1993). Mammalian DNA and RNA viruses are among the stimuli that have been associated with cell apoptosis. Viruses possess various biochemical and genetic mechanisms to evade and/or induce apoptosis modulation through virus-encoded proteins (OHATA & NISHIYAMA, 2011; TIEDE et al., 2011; WEST et al., 2011).

Caspases are a family of cysteine proteases that mediate apoptosis induced by a variety of stimuli (TIEDE et al., 2011). Based on their structures and order in cell death pathways, caspases can be divided into initiators (such as caspase-2, -8, -9, -10, and -12) and effectors (such as caspase-3, -6, and -7). Two pathways, the intrinsic and extrinsic death pathways, have been identified in most cases of caspase-dependent apoptosis (BEST, 2008). From the point of view of the host, death of pathogen-infected cells may be required in order to kill the intracellular pathogens and reduce or eliminate the production of viable pathogenic organisms (BEST, 2008).

The role of host cell apoptosis and the underlying molecular processes differ among pathogens, and this reflects the diversity of the pathogenic mechanisms involved in a given type of infection (PAROLI et al., 2000). Inhibitors of apoptosis proteins (IAPs) are a family of proteins that interfere with

the activation of caspases by various mechanisms (ALTIERI, 2006). Increased expression of various IAPs has been reported in several types of cancer and is thought to contribute to the phenomenon of resistance to apoptosis that is often a feature of the neoplastic process (CASTANIER & ARNOULT, 2011). Survivin is a member of the IAP family, with well-known functions in the regulation of cell division (MARUSAWA et al., 2003). In contrast, its anti-apoptotic function has long been debated and, only recently, relevant mechanisms have been unveiled in tumor cells (SEN et al., 2012). In order to inhibit apoptosis, survivin must localize to the cytosol and its negative regulatory effect on caspase function appears to be indirect (MARUSAWA et al., 2003). Based mostly on early data from man, it is frequently claimed that survivin is widely expressed during embryonic development, but is not expressed or only weakly expressed in normal adult tissues. Some authors concede that survivin is expressed to some extent in adult tissues with a high cell turnover including testis, intestinal epithelium and bone marrow (ALTIERI, 2006; MARUSAWA et al., 2003). Evidence that the role of survivin is not restricted to developing tissues is emerging, with several reports of its expression in normal adult tissues (RUBIO et al., 2012).

Canine distemper virus (CDV), a negative stranded RNA *Morbillivirus*, causes a multisystemic disease in dogs, which is associated with severe immune suppression. In this respect, several studies have been done in order to find evidences of CDV main role in induction of this immune suppression stage, but the direct involvement of CDV infection on immune depletion is not well characterized (PILLET & VON MESSLING, 2009; SCHOBESBERGER et al., 2005). In vivo studies have demonstrated that CDV infection induced a severe CD3+T cell and CD21+B cell depletion in dogs at 3 days post-infection (SCHOBESBERGER et al., 2005). However, four infected dogs have presented virus persistence in lymphoid tissues and central nervous system, and the immune suppression state lasted until 24 days post-infection (SCHOBESBERGER et al., 2005). In other in vivo model, infected ferrets demonstrated levels of cell viability and early/late apoptosis remained stable in thymus and lymph node, where more than 80% of cells were infected (PILLET

& VON MESSLING, 2009). Moreover, a small increase in apoptosis was observed in peripheral blood mononuclear cells and spleen (PILLET & VON MESSLING, 2009). Recently, it has been demonstrated that expression of caspase-3, 8 and 9, Bax and BCl-2 in peripheral blood did not differ between naturally infected and uninfected dogs (DEL PUERTO et al., 2010). Moreover, the expression of caspase-3 and 8 was considered higher in lymph nodes of naturally infected dogs in comparison to uninfected group (DEL PUERTO et al., 2010).

To better understand of the real importance of early apoptosis in develop immune depression after CDV exposure, this study evaluated the early expression of annexin™ V FITC and Apo-Trace™ FITC by flow cytometric analysis, and also de mRNA expression of pro-apoptotic caspase 3, 8 and 9, and Bax, and the anti-apoptotic BCl-2 and survivin by real time polymerase chain reaction in canine peripheral blood mononuclear cells (PBMC) derived from healthy dogs and submitted to CDV *in vitro* infection.

5.3- Materials and methods

5.3.1 - Isolation of PBMC and virus infection

Two dogs were assessed from Central Animal Facility at University of São Paulo State with their owner´s informed consent. The study was approved by Animal care Committee of University of São Paulo State. Five milliliters of blood was taken from each dog from the vena cephalica antebrachii and placed into tubes containing EDTA (BD, NJ, USA). PBMC were isolated from whole blood by density gradient centrifugation using a protocol from the directions provided with Histopaque® 1077 (Sigma-Aldrich®, St. Louis, MO, USA). Undiluted blood was layered 1:1 over Histopaque® and submitted to centrifugation at 400 x *g* for 30 min at room temperature. The cells from the interface were aspirated by pipette and washed twice by suspension in sterile phosphate buffered saline (PBS) solution and centrifuged at 300 x *g* for 30 min. The resulting cell pellet was ressuspended in a small volume of PBS and viable cell concentration was determined by microscopic examination using trypan blue exclusion method.

Viability was > 90% in all samples. The cells were ressuspended with 2 mM glutamine, 100 µg/ml streptomycin, 100 UI penicillin and 10% heat inactivated fetal bovine serum (Sigma-Aldrich®) at approximately 1 x 10^6 PBMC/ml. PBMC (1 x 10^6 ml^{-1}) were cultured in 6 well polystyrene plaques (Nunc, 142489, Thermo Fischer Scientific, Rochester, NY) at 37 °C, 5% CO_2.

Modified live canine distemper virus (Onderstepoort strain) vaccine (Galaxy® D, Schering-Plough, Animal Health Corporation, NE, USA) was reconstituted with 0,5 ml of RPMI 1640 medium (Sigma-Aldrich) and was added to PBMC culture immediately upon reconstitution at a 1:10 dilution. The culture infection were performed in triplicate wells and the entire content of one well from each group (CDV + and CDV -) was aspirated after 24 h of incubation and frozen at – 86 °C until needed.

5.3.2 - Immunocytochemistry and flow cytometry of early stages of apoptosis

Infected and uninfected canine PBMC were fixed with 4% paraformaldehyde for 15 min in Lab-Tek® chamber slides (Falcon™, BD). The cells were permeabilized for 10 min at room temperature in 0.4% Triton X-100 diluted in phosphate buffered solution (PBS). The fixed cells were incubated overnight at 4 ºC with each of the primary antibody all purchased from Sigma-Aldrich®. On the next day, after three washes, cells were incubated with the respective goat secondary antibody (1:100) anti-mouse FITC (Sigma-Aldrich®). For nuclear staining, Propidium iodide (1 mg/ml) was diluted in Fluormount™ aqueous medium and loaded onto samples for 15 min. The images were collected under an AxioImager® A.1 light and an ultraviolet (UV) microscope connected to an AxioCam®MRc (Carl Zeiss, Oberkochen, Germany). The images were processed using AxioVision® 4.8 software (Carl Zeiss) for each antigen, whereas values were determined by visually counting positive cells. The undifferentiated cells were submitted to the same staining procedure to assess for cross reaction among antibodies. The negative controls consisted of incubation of slides with bovine IgG and IgM isotypes as the primary antibodies.

Following CDV infection, PBMC at 1 x 10^6 cells/ml were harvested and washed with PBS, permeabilized in 4% of paraformaldehyde, and incubated for 18 h at 4 ºC with the monoclonal antibodies at the same dilutions described for immunostaining in 1% Triton X-100 and 0.5% bovine serum albumin (BSA). After incubation with the primary antibodies, the cells were washed three times with PBS plus 0.1% Triton X-100. Next, a 1:50 dilution of the secondary antibody was added to100 µl of the cell suspension and was then incubated at 37 ºC for 30 min. The cell suspension was washed as previously described, and after the final wash, the cells were fixed with 4% paraformaldehyde. Data were acquired with an Attune™ acoustic focusing cytometer system (Applied Biosystems®, Foster City, CA, USA) and at least 50,000 events were counted. The negative pattern was examined by applying the same cell suspension with the initial incubation with bovine IgG and IgM isotypes, and the result was included on the global compensation to exclude auto-fluorescence. A BL1-A (488 nm) filter was used in each analysis.

5.3.3 - Real time polymerase chain reaction: Bax, BCl-2, caspase-3, 8 and 9 and survivin mRNA expression

Upon harvest at 24 h p.i. the PBMC cells total RNA was extracted using Trizol LS™ protocol according to manufacturer's instructions (Invitrogen®). One average, 150 ng total RNA was used for first-strand cDNA synthesis with Enhanced Avian RT First stand synthesis (Sigma-Aldrich®). The qPCR was carried out and analyzed by the software on a StepOnePlus® real time instrument (Applied Biosystems). The real time PCR mixtures (50 µl) contained 1.2 µg of cDNA, 400 nM primers and 200 nM probes FAM-labeled customized for Bax, BCL-2, caspases 3, 8, 9 and survivin dog sequences (Applied Biosystems™) were used. The PCR was initiated by sequential amplification of 40 cycles at 95°C (15s) and 60°C (60s). The results were obtained from three replicates of each sample to ensure representative and accuracy pipetting. The expression of canine GADH (glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase) gene was also quantified in a similar way for normalization. The comparative

delta-delta C_t method was used to analyze the results with the expression level of the respective target genes at the corresponding time point in infected and uninfected PBMC in comparison to GADH C_t values.

5.3.4 - Statistical analysis

All of the experiments were performed at least in triplicate. Results of representative experiments are presented. Descriptive statistics include the mean ± standard deviation (s.d). A *p*-values < 0.005 was considered significant.

5.4 - Results and discussion

5.4.1 - Immunocytochemistry and flow cytometry of annexin™ V and Apo-Trace™ analysis

CDV-infection induced PBMC loss of viability in comparison to uninfected group ($p< 0.0001$). Moreover, CDV-infection also induced annexin™ V and Apo-Trace™ increase in comparison to uninfected PBMC ($p<0.0002$). In previous study, dogs experimentally infected with virulent CDV strain A-75/17 have developed lymphocyte depletion (SCHOBESBERGER et al., 2005). It also has demonstrated that T cells counts in CDV-antigen positive group were more severely affected. In order to analyze whether this severe lymphopenia caused by virulent CDV strain was associated with lymphocyte death, the annexin™ V staining was measured (SCHOBESBERGER et al., 2005), same procedure performed in the present study. The percentage of annexin™ V cells in CDV-Ag + group was sharply increased 3 to 6 days post-infection (SCHOBESBERGER et al., 2005). However, in contrast to percentage of annexin™ V leucocytes, the amount of propidium iodide positively marked (necrosis) remained constant throughout the observation (SCHOBESBERGER et al., 2005). The differences between this study and the one described here are in vivo infection, replacement of propidium iodide by 7-AAD, other vital stain with the same function, and the use of vaccinal CDV strain. Thereafter, study performed in ferrets, considered most

susceptible in vivo model, infected immune cells remained viable despite of severe leucopenia (PILLET and VON MESSLING, 2009). Moreover, in the same study the extend of early apoptosis (annexin V +; propidium iodide/7-AAD -) in infected immune cells is tissue dependent. In fact, the in vitro studies have an advantage of avoid individual immune response, normally observed in ferrets and/or dogs, which were not specific pathogen free animals.

5.4.2 - Pro- and anti-apoptotic mRNA genes expression

This study demonstrated that canine PBMC infected with vaccinal strain of CDV increased the mRNA expression of two major anti-apoptotic mediators: surviving and BCl-2 encoding genes at 24 h post-infection. In a previous study, no significant differences were found between CDV + and CDV – dogs in hematological results blood (DEL PUERTO et al., 2010). In addition expression of Bax mRNA was significantly higher in cerebellum, whilst caspase 3 and 8 was considered higher expressed in lymph nodes of CDV + group (DEL PUERTO et al., 2010). It is important to emphasize that dogs including in the study were considered CDV+ spontaneously manifested, with different symptoms, age and sex (DEL PUERTO et al., 2010).

It has been demonstrated that canine distemper virus induces apoptosis in cerebellum of dogs with neurological disorders (MORO et al., 2003). In spite of distinct tropism of CDV strains, the virus-induced depletion of uninfected lymphocytes is most of the time associated with apoptosis (SCHOBESBERGER et al., 2005). Finally, the present study have demonstrated, for the first time, the anti-apoptotic events associated to CDV-infected PBMC which can be associated to survivin and BCl-2 expression.

5.5– References

ALTIERI, D.C. The case for survivin as a regulator of microtubule dynamics and cell-death decisions. Current Opinion Cell Biology. v.18, p.609-615, 2006.

BEST, M.S. Viral subversion of apoptotic enzymes: escape from death row. Annual Review Microbiology, v.62, p. 171-192, 2008.

CASTANIER, C., ARNOULT, D. Mitochondrial localization of viral proteins as a means to subvert host defense. Biochimica et Biophysica Acta, v. 1813, p.575-583, 2011.

DEL PUERTO, H.L., MARTINS, A.S., MILSTED, A., FAGUNDES, E.M.S., BRAZ, G.F., HISSA, B., ANDRADE, L.O., ALVES, F., RAJÃO, D.S., LEITE, R.C., VASCONCELOS, A.C. canine distemper virus induces apoptosis in cervical derived cell lines. Virology Journal, v. 8, e334, 2011.

DEL PUERTO, H.L., MARTINS, A.S., MORO, L., MILSTED, A., ALVES, F., BRAZ, G.F., VASCONCELOS, A.C. caspase 3/8/9, bax and Bcl-2 expression in the cerebellum, lymph nodes and leucocytes of dogs naturally infected with canine distemper virus. Genetics and Molecular Research, v.9, p.151-161, 2010.

DEL PUERTO, HL., MARTINS, A.S., BRAZ, G.F., ALVES, F., HEINEMANN, M.B., RAJÃO, D.S., ARAÚJO, E.C., MARTINS, S.F., NASCIMENTO, D.R., LEITE, R.C., VASCONCELOS, A.C. Vero cells infected with Lederle strain of canine distemper virus have increased Fas receptor

signaling expression at 15 h post-infection. Genetics and Molecular Research, v. 10, p. 2527-2533, 2011.

MARUSAWA, H.; MATSUZAWA, S.; WELSH, K. HBXIP functions as a cofactor of survivin in apoptosis suppression. EMBO Journal v 22, p.2729-2740, 2003.

MOORE, CB., TING, JP-Y. Regulation of mitochondrial ativiral signaling pathways. Immunity, v. 28, p.735-739, 2008.

MORO, L., MARTINS, A.S., ALVES, C.M., SANTOS, F.G.A., DEL PUERTO, H.L., VASCONCELOS, A.C. Apoptosis in the cerebellum of dogs with distemper. Journal Veterinary Medicine B, v. 50, p. 221-225, 2003.

OHATA, A., NISHIYAMA, Y. Mitochondria and viruses. Mitochondrion, v.11, p.1-12, 2011.

PAROLI, M.; SCHIAFELLA, E.; DI ROSA, F., BARNABA, V. Persisting viruses and autoimmunity. Journal Neuroimmunology, v.107, p.201-4, 2000.

PILLET, S., VON MESSLING, V. canine distemper virus selectively inhibits apoptosis progression in infected immune cells. Journal Virology, v.83, p. 6279-6287, 2009.

RUBIO, N., GARCIA-SEGURA, L., AREVALO, M-A. Survivin prevents apoptosis by binding to caspase-3 in astrocytes infected with the BeAn strain of Theiler´s murine encephalomyelitis virus. Journal Neurovirology, doi:10.1007s13365-0112-3, 2012.

SCHWARTZMAN, R.A.; CIDLOWSKI, J.A. Apoptosis: molecular biology of programmed cell death. Endocrinology Review, v.14, p. 133-151, 1993.

SCOTT, I. The role of mitochondria in the mammalian antiviral defense system. Mitochondrion, v. 10, p. 316-320, 2010.

SEN, N., CHE, X., RAJAMANI, J., ZERBONI, L., SUNG, P., PTACEK, J., ARVIN, A.M. Signal transducer and activator of transcription 3 (STAT3) and survivin induction by varicella-zooster virus promote replication and skin pathogenesis. PNAS, v. 109, p.600-605, 2012.

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

TECHANGAMSUWAN, S., HAAS, L., ROHN, K., BAUMGÄRTNER, W., WEWETZER, K. Distinct tropism of canine distemper virus strains to adult olfactory ensheathing cells and Schwann cells in vitro. Virus Research, v. 144, p. 195-201, 2009.

TIEDE, LM., COOK, EA., FOX, HS. Oxygen matters: tissue culture oxygen levels affect mitochondrial function and structure as well as responses to HIV viroproteins. Cell Death and Disease, 2, e246, doi:10.1038/cddis.2011.128.

WEST, A.P., SHADEL. G.S., GHOSH, S. Mitochondria in innate immume responses. Nature Reviews, v.11, p. 389-402, 2011.

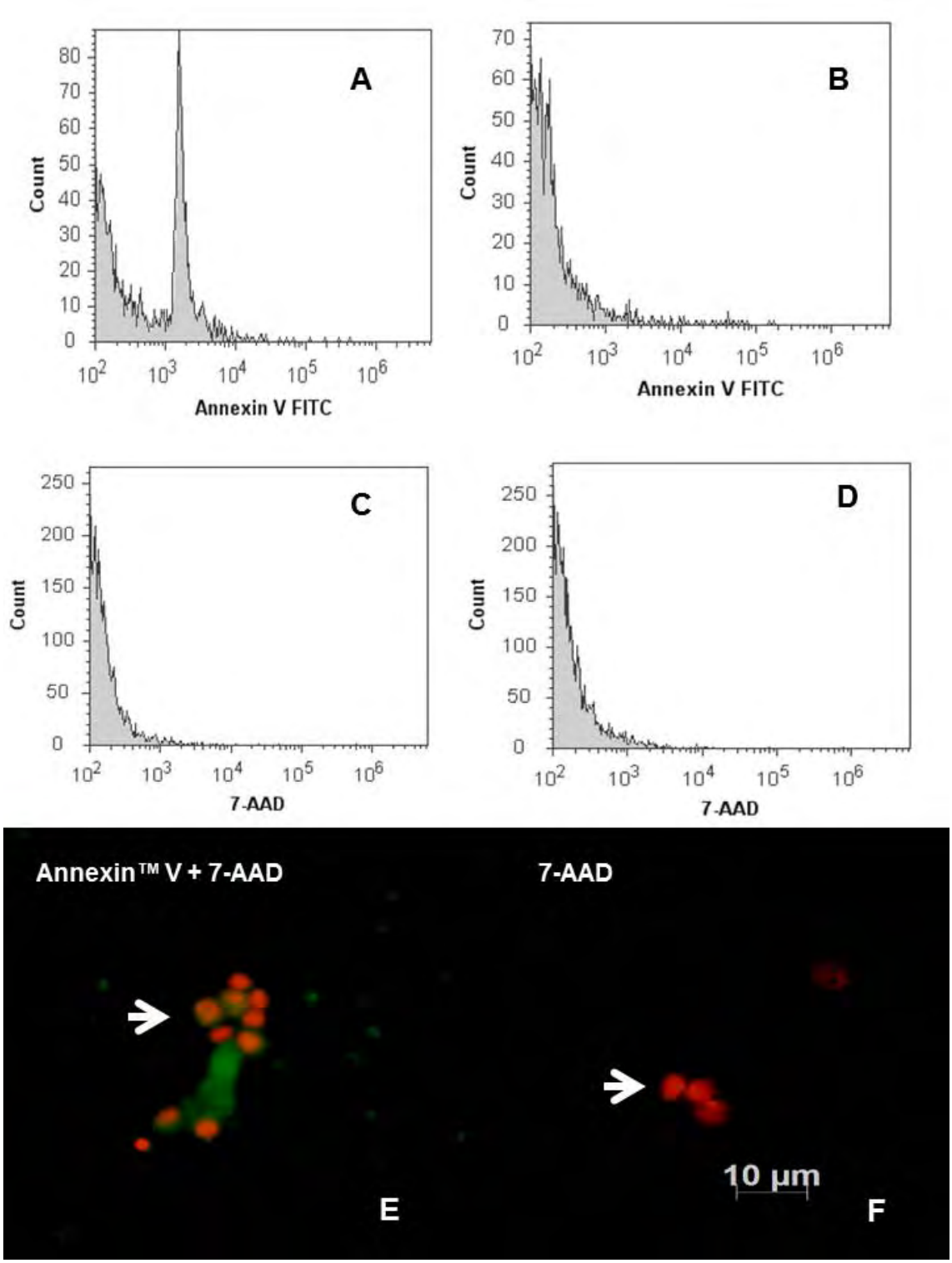


Figure 1- Flow cytometric analysis of infected (A-C) and uninfected (B-D) PBMC showing positive annexin™ V in CDV + PBMC group (A), > 10^3, considered positive stained. Immunocytochemistry analysis demonstrating E) annexin™ positive PBMC and F) 7-AAD positive PBMC both from CDV infected group.

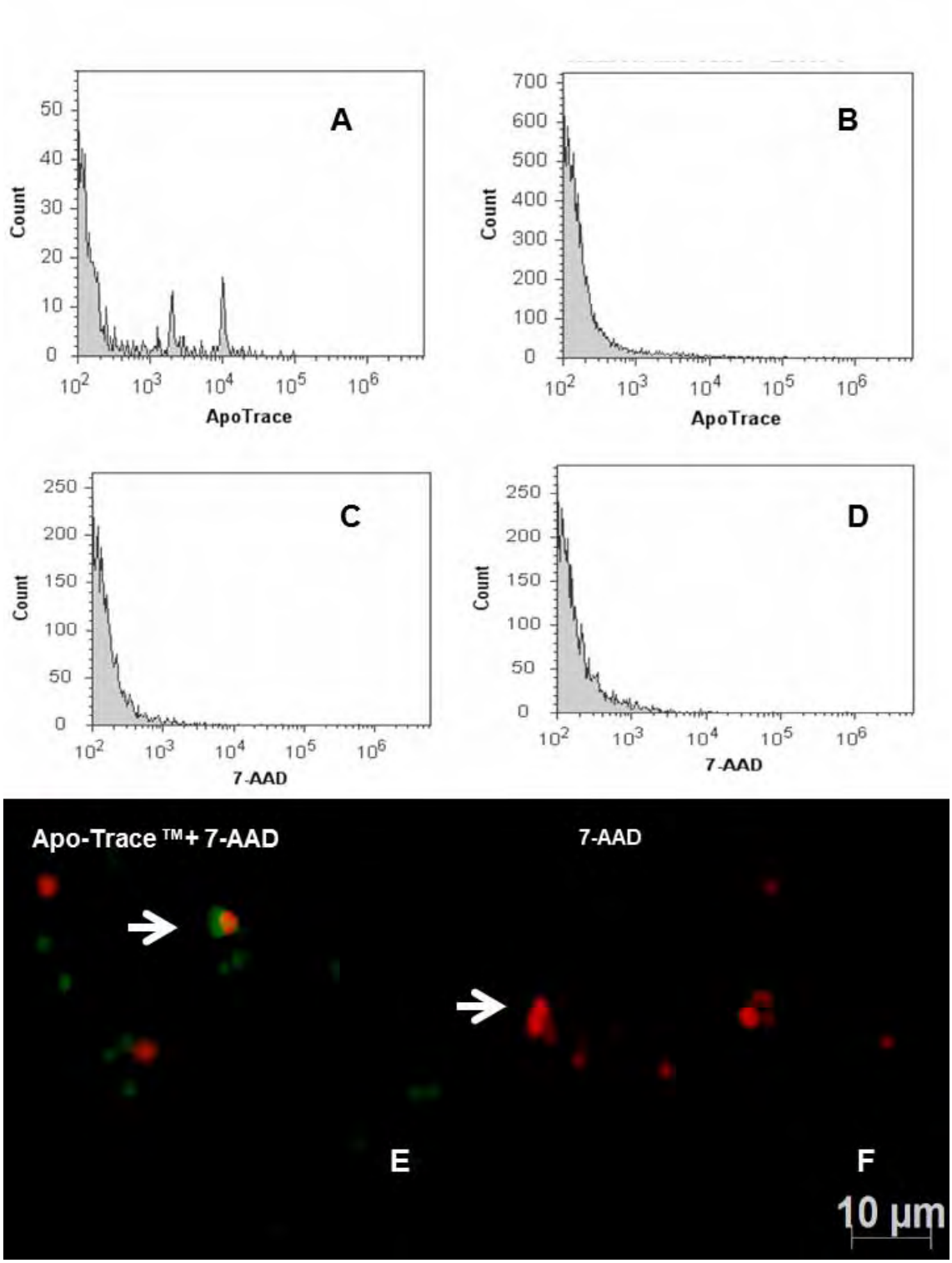


Figure 2- Flow cytometric analysis of infected (A-C) and uninfected (B-D) PBMC showing positive Apo-Trace™ V in CDV + PBMC group (A), > 10^3, considered positive stained. Immunocytochemistry analysis demonstrating E) Apo-Trace™ positive PBMC and F) 7-AAD positive PBMC both from CDV infected group.

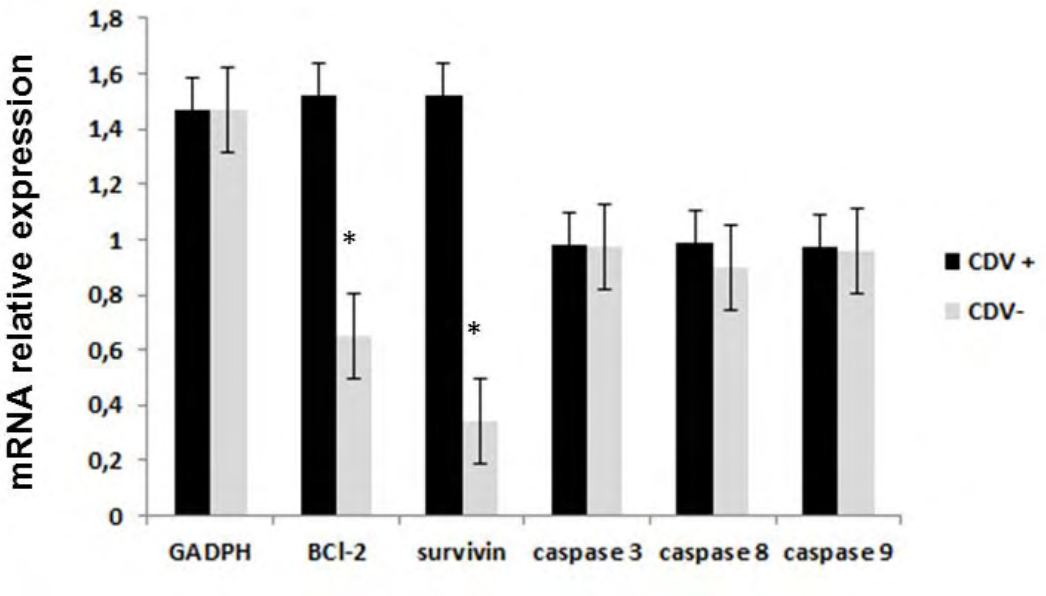


Figure 3- Expression of GADPH, BCl-2, survivin, caspase 3, 8 and 9 m RNA in infected (CDV +) and uninfected (CDV-) PBMC. * $p < 0.005$