

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
“JULIO DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA DE ARAÇATUBA

**PROPRIEDADES ONCOLÍTICAS DO VÍRUS DA
CINOMOSE CANINA: EXPRESSÃO DA PROTEÍNA 8
(TNFAIP8) EM CÉLULAS DE CARCINOMA MAMÁRIO**

Juliana Albarracin Garcia
Bióloga

Araçatuba – SP
2015

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

**PROPRIEDADES ONCOLÍTICAS DO VÍRUS DA
CINOMOSE CANINA: EXPRESSÃO DA PROTEÍNA 8
(TNFAIP8) EM CÉLULAS DE CARCINOMA MAMÁRIO**

Juliana Albarracin Garcia

Orientadora: Prof^a. Adj. Tereza Cristina Cardoso Silva

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

Araçatuba – SP

2015

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

Garcia, Juliana Albarracin

G165p

Propriedades oncolíticas do vírus da cinomose canina: expressão da proteína 8 (TNFAIP8) em células de carcinoma mamário / Juliana Albarracin Garcia.

Araçatuba: [s.n], 2015
47f. il.; CD-ROM

Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Medicina Veterinária, 2015

Orientadora: Profa. Adj. Tereza Cristina Cardoso da Silva

1. Terapia viral oncolítica. 2. Neoplasias de mama. 3. Técnicas in vitro. 4. Marcadores biológicos de tumor. 5. Fenótipo. I. T.

CDD: 616.994061



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
Campus de Araçatuba
Seção Técnica de Graduação e Pós-Graduação



CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

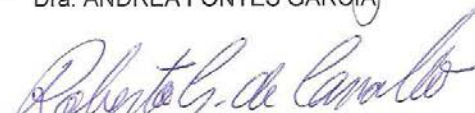
TÍTULO: Propriedades oncolíticas do vírus da cinomose canina: expressão da proteína 8
(TNFAIP8) em células de carcinoma mamário.

AUTORA: JULIANA ALBARRACIN GARCIA

ORIENTADORA: Dra. TEREZA CRISTINA CARDOSO DA SILVA

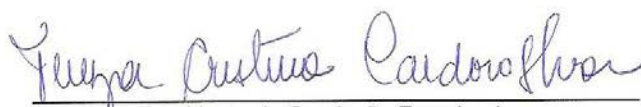
Aprovada como parte das exigências para obtenção do Título de MESTRA em CIÊNCIA ANIMAL (MEDICINA VETERINÁRIA PREVENTIVA E PRODUÇÃO ANIMAL) pela Comissão Examinadora.


Dra. ANDRÉA FONTES GARCIA


Dr. ROBERTO GAMEIRO DE CARVALHO


Dra. TEREZA CRISTINA CARDOSO DA SILVA

DATA DA REALIZAÇÃO: 6 de agosto de 2015.


Presidente da Comissão Examinadora
Dra. TEREZA CRISTINA CARDOSO DA SILVA
- Orientadora -

DADOS CURRICULARES DA AUTORA

JULIANA ALBARRACIN GARCIA - Nascida em 18 de março de 1986, na cidade de Araçatuba – SP. Graduada em Ciências Biológicas pela Universidade Federal de Mato Grosso do Sul - (UFMS) – Três Lagoas - MS, em 2009 e Pedagogia pelas Faculdades Integradas Urubupungá – Pereira Barreto – SP, em 2011. Ingressou no programa de Mestrado em Ciência Animal em agosto de 2013.

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho a todas as pessoas que procuraram o melhor de mim, e a todos que ofereceram o melhor de si.

AGRADECIMENTOS

À Deus, por me cobrir de proteção, saúde, me suprir de coragem e discernimento em todos os momentos, requisitos esses, indispensáveis para esta conquista.

Ao meu esposo Rodrigo, meu companheiro, amor e melhor amigo, por toda ajuda, apoio, força e compreensão. Por estar sempre ao meu lado me dando suporte e carinho nas horas difíceis.

Aos meus pais, Maria de Lourdes e José, pelo amor imensurável, pelo apoio e por não medirem esforços para que meus sonhos se realizassem.

Ao meu irmão Marcus Vinicius pelas conversas, apoio e carinho.

Aos meus amigos e familiares que de forma direta ou indireta me deram suporte e torceram pelo meu sucesso.

Aos amigos que fiz no laboratório de virologia animal da UNESP - Araçatuba, pela amizade e apoio para que esse projeto se concretizasse.

Aos funcionários Gilmara Castilho, Cilene Vidovix, Alexandre José Teixeira, ao Prof. Roberto Gameiro e Pedro Florindo pelo aprendizado, amizade e apoio.

À minha orientadora Profa. Tereza Cristina Cardoso Silva, pela oportunidade de orientação, por toda ajuda e credibilidade em mim e por ter se tornado tão especial na concretização deste sonho.

À Faculdade de Medicina Veterinária – UNESP – campus de Araçatuba.

Ao programa de Pós-graduação em Ciência Animal da Faculdade de Medicina Veterinária – UNESP – campus de Araçatuba.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (Capes), pelo suporte financeiro para a realização desse trabalho.

SUMÁRIO	Pág
CAPÍTULO 1 – Considerações gerais	15
1 Introdução	15
2 Hipótese	20
3 Objetivo.....	20
3.1 Gerais.....	20
3.2 Específicos.....	20
4 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	21
4.1 Neoplasias mamárias.....	21
4.2 Cinomose.....	22
4.3 Vírus da cinomose canina	24
4.4 Apoptose.....	26
5. REFERÊNCIAS.....	27
CAPÍTULO 2 – Artigo Científico: Tumour necrosis fator-alpha-induced protein 8 (TNFAIP8) expression associated with cell survival and death in cancer cell lines infected with canine distemper virus.....	33

LISTA DE TABELAS

TABLE 1	Proportion of Annexin V-Fitc/PI Tabeled cells after 48h of CDV infection.....	45
---------	--	----

LISTA DE FIGURAS

	Pág
CAPÍTULO 1	
FIGURA 1	17
FIGURA 2	19
FIGURA 3	25
CAPÍTULO 2	
FIGURE 1	46
FIGURE 2	47
FIGURE 3	48
FIGURE 4	

control corresponded to C2Bbel, HS578T, MCF-7 and AF-72
cells submitted to 1.5 μ M of staurosporine at 24h and 48h p.i..... 49

FIGURE 5 Correlation between TNFAIP8 and CDV M gene expression in
HS578T, C2Bbel, MCF-7 and AF-72 cells infected by Snyder
Hill and Lederle CDV strains at 48h p.i. The correlation
coeficiente was calculated according to Spearman analysis and
p<0.005 was considered significant..... 50

PROPRIEDADES ONCOLÍTICAS DO VÍRUS DA CINOMOSE CANINA: EXPRESSÃO DA PROTEÍNA 8 (TNFAIP8) EM CÉLULAS DE CARCINOMA MAMÁRIO

RESUMO – A Viroterapia oncolítica é uma nova estratégia para o tratamento de câncer em seres humanos e também em animais de companhia. O vírus da cinomose canina (CDV), um paramixovírus, tem se mostrado ser oncolítico através da indução de apoptose em células tumorais derivadas de cães, ainda que o mecanismo subjacente a esta acção inibidora seja pouco compreendida. Neste estudo, três linhagens de células tumorais mamárias humanas e uma linhagem celular derivada de adenofibrossarcoma canino foram testados quanto à sua suscetibilidade à infecção por CDV, a apoptose, o potencial de membrana mitocondrial (MMP) e a expressão de necrose tumoral-alfa induzida pela proteína de fator 8 (TNFAIP8). A replicação CDV induziu o efeito citopático e > 45% das células infectadas foram consideradas no âmbito de morte e/ou apoptose tardia sob necrose. TNFAIP8 e expressão gênica CDV foram positivamente correlacionadas em todas as linhagens celulares.

Além disso, a MMP foi altamente associada com o aumento nos títulos de vírus ($p < 0,005$). Assim, estes resultados sugerem fortemente que ambas as células tumorais mamárias humanas e caninas são potenciais candidatos para estudos sobre a terapia do câncer induzido por CDV.

Palavras-chave: Neoplasias de mama, técnicas in vitro, marcadores biológicos de tumor, fenótipo.

ONCOLYTIC PROPERTIES OF DISTEMPER VIRUS CANINE BY PROTEIN EXPRESSION 8 (TNFAIP8) IN INFECTED TUMOUR CELLS.

SUMMARY – Oncolytic virotherapy is a novel strategy for treatment of cancer in humans and companion animals as well. Canine distemper virus (CDV), a paramyxovirus, has proven to be oncolytic through induction of apoptosis in canine-derived tumour cells, yet the mechanism behind this inhibitory action is poorly understood. In this study, three human mammary tumour cell lines and one canine-derived adenofibrosarcoma cell line were tested regarding to their susceptibility to CDV infection, apoptosis, mitochondrial membrane potential (MMP) and expression of tumour necrosis factor- α -induced protein 8 (*TNFAIP8*). CDV replication induced cytopathic effect and > 45% of infected cells were considered death and/or under late apoptosis/necrosis. *TNFAIP8* and CDV *M* gene expression were positively correlated in all cell lines. In addition, MMP was highly associated with increase in virus titres ($p < 0.005$). Thus, these results strongly suggest that both human and canine mammary tumour cells are potential candidates for studies concerning CDV-induced cancer therapy.

Keywords: Breast neoplasms, in vitro techniques, tumor markers biological, phenotype.

CAPÍTULO 1 – CONSIDERAÇÕES GERAIS

1. INTRODUÇÃO

Os vírus são estruturalmente muito simples quando comparados às células procarióticas e eucarióticas, se comportam como ametabólicos em meio extracelular e são desprovidos de quaisquer organelas ou ribossomos próprios para seus processos fisiológicos, como a produção de sua energia metabólica, a capacidade de crescimento e sua divisão (MAHY, 2001; CANN, 2005; CARTER; SAUNDERS, 2007).

Muitos são os vírus que estão sendo pesquisados, modificados e caracterizados com o objetivo de gerar uma nova opção terapêutica contra o câncer. Entre os diferentes tipos virais em estudo, o vírus do sarampo (MV) representa uma alternativa viável para tal finalidade, pois demonstrou atividade oncolítica *in vitro* e *in vivo* em células de diferentes tipos tumorais em seres humanos, como por exemplo, o linfoma maligno, a neoplasia pulmonar, o câncer de ovário, o câncer de pulmão e o adenocarcinoma colo-retal. Contudo, ainda que seja um valioso modelo de estudo de replicação viral e de efeitos das infecções virais, o vírus do sarampo (MV) apresenta certas especificidades às células humanas, motivo pelo qual seu uso é contra-indicado no tratamento de neoplasias em animais de companhia (LAPP et al., 2014).

Surpreendentemente, poucos estudos investigaram a oncólise viral na medicina veterinária. O vírus da cinomose canina (CDV) apresenta muitas semelhanças com o vírus do sarampo (MV) em humanos, sendo assim, as propriedades de tal agente tornam-o uma opção considerável para o estudo de oncólise viral (SCHNEIDER-SCHAULIES, 2008).

Embora sejam modelos de estudo devido aos seus efeitos oncolíticos em células, ambos diferem significativamente em seu potencial bioquímico para induzir lesões neurológicas. Ademais, enquanto o MV é um patógeno estritamente humano, o CDV apresenta comportamento oposto, uma vez que

infecta uma gama de hospedeiros muito mais ampla, incluindo diversas espécies de carnívoros. Ainda assim, as semelhanças entre ambos permitem uma exploração de possíveis protocolos de tratamento tanto em medicina veterinária, quanto na medicina humana.

Existem poucas publicações sobre seus potenciais oncolíticos e a maioria delas investigou a patogênese da infecção, sem levar em consideração a potente atividade antitumoral desses morbilivírus. (LAPP et al., 2014).

A infecção por CDV de uma linhagem celular derivada de um tumor cervical humano (células Hela) demonstrou um aumento da quantidade da forma ativa da proteína clivada da caspase-3 e sinais de apoptose desencadeados pela via intrínseca (DEL PUERTO et al., 2011). Do mesmo modo, taxas aumentadas de apoptose também foram demonstradas após a infecção por CDV em linhagens de células linfóides caninas (SUTER et al., 2005).

O CDV é o agente etiológico da cinomose canina, doença aguda e multissistêmica importante mundialmente por infectar cães domésticos (*Canis familiares*) e carnívoros silvestres, levando a altas taxas de morbidade e mortalidade (GREENE; APPEL, 2006; KAPIL et al., 2008; QUINN et al., 2005).

Após a inalação da partícula viral dispersa em aerossol, a replicação se inicia em tecidos linfóides do trato respiratório superior. Entre as alterações induzidas pelo CDV estão a atrofia do timo, a depleção de células T e B e a presença de corpúsculos de inclusão em células reticulares e linfáticas (WÜNSCHMANN et al., 2000). Ao se disseminar dos sítios de replicação primários, o CDV atinge vários tecidos epiteliais, podendo ainda chegar ao sistema nervoso central (SNC), onde causa uma desmielinização que se inicia em aproximadamente 10 dias pós-infecção (GREENE; APPEL, 2006).

Estudos revelam que os morbilivírus atenuados são importantes desencadeadores de fusão celular, levando a formação sincicial ou apoptose. Tem sido observados também, os benefícios de algumas infecções virais e bacterianas sob o progresso da doença maligna. Muitos são os vírus oncolíticos que estão sendo analisados e estudados como novos agentes anti-

cancerígenos em processos apoptóticos nos últimos anos, esses incluem os adenovírus, paramixovírus (caxumba, sarampo), enterovírus bovino, vírus do Nilo Ocidental, e dentre esses e outros, o vírus da cinomose canina (SUTER et al., 2005).

A apoptose, também conhecida como morte celular programada, é um processo que resulta no condensamento da cromatina seguido de formação de *blebs* (prolongamentos da membrana celular) e desintegração nuclear em fragmentos envoltos pela carioteca. Os prolongamentos da membrana nuclear vão aumentando em número e tamanho e se rompem dando origem aos corpos apoptóticos que são rapidamente fagocitados por macrófagos (Figura 1), não resultando em processo inflamatório (GHAVAMI et al., 2009).

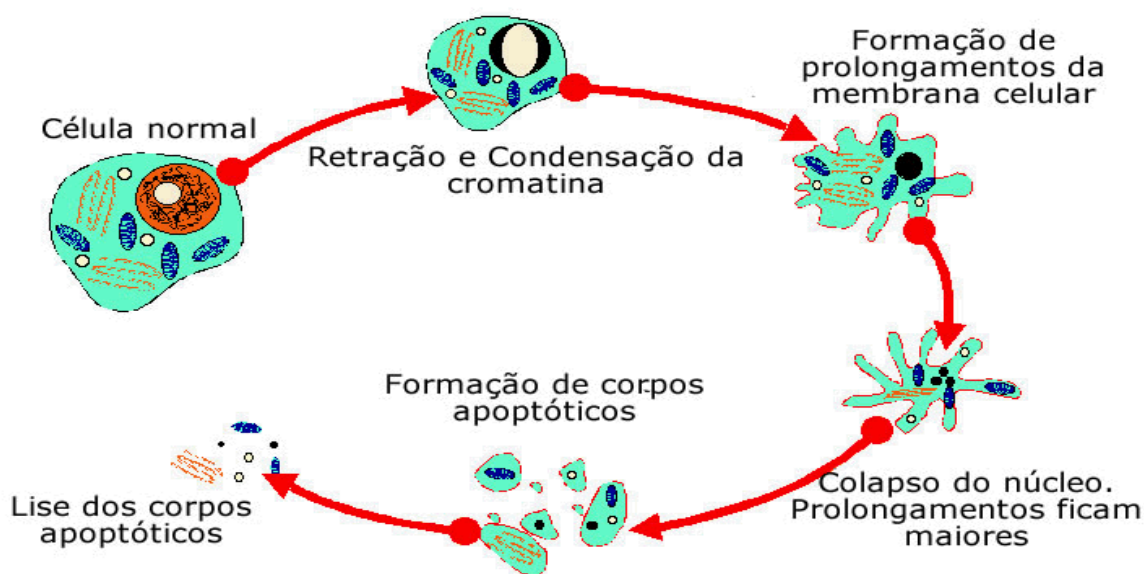


FIGURA 1 –Alterações morfológicas decorrentes do processo de apoptose, que envolvem alteração de permeabilidade de membranas, condensação cromatinica, encolhimento celular, formação de corpos apoptóticos sem desintegração de organelas. Fonte: domínio público.

Estímulos patológicos e fisiológicos podem dar início a apoptose, processo este, presente em diversas reações imunossupressoras em animais e humanos, bem como na maioria das infecções virais (BEST, 2008). Este evento é de fundamental importância na homeostasia dos organismos multicelulares em diversas situações, como por exemplo, na organogênese e hematopoiese normal e patológica, na reposição fisiológica de certos tecidos maduros, na atrofia dos órgãos, na resposta inflamatória e na eliminação de células após dano celular por agentes tóxicos (GRIVICICH et al., 2007).

A morte celular programada é um processo altamente regulado, de grande eficiência, e que requer a interação de inúmeros fatores; assim, as alterações morfológicas observadas são consequências de uma cascata de eventos moleculares e bioquímicos específicos regulados geneticamente (GRIVICICH et al., 2007). A ativação dos processos apoptóticos pode ocorrer de duas formas diferentes: pela via extrínseca (hialoplasmática) que é iniciada via receptores de morte tais como Fas, também chamado de Apo-1, e TNF (receptor fator de necrose tumoral), e requerem pró-caspase 8 ou 10 no complexo apoptossomo, ativando a caspase-3 que culmina na apoptose; ou pela via intrínseca (mitocondrial), que envolve a ativação de um membro pró-apoptótico da família Bcl-2 (Bax, Bid), que libera o citocromo c a partir da membrana mitocondrial interna. Este se associa com Apaf-1, dATP e pró-caspase-9, caspases subsequentes são ativadas, culminando em apoptose (Figura 2) (GHAVAMI et al., 2009).

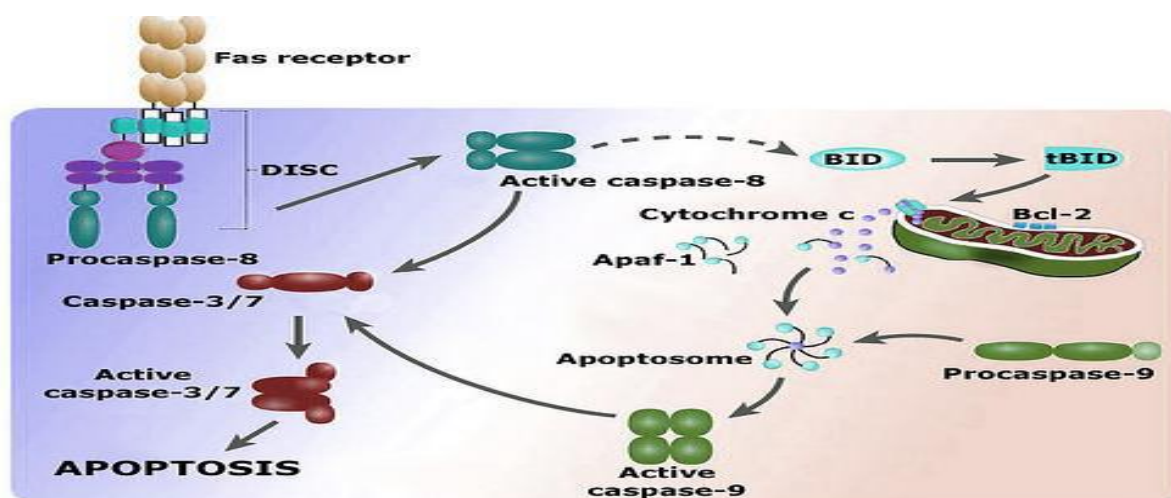


FIGURA 2 - Mecanismos extrínsecos relacionados ao processo de infecção viral e sua relação com os processos de morte celular programada. Fonte: domínio público.

É difícil, se não impossível, que um vírus infecte uma célula sem ativar uma das vias do processo de apoptose, entretanto, estudos recentes demonstram um arranjo entre as vias apoptóticas viral e celular (HARDWICK, 2001). Kajita et al. (2006) descreveram a ativação das caspases 3 e 8 no processo de infecção viral em monocamadas de células Vero, associando este mecanismo ao processo de morte celular.

Suter et al. (2005), relataram que a infecção por CDV atenuado foi eficiente em linhagens de células linfóides neoplásicas caninas e linfócitos B e T coletados de cães com linfoma, documentando a apoptose em 50% a 90% das células infectadas. Outros estudos revelam que as estirpes virais utilizadas na formação de vacinas podem induzir a apoptose nas células Vero e a importância da MCP na patogenia da degradação oligodendrocítica na cinomose clínica (BEINEKE et al., 2008).

As doenças neoplásicas representam uma das causas mais comuns de morte entre os seres humanos e animais. Atualmente as opções terapêuticas disponíveis e aplicadas muitas vezes continuam a ser insatisfatórias, portanto, novas estratégias e abordagens são extremamente necessárias. De acordo

com o que já foi exposto acima, é possível inferir que o CDV atenuado pode ter atividade oncolítica em células de tumor de mama em cadelas, representando uma promessa para testes clínicos e possível terapia para tal neoplasia (LAPP et al., 2014).

2. HIPÓTESE

A infecção de linhagens celulares de tumores de mama humanos e caninos pelo CDV interfere no metabolismo das mitocôndrias, desencadeando processos de sinalização para os eventos intrínsecos e extrínsecos da morte celular programada (MCP).

3. OBJETIVOS

3.1 Gerais

Avaliar os eventos intrínsecos e extrínsecos de morte celular programada associados à infecção pelo CDV, no cultivo de três linhagens de células oriundas de tumor de mama em humanos: C2Bbel (adenocarcinoma humano: ATCC[®] CRL 2102), Hs578T (tumor de mama humano, ATCC[®] HTB 126), MCF-7 (tumor mamário humano, ATCC[®] HTB 22) e uma linhagem celular de tumor de mama canino AF-72 (adenofibrossarcoma canino, ATCC[®] CRL 1542). Além disso, estimular novas pesquisas neste potente campo de oncólise viral em modelos celulares altamente adequados para o benefício dos seres humanos e dos cães.

3.2 Específicos

Promover a infecção experimental com as estirpes Snyder Hill (ATCC[®] VR-1587[™]) e Lederle (ATCC[®] VR-128[™]) do CDV em linhagens tumorais mamárias humanas e caninas para observação dos efeitos citopáticos.

Avaliar parâmetros como a viabilidade celular, suscetibilidade à infecção por CDV e fatores ligados ao processo de morte celular programada.

Avaliar o potencial de membrana mitocondrial (MMP) e a indução de necrose tumoral-alfa pela expressão da proteína 8 (TNFAIP8).

4. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

4.1 Neoplasia mamária em cadelas

A neoplasia mamária em cadelas tem sido muito investigada por servir de modelo para o estudo do câncer de mama em mulheres (MARTINS; FERREIRA, 2003) e por possuir várias características epidemiológicas, clínicas, biológicas e genéticas semelhantes ao da espécie humana (SILVA et al., 2004).

Os tumores mamários caninos podem se desenvolver por motivos genéticos, nutricionais, ambientais ou hormonais. Constituem aproximadamente 52% das diversas neoplasias que afetam as fêmeas da espécie *Canis familiares*, sendo que 50% dos mesmos apresentam características de malignidade (QUEIROGA; LOPES, 2002).

Segundo Lana et al. (2007), os riscos desta carcinogênese aumentam com a idade do animal, apresentando fatores de riscos mais elevados de manifestação tumoral as cadelas que possuem entre 10 a 11 anos. A remoção cirúrgica completa do tumor, com amplas margens de segurança é o tratamento de escolha quando não há envolvimento metastático, sendo o mesmo, um procedimento a ser definido pelo médico veterinário.

Entretanto, de acordo com Lana et al. (2007), os protocolos de quimioterapia antineoplásica e radioterapia apresentam baixa atividade anti-tumoral em neoplasias de mama em cadelas.

O câncer é um importante problema de saúde animal que vem sendo bastante estudado pelo significativo aumento da casuística mundial. Apesar de eficazes, em sua maioria, os tratamentos convencionais das neoplasias malignas apresentam um grande desafio para a medicina, pois, embora com consideráveis avanços, os protocolos quimioterápicos são altamente agressivos, bioacumulativos e podem estar relacionados a recidivas tumorais e aparecimento de novos tumores.

Neste contexto, muitos anticorpos monoclonais são utilizados, sendo expostos a determinados antígenos específicos, a fim de que a célula tumoral obtenha uma resposta imune citotóxica tornando-a capaz de responder a processos anti-tumorais.

4.2 Cinomose

A cinomose é uma doença mundialmente importante, altamente infecciosa, caracterizada por uma enfermidade multissistêmica que apresenta altos índices de morbidade (GREENE; APPEL, 2006; KAPIL et al., 2008).

No Brasil, milhares de cães morrem todo o ano devido a essa doença viral (HEADLEY; GRAÇA, 2000). Ainda, há locais que sofrem com o aparecimento de surtos esporádicos apesar do aparente controle da doença, como alguns países desenvolvidos da Europa, América do Norte e Oceania (JOZWIK; FRIMUS, 2002; MAES et al., 2003; NORRIS et al., 2006).

O CDV possui uma gama de hospedeiros, é capaz de infectar diversas espécies de mamíferos (GREENE; APPEL, 2006) e representa sério risco a vida destes animais (POMEROY et al., 2008). Além dos cães, que servem como principal reservatório do vírus e fonte de infecção para outros animais, a cinomose pode ocorrer em outros membros da ordem Carnívora (GREENE; APPEL, 2006).

Há relatos descritos sobre a cinomose canina que datam de 1746 na América do Sul. Anos mais tarde, em meados de 1760 a doença foi descrita na Espanha, seguida de Inglaterra, Itália e Rússia. Somente em 1853, surgiu a teoria de que a cinomose dos cães poderia ter sido importada do Peru para a Europa, com entrada inicial feita por colonizadores espanhóis no século XVII (BLANCOU, 2004).

A taxa de mortalidade causada pelo vírus pode variar de acordo com a espécie e *status* imunológico do animal. Em animais infectados pelo vírus observa-se desde infecção branda e inaparente (animais assintomáticos) até doença clínica severa e frequentemente fatal (GREENE; APPEL, 2006). Em cães a mortalidade decorrente da infecção pelo vírus da cinomose, corresponde à segunda maior causa de óbito por doenças virais, sendo superada apenas pela raiva canina. Os índices de mortalidade descritos estão entre 30% a 70% dos animais infectados (GREENE; APPEL, 2006).

Filhotes e cães jovens são mais susceptíveis à doença, contudo a faixa etária entre os três a seis meses de idade apresenta maior número de casos descritos (JOZWIK; FRIMUS, 2002; NORRIS et al., 2006).

O vírus não possui predileção sexual e racial (PATRONEK et al., 1995; HEADLEY; GRAÇA, 2000). Os cães sem raça definida (SRD) parecem liderar as estatísticas da doença quando comparados às diferentes raças caninas, entretanto, este fato pode ser explicado, por este grupo ser extremamente representativo no Brasil (HEADLEY; GRAÇA, 2000).

O diagnóstico clínico realizado com base na anamnese, exame físico e exames complementares em alguns casos pode ser inconclusivo (AMUDE et al., 2007). Entretanto, diversos testes mais específicos podem ser usados para o diagnóstico da doença. Cães que se recuperam da infecção são provavelmente imunes por toda sua vida, e resistem à exposição ao vírus após sete anos em isolamento.

A cinomose canina é uma doença endêmica no Brasil. No entanto, tem se tornado emergente em países que por anos controlaram o aparecimento da doença. Isto se deve em parte, a grande variabilidade genética do vírus, que

faz com que este alcance um vasto número de novos hospedeiros. Este fato, também coloca em dúvida a eficiência de vacinas desenvolvidas com cepas que com o passar do tempo não se encontram mais circulantes no ambiente.

4.3 Virus da cinomose canina

Pertencente ao gênero *Morbillivirus* e a família *Paramyxoviridae*, (CARTER et al., 2005) o CDV é um vírus envelopado com genoma de RNA fita simples polaridade negativa que contém seis genes que codificam as proteínas virais estruturais e não estruturais: o Nucleocapsídeo (N), a Phosphoproteína (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).

A hemaglutinina é a proteína viral mais importante no processo infeccioso, pois o vírus utiliza esta macromolécula na ligação aos receptores da célula do hospedeiro. Uma adequada resposta imune contra esta proteína pode prevenir a infecção pelo CDV (VON MESSLING et al., 2001).

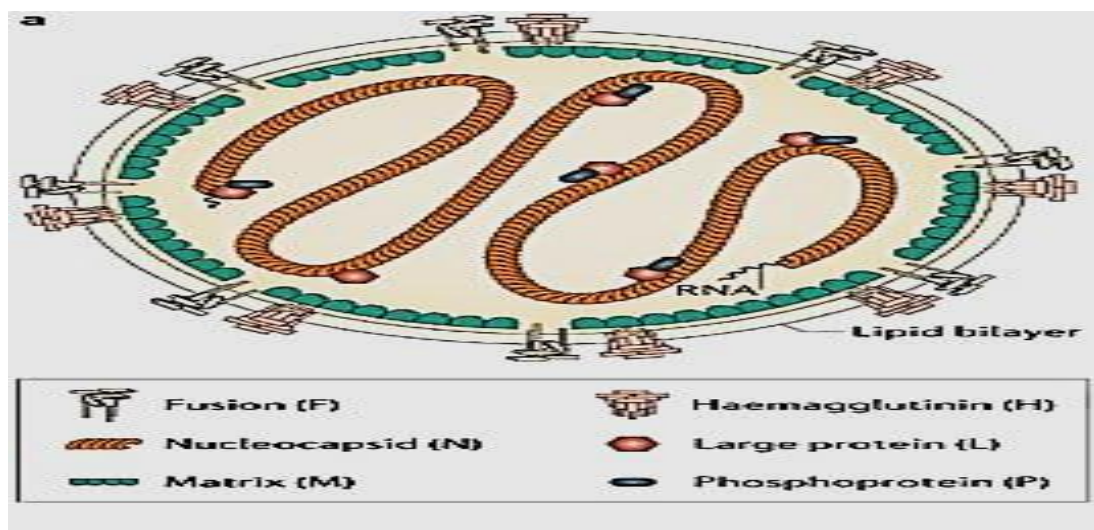


FIGURA 3- Esquema ilustrado da partícula viral do vírus da cinomose canina, família *Paramyxoviridae*, gênero *Morbillivirus*. Morfologia circular, variando à pleomórfica, com envelope viral (*lipid bilayer*), fita simples de ácido ribonucleico (RNA), com as principais proteínas virais fusão (F), nucleocapsídeo (N), matrix (M), hemaglutinina (H), proteína maior (L), fosfoproteína (P).

Em relação ao tropismo celular, o vírus da cinomose canina é capaz de replicar-se em diversos de órgãos e tecidos causando infecção (SEEHUSEN et al., 2007).

Diversos tipos celulares de origem primária ou de linhagem foram utilizados no estudo da replicação deste vírus, incluindo *African Green Monkey Kidney cell* (células Vero), marmoset lymphoid cells (B95a), *Madin-Darby Canine Kidney* (MDCK) cells, canine macrophages and lymphocytes (SULTAN et al., 2009; TECHANGAMSUWAN et al., 2009). 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.

4.4 Apoptose

A morte celular foi considerada durante muito tempo, um processo passivo de caráter degenerativo como a necrose e senescência. Em 1964, foi proposto o termo "morte celular programada" para designar um tipo de morte celular que ocorre de forma não acidental; e em 1972, Kerr, Wyllie e Currie sugeriram o termo apoptose para indicar esse tipo ativo de morte celular.

Células animais possuem uma capacidade inata de perceber uma infecção viral e ativar medidas que limitam a replicação e disseminação do vírus. As duas principais medidas de defesa são: uma resposta protetora que leva à síntese de citocinas, incluindo interferons (IFN), para alertar e proteger as células vizinhas; e uma resposta suicida das células infectadas (apoptose) para restringir os componentes celulares disponíveis para a multiplicação viral.

Na apoptose as alterações iniciais ocorrem com uma retração da célula, que leva a perda da aderência com a matriz extracelular e células vizinhas, seguida de condensação da cromatina e concentração junto à membrana nuclear, que se mantém intacta. A seguir, a membrana celular forma prolongamentos e o núcleo se desintegram em fragmentos envoltos pela membrana nuclear. Os prolongamentos da membrana celular aumentam de número e tamanho e rompem, originando estruturas com conteúdo celular, denominadas corpos apoptóticos, que são rapidamente fagocitados por macrófagos e removidos sem causar um processo inflamatório (GHAVAMI et al., 2009). Este processo de grande eficiência é extremamente regulado e requer a interação de inúmeros fatores. Sua ativação é iniciada de duas diferentes maneiras: pela via extrínseca (citoplasmática) ou pela via intrínseca (mitocondrial). A ativação da via intrínseca ocorre por estresse intracelular ou extracelular, especificamente estresse mitocondrial causado por fatores como dano ao DNA. Sob o sinal de stress, as proteínas pró-apoptóticas no citoplasma, Bax e Bid, se ligam a membrana externa da mitocondria levando a liberação do conteúdo interno. Entretanto, o sinal de Bax e Bid apenas não é suficiente para ativação completa (GRIVICICH et al., 2007). Bax, outra proteína

pró-apoptótica que reside com a mitocôndria também é necessária para promover a completa liberação do citocromo c e do conteúdo intramembranar da mitocôndria, ao passo que, a expressão do gene Bcl-2 tem como função proteger as células da morte prevenindo a liberação da citocromo c e impedindo o processo de apoptose. Seguindo a liberação, o citocromo c forma um complexo no citoplasma com adenosina trifosfato (ATP) e a enzima Apaf-1. Em seguida, o complexo ativa a caspase-9, uma proteína iniciadora que age em conjunto com o complexo citocromo c, ATP e Apaf-1 formando os apoptosomos, estes ativam a caspase-3, a proteína efetora que inicia a degradação (GHAVAMI et al., 2009).

A via extrínseca é desencadeada pela ação de moléculas sinalizadoras, conhecidas como ligantes específicos, em um grupo de receptores de morte transmembrana da célula alvo, como o FAS. Esta ligação é capaz de ativar pró-15 caspases 8 ou 10, levando à ativação da caspase-3, efetora (GRIVICICH et al., 2007). As vias apoptóticas são extremamente sofisticadas, altamente reguladas e monitoradas pelas células, e tem se mostrado um passo chave para a compreensão da patogênese dos vírus da cinomose canina.

5. REFERÊNCIAS

AMUDE, A. M.; CARVALHO, G. A.; ALFIERI, A. A.; ALFIERI A. F. Virus isolation and molecular characterization of canine distemper virus by RT-PCR from a mature dog with multifocal encephalomyelitis. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 38, p. 354-356, 2007.

BEINEKE A.; PUFF C.; SEEHUSEN, F.; BAUMGÄRTNER, W. Pathogenesis and immunopathology of systemic and nervous canine distemper. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 127, p. 1-18, 2008.

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

BLANCOU, J. Dog distemper: imported into Europe from South America? **Historia Medicinae Veterinarie**, v. 29, p. 35-41, 2004.

CANN, A. J. **Principles of Molecular Virology**. 4. ed. Massachusetts: Elsevier Academic Press, 2005.

CARTER, G. R.; WISE, D. J.; FLORES, E. F. Paramyxoviridae. In.: CARTER, G. R.; WISE, D. J.; FLORES, E. F. A Concise Review of Veterinary Virology. **International Veterinary Information Service**. Disponível em <<http://www.ivis.org/docarchive/A3418.2005.pdf>> Acesso em 03 de fev. 2015.

CARTER, J.; SAUNDERS, V. **Virology: Principles and Applications**. 1. Ed. Chichester: Wiley, 2007.

DEL PUERTO, H.L.; MARTINS, A.S.; MILSTED, A.; SOUZA-FAGUNDES, E.M.; 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, p. 334, 2011.

GHAVAMI, S.; HASHEMI, M.; ANDE, S.R.; YEGANEH, B.; XIAO, W.; ESHRAGHI, M.; BUS, C.J.; KADKHODA, K.; WIECHEC, E.; HALAYKO, A.J.; LOS, M. Apoptosis and cancer: mutations within caspase genes. **Journal of Medical Genetics**, v. 46, p. 497-510, 2009.

GREENE, C.E.; APPEL M. Canine distemper. In: Greene C.E. (ed.) *Infectious Diseases of the Dog and Cat*. 3 ed. Amsterdam:Elsevier, p.25-41, 2006.

GRIVICICH, I.; REGNER, A.; ROCHA, A.B. **Revista Brasileira de Cancerologia**, v. 53, n. 3, p. 335-343, 2007.

HARDWICK, J. M. Apoptosis in viral pathogenesis. **Cell Death and Differentiation**, v. 8, p. 109-110, 2001.

HEADLEY, S.A.; GRAÇA, D.L. Canine distemper: epidemiological findings of 250 cases. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, v. 37, p. 136-140, 2000.

JOZWIK, A.; FRIMUS, T. Natural distemper in vaccinated and unvaccinated dogs in Warsaw. **Journal of Veterinary Medicine. B, Infectious Diseases and Veterinary Public Health**, v. 49, p.413-414, 2002.

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 of Veterinary Medicine. B, Infectious Diseases and Veterinary Public Health**, v. 53, p. 273 – 277, 2006.

KAPIL, S.; ALLISON, R.W.; JONHSTON, L.; MURRAY, B.L.; HOLLAND, S.; MEINKOTH, J.; JONHSON, B. Canine distemper virus strains circulating among North American dogs. **Clinical and Vaccine Immunology**, v. 15, p. 707-712, 2008.

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

LANA, S.E.; RUTTEMAN, G.R.; WITHROW, S.J. Tumors of the mammary gland. In: WITHROW, S.J. & VAIL, D.M., **Withrow & MacEwen's Small Animal Clinical Oncology** 4.ed. St. Louis: Saunders Elsevier, p.619-636, 2007.

LAPP, S.; PFANKUCHE, V.M.; BAUMGÄRTNER, W.; PUFF, C. Viral Oncolysis — Can Insights from Measles Be Transferred to Canine Distemper Virus? **Viruses**, v.6, p. 2340-2375, 2014.

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

MAHY, B. W. J.. **Dictionary of Virology**. 3. ed. London: Academic Press, 2001.

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

MARTINS, D.C.; FERREIRA, A.M.R. Marcadores prognósticos como um auxílio à conduta clínico-cirúrgica em uma cadela apresentando múltiplos nódulos mamários. **Acta Scientiae Veterinariae**, v.31, p.189-191, 2003.

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.

PATRONEK, G.J.; GLICKMAN, L.T.; JOHNSON, R.; EMERICK, T.J. Canine distemper infection in pet dogs: II. A case-control study of risk factors during a suspect outbreak in Indiana. **Journal of American Animal Hospital Association**, v. 31, p.230-235, 1995.

POMEROY, L.W.; BJOMSTAD, O.N.; HOLMES E.C.. The evolutionary and epidemiological dynamics of the paramyxoviridae. **Journal of Molecular Evolution**, v. 66, p. 98-106, 2008.

QUEIROGA, F.; LOPES, C. Tumores mamários caninos – novas perspectivas. In: Congresso de Ciências Veterinárias, Oeiras, 2002. Disponível em: < <http://horta.0catch.com/congressospcv/21.pdf> > Acesso em: 25 de jun. 2015.

QUINN, P. J.; MARKEY, B. K.; CARTER, M. E.; DONNELLY, W. J.; LEONARD, F. **Microbiologia Veterinária e Doenças Infecciosas**. Porto Alegre: Artmed, 2005.

SCHNEIDER-SCHAULIES, J.; SCHNEIDER-SCHAULIES, S. Receptor interactions, tropism, and mechanisms involved in morbillivirus-induced immunomodulation. **Advances in Virus Research**, v.71, p. 173–205, 2008.

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.

SILVA, A.E.; SERAKIDES, R.; CASSALI, G.D. Carcinogênese hormonal e neoplasias hormônio-dependentes. **Ciência Rural**, v.34, n.2, p.625-633, 2004.

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.

SUTER, S.E.; CHEIN, M.B.; VON MESSLING, V.; YIP, B.; CATTANEO, R.; VERNAU, W.; MADEWELL, B.R.; LONDON, C.A. In vitro canine distemper virus infection of canine lymphoid cells: A prelude to oncolytic therapy for lymphoma. **Clinical Cancer Research**, v.11, p. 1579–1587, 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.

VON MESSLING, V.; ZIMMER, G.; HERRLER, G. HAAS, L.; CATTANEO, R. The Hemagglutinin of Canine Distemper Virus Determines Tropism and Cythopathogenicity. **The Journal of Virology**. v.75, n.14, p. 6418-6427, 2001.

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

**Veterinary and
Comparative Oncology****Tumour necrosis factor-alpha-induced protein 8 (TNFAIP8)
expression associated with cell survival and death in cancer
cell lines infected with canine distemper virus**

Journal:	<i>Veterinary and Comparative Oncology</i>
Manuscript ID:	VCO-2015-050.R1
Manuscript Type:	Original Article
Keywords:	In vitro Models, Comparative Oncology, Small Animal, Tumor Biology, Cell Signalling

SCHOLARONE™
Manuscripts

Review Only

Veterinary and Comparative Oncology

Original paper

R1 highlighted

**Tumour necrosis factor-alpha-induced protein 8
(TNFAIP8) expression associated with cell survival and
death in cancer cell lines infected with canine distemper
virus**

J. A. Garcia², H. L. Ferreira³, F. V. Vieira^{1,2}, R. Gameiro¹, A. L. Andrade¹, F. R.
Eugênio¹, E. F. Flores⁴, T. C. Cardoso^{1,2*}.

¹Univ-University of São Paulo State, Veterinary Medicine School, Department of Clinical, Surgery
and Animal Reproduction, Veterinary Hospital Section, Araçatuba, São Paulo, 16050-680, Brazil.

² Univ-University of São Paulo State, Veterinary Medicine School, Department of Support,
Production and Animal Health, Laboratory of Animal Virology and Cell Culture, Araçatuba, São
Paulo, 16050-680, Brazil.

³FZEA-USP, Department of de Veterinary Medicine, Av. Duque de Caxias Norte, 225,
Pirassununga – SP, CEP 13635-900, Brazil.

⁴ Federal University of Santa Maria, Department of Preventive Veterinary Medicine, Virology
Section, Santa Maria, RS, Brazil, 97115-900.

* To whom correspondence should be addressed:

Tereza. C. Cardoso

Departamento de Apoio, Produção e Saúde Animal

Curso de Medicina Veterinária

Rua Clóvis Pestana, 793.

16.050-680 Araçatuba, SP, Brasil.

Fax: +55-18-622 6487

e-mail: tcardoso@fmva.unesp.br

Abstract

Oncolytic virotherapy is a novel strategy for treatment of cancer in humans and companion animals as well. Canine distemper virus (CDV), a paramyxovirus, has proven to be oncolytic through induction of apoptosis in canine-derived tumour cells, yet the mechanism behind this inhibitory action is poorly understood. In this study, three human mammary tumour cell lines and one canine-derived adenofibrosarcoma cell line were tested regarding to their susceptibility to CDV infection, cell proliferation, apoptosis, mitochondrial membrane potential and expression of tumour necrosis factor-alpha-induced protein 8 (*TNFAIP8*). CDV replication induced cytopathic effect, decrease of cell proliferation rates, and > 45% of infected cells were considered death and/or under late apoptosis/necrosis. *TNFAIP8* and CDV *M* gene expression were positively correlated in all cell lines. In addition, mitochondrial membrane depolarization was associated with increase in virus titres ($p < 0.005$). Thus, these results strongly suggest that both human and canine mammary tumour cells are potential candidates for studies concerning CDV-induced cancer therapy.

Keywords: Canine and human mammary tumours, *in vitro* culture, cancer markers, cell phenotype.

Introduction

Oncolytic viruses represent a potential treatment for human and animal neoplasias.¹ Canine distemper virus (CDV) is a member of the family *Paramyxoviridae*, a negative-stranded RNA belonging to the genus *Morbillivirus* and is closely related to measles virus (MV).² CDV is able to infect canine lymphoid cell lines, macrophage/monocytes tumour cell lines, such as DH82 cells, and neoplastic lymphocytes *in vitro*, leading to apoptosis of tumour cells.³⁻⁵ In addition, CDV may produce both cytolytic and persistent infections *in vivo* and *in vitro*.^{6,7}

Apoptosis is a frequent outcome of several viral infections and may be either induced or inhibited by a number of viral proteins.^{8,9} Both apoptosis induction and inhibition may be part of the host defense against virus infection, or they can be a mechanism for viral spread to neighboring cells.⁹ CDV has been shown to induce apoptosis in cerebellum and lymphoid tissue of naturally infected dogs, through the extrinsic pathway, activating caspase-8 and caspase-3 gene expression.^{6,10} In addition, CDV has been shown to induce apoptosis of Vero cells by triggering the extrinsic pathway, with caspase-8 and caspase -3 activation.^{11,12} The cellular stress caused by CDV infection of HeLa cells leading to apoptosis may represent an attractive alternative for cancer treatment.¹¹

TNFAIP8 like-2 (TIPE2), a member of the tumor necrosis factor- α -induced protein-8 (TNFAIP8) family, was recently identified as a novel negative regulator gene of the immune system which can independently maintain immune homeostasis.¹³ Experiments *in vitro* have demonstrated that TIPE2 inhibits activator protein 1 (AP-1) and NF- κ B stimulation.¹³ TIPE2 knockout cells showed hyper-responsiveness to Toll-like receptor (TLR) and T cell receptor (TCR) activation.¹³ These findings suggest that TIPE2 expression in some cells is closely associated with immune system disorders, and may trigger some developmental diseases. TIPE2 is expressed in human lymphoid tissues, but also in some non-lymphoid tissues, such as tissues of the nervous, digestive, urinary, respiratory, and reproductive systems, suggesting that TIPE2 may have roles beyond immune regulation.¹³ In spite of some studies on human cancer and respective cell lines, little information on *TNFAIP8* expression induced by animal oncolytic viruses is available. Thus, the main objectives of this study were to

determine if CDV is able to induce apoptosis in cultured human and canine tumor cells, associated with *TNFAIP8* gene expression.

Material and methods

Cell culture and virus

The cell lines C2Bbel (human adenocarcinoma; ATCC # CRL 2102), HS578T (human breast tumour, ATCC # HTB 126), MCF-7 (human mammary tumour; ATCC # HTB 22) and AF-72 (canine adenofibrosarcoma; ATCC # CRL 1542) were cultured in F12/Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) (Invitrogen®, Carlsbad, CA, USA), antibiotic-antimycotic 100 x (Invitrogen®), 10% FBS, and 5% 200 mM glutamine (Invitrogen®). Under these conditions, culture flasks were maintained in humidified incubator at 37 °C and 5 % CO₂ until complete monolayer confluence. The medium was replaced every 24 h, and pictures were taken to observe the morphology at 5-day intervals under an inverted microscope (Olympus IX 70, Tokyo, Japan). The canine distemper viruses strains Snyder Hill (ATCC® VR-1587™) and Lederle (ATCC® VR-128™), all belong to American 1 group were used.

Virus infection and cell proliferation

For virus infection, all cell lines were grown to 80% confluency in Lab-Tek® chambers slides (BD Falcon™, Franklin Lakes, NJ, USA) and inoculated with 100 µl of each CDV strain suspensions ($10^{3.2}$ TCID₅₀/ml), corresponding to a multiplicity of infection (m.o.i.) of approximately 1. The negative control corresponded to uninfected cells and positive control corresponded to all cells exposed to 1.5 µM of staurosporine (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA). Staurosporine, a pan-inhibitor of kinases, is well-known research compound often used as a classical apoptosis-inducing agent.¹⁴ The viral suspensions were allowed to adsorb for 1 h at 37°C. After incubation, the viral suspensions were removed and the monolayers were supplemented with the same medium. Infected and uninfected (control) cells were monitored under phase-contrast using an Olympus IX-70 microscope for cytopathic effect (cpe). Approximately 10

fields were analyzed in each condition and photographs were taken at 200 x magnification by cellSens™ software (Olympus™). All cells (5×10^5 per well) were seeded into 12-well plates and infected at a multiplicity of infection of 1 with the respective viruses. All analyses were done in duplicate. After 2 h of adsorption, the inoculum was removed and cells were washed twice with medium and further incubated at 37°C. At 0, 2, 6, 12, 18, 24, 30, 36 and 48h post-infection (p.i.), supernatant and cell-associated virus were recovered and stored at -86°C. The 50% tissue culture infectious dose (TCID₅₀) of the samples was determined by limited dilution.¹² Cell proliferation analysis was performed using an *In Vitro* Toxicology Assay® Kit, an MTT-based assay in all cells at 24 and 48 post-infection (p.i.) (TOXI-1 Kit; Sigma-Aldrich®). For each p.i. interval, the supernatant was removed and 2ml MTT (tetrazolium salts) were added following the manufacturer's recommendations (Sigma-Aldrich®). Absorbance was measured at 600 nm with a Biophotometer (Eppendorf®, Hamburg, Germany). All reported values are means of triplicated samples.

Apoptosis and mitochondrial membrane potential

Apoptosis/necrosis was investigated using the double staining method with the Vybrant Apoptosis Assay Kit (Molecular Probes™, Life Technologies). At 48h p.i., cells were processed according to manufacturer's instructions. A total of 400 µl of 1 x annexin-binding buffer were added and stained cells were analyzed by acoustic flow cytometry under BL2-A (530 nm). JC-1 (5,5',6,6'-tetrachloro-1,1',3,3'-tetrathylbenzimidazolyl-carbocyanine iodide (Molecular Probes, Eugene, OR) is a mitochondria-specific probe. To perform this assay, 2×10^3 of infected and uninfected cells at 48h p.i. were trypsinized, washed and incubated with 10 µg/ml of JC-1 for 10 min at 37°C in the dark. After this period, cells were immediately analyzed by acoustic flow cytometry under BL1-A (488 nm) and BL2-A (575 nm) filters. Data were acquired via the Attune™ acoustic focusing cytometer system (Applied Biosystems®). Data were expressed as % of JC-1 cells emission. The parameters used were as follows: 2,500 events/seconds, flow rate of 1 µL per min with a stop gate of 500,000 total cells, BL1-A voltage of a 488 laser and SSC threshold of 300. All of the experiments were performed at least in quadruplicate.

Molecular analysis

Upon harvesting at 0, 2, 6, 12, 18, 24, 30, 36 and 48 p.i., total RNA was extracted from cell monolayers using Trizol™ protocol according to manufacturer's instructions (Invitrogen®). An average of 100 ng of RNA treated with DNase were used for qPCR in order to quantify *TNFAIP8* and virus (CDV) *M* gene expression (catalog # 4351372 assay ID: Cf 02672103_S1; catalog # 4331182 assay ID: Hs 656274). The primers and respective probes used were purchased from Applied Biosystems customer service, and reaction was carried out on StepOnePlus™ real time instrument (Applied Biosystems®). The data were obtained from three replicates of each sample. Quantification of gene expression was performed by $-2^{-\Delta\Delta Ct}$ method and normalized with housekeeping genes described previously.¹⁵

Statistical analysis

Descriptive statistics included the mean $\pm$ standard deviation (s.d.). A p -value < 0.005 was considered statistically significant. All statistical analyses were performed using Prism software v.6.1 (GraphPad®, La Jolla, CA, USA). Gene expression values were transformed in logs and correlations were evaluated with Spearman correlation coefficient.

Results

Virus infection and apoptosis

All cell lines presented cytopathic effects after 48h of inoculation with Snyder Hill and Lederle strains, characterized by cell lysis, floating rounded cells and giant cells (Fig. 1). Additionally, virus titres were approximately the same level at 48 h p.i. in all cell lines (Fig. 2 A and B). In contrast, infected cells showed a significant decrease in proliferation rate upon infection by both CDV strains (Fig. 3A-B).

Regarding to apoptosis, at least 45 to 70.7% of infected tumour cells were considered under death process and 10 to 30.8% under late apoptotic/necrotic phase at 48h p.i. for both CDV strains (Table 1). These findings suggest that CDV infection activates apoptosis leading infected cells to undergo an early death process.

Mitochondrial membrane potential and *TNFAIP8* expression

Mitochondrial membrane potential (MMP) was assessed using the JC-1 assay. This assay detects fluorescent dye that leaks from depolarized mitochondria of infected cells and non-aggregated dye emits fluorescent light at 488 nm BL-1 filter (Fig. 3A-B). All tumour cell lines showed $\pm 40\%$ of cells undergoing MMP when infected by Snyder Hill (Fig. 3B). Lederle strain affected mitochondria function more intensively when infected C2Bbel cells (Fig. 3A; $p < 0.005$). These results suggest that CDV strains activate mitochondrial metabolism in order to increase virus progeny. According to Spearman correlation coefficient, analysis *TNFAIP8* and CDV *M* gene expression was considered positively correlated for both CDV strains analysed (Fig.2). A lower correlation was found for C2Bbel cells ($r = 0.59$; $p = 0.0025$).

Discussion

The six hallmarks of cancer: (1) ability to evade apoptosis; (2) sustained angiogenesis; (3) limitless growth potential; (4) ability to invade and metastasize; (5) self-sufficient growth signals; (6) insensitivity to antigrowth signals and phenotype change.¹⁶ Some cancer therapeutic modalities, such as radiation and chemotherapy, promote cell death through DNA damage and consequently trigger the apoptotic pathway. However, neoplastic cells with defects in apoptotic mechanisms tend to be resistant to these therapies.¹⁷ In this way, it will be more useful, from a therapeutic and prognostic standpoint, to consider the entire apoptotic network rather than targeting a single step.¹⁶ In order to overcome these obstacles, oncolytic viruses emerge as an alternative especially for activate more than one-step of apoptosis process.^{1,2,18}

Members of the family *Paramyxoviridae*, such as Newcastle disease virus (NDV) and CDV represent interesting candidates for oncolytic therapy as they display a broad cell tropism.^{2,18} In this study, both CDV strains were capable to replicate in canine and human-derived tumours cells leading to death and/or late apoptosis after 48h p.i. Similar result was observed in CDV infected acute B cell lymphoma cells when 50% of infected cells display apoptosis at 48h p.i.⁵ According to previous studies, CDV infection activates both intrinsic and extrinsic apoptosis pathways, similarly to what has been observed here, almost always leading infected cells to death.^{3,6,7,10-12} Moreover, a relationship between viral infection and apoptosis has been reported in HeLa cells by intrinsic pathway through activation of caspase-3 at 24h p.i.¹¹ Cancer is a complex, multi-step gene-derived disease with astonishingly numerous links cell death.¹⁷

In fact, MMP were of cellular processes that can serve to trigger cell death via the mitochondrial pathway, however some viruses manipulate cell energy for their replication process.¹⁸⁻²³ Successful replication of many viruses, therefore, depends on the ability of the virus to prevent apoptosis induced by the mitochondrial pathway.¹⁹ The maintenance of mitochondrial activity during viral infection is essential for ensuring that sufficient ATP is available for viral replication to proceed, while concomitantly inhibiting apoptosis induced by oxidative stress.²¹ However, some viruses replicate and leave infected cells after abundant production of progeny virus⁹, similar to what was observed in this study.

Apoptosis involves controlled steps that eventually lead to the loss of cell viability.⁸ These steps cause changes in the morphology of dying cells, including cytoplasm condensation, DNA fragmentation and subsequent alterations in membrane phospholipids through the intrinsic and/or extrinsic pathways.¹⁶ The extrinsic pathway is signalled via ligand Fas/CD95 or TNF receptors 1 family.^{8,17} Tumour necrosis factor-alpha-induced protein 8 (*TNFAIP8*) is expressed in various human cancer cell lines.¹³ Like several other regulators of apoptosis, *TNFAIP8* can play different roles in apoptosis in response to different stimuli. In addition, experimental evidences support that *TNFAIP8* may serve as an oncogene in human cancers and exogenous expression in breast cancer cells enhances invasion *in vitro* and experimental metastasis *in vivo*, while knocking down *TNFAIP8* reduce their tumorigenicity.¹³ In spite of *TNFAIP8* expression has

been described in human breast cancer cells, its transcription in canine derived tumour cells was first evaluated here. Therefore, it may represent an innovative topic for a wide range of applications and tumour types in both humans and dogs.²⁴

Further work with CDVs should focus on the development of canine cancer treatment *in vivo*. This will not only be of benefit to canine population but will also provide important data for improving morbillivirus human therapy.

Acknowledgements

The authors thank the FAPESP (Fundação Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo; Grants 2010/52465-9 and 2011/50845-1) for their support. TC Cardoso and EF Flores are recipient of CNPq (Brazilian Council for Research) funding.

Competing interests

The authors declare that they have no financial or non-financial competing interests.

References

1. Arendt M, Nasir L and Morgan IM. Oncolytic gene therapy for canine cancers: teaching old dog viruses new tricks. *Veterinary and Comparative Oncology* 2009; **3**:153-161.
2. Lapp S, Pfankuche VM, Baumgärtner W and Puff C. Viral Oncolysis- Can Insights from Measles be transferred to canine distemper virus? *Viruses* 2014; **6**: 2340-2375.
3. Schobesberger M, Summerfield A, Dohher MG, Zurbiggen A and Griot, C. Canine distemper virus-induced depletion of uninfected lymphocytes is associated with apoptosis. *Veterinary Immunology and Immunopathology* 2005; **104**:33-44.
4. Puff C, Krudewig C, Imbschweiler I, Baumgärtner W and Alldinger S. Influence of persistent canine distemper virus infection on expression of RECK, matrix-metalloproteinases and their inhibitors in a canine macrophage/monocytic tumor cell line (DH82).
5. Suter SE, Chein MB, Messling VV, Yip B, Cattaneo R, Vernau W, Madewell BR and London CA. In vitro canine distemper virus infection of canine lymphoid cells: a prelude to oncolytic therapy for lymphoma. *Clinical Cancer Research* 2005; **11**:1579-1587.
6. Moro L, Martins AS, Alves CM, Santos FGA, Del Puerto HL and Vasconcelos AC. Apoptosis in the cerebellum of dogs with distemper. *Journal Veterinary Medicine B* 2003; **50**: 221-225.
7. Pillet S and Von Messling V. Canine distemper virus selectively inhibits apoptosis progression in infected immune cells. *Journal Virology* 2009; **83**:6279-6287.

8. Schwartzman RA and Cidlowski JA. Apoptosis: molecular biology of programmed cell death. *Endocrinology Review* 1993; **14**: 133-151.
9. Best MS. Viral subversion of apoptotic enzymes: escape from death row. *Annual Review Microbiology* 2008; **62**:171-192.
10. Del Puerto HL, Martins AS, Moro L, Milsted A, Alves F, Braz GF and Vasconcelos AC. 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* 2010; **9**:151-161.
11. Del Puerto HL, Martins AS, Milsted A, Fagundes EMS, Braz GF, Hissa B, Andrade LO, Alves F, Rajão DS, Leite RC and Vasconcelos AC. Canine distemper virus induces apoptosis in cervical derived cell lines. *Virology Journal* 2011; **8**:e334.
12. Del Puerto HL, Martins AS, Braz GF, Alves F, Heinemann MB, Rajão DS, Araújo EC, Martins SF, Nascimento DR, Leite RC and Vasconcelos AC. 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* 2011; **10**:2527-2533.
13. Lou Y and Liu S. The TIPE (TNFAIP8) family in inflammation, immunity and cancer. *Molecular Immunology* 2011; **49**: 4-7.
14. Maugg D, Rothenaigner I, Schorpp K, Potukuchi HK, Korsching E, Baumhoer D, Hadian K, Smida J, Nathrath M. New small molecules targeting apoptosis and cell viability in osteosarcoma. *Plos One* 2015; **3**:1-19.
15. Wilkes RP, Sanchez E, Riley MC and Kennedy MA. Real-time transcription polymerase chain reaction method for detection of Canine distemper virus modified live vaccine shedding for differentiation from infection with wild-type strains. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation* 2014; **26**:27-34.
16. Matos AJF and Santos AA. Advances in the understanding of the clinically relevant genetic pathways and molecular aspects of canine tumours: Part 1. Proliferation, apoptosis and DNA repair. *Veterinary Journal* 2015;
17. Wen X, Lin Z-Q, Liu B and Wei Y-Q. Caspase-mediated programmed cells death pathways therapeutic targets in cancer. *Cell Proliferation* 2012; **45**: 217-224.
18. Tayeb S, Zakay-Rones Z and Panet A. Therapeutic potential for oncolytic Newcastle disease virus: a critical review. *Oncolytic Virotherapy* 2015; **4**: 49-62.
19. Scott I. The role of mitochondria in the mammalian antiviral defense system. *Mitochondrion* 2010; **10**: 316-320.
20. Castanier C and Arnoult D. Mitochondrial localization of viral proteins as a means to subvert host defense. *Biochimica et Biophysica Acta* 2011; **1813**:575-583.
21. Moore CB and Ting JP-Y. Regulation of mitochondrial antiviral signaling pathways. *Immunity* 2008; **28**:735-739.
22. Ohata A and Nishiyama Y. Mitochondria and viruses. *Mitochondrion* 2011; **11**: 1-12.
23. West AP, Shadel GS and Ghosh S. Mitochondria in innate immune responses. *Nature Reviews* 2011; **11**:389-402.

24. Sanjuán R and Grdzelišvili VZ. Evolution of oncolytic viruses. *Current Opinion in Virology* 2015; **13**:1-5.

Figure captions

Figure 1. Cytopathic effects produced by Snyder Hill and Lederle CDV strains at 48h p.i. documented under phase contrast microscopy. C2Bbel cells revealed few rounded and floated cells (bars 20- μ m); HS578T showed monolayer lysis (bars 40- μ m); MCF-7 revealed less intense cell damage (bars 100- μ m); AF-72 showed rounded and giant cells (bars 100- μ m). Negative control corresponded to uninfected cells at the same p.i.

Figure 2. Virus titres corresponded to 0, 2, 6, 12, 18, 24, 30, 36 and 48 h p.i. produced by Snyder Hill and Lederle CDV strains in all cells. The data were Log transformed corresponded to tissue culture infectious dose 50% method ($p < 0.005$).

Figure 3. Percentage of viable cells measured by MTT assay at 24h and 48h p.i. with Snyder Hill (A) and Lederle (B); * $p < 0.005$. Negative control corresponded to uninfected cells at the same p.i. Positive control corresponded to C2Bbel, HS578T, MCF-7 and AF-72 cells submitted to 1.5 μ M of staurosporine at 24h and 48h p.i.

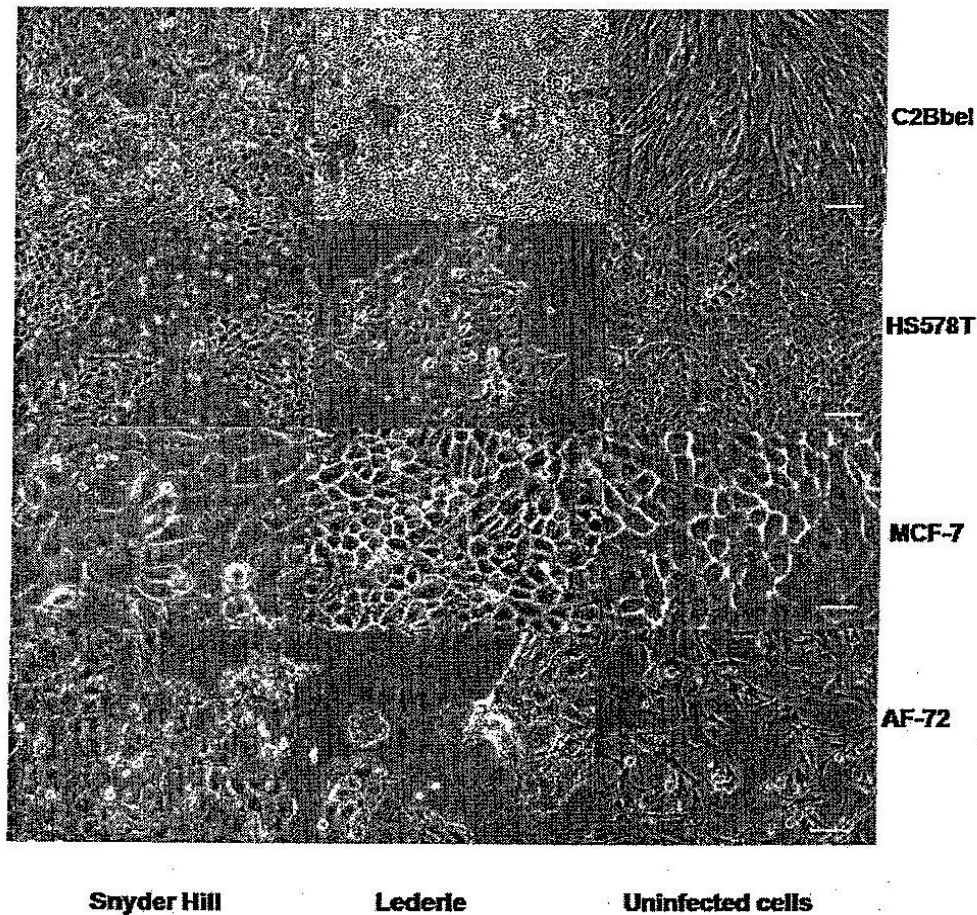
Figure 4. Percentage of JC-1 positive labelled cells after 24 and 48h p.i. with Snyder Hill (A) and Lederle (B); * $p < 0.005$. Negative control corresponded to uninfected cells at the same p.i. Positive control corresponded to C2Bbel, HS578T, MCF-7 and AF-72 cells submitted to 1.5 μ M of staurosporine at 24h and 48h p.i.

Figure 5. Correlation between TNFAIP8 and CDV M gene expression in HS578T, C2Bbel, MCF-7 and AF-72 cells infected by Snyder Hill and Lederle CDV strains at 48h p.i. The correlation coefficient (r) was calculated according to the Spearman analysis and $p < 0.005$ was considered significant.

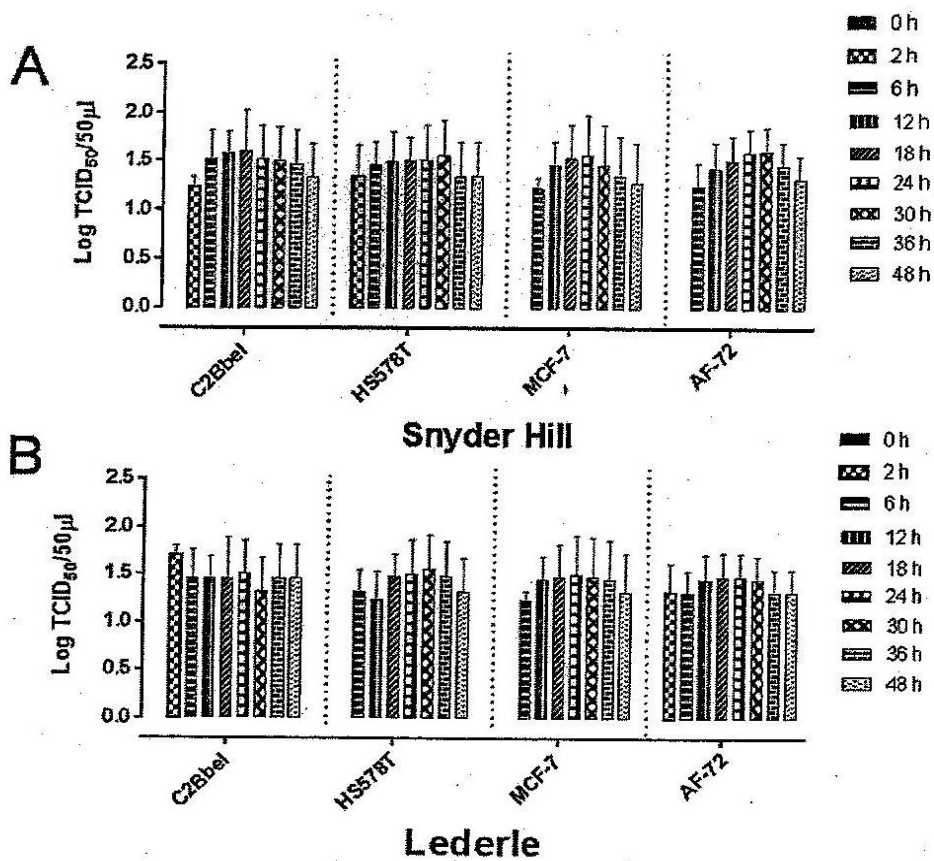
Table 1

Proportion of Annexin V-FITC/PI labeled cells after 48h of CDV infection

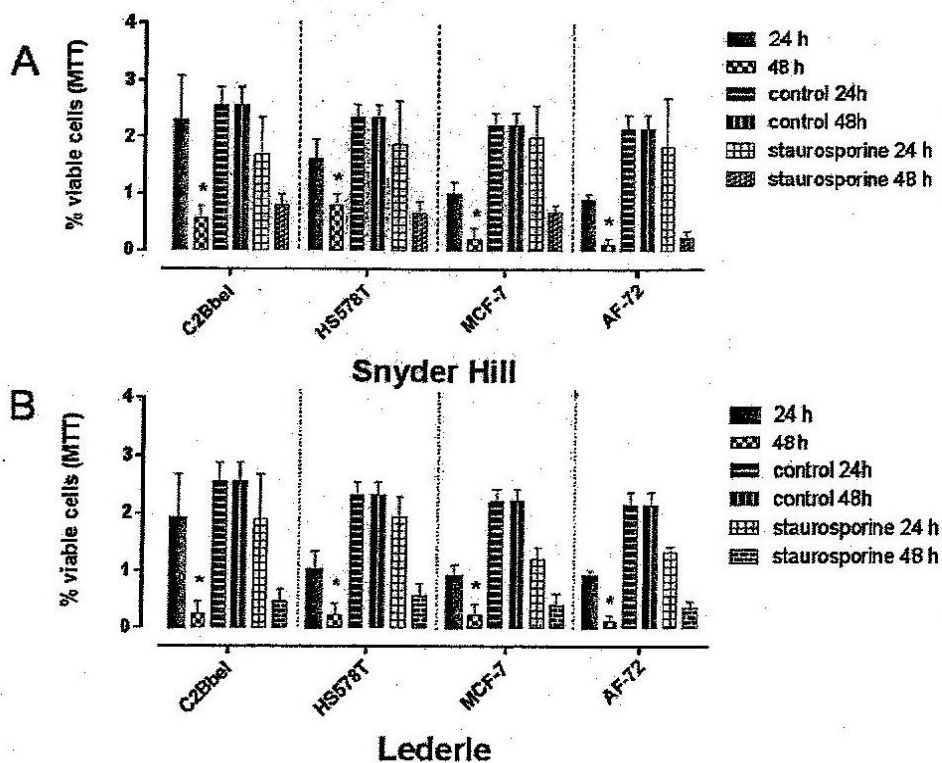
	Dead (% $\pm$ sd)	Late apoptotic/necrotic (% $\pm$ sd)	Early apoptotic (% $\pm$ sd)	Viable (% $\pm$ sd)
	(annexin V-FITC-/PI+)	(annexin V-FITC+/PI+)	(annexin V-FITC+/PI-)	(annexin V-FITC-/PI-)
Lederle				
control	5.6 $\pm$ 1.2	0.5 $\pm$ 0.1	5.0 $\pm$ 0.6	88.9 $\pm$ 7.8
C2Bbel	77.1 $\pm$ 4.7	20.9 $\pm$ 2.9	ND	ND
HS578T	67.6 $\pm$ 3.8	10.7 $\pm$ 1.0	12.7 $\pm$ 2.3	9 $\pm$ 1.3
MCF-7	50.4 $\pm$ 4.9	16.8 $\pm$ 0.9	23.8 $\pm$ 3.9	9 $\pm$ 1.9
AF-72	49.9 $\pm$ 5.3	30.6 $\pm$ 2.3	13.5 $\pm$ 2.8	6 $\pm$ 1.2
staurosporine	70 $\pm$ 9.7	16 $\pm$ 2.3	10.7 $\pm$ 2.7	3.3 $\pm$ 1.7
Snyder Hill				
Control	5.6 $\pm$ 1.2	0.5 $\pm$ 0.1	5.0 $\pm$ 0.6	88.9 $\pm$ 7.8
C2Bbel	60.1 $\pm$ 3.7	20.7 $\pm$ 2.7	15.7 $\pm$ 3.8	3.5 $\pm$ 1.7
HS578T	64.8 $\pm$ 3.9	30.8 $\pm$ 3.7	3.2 $\pm$ 0.7	1.2 $\pm$ 0.7
MCF-7	69.7 $\pm$ 4.7	30.3 $\pm$ 3.9	ND	ND
AF-72	70.7 $\pm$ 9.7	15.3 $\pm$ 2.3	10.7 $\pm$ 2.7	3.3 $\pm$ 1.7
staurosporine	70 $\pm$ 9.7	14.3 $\pm$ 2.3	9.7 $\pm$ 2.7	4 $\pm$ 1.7
ND- not detected				



Cytopathic effects produced by Snyder Hill and Lederle CDV strains at 48h p.i. documented under phase contrast microscopy. C2Bbel cells revealed few rounded and floated cells (bars 20- μ m); HS578T showed monolayer lysis (bars 40- μ m); MCF-7 revealed less intense cell damage (bars 100- μ m); AF-72 showed rounded and giant cells (bars 100- μ m). Negative control corresponded to uninfected cells at the same p.i. 249x238mm (96 x 96 DPI)

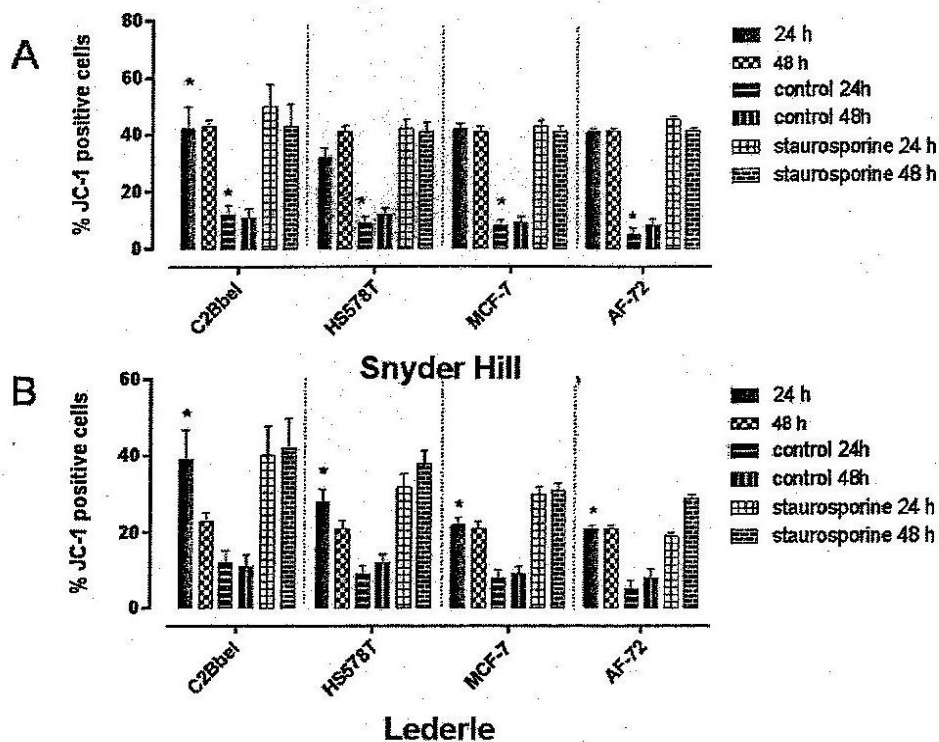


Virus titres corresponded to 0, 2, 6, 12, 18, 24, 30, 36 and 48 h p.i produced by Snyder Hill and Lederle CDV strains in all cells. The data were Log transformed corresponded to tissue culture infectious dose 50% method ($p < 0.005$).
205x190mm (96 x 96 DPI)

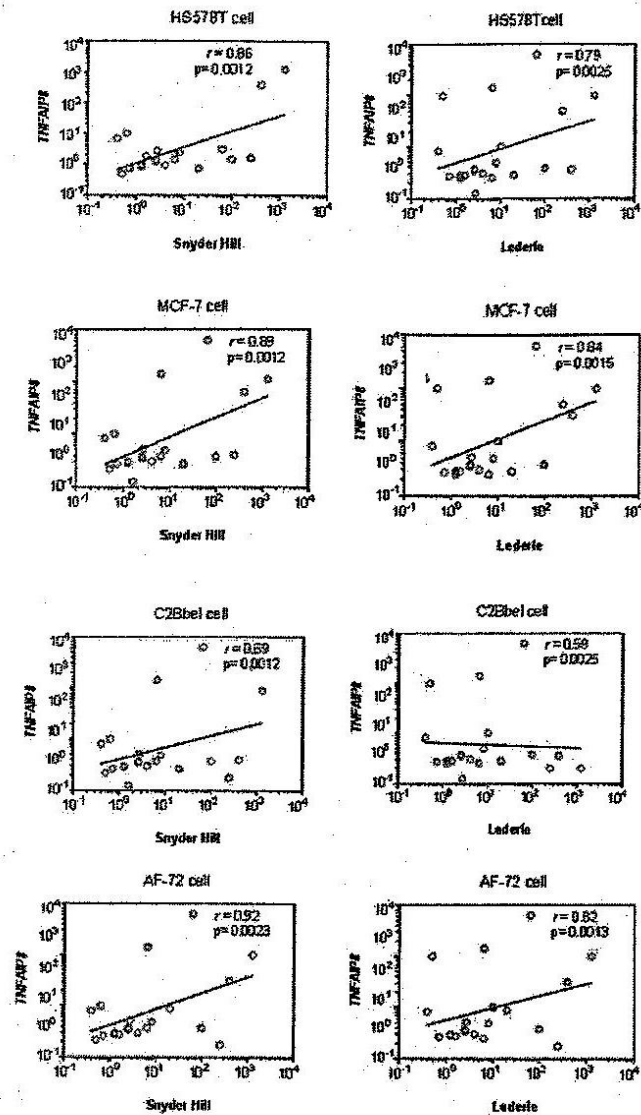


Percentage of viable cells measured by MTT assay at 24h and 48h p.i with Snyder Hill (A) and Lederle (B); * $p < 0.005$. Negative control corresponded to uninfected cells at the same p.i. Positive control corresponded to C2Bbel, HS578T, MCF-7 and AF-72 cells submitted to 1.5 μ M of staurosporine at 24h and 48h p.i.

237x190mm (96 x 96 DPI)



. Percentage of JC-1 positive labelled cells after 24 and 48h p.i with Snyder Hill (A) and Lederle (B); * $p < 0.005$. Negative control corresponded to uninfected cells at the same p.i. Positive control corresponded to C2Bbel, HS578T, MCF-7 and AF-72 cells submitted to 1.5 μ M of staurosporine at 24h and 48h p.i.
238x190mm (96 x 96 DPI)



Correlation between TNFAIP8 and CDV M gene expression in HS578T, C2Bbel, MCF-7 and AF-72 cells infected by Snyder Hill and Lederle CDV strains at 48h p.i. The correlation coefficient (r) was calculated according to the Spearman analysis and $p < 0.005$ was considered significant.
155x270mm (96 x 96 DPI)