

Helen Lima Del Puerto

**MECANISMOS MOLECULARES ENVOLVIDOS NA
APOPTOSE INDUZIDA PELO VÍRUS DA CINOMOSE
CANINA *IN VIVO* E *IN VITRO***

Belo Horizonte
Faculdade de Medicina
Universidade Federal de Minas Gerais
2010

Helen Lima Del Puerto

MECANISMOS MOLECULARES ENVOLVIDOS NA APOPTOSE INDUZIDA
PELO VÍRUS DA CINOMOSE CANINA *IN VIVO* E *IN VITRO*

Tese apresentada ao curso de Patologia Geral
do Programa de Pós-Graduação em Patologia
da Faculdade de Medicina da Universidade
Federal de Minas Gerais, como requisito para
a obtenção do título de Doutor.

Orientador: Prof. Dr. Anilton César Vasconcelos

Co-orientador: Prof. Dr. Almir de Sousa Martins

Prof. Dra. Amy Milsted

Belo Horizonte

Faculdade de Medicina

Universidade Federal de Minas Gerais

2010



FACULDADE DE MEDICINA
CENTRO DE PÓS-GRADUAÇÃO

Av. Prof. Alfredo Balena 190 / sala 533
Belo Horizonte – MG - CEP 30.130-100
Fone: (031) 3409.9641 FAX: (31) 3409-9640
epg@medicina.ufmg.br



ATA DA DEFESA DE TESE DE DOUTORADO de **HELEN DE LIMA DEL PUETRO**, nº de registro 2006218330. Às nove horas do **vinte e seis de fevereiro de dois mil e dez**, reuniu-se no Instituto de Ciências Biológicas da UFMG, a comissão examinadora de tese indicada pelo colegiado do Programa de Pós-Graduação em Patologia, para julgar, em exame final, o trabalho intitulado: **“MECANISMOS ENVOLVIDOS NA APOPTOSE INDUZIDA PELO VIRUS DA CINOMOSE CANINA IN VIVO E IN VITRO”**, requisito final para a obtenção do grau de Doutora em Patologia, pelo Programa de Pós-Graduação em Patologia - Área de Concentração em Patologia Geral. Abrindo a sessão, o Presidente da comissão, Prof. Anilton Cesar Vasconcelos, após dar a conhecer aos presentes o teor das normas regulamentares do trabalho final passou a palavra à candidata para apresentação de seu trabalho. Seguiu-se a arguição pelos examinadores com a respectiva defesa da candidata. Logo após, a comissão se reuniu sem a presença da candidata e do público para julgamento e expedição do resultado final. Foram atribuídas as seguintes indicações:

Prof. Dr. Anilton Cesar Vasconcelos/Orientador
Prof. Dr. Almir de Sousa Martins/Coorientador
Profa. Dra. Milene Alvarenga Rachid
Profa. Dra. Tatiane Alves da Paixão
Profa. Dra Silvana Maria Medeiros de Sousa Silva
Prof. Dr. Deoclesio Alves Chianca Junior

Instituição: UFMG
Instituição: UFMG
Instituição: UFMG
Instituição: UFMG
Instituição: UFPI
Instituição: UFOP

Indicação: APROVADA
Indicação: aprovado
Indicação: aprovado
Indicação: aprovado
Indicação: aprovado
Indicação: aprovado

Pelas indicações, a candidata foi considerada

APROVADA

O resultado final foi comunicado publicamente à candidata pelo presidente da comissão. Nada mais havendo a tratar, o presidente encerrou a reunião e lavrou a presente ATA, que será assinada por todos os membros participantes da comissão examinadora. Belo Horizonte, 26 de fevereiro de 2010.

Prof. Anilton Cesar Vasconcelos/Orientador

Prof. Almir de Sousa Martins/Coorientador

Profa. Milene Alvarenga Rachid

Prof. Tatiane Alves da Paixão

Profa. Silvana Maria Medeiros de Sousa Silva

Prof. Deoclesio Alves Chianca Junior

Prof. Wagner Luiz Tafuri/Coordenador

Obs.: Este documento não terá validade sem a assinatura e carimbo do Coordenador.

CONFERE COM O ORIGINAL
Centro de Pós-Graduação

PROF. WAGNER LUIZ TAFURI
Coordenador do Programa de Pós-Graduação em Patologia
Faculdade de Medicina/UFMG

Este trabalho foi realizado no laboratório de Biologia Molecular no Departamento de Fisiologia e Biofísica, ICB-UFMG; no laboratório de apoptose do Departamento de Patologia Geral, ICB-UFMG; no laboratório de Retrovírus do Departamento de Medicina Veterinária Preventiva da Escola de Veterinária, UFMG; e no laboratório de pesquisa da Dra Amy Milsted no Departamento de Biologia da Universidade de Akron, Ohio, USA.

Apoio Financeiro: CNPq , Fapemig e CAPES.

Dedico esta vitória a **DEUS**,
ao meu inestimável marido: **Fabiano**,
à minha maravilhosa mãe: **Marinéia**,
e às minhas queridas irmãs: **Lhoren e Caroline**.

AGRADECIMENTOS

À JESUS CRISTO, meu Senhor, por fazer morada em mim, e me encorajar todos os dias com a Sua vida vencedora! Obrigada por ser a minha fonte inesgotável de VIDA e alegria!

Ao meu amado FABIANO, por ser o melhor companheiro, amigo, cúmplice e marido do mundo. Com você tudo fica mais fácil, colorido, alegre e possível. Obrigada por existir e encantar a minha vida! TE AMO MUITO!

À minha maravilhosa MÃE: MARINÉLIA. Obrigada por ter me ensinado a lutar, a estudar, a trabalhar, e a ser uma pessoa melhor. Obrigada por sozinha ter nos criado com tanta dignidade! Se hoje estou aqui é por você! Te amo.

Às minhas queridas irmãs: LHOREN e CAROLINE. Obrigada por fazerem parte da minha vida, por terem compartilhado a presença insubstituível de vocês comigo, por terem me ensinado tantas coisas boas, por serem amigas incondicionais, por sempre me encorajarem com o seus sorrisos e orações. Sem vocês não seria quem eu sou. Amo vocês lindinhas!

Ao meu orientador e amigo ANILTON. Obrigada por ter acreditado em mim, por ter me apoiado e me dado a liberdade de trabalhar com alegria. Professor, você já está marcado para sempre na minha história. OBRIGADA por tudo!

Ao meu co-orientador, amigo e irmão ALMIR. Obrigada por ter me ensinado tantas coisas durante esses 9 anos trabalhando juntos, por ter me dado oportunidades de crescimento pessoal e profissional. Você é muito especial para mim! OBRIGADA por tudo!

À professora AMY MILSTED da Universidade de Akron, por ter nos acolhido em seu lar, por me receber em seu laboratório durante o meu doutorado *sandwich*, e por ter me dado a oportunidade de aprender e trabalhar com cultivo celular. E também ao seu esposo JIM, pela amizade. OBRIGADA!

Aos professores RÔMULO e MARCOS do Departamento de Medicina Veterinária Preventiva, por terem me acolhido e “adotado”! Vocês estarão para sempre no meu coração. Sou eternamente grata por tudo o que fizeram por mim! MUITO OBRIGADA!

Às minhas amigas do Retrolab: FABIANA, GISSANDRA, DANI e FERNANDA. Eu não tenho palavras para agradecer a amizade e companheirismo durante essa fase final. O que teria sido de mim sem vocês? Obrigada pelo apoio e por terem feito do ano de 2009 o melhor do meu doutorado. Vocês terão para sempre a minha amizade!

À professora ELAINE FAGUNDES do Departamento de Fisiologia do ICB, por ter dedicado tempo para me orientar na citometria de fluxo. MUITO OBRIGADA professora pelo tempo e amizade!

À professora LUCIANA DE OLIVEIRA ANDRADE, do Laboratório Professora Conceição Machado, do Departamento de Morfologia do ICB, por ter aberto as portas do seu laboratório para mim; e à sua aluna de doutorado BÁRBARA HISSA que prontamente me ajudou nas reações de imunocitoquímica. MUITO OBRIGADA!

Ao meu cunhado CARLIM, agradeço pelas orações e amizade, e por estar sempre por perto. E ao CHICO pelo apoio compartilhado nesses anos.

Ao professor CARLOS SALAS, pelas preciosas sugestões na minha qualificação.

Aos professores, coordenadores, e secretárias do programa de Pós-Graduação em Patologia Geral da Faculdade de Medicina da UFMG, pelo suporte oferecido sempre que precisei.

À minha família em Barbacena: DR. HENRIQUE e APARECIDA, PAULINHA e TIGU, ROBERTA e RÚBENS E HENRIQUINHO e CAMILA. OBRIGADA pelo apoio e amizade! ADORO VOCÊS!

Aos meus colegas da Universidade de Akron: ADAM, JEFF, JEREMY, SARAH ROBENSTINE, SHANNON, GAIL, SARAH SCOTT e RUPALI, pelos ensinamentos, e por terem feito a minha estadia em Akron mais alegre e proveitosa. OBRIGADA!

Às minhas amigas da Igreja: CLAUDINHA e HELEN FERNANDES, por sempre estarem por perto com muito amor e carinho! Vocês são muito especiais para mim!

Aos meus colegas do laboratório de apoptose: KARINA, LU VILELA, BÁRBARA, PAULINHA, MARCOS e SORAIA, foram poucos os momentos juntos, mas muito proveitosos.

Aos meus colegas do laboratório de retrovírus: ELIZÂNGELA, ROBERTA, JULIANA, NATÁLIA, CRISTINA e DANIEL. Obrigada pela companhia!

À TODOS os irmãos da IGREJA EM BELO HORIZONTE, pelas orações, amizade, cuidado e amor dedicados a mim! AMO MUITO VOCÊS!

E finalmente, mas não menos importante, agradeço ao CNPq pelo bolsa de doutorado no Brasil, e pela bolsa de doutorado *sandwich* no exterior, e à FAPEMIG pela bolsa de 3 meses de extensão na Universidade de Akron, e pelo apoio financeiro na publicação do nosso artigo.

*“O bom humor espalha mais felicidade que
todas as riquezas do mundo.
Vem do hábito de olhar para as coisas
com esperança, e de esperar
o melhor e não o pior.”*

Alfred Montapert

SUMÁRIO

LISTA DE ILUSTRAÇÕES E TABELAS.....	xi
LISTA DE QUADROS E GRÁFICOS.....	xiii
LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS	xiv
CAPÍTULO I.....	1
RESUMO	2
ABSTRACT	3
OBJETIVOS.....	4
1.1. Objetivo geral	4
1.2. Objetivos específicos	4
ARTIGO PUBLICADO.....	5
CAPÍTULO II.....	16
RESUMO	17
ABSTRACT	18
INTRODUÇÃO.....	19
1. O vírus da cinomose canina (VCC).....	19
2. A cinomose canina (CC).....	21
2.1. Patogenia.....	21
2.2. Diagnóstico.....	24
2.3. Tratamento	24
3. Morte celular.....	24
3.1. Necrose.....	24
3.2. Apoptose	25
4. Vírus da cinomose canina e apoptose	33
OBJETIVOS.....	35
1.1. Objetivo geral	35
1.2. Objetivos específicos	35
MATERIAL E MÉTODOS.....	36
1. Cultivo de células Vero (células de rim de macaco verde africano)	36
2. Cultivo do vírus da cinomose canina (VCC) em célula Vero	36
3. Titulação do vírus da cinomose canina (VCC).....	36
4. Imunocitoquímica	37

4.1. Cultivo das células Vero	37
4.2. Cultivo das células HeLa	37
4.3. Sistema avidina-biotina-peroxidase	38
4.4. Protocolo da imunocitoquímica	39
4.5. Leitura das lâminas	41
5. PCR em tempo real	41
5.1. Cultivo das células Vero	41
5.2. Extração de RNA total	42
5.3. Síntese do cDNA pela transcrição reversa (RT)	43
5.4. Oligonucleotídeos Específicos	43
5.5. PCR em tempo real	46
5.6. Análise estatística	46
6. Detecção do VCC - PCR convencional	47
6.1. Eletroforese dos produtos da PCR	48
7. Índice apoptótico	49
7.1. Cultivo de células Vero	49
7.2. Coloração das lamínulas com DAPI	49
7.3. Coloração das lamínulas com Giemsa	50
7.4. Coloração com cristal violeta	52
7.5. Análise estatística	52
8. Citometria de fluxo	53
8.1. Cultivo das células Vero e infecção pelo VCC	53
8.2. Leitura no citômetro de fluxo	54
8.3. Análise estatística	55
RESULTADOS	56
1. Imunocitoquímica	56
1.1. Imunolocalização das Caspase 3 e 8 em HeLa tratada com cisplatina	56
1.2. Imunolocalização das Caspase 3 e 8 em HeLa infectada pelo VCC	58
1.3. Imunolocalização das Caspase 3 e 8 em células Vero infectadas pelo VCC	59
2. RT-PCR Convencional	61
3. PCR em tempo real	62
4. Índice apoptótico	68
4.1. Coloração com DAPI	68
4.2. Coloração com Giemsa	69

4.3. Coloração com Cristal Violeta	70
4.4. Índice apoptótico final	71
5. Citometria de fluxo	74
DISCUSSÃO	77
5.1. Imunocitoquímica	77
5.2. PCR em tempo real	78
5.3. Índice apoptótico e citometria de fluxo.....	80
CONCLUSÃO	82
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICA.....	83
ANEXO.....	91

LISTA DE ILUSTRAÇÕES E TABELAS

FIGURA 1	– Estrutura dos <i>Morbillivirus</i>	20
FIGURA 2	– Patogenia do VCC.	23
FIGURA 3	– Principais diferenças morfológicas entre necrose e apoptose.	25
FIGURA 4	– Estrutura e organização dos domínios das caspases de mamíferos.	27
FIGURA 5	– Estrutura do receptor de morte Fas.	28
FIGURA 6	– Via extrínseca de ativação da apoptose.	29
FIGURA 7	– Via intrínseca de ativação da apoptose.	30
FIGURA 8	– Princípio da imunocitoquímica pelo método da avidina-biotina-peroxidase.	39
FIGURA 9	– Estratégia para os ensaios de extração de RNA e coloração com cristal violeta.	42
FIGURA 10	– Estratégia para a montagem das placas de reação de PCR em tempo real.	47
FIGURA 11	– Estratégia para montagem das lamínulas para coloração com DAPI e Giemsa.	51
FIGURA 12	– Análise feita pelo citômetro de fluxo com PI.....	53
FIGURA 13	– Estratégia para os experimentos de citometria de fluxo.	55
FIGURA 14	– Imunocitoquímica para Caspase 3 e Caspase 8 em células HeLa com e sem a droga cisplatina.	57
FIGURA 15	– Imunocitoquímica de células HeLa com cisplatina incubadas com o anticorpo secundário – controle da reação.	58
FIGURA 16	– Imunocitoquímica para Caspase 3 e Caspase 8 de células HeLa	

	infectadas com o VCC.	59
FIGURA 17	– Imunocitoquímica para Caspase 3 e Caspase 8 em células Vero controle e células Vero infectadas pelo VCC.	60
FIGURA 18	– Imunocitoquímica de células Vero controle e infectadas pelo VCC incubadas com o anticorpo secundário – controle da reação.	61
FIGURA 19	– Diagnóstico do VCC por RT-PCR em células Vero infectadas pelo VCC.	62
FIGURA 20	– Curva de dissociação para S26, Bax, Bcl-2 e rFas.	63
FIGURA 21	– Curva de dissociação para Caspase 3, Caspase 8 e Caspase 9.	63
FIGURA 22	– Micrografia de fluorescência de células coradas com DAPI.	68
FIGURA 23	– Micrografia de células coradas com Giemsa.	69
FIGURA 24	– Micrografia de células coradas com Giemsa e a presença de corpúsculos de inclusão.	70
FIGURA 25	– Micrografia de células coradas com cristal violeta.	71
FIGURA 26	– Histograma resultante da citometria de fluxo com PI dos tempos de 3, 6 e 9 horas.	75
FIGURA 27	– Histograma resultante da citometria de fluxo com PI dos tempos de 24, 30 e 48 horas.	76
TABELA 1	– Oligonucleotídeos iniciadores utilizados para a reação de PCR convencional e em tempo real.	45

LISTA DE QUADROS E GRÁFICOS

QUADRO 1	–	Resumo do protocolo de PCR convencional.	48
QUADRO 2	–	Programação adotada para os ciclos de PCR.	48
GRÁFICO 1	–	Expressão da Caspase 3 em células Vero.	65
GRÁFICO 2	–	Expressão da Caspase 8 em células Vero.	66
GRÁFICO 3	–	Expressão do receptor Fas em células Vero.	67
GRÁFICO 4	–	Índice apoptótico em células Vero.	72
GRÁFICO 5	–	Índice apoptótico em células Vero.	73
GRÁFICO 6	–	Contagem de células em apoptose pelo citômetro de fluxo.	74

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

°C	graus Celsius
ABC	Complexo avidina-biotina-peroxidase
Água DEPC	Água tratada com dietilpirocarbonato
AIF	Fator de indução apoptótico
Apaf-1	Fator de ativação de proteases pró-apoptóticas
ATP	Adenosina Trifosfato
BSA	Do inglês <i>bovine serum albumin</i> ou Albumina de soro bovino
CAD	Dnase caspase ativada
CARD	Do inglês <i>caspase recruitment domain</i> , ou domínio de recrutamento de caspase
CC	Cinomose canina
cDNA	Ácido Desoxirribonucléico complementar
CPP32	caspase3
DAB	cromógeno 3,3'-diaminobenzidina
DAPI	4'-6-diamino-2-fenilindol
DD	Do inglês <i>death domain</i> , ou domínio de morte
DED	Do inglês <i>death effector domain</i> , ou domínio efetor de morte
DNA	Do inglês <i>Deoxyribonucleic acid</i> ou Ácido Desoxirribonucléico
ECP	Efeito citopático
EtBr	Brometo de etídio
G0	Fase de quiescência do ciclo celular
G1	Fase de pré-síntese do ciclo celular
G2	Fase pré-mitótica do ciclo celular
HeLa	Células cancerosas do epitélio cervical

HFS	Do inglês <i>hypotonic fluorochromic solution</i> ou Solução hipotônica fluorocrômica
IAP	Proteínas indutoras da apoptose
M	Fase mitótica do ciclo celular
MEM	Meio essencial mínimo (Modified Eagle's medium)
mg	miligramas
MgCl ₂	Cloreto de Magnesium
MOI	Multiplicidade de infecção
mRNA	Ácido Ribonucléico mensageiro
ng	nanogramas
nt	nucleotídeos
P.I.	Pós infecção
PARP	Poli ADP ribose polimerase
pb	par(es) de base(s)
PBS	Do inglês <i>Phosphate buffered saline</i> ou solução salina tamponado com fosfatos
PCR	Do inglês <i>Polimerase Chain Reaction</i> ou Reação em Cadeia da Polimerase
PI	Iodeto de propídio
RNA	Do inglês <i>Ryribonucleic acid</i> ou Ácido ribonucléico
RT	Do inglês <i>Reverse Transcription</i> ou Transcrição Reversa
S	Fase de síntese do ciclo celular
S26	Subunidade da proteína ribossomal
SBF	Soro bovino fetal
TAE	Tampão Tris-base acetato-EDTA
TBS	Tampão tris-salina
TEMED	agente polimerizante (NNN'N'-tetra metil etileno diamina)

Tris	Trishidroximetil aminometano
U	unidade
V	Volts
VCC	Vírus da cinomose canina
VERO	Células de rim de macaco verde africano

CAPÍTULO I

MECANISMOS ENVOLVIDOS NA APOPTOSE INDUZIDA PELO VÍRUS DA CINOMOSE CANINA *IN VIVO*

RESUMO

A cinomose canina (CC) é uma doença imunossupressiva causada pelo vírus da cinomose canina (VCC), que pode acarretar complicações no SNC. Cães naturalmente infectados pelo VCC apresentam células em apoptose no tecido linfóide e cerebelo, mas os mecanismos da apoptose na infecção pelo VCC ainda não foram bem descritos. O objetivo desse estudo foi avaliar as vias de apoptose na infecção pelo VCC analisando a expressão de mRNA dos genes anti e pro apoptóticos Bax, Bcl-2, Caspases 3, -8 e -9 em sangue periférico, linfonodos e cerebelo de cães naturalmente infectados pelo VCC (VCC+) e de cães não infectados pelo VCC (VCC-). Amostras de sangue de 20 cães clinicamente suspeitos da infecção pelo VCC e de 12 cães clinicamente saudáveis foram utilizadas para a detecção do vírus através da técnica de RT-PCR, e para análise hematológica. As amostras de sangue, cerebelo e linfonodo foram submetidas a extração de RNA total. Após o resultado de detecção do vírus por RT-PCR, foram selecionadas 12 amostras de sangue de cães infectados (VCC+) e 8 amostras de sangue de cães não infectados (VCC-). Dentre os 12 cães VCC+, 4 foram submetidos à necropsia, e amostras de cerebelo e linfonodo foram coletadas. Dentre os 8 cães VCC-, 3 foram submetidos à necropsia, e amostras de linfonodo e cerebelo foram coletadas. As amostras de RNA foram reverso transcritas e a expressão dos genes alvos quantificada pela PCR em tempo real. Teste t de *Student* não pareado foi utilizado para a estatística comparando-se os grupos VCC+ e VCC-, e as diferenças considerados estatisticamente significantes quando $p < 0.05$. O diagnóstico do VCC através da RT-PCR nos 20 cães clinicamente suspeitos resultou em 12 cães positivos (60%), e dos 12 cães clinicamente sadios, 8 foram confirmados negativos (67%). O resultado da expressão dos genes Caspases 3, -8, -9, Bax e Bcl-2 em sangue periférico não apresentou diferença estatística entre os cães VCC+ (n=12) e VCC- (n=8), assim como os resultados hematológicos ($p > 0.05$). Os resultados da expressão de Bax, Caspase 3, -8 e -9 em cerebelo foi significativamente maior ($p < 0.05$) nos cães VCC+ (n=4) em comparação com os cães VCC- (n=3). Adicionalmente, a expressão de Caspase 3 e -8 foi significativamente maior ($p < 0.05$) em linfonodos de cães VCC+ (n=4) quando comparado com os cães VCC- (n=3). Os resultados da RT-PCR para o diagnóstico do VCC foi capaz de detectar o vírus em cães clinicamente saudáveis, o que a torna uma ferramenta sensível e específica para o diagnóstico do VCC e para futuros estudos epidemiológicos. Os resultados sugerem que o VCC induz apoptose em linfonodos através da ativação de Caspase 3, iniciada pela Caspase 8; e a indução no cerebelo através da ativação da Caspase 3, iniciada pela Caspase 8 e pela via mitocondrial através da Caspase 9.

ABSTRACT

Canine distemper (CD) is an immunosuppressive disease caused by the canine distemper virus (CDV). Pathogenesis includes mainly complications in the CNS and immunosuppression that are not completely understood. Dogs naturally infected with CDV show apoptotic cells in lymphoid tissues and cerebellum, but the apoptotic mechanism is not well characterized. Thus, in this study we evaluated the expression of Bax, Bcl-2, Caspases 3, -8 and -9 mRNA in the peripheral blood, lymph nodes and cerebellum of CDV infected (CDV+) and non-infected (CDV-) dogs by real-time PCR. Blood samples from 12 CDV+ and 8 CDV- dogs, diagnosed by RT-PCR, were used for hematological analysis and to evaluate apoptotic gene expression using real-time PCR. Cerebellum and lymph nodes of 4 CDV+ and 3 CDV- dogs were also used in real-time PCR. No significant differences were statistically found in the expressions of Caspase 3, -8, -9, Bax and Bcl-2 mRNA or in the hematological results between CDV+ and CDV- dogs. Expressions of Bax, Caspase 3, -8 and -9 was significantly higher ($p<0.05$) in CDV+ cerebellum compared to CDV- dogs. In addition, expressions of Caspase 3 and -8 were significantly higher ($p<0.05$) in the lymph nodes of CDV+ compared to CDV- dogs. These findings suggest that CDV induces apoptosis in the cerebellum and lymph nodes in different ways. Lymph node apoptosis might occur via Caspase 3 activation, through the Caspase 8 pathways, and cerebellum apoptosis might occur via Caspase 3 activation, through Caspase 8 and through the mitochondrial pathway.

OBJETIVOS

1.1. Objetivo geral

Avaliar os mecanismos moleculares envolvidos na apoptose induzida pelo vírus da cinomose canina na infecção natural (*in vivo*).

1.2. Objetivos específicos

Para alcançar o objetivo geral, os seguintes objetivos específicos foram propostos:

- a) Utilizar a RT-PCR para confirmar ou não a infecção pelo vírus da cinomose canina.
- b) Avaliar a contagem de leucócitos (linfócitos, neutrófilos, eosinófilos e monócitos) através da análise hematológica do sangue periférico.
- c) Analisar o padrão do DNA isolado do sangue, cerebelo e linfonodo de animais infectados pelo vírus da cinomose canina, e em cães controle, através de eletroforese em gel de agarose corado com brometo de etídio.
- d) Avaliar os transcritos dos genes pró-apoptóticos: Caspase 3, Caspase 8, Caspase 9 e Bax; e os transcritos do gene anti-apoptótico: Bcl-2; no sangue, cerebelo e linfonodo de cães naturalmente infectados pelo vírus da cinomose canina.



Caspase-3/-8/-9, Bax and Bcl-2 expression in the cerebellum, lymph nodes and leukocytes of dogs naturally infected with canine distemper virus

H.L. Del Puerto¹, A.S. Martins², L. Moro¹, A. Milsted³, F. Alves², G.F. Braz⁴ and A.C. Vasconcelos¹

¹Departamento de Patologia Geral, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, MG, Brasil

²Departamento de Fisiologia e Biofísica, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, MG, Brasil

³Department of Biology, University of Akron, Akron, OH, USA

⁴Escola de Veterinária, Departamento de Medicina Veterinária Preventiva, Universidade Federal de Minas, Belo Horizonte, MG, Brasil

Corresponding author: H.L. Del Puerto
E-mail: helendelpuerto@hotmail.com

Genet. Mol. Res. 9 (1): 151-161 (2010)

Received October 22, 2009

Accepted November 17, 2009

Published January 26, 2010

ABSTRACT. Canine distemper is an immunosuppressive disease caused by the canine distemper virus (CDV). Pathogenesis mainly involves the central nervous system and immunosuppression. Dogs naturally infected with CDV develop apoptotic cells in lymphoid tissues and the cerebellum, but this apoptotic mechanism is not well characterized. To better understand this process, we evaluated the expression of Bax, Bcl-2, and caspase-3, -8 and -9, by evaluating mRNA levels in the peripheral blood, lymph nodes and cerebellum of CDV-infected (CDV+) and uninfected (CDV-) dogs by real-time polymerase chain reaction (PCR). Blood samples from 12 CDV+ and 8 CDV- dogs, diagnosed by reverse transcription-PCR, were subjected to hematological analysis and apoptotic gene expression was evaluated using real-time-PCR. Tissues

from the cerebellum and lymph nodes of four CDV+ and three CDV- dogs were also subjected to real time-PCR. No significant differences were found between CDV+ and CDV- dogs in the hemotological results or in the expression of caspase-3, -8, -9, Bax, and Bcl-2 in the peripheral blood. However, expression of Bax, caspase-3, -8 and -9 was significantly higher in the cerebellum of CDV+ compared to CDV- dogs. Expression of caspase-3 and -8 was significantly higher in the lymph nodes of CDV+ compared to CDV- dogs. We concluded that infection with CDV induces apoptosis in the cerebellum and lymph nodes in different ways. Lymph node apoptosis apparently occurs via caspase-3 activation, through the caspase-8 pathway, and cerebellum apoptosis apparently occurs via caspase-3 activation, through the caspase-8 and mitochondrial pathways.

Key words: Apoptosis; Canine distemper virus; Caspases; Cerebellum; Lymph nodes; Real-time PCR

INTRODUCTION

Canine distemper virus (CDV) causes canine distemper (CD) in dogs and other carnivores and belongs to the genus *Morbillivirus* within the family Paramyxoviridae. The virus is a highly contagious pathogen that occurs worldwide (Blixenkroner-Moller et al., 1993; Pringle, 1999), and its infection in dogs generally induces a multisystemic disease (Griot et al., 2003). After aerosol infection, initial virus replication takes place in the lymphoid tissues of the upper respiratory tract. CDV-induced alterations of lymphoid tissue include thymus atrophy, depletion of B and T cells and inclusion bodies in reticular and lymphoid cells (Krakowka et al., 1980; Iwatsuki et al., 1995; Wunschmann et al., 2000). Canine distemper virus spreads, at approximately 10 days post-infection, from the primary replication sites to epithelial tissues and reaches the central nervous system, resulting in a demyelinating disease (Vandeveldt and Zurbriggen, 2005). In CD, immunosuppression followed by secondary infections is the leading cause of death (Krakowka et al., 1975).

A number of viruses have been shown to cause cell death by induction of apoptosis (Guo and Lu, 1998; Moro et al., 2003b), such as the human immunodeficiency virus (Banda et al., 1992) and the influenza virus (Takizawa et al., 1993). In CDV-infected dogs apoptosis was reported to occur *in vitro* and *in vivo* (Guo and Lu, 2000; Moro et al., 2003a). Moro et al. (2003b) and Kumagai et al. (2004) observed that CD causes apoptosis in the lymph nodes. Moro et al. (2003a) also observed apoptosis in the cerebellum, and Schobesberger et al. (2005) observed that CDV infection induced apoptosis of lymphocytes and monocytes. Apoptosis can be triggered by various physiological and pathological stimuli, and it is prevalent in several immunosuppressive diseases of humans and animals (Ameisen and Capron, 1991; Lam and Vasconcelos, 1994). There are two major pathways of apoptosis: the death receptor-mediated external signal pathway - extrinsic pathway, and mitochondrion-mediated internal signal pathway - intrinsic pathway (Finucane et al., 1999; Wajant, 2002). The most important effectors of apoptosis are cysteine aspartic acid-specific proteases (caspases), pro-apoptotic proteins, which participate in a tightly regulated proteolytic cascade (Slee et al., 2001; Adams and Cory, 2002). In many cell types, apoptosis is controlled by Bcl-2 family

members, which can be divided into two groups: anti-apoptotic and pro-apoptotic proteins (Adams and Cory, 1998). Anti-apoptotic protein, Bcl-2, acts to regulate the mitochondrial membrane potential and blocks the release of cytochrome-C and apoptosis inducing factor into the cytoplasm (Manon et al., 1997; Shimizu et al., 1998). Under various circumstances, the activity of the Bcl-2 protein may be regulated through caspase cleavage (Clem et al., 1998). The balance between pro-apoptotic and anti-apoptotic proteins is thought to determine cell death or survival by controlling apoptosis (Oltvai et al., 1993). Little is known about the apoptotic molecular mechanisms involved in CD disease pathogenesis *in vivo*. In this regard, the aim of the present study was to evaluate mRNA expression of pro-apoptotic Bax, caspase-3, -8 and -9, and anti-apoptotic Bcl-2, in different tissues of dogs naturally infected with CDV and in non-infected dogs, in order to understand the apoptotic pathway induced in CD disease.

MATERIAL AND METHODS

Animals

Blood sample collection

Blood samples (5 mL) from 20 domestic dogs presenting clinical signs suggesting CD (including listlessness, decreased appetite, fever, and oculonasal discharge), and 12 domestic dogs with no clinical signs of CD were collected. An aliquot of 1 mL was immediately placed on dry ice, and transferred to a -80°C freezer until use. A second aliquot was used for hematological analysis, performed in the clinical pathology laboratory at UFMG School of Veterinary Medicine. Dogs were of mixed breeds, ages, and sexes and had no signs of other infections. Blood samples were collected in two veterinary clinics from Belo Horizonte, MG, Brazil, after owner consent, and in the Center for Zoonoses Control (Centro de Controle de Zoonoses) of Belo Horizonte, MG, Brazil.

CDV diagnosis

Dogs were diagnosed for CDV using conventional gel-based reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) and checked again using real-time PCR quantitative diagnosis. After that, animals were divided into two groups: CDV positive (CDV+) and CDV negative (CDV-) animals.

Necropsies and tissue samples (cerebellum and lymph node)

Necropsies of 4 of 12 CDV+ animals were performed after euthanasia. Animals presented neurological and systemic clinical signs of CDV infection. Portions of the cerebellum and retropharyngeal lymph nodes were snap frozen in liquid nitrogen and stored at -80°C until DNA/RNA extraction and analysis. Control animals (N = 3) were provided by the Center of Zoonoses Control, and necropsy after euthanasia was performed and cerebellum and lymph nodes were submitted to the same DNA/RNA procedures.

Virus samples - positive control

Canine distemper virus vaccine samples (Onderstepoort and Rockborn) in Vero cells (African green monkey kidney) were used as positive controls. Samples were kindly supplied by Dr. Marilene Camargos from the Labovet Laboratory (Produtos Veterinários Ltda. - Feira de Santana, BA, Brazil).

DNA isolation and electrophoresis

Approximately 300 μ L peripheral blood, or 0.2 g cerebellum or lymphoid tissue was ground in 1 mL cell lysis buffer (320 mM sucrose; 10 mM Tris-HCl, pH 7.5; 1 M Tris-HCl, pH 7.5; 5 mM MgCl₂; 1% (v/v) Triton X-100), centrifuged at 4000 rpm for 5 min and the supernatant discarded. Four hundred-microliter protein digestion buffer (10 mM Tris-HCl, pH 7.5; 10 mM EDTA, pH 8.0; 10 mM NaCl; 0.5% SDS and 20 mg/mL proteinase K) was added and incubated at 55°C for 2 h in a water bath. Samples were centrifuged at 13,000 rpm for 5 min and DNA extracted from the supernatant using ethanol precipitation. A DNA pool of 3 CDV- animals (for blood, lymph nodes and cerebellum), and 4 CDV+ animals (for blood, lymph nodes and cerebellum) was analyzed on 1.5% agarose gel by standard electrophoresis.

RNA isolation and reverse transcription

RNA was isolated from tissue (100 mg), peripheral blood (300 μ L) and Vero cell homogenate (300 mL) using acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction (Chomczynski and Sacchi, 2006). Samples were treated with the Turbo DNA-free kit (Ambion Inc., Foster, CA, USA). First-strand complementary DNA (cDNA) was synthesized from 2 μ g total RNA using the Superscript first-strand synthesis system (Invitrogen Inc., Carlsbad, CA, USA). After denaturing the template RNA and primers (25 pmol of each reverse oligonucleotide primer) at 70°C for 10 min, 40 U reverse transcriptase was added in the presence of RT buffer (50 mM KCl, 20 mM Tris-HCl, pH 8.4), 4 μ L dNTP mix (250 μ M each), 40 U RNase inhibitor and RNase-free water to complete the final volume. The reaction mixture (50 μ L) was incubated at 43°C for 1 h, then stopped at 4°C and used immediately for PCR or kept at -80°C until use.

RT-PCR

Canine distemper virus nucleocapsid cDNA and canine housekeeping gene S26 were amplified by conventional PCR, using positive control cDNA samples (infected Vero cells) and dog cDNA samples. Specific primers were designed for gel-based RT-PCR using the sequences obtained in GeneBank. Subsequently, all sequences were designed and analyzed using the Integrated DNA Technologies website program (<http://www.idtdna.com>), and specific primers that amplified a 319-bp amplicon for CDV and 75 bp for S26 were designed (Table 1). Exon 2 of rat angiotensinogen (AGT), which amplified a 298-bp amplicon was used as PCR control, using genomic DNA from rat. Conventional PCR occurred under the following cycling conditions: denaturation at 93°C for 1 min, annealing at 56°C for 1 min, and extension at 72°C for 1 min, for 40 cycles.

Table 1. PCR primers selected. Primers used for gel-based RT-PCR for CDV diagnosis (A), housekeeping gene S26 (B), and PCR control AGT (rat angiotensinogen; H). Primers used in real-time PCR for apoptosis related target genes (C, D, E, F and G), and normalizer gene S26 (B).

	Primers	Sequence of the nucleotides (nt)	Size (nt)	Fragment length
A	VCC01-F1	5'-CAG CAC CGT ACA TGG TTA TC-3'	20 nt	319 bp
	VCC02-R2	5'-TAG CAT AAC TCC AGA GCA ATG-3'	20 nt	
B	S26CF-F1	5'-CGT GCT TCC CAA GCT GTA CGT GA-3'	24 nt	75 bp
	S26CF-R2	5'-CGA TTC CGG ACT ACC TTG CTG TG-3'	23 nt	
C	CASP3BT/CF-F1	5'-TTC ATT ATT CAG GCC TGC CGA GG-3'	24 nt	83 bp
	CASP3BT/CF-R2	5'-TTC TGA CAG GCC ATG TCA TCC TCA-3'	24 nt	
D	CASP8CF-F1	5'-ACA AGG GCA TCA TCT ATG GCT CTG A-3'	25 nt	70 bp
	CASP8CF-R2	5'-CCA GTG AAG TAA GAG GTC AGC TCA T-3'	25 nt	
E	CASP9CF-F1	5'-TCA GTG ACG TCT GTG TTC AGG AGA-3'	24 nt	97 bp
	CASP9CF-R2	5'-TTG TTG ATG ATG AGG CAG TAG CCG-3'	24 nt	
F	BAXCF-F1	5'-TTC CGA GTG GCA GCT GAG ATG TTT-3'	24 nt	79 bp
	BAXCF-R2	5'-TGC TGG CAA AGT AGA AGA GGG CAA-3'	24 nt	
G	BCL2CF-F1	5'-CAT GCC AAG AGG GAA ACA CCA GAA-3'	24 nt	76 bp
	BCL2CF-R2	5'-GTG CTT TGC ATT CTT GGA TGA GGG-3'	24 nt	
H	AGT01	5'-TCC ACA GAT CCG TGA TGA CTC-3'	21 nt	298 bp
	AGT02	5'-GCA GCT CGC TGC CGA TCC TC-3'	20 nt	

Real-time PCR

Real-time PCR was carried out in an ABI Prism 7500 Sequence Detection System (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA), using the fluorescent dye Sybr® Green Master Mix (Applied Biosystems). PCR were set up in a dedicated room, and gloves, face masks, and barrier tips used for all work. All samples were run in duplicate on 96-well optical PCR plates in a final reaction volume of 25 µL. The PCR parameters were 1 cycle at 50°C for 2 min, 1 cycle at 95°C for 10 min, 40 cycles at 95°C for 15 s and 60°C for 1 min.

The primers used for PCR amplification of caspase-3, -8, -9, Bcl-2, Bax, S26, and CDV are listed in Table 1. The gene encoding the ribosomal protein S26 was used as an internal control to normalize target gene expression.

Specific primers were designed using the sequences obtained in GeneBank, through the Blast program (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/blast.cgi>). Subsequently, all sequences were designed and analyzed using the Integrated DNA Technologies website program (Table 1).

The specificity of PCR products was confirmed by the single peak dissociation curves and by acrylamide gel electrophoresis showing that amplicons had the predicted size. Relative gene expression was calculated by using the $2^{-\Delta\Delta CT}$ method, where CT is the threshold cycle (Livak and Schmittgen, 2001).

Statistical analysis

The PCR results were analyzed based on the ΔCT , which is the primary source of data variability (Yuan et al., 2006). The unpaired Student *t*-test was used to analyze expression levels of transcripts of the pro- and anti-apoptotic genes in peripheral blood, cerebellum and lymph nodes, comparing the groups of positive (CDV+) and negative (CDV-) animals. Statistical significance ($P < 0.05$) was determined with the *t*-test in GraphPad Prism 5.

RESULTS

RT-PCR

In the present study, we used RT-PCR to diagnosis CDV in 20 dogs presenting clinical signs suggesting CD and 12 dogs without any clinical signs of CDV infection. PCR results confirmed CDV positivity in 12 of 20 (60%) animals previously showing CD clinical signs, by amplification of a 319-bp fragment (Figure 1). Furthermore, 8 of 12 non-suspected animals were confirmed negative in both conventional and real-time PCR. The amplification of S26 (used as the normalizer), was observed in all samples (Figure 1). A total of 20 selected samples were then used for gene expression analysis of pro-apoptotic caspase-3, -8, -9 and Bax, and anti-apoptotic Bcl-2 targets by means of relative quantitative real-time PCR.

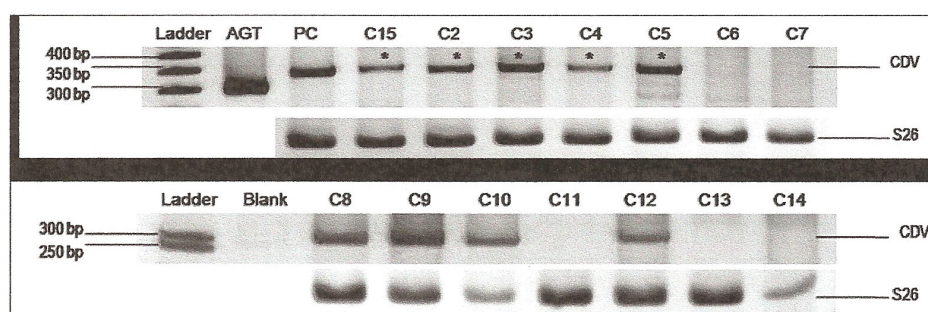


Figure 1. Typical canine distemper virus (CDV) gel-based conventional PCR diagnostic test of total blood using VCC01/VCC02 primers. Samples are from 12 clinically suspected animals (C1-C12) and 2 healthy animals (C13, C14). Three microliters of the amplification reaction was applied and visualized on a silver stained 8% polyacrylamide gel after electrophoresis at 100 V for 50 min. The CDV-specific amplicon of 319 bp is indicated by asterisk and the S26 75 bp normalizer is shown below each sample. Ladder = 50-bp DNA ladder (0.3 µg); AGT = rat angiotensinogen, 298-bp amplicon PCR control; PC = positive control Vero cells infected with CDV; Blank = no template, negative control.

Hematological analysis

The hemogram results for CDV- and CDV+ dogs did not present a significant difference in the absolute lymphocyte, neutrophil, eosinophil and monocyte counts or in total leukocyte counts ($P > 0.05$).

DNA electrophoresis

DNA from the cerebellum and retropharyngeal lymph node of infected animals that presented systemic and neurological CD signs showed the ladder pattern of DNA (Figure 2), and apoptosis was characterized by typical DNA fragmentation on agarose gel, while DNA from peripheral blood cells did not (Figure 2). Control animals showed more intact high molecular DNA than infected dogs, except when comparing blood samples.

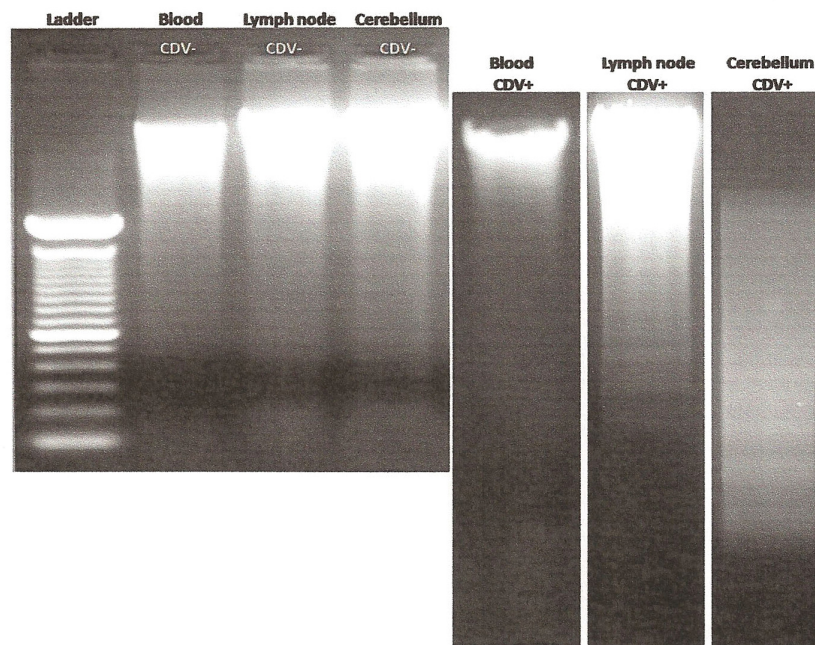


Figure 2. Typical agarose gel electrophoresis of DNA extracted from peripheral blood, lymph node and cerebellum control (canine distemper virus, CDV- / pool from 3 animals), and peripheral blood, lymph node and cerebellum of animals naturally infected with CDV (CDV+ / pool from 4 animals). Electrophoresis was performed on a 1.5% agarose gel, 1X TAE, 1 h at 100 V. Ladder = gene ruler - 100-bp DNA ladder (MBI); 20 μ L of each sample was used. Qualitative differences in high molecular DNA and in the ladder pattern of degradation are observed between controls and infected animals, except on peripheral blood.

Real-time PCR

Real-time PCR did not show statistically significant differences in peripheral blood samples from CDV+ (N = 12) and CDV- (N = 8) dogs in expression of caspase-3, -8, -9, Bax and Bcl-2 ($P > 0.05$). The expression of caspase-3 and -8 was significantly higher in the lymph nodes of CDV+ (N = 4) than in CDV- (N = 3) dogs (caspase-3: fold change = 3.29, 3.2 ± 0.4 ; caspase-8: fold change = 3.05, 3.0 ± 0.2 ; $P < 0.05$, Figure 3). Therefore, there were no statistically significant differences in the expression of caspase-9, Bax and Bcl-2 when comparing lymph nodes from CDV+ and CDV- dogs ($P > 0.05$). In addition, expression of caspase-3, -8, -9 and Bax was significantly higher in the cerebellum of CDV+ (N = 4) than in CDV- (N = 3) dogs (caspase-3: fold change = 17.47, 3.2 ± 0.4 ; caspase-8: fold change: 19.93, 19.74 ± 0.23 ; caspase-9: fold change = 1.97, 1.9 ± 0.1 ; Bax: fold change = 9.78, 9.7 ± 1.4 ; $P < 0.05$; Figure 4). Thus, as in lymph nodes, there were no statistically significant differences in the expression of Bcl-2 between the CDV+ and CDV- groups ($P > 0.05$). Dissociation curves were unique for each amplicon and confirmed gene target specificity.

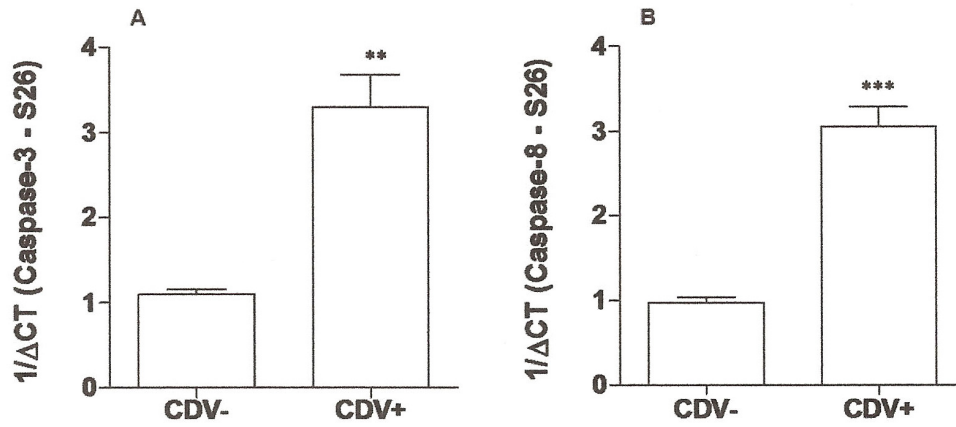


Figure 3. Expression of caspase-3 (panel A) and caspase-8 (panel B) mRNA in retropharyngeal lymph node of canine distemper virus (CDV+) dogs (N = 4) and CDV- (N = 3). For better clarity, data are plotted as means \pm SEM of $1/\Delta CT$ (where CT is the threshold cycle), which is directly proportional to the relative gene expression (fold change). **P < 0.01 and ***P < 0.001 (unpaired *t*-test, analysis performed in GraphPad Prism 5).

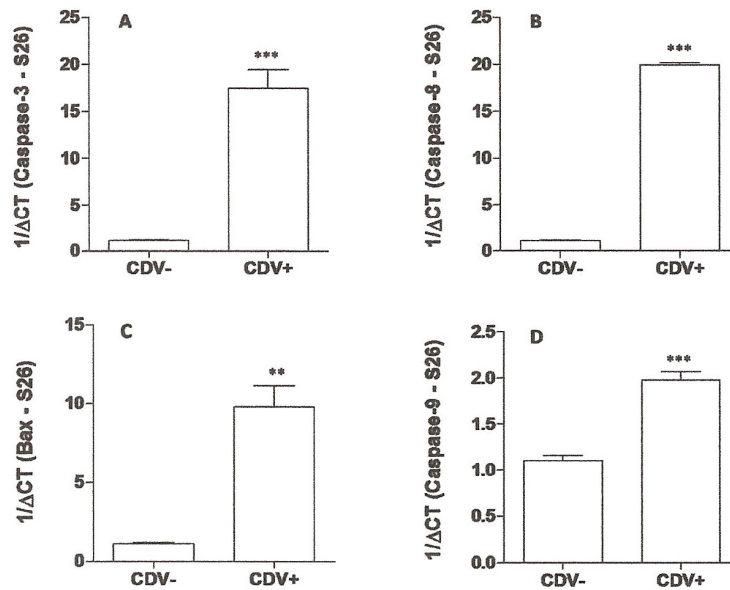


Figure 4. Expression of caspase-3 (panel A), caspase-8 (panel B), Bax (panel C), and caspase-9 (panel D) mRNA in cerebellum of canine distemper virus (CDV+) dogs (N = 4) and CDV- (N = 3). For better clarity, data are plotted as means \pm SEM of $1/\Delta CT$ (where CT is the threshold cycle), which is directly proportional to the relative gene expression (fold change). **P < 0.01 and ***P < 0.001 (unpaired *t*-test, analysis performed in GraphPad Prism 5).

DISCUSSION

The present study shows that CDV infection induces apoptosis in lymph node and in the cerebellum through enhanced expression of caspases. Moreover, we have shown that expression of caspase-3 and -8 is increased in the lymph nodes of CDV-infected animals compared to non-infected animals, and that the expression of caspase-3, -8, -9 and Bax is increased in the cerebellum of CDV-infected animals compared to those non-infected.

This study was based on 20 dogs that presented clinical signs suggesting CD and 12 dogs without any clinical signs for CD screened by conventional gel-based RT-PCR for CDV detection. PCR results confirmed CDV positivity in 12 of 20 (60%) of the suspected animals and negativity in 8 of 12 (67%) non-suspected animals. The use of RT-PCR for CDV detection has been demonstrated to be a useful tool in diagnosis and research, capable of detecting CDV in different specimens (Frisk et al., 1999).

Apoptosis plays an important role in lymphoid depletion induced by CDV. Apoptotic cells are seen in blood smears of CDV-infected animals, and CDV infection caused lymphocyte apoptosis at 3 days post-infection in spite of the absence of detectable leukocyte infection (Schobesberger et al., 2005). In our study, it was not possible to detect lymphocyte apoptosis in peripheral blood. There were no differences in mRNA expression of apoptotic genes, and no differences in hematological results comparing CDV+ and CDV- animals. Dogs used in our study were naturally infected by CDV, probably for longer than 1 week. Schobesberger et al. (2005) performed an experimental infection in dogs, and blood samples were analyzed at 3, 6 and 10 days post-infection. Clinical symptoms were checked daily, and it was observed that leukocyte numbers dropped in all animals when compared to the values before the challenge, but on 10 days post-infection leukocyte numbers were normal again. To begin to address changes in expression of apoptotic genes in peripheral blood samples, it was necessary to experimentally inoculate animals and analyze blood samples during the first week of infection.

Canine distemper virus infection induced apoptosis in lymphoid tissue (Moro et al., 2003b) and in the cerebellum (Moro et al., 2003a), but until now the molecular mechanisms of apoptosis *in vivo* have remained unknown. Recently, Kajita et al. (2006) demonstrated that CDV infection may induce apoptosis in Vero cells through caspase-3 and -8 activation. In that study, a gel-based semiquantitative RT-PCR analysis for Fas, Bcl-2 and Bax was performed. Their results demonstrated no changes in expression for either intrinsic anti-apoptotic pathway Bcl-2 or intrinsic pro-apoptotic pathway Bax mRNAs. However, the extrinsic pro-apoptotic pathway Fas receptor mRNA expression was increased, suggesting involvement of the extrinsic pathway in apoptosis induction by CDV in Vero cells.

This study presents the first data *in vivo* of the molecular apoptosis mechanisms induced by CDV. Results of caspase-3 and -8 mRNA expression, normalized to the invariant housekeeping gene S26, showed in the lymph node that caspase-3 in CDV+ dogs was 3.29 times higher than in CDV- dogs (Figure 3A). Similarly, our results showed that caspase-8 mRNA expression was also significantly increased in CDV+ animals by 3.05-fold compared to CDV- dogs (Figure 3B). In addition, results from cerebellum demonstrated that mRNA expression of caspase-3 (17.47-fold change), caspase-8 (19.93-fold change), caspase-9 (1.97-fold change) and Bax (9.78-fold change) were significantly increased in CDV-infected animals compared to non-infected animals (Figure 4A-D). Bcl-2 mRNA expression showed no significant change in CDV+ and CDV- dogs. Apoptosis normally occurs in lymphoid tissue,

rather than in cerebellum, which normally has no apoptosis. This could explain the difference in mRNA expression levels of apoptotic genes in lymph nodes compared to the cerebellum in CDV+ and CDV- animals.

In the lymph nodes and cerebellum of CDV+ dogs, DNA showed a greater degree of genomic fragmentation, suggesting a higher incidence of apoptosis in this tissue related to CDV infection, as observed in Figure 2. However, no genomic fragmentation indicating apoptosis was observed in blood samples of CDV- and in CDV+ dogs, and these data are consistent with the hematological and molecular results, which did not show any difference in leukocyte counts and mRNA expression when comparing blood samples from dogs infected and non-infected by CDV.

Recently, it has been reported that several viral proteins can induce apoptosis of infected cells, for example VP3 of CAV (Kawanishi, 1997), EIA of the adenovirus (Rao et al., 1992) and HA of the influenza virus (Olsen et al., 1996). Thus, it is not known if any CDV protein can induce apoptosis, or if apoptosis is a defense against CDV, or if apoptosis is a way for the virus to spread to other cells. Further study is needed to evaluate the CDV protein, its relation to apoptosis, and studies of apoptosis and host-parasite interaction. Based on the present findings *in vivo* and other studies *in vitro*, a very important conclusion is that CDV may induce apoptosis by the activation of caspase-3 through caspase-8 signaling, but in the cerebellum both pathways can be triggered together: caspase-3 through caspase-8 signaling, and caspase-3 through mitochondrial signaling.

ACKNOWLEDGMENTS

This study was approved by the Ethics Committee of the Department of Pathology at the Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG) in Brazil. We would like to thank the National Council for Scientific and Technological Development (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico - CNPq), and the State of Minas Gerais Research Foundation (Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais - FAPEMIG) for financial support, and Dr. Marilene Camargos for the CDV strains (Labovet Laboratory, Produtos Veterinários Ltda., Feira de Santana, BA, Brazil).

REFERENCES

- Adams JM and Cory S (1998). The Bcl-2 protein family: arbiters of cell survival. *Science* 281: 1322-1326.
- Adams JM and Cory S (2002). Apoptosomes: engines for caspase activation. *Curr. Opin. Cell Biol.* 14: 715-720.
- Ameisen JC and Capron A (1991). Cell dysfunction and depletion in AIDS: the programmed cell death hypothesis. *Immunol. Today* 12: 102-105.
- Banda NK, Bernier J, Kurahara DK, Kurrle R, et al. (1992). Crosslinking CD4 by human immunodeficiency virus gp120 primes T cells for activation-induced apoptosis. *J. Exp. Med.* 176: 1099-1106.
- Blixenkron-Moller M, Svansson V, Have P, Orvell C, et al. (1993). Studies on manifestations of canine distemper virus infection in an urban dog population. *Vet. Microbiol.* 37: 163-173.
- Chomczynski P and Sacchi N (2006). The single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction: twenty-something years on. *Nat. Protoc.* 1: 581-585.
- Clem RJ, Cheng EH, Karp CL, Kirsch DG, et al. (1998). Modulation of cell death by Bcl-XL through caspase interaction. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 95: 554-559.
- Finucane DM, Bossy-Wetzel E, Waterhouse NJ, Cotter TG, et al. (1999). Bax-induced caspase activation and apoptosis via cytochrome c release from mitochondria is inhibitable by Bcl-xL. *J. Biol. Chem.* 274: 2225-2233.
- Frisk AL, Konig M, Moritz A and Baumgartner W (1999). Detection of canine distemper virus nucleoprotein RNA by

- reverse transcription-PCR using serum, whole blood, and cerebrospinal fluid from dogs with distemper. *J. Clin. Microbiol.* 37: 3634-3643.
- Griot C, Vandeveld M, Schobesberger M and Zurbriggen A (2003). Canine distemper, a re-emerging morbillivirus with complex neuropathogenic mechanisms. *Anim. Health Res. Rev.* 4: 1-10.
- Guo A and Lu CP (1998). Regulation of cell apoptosis by virus infection. *Chinese J. Vet. Med.* 7: 46-47.
- Guo A and Lu C (2000). Canine distemper virus causes apoptosis of Vero cells. *J. Vet. Med. B Infect. Dis. Vet. Public Health* 47: 183-190.
- Iwatsuki K, Okita M, Ochikubo F, Gemma T, et al. (1995). Immunohistochemical analysis of the lymphoid organs of dogs naturally infected with canine distemper virus. *J. Comp. Pathol.* 113: 185-190.
- Kajita M, Katayama H, Murata T, Kai C, et al. (2006). Canine distemper virus induces apoptosis through caspase-3 and -8 activation in Vero cells. *J. Vet. Med. B Infect. Dis. Vet. Public Health* 53: 273-277.
- Kawanishi M (1997). Epstein-Barr virus BHRF1 protein protects intestine 407 epithelial cells from apoptosis induced by tumor necrosis factor alpha and anti-Fas antibody. *J. Virol.* 71: 3319-3322.
- Krakowka S, Cockerell G and Koestner A (1975). Effects of canine distemper virus infection on lymphoid function *in vitro* and *in vivo*. *Infect. Immun.* 11: 1069-1078.
- Krakowka S, Higgins RJ and Koestner A (1980). Canine distemper virus: review of structural and functional modulations in lymphoid tissues. *Am. J. Vet. Res.* 41: 284-292.
- Kumagai K, Yamaguchi R, Uchida K and Tateyama S (2004). Lymphoid apoptosis in acute canine distemper. *J. Vet. Med. Sci.* 66: 175-181.
- Lam KM and Vasconcelos AC (1994). Newcastle disease virus-induced apoptosis in chicken peripheral blood lymphocytes. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 44: 45-56.
- Livak KJ and Schmittgen TD (2001). Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods* 25: 402-408.
- Manon S, Chaudhuri B and Guerin M (1997). Release of cytochrome c and decrease of cytochrome c oxidase in Bax-expressing yeast cells, and prevention of these effects by coexpression of Bcl-xL. *FEBS Lett.* 415: 29-32.
- Moro L, Martins AS, Alves CM, Santos FG, et al. (2003a). Apoptosis in the cerebellum of dogs with distemper. *J. Vet. Med. B Infect. Dis. Vet. Public Health* 50: 221-225.
- Moro L, de Sousa MA, de Moraes AC, de Araujo Santos FG, et al. (2003b). Apoptosis in canine distemper. *Arch. Virol.* 148: 153-164.
- Olsen CW, Dybdahl-Sissoko N and Hinshaw VS (1996). The influence of calcium and reactive oxygen species on influenza virus-induced apoptosis. *Cell Death Differ.* 3: 191-197.
- Oltvai ZN, Milliman CL and Korsmeyer SJ (1993). Bcl-2 heterodimerizes *in vivo* with a conserved homolog, Bax, that accelerates programmed cell death. *Cell* 74: 609-619.
- Pringle CR (1999). Virus taxonomy - 1999. The universal system of virus taxonomy, updated to include the new proposals ratified by the International Committee on Taxonomy of Viruses during 1998. *Arch. Virol.* 144: 421-429.
- Rao L, Debbas M, Sabbatini P, Hockenbery D, et al. (1992). The adenovirus E1A proteins induce apoptosis, which is inhibited by the E1B 19-kDa and Bcl-2 proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 89: 7742-7746.
- Schobesberger M, Summerfield A, Doherr MG, Zurbriggen A, et al. (2005). Canine distemper virus-induced depletion of uninfected lymphocytes is associated with apoptosis. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 104: 33-44.
- Shimizu S, Eguchi Y, Kamiike W, Funahashi Y, et al. (1998). Bcl-2 prevents apoptotic mitochondrial dysfunction by regulating proton flux. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 95: 1455-1459.
- Slee EA, Adrain C and Martin SJ (2001). Executioner caspase-3, -6, and -7 perform distinct, non-redundant roles during the demolition phase of apoptosis. *J. Biol. Chem.* 276: 7320-7326.
- Takizawa T, Matsukawa S, Higuchi Y, Nakamura S, et al. (1993). Induction of programmed cell death (apoptosis) by influenza virus infection in tissue culture cells. *J. Gen. Virol.* 74 (Pt 11): 2347-2355.
- Vandeveld M and Zurbriggen A (2005). Demyelination in canine distemper virus infection: a review. *Acta Neuropathol.* 109: 56-68.
- Wajant H (2002). The Fas signaling pathway: more than a paradigm. *Science* 296: 1635-1636.
- Wunshmann A, Kremmer E and Baumgartner W (2000). Phenotypical characterization of T and B cell areas in lymphoid tissues of dogs with spontaneous distemper. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 73: 83-98.
- Yuan JS, Reed A, Chen F and Stewart CN Jr (2006). Statistical analysis of real-time PCR data. *BMC Bioinformatics* 7: 85.

CAPÍTULO II

MECANISMOS ENVOLVIDOS NA APOPTOSE INDUZIDA PELO VÍRUS DA CINOMOSE CANINA *IN VITRO*

RESUMO

A apoptose participa na patogênese de várias doenças infecciosas, incluindo as doenças causadas por vírus. O vírus da cinomose canina (VCC) causa uma doença sistêmica severa caracterizada por febre, sinais respiratórios e entéricos, e desordens nervosas. O VCC induz apoptose em tecido linfóide e cerebelo de cães infectados, assim como também em células Vero. Avaliou-se os mecanismos de indução da apoptose pelo VCC em células Vero, através de PCR em tempo real quantitativo, imunocitoquímica, citometria de fluxo e índice apoptótico através das colorações com DAPI, Giemsa e cristal violeta. A expressão dos genes pro-apoptóticos Caspase 3, Caspase 8, Caspase 9, receptor Fas e Bax, e anti-apoptótico Bcl-2, foi quantificada pelo PCR em tempo real comparando-se células Vero infectadas e não infectadas pelo VCC, nos tempos de 3, 6, 9, 15, 24, 30 e 48 horas de infecção. A imunolocalização das proteínas Caspase 3 e Caspase 8 em células Vero infectadas e em células controle no tempo de 24 horas de infecção foi realizada por imunocitoquímica. A quantificação das células em apoptose nos tempos de 3, 6, 9, 24, 30 e 48 horas pós-infecção pelo VCC foi avaliado por citometria de fluxo e índice apoptótico. Os resultados da PCR em tempo real revelaram que o VCC aumenta significativamente ($p < 0.05$) as expressões de Caspase 3, -8 e receptor Fas nas células Vero infectadas quando comparadas com o grupo controle. A reação de imunocitoquímica revelou a imunolocalização da Caspase 3 e -8 em células Vero após 24 horas de infecção pelo VCC, e os resultados de citometria de fluxo e de índice apoptótico demonstraram que a apoptose induzida pelo VCC é crescente com o tempo. Os resultados sugerem que o VCC induz apoptose em células Vero através da sinalização da Caspase iniciadora 8, que ativa a Caspase efetora 3, e as células entram em apoptose. No início da infecção há ativação da expressão dos genes Caspase 3 e Caspase 8, mas que a detecção morfológica da apoptose inicia-se após 9 horas de infecção.

ABSTRACT

Apoptosis has been implicated in the pathogenesis of many infectious diseases, including those caused by viruses. Canine distemper virus (CDV) causes a severe systemic disease characterized by fever, respiratory and enteric signs, and neurologic disorders. CDV causes apoptosis in lymphoid tissue and cerebellum of infected dogs, and also in Vero cells. The mechanisms of apoptosis induction in CDV-Lederle infected Vero cells was evaluated by quantitative real time PCR, immunocytochemistry, flow cytometry and by different staining protocols to perform an apoptotic index (DAPI, Giemsa and Violet Crystal). Pro-apoptotic genes Caspase 3, Caspase 8, Caspase 9, Fas receptor and Bax, and anti-apoptotic gene Bcl-2 expression were quantified by real time PCR comparing infected and non infected Vero cells at 3, 6, 9, 15, 24, 30 and 48 hours of infection. Caspase 3 and Caspase 8 protein immunolocalization were performed in Vero cells infected and non- infected with CDV at 24 hours. Flow cytometry of CDV infected and non- infected Vero cells at 3, 6, 9, 24, 30 and 48 hours was performed to quantified apoptotic cells, including cells in suspension. Finally, DAPI, Giemsa and Violet crystal staining were performed to quantified apoptotic cells at 3, 6, 9, 24, 30 and 48 hours. Real time PCR results revealed that CDV infection increased gene expressions of Caspase 3, Caspase 8 and Fas receptor compared to control group ($p < 0.05$). Immunocytochemistry revealed Caspase 3 and Caspase 8 immunolocalization in Vero cells infected with CDV. Flow cytometry results demonstrated that apoptosis in CDV infection occurs in a time depending way, increasing the number of apoptotic cells along the time line, and the same results were found in the apoptosis index by counting apoptotic cells staining with DAPI, Giemsa and violet crystal. These results suggest that CDV-Lederle induced apoptosis through Caspase 8 signaling rather than through mitochondrial signaling in the infected cells.

INTRODUÇÃO

1. O vírus da cinomose canina (VCC)

O vírus da cinomose canina (VCC) pertence ao gênero *Morbillivirus*, subfamília Paramixovirinae e à família Paramixoviridae (Norrby, Kovamees *et al.*, 1992). O VCC, um vírus de RNA fita simples negativa não segmentado, infecta diferentes tipos celulares, incluindo epitelial, mesenquimal, neuroendócrino, hematopoiéticas e células de vários órgãos e tecidos (Beineke, Puff *et al.*, 2009). É um vírus pantrópico (Baumgartner, Boyce *et al.*, 1995), mas existem várias cepas, cada qual com virulência e predileção tecidual diferentes, sendo algumas mais neurotrópicas que outras (Greene, 1990; Shell, 1990), sendo esse um importante fator que influencia no resultado final da lesão nervosa (Summers, Greisen *et al.*, 1984). O vírus da cinomose canina é um importante patógeno responsável por altas taxas de mortalidade, com letalidade inferior apenas à raiva canina (Shell, 1990; Tipold, 1992; Appel e Summers, 1995).

O espectro de hospedeiros do VCC, o qual tradicionalmente inclui várias famílias da ordem Carnivora, como *Canidae*, *Procyonidae*, *Mustelidae*, *Mephitidae*, *Hyaenidae*, *Viverridae* e *Felidae*, tem mudado nos últimos anos, e doenças parecidas com a cinomose tem sido observadas em grandes felinos no Parque Nacional da Tanzânia e nos zoológicos da América do Norte (Beineke, Puff *et al.*, 2009).

Amostras do VCC provenientes do campo não replicam-se bem *in vitro*, e a adaptação do vírus em cultura de tecido é trabalhosa. Macrófagos de cão são utilizados para a adaptação do vírus para crescimento *in vitro*, mas entretanto para a propagação do VCC adaptado às células (utilizado nas vacinas), células Vero são utilizadas. A replicação do VCC nas células Vero normalmente induz a formação de células gigantes (sincício) com corpúsculos de inclusão intracitoplasmático e intranuclear (Martella, Elia *et al.*, 2008).

O genoma de RNA do VCC, o qual contém aproximadamente 16 Kilobases (Kb), apresenta 6 genes. Esses genes codificam uma única proteína associada ao envelope viral, a proteína da Matriz (M), duas glicoproteínas (a Hemaglutinina H e a proteína de fusão F), duas proteínas associadas a transcriptase (a fosfoproteína P e a proteína grande L), e a proteína do nucleocapsídeo (N), que encapsula o RNA viral (Moss e Griffin, 2006) (**FIGURA 1a**). A proteína H é utilizada para a ligação a receptores das células no primeiro passo da infecção, e uma resposta imune adequada contra a proteína H pode prevenir a infecção pelo VCC (Von Messling, Zimmer *et al.*, 2001). Depois da ligação, a proteína F promove a fusão do envelope viral com a membrana da célula hospedeira, e também promove a fusão de membrana entre as células hospedeiras, com a

formação de sincícios (Lamb, Paterson *et al.*, 2006). A proteína M conecta as ribonucleoproteínas com as proteínas do envelope durante a montagem dos vírions, e a proteína P regula a transcrição, replicação e a eficiência na qual a nucleoproteína liga-se ao nucleocapsídeo (Moss e Griffin, 2006). O gene do nucleocapsídeo é considerado uma região conservada entre diferentes linhagens do VCC, enquanto o gene H é o que apresenta maior variabilidade genética e antigênica em relação aos outros genes do VCC, a sequência de aminoácidos pode variar até 10% entre as diferentes linhagens do vírus (Martella, Elia *et al.*, 2008). O arranjo linear e a posição dos genes no genoma do VCC são respectivamente: N, P, M, F, H e L (**FIGURA 1b**).

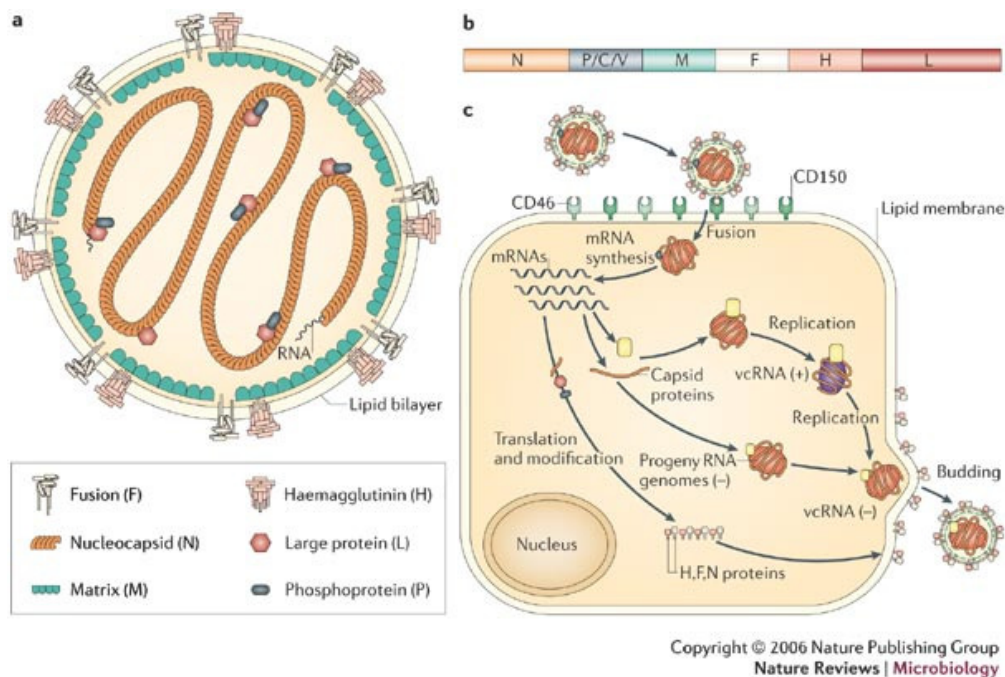


FIGURA 1 – Esquema representativo dos *Morbillivírus*. (a) Estrutura do vírus; (b) genoma viral e (c) a replicação viral. (Fonte: William J. Moss & Diane E. Griffin, Global measles elimination, 2006, Nature Reviews Microbiology, v. 4, 900–908).

Como em outros vírus envelopados, o VCC é rapidamente inativado no ambiente, e a principal via de transmissão ocorre por contato direto animal-animal ou pela exposição a aerossóis infectados (Martella, Elia *et al.*, 2008). O vírus pode ser detectado com altos títulos nas secreções e excreções do animal, incluindo urina (Elia, Decaro *et al.*, 2006).

A infecção pelo VCC em cães tem recebido grande atenção há vários anos pelo seu valor como modelo experimental animal para a infecção por morbilivírus no homem, como o vírus do sarampo (Krakowka, Ringler *et al.*, 1987). Além disso, a encefalomielite por cinomose constitui um

modelo experimental da esclerose múltipla, doença desmielinizante humana (Koestner, 1975) e do estudo da patogenia de lesões ósseas induzidas pelo paramixovírus (Baumgartner, Boyce *et al.*, 1995). A presença do RNA do VCC tem sido demonstrada em tecido ósseo humano na doença de Paget (Gordon, Bell *et al.*, 1993; Hoyland, Dixon *et al.*, 2003) e além disso, estudos epidemiológicos sugerem um papel etiológico do morbilivírus canino em alterações ósseas no homem (O'driscoll e Anderson, 1985).

Nas infecções por morbilivírus observa-se um fenômeno de susceptibilidade relacionado com a idade, onde os indivíduos mais jovens são mais severamente acometidos (Svansson, Blixenkrone-Moller *et al.*, 1993). Esse fenômeno é também observado nas infecções pelo VCC, onde entre os cães gnotobióticos infectados com menos de uma semana de idade, 85% morrem de encefalite fulminante duas a cinco semanas após a infecção (Krakowka e Koestner, 1976). Apesar de ser mais comum em cães com menos de um ano de idade, a doença também acomete os adultos (Tipold, 1992). Krakowka & Koestner (1976) sugerem que a imaturidade fisiológica do sistema imune dos cães neonatos possa ser a responsável por essa maior susceptibilidade à infecção pelo VCC.

2. A cinomose canina (CC)

A cinomose canina (CC) é uma doença contagiosa, sistêmica, febril e viral, que acarreta alterações dos sistemas respiratório, gastrointestinal e nervoso central (Appel e Summers, 1995). Uma das características mais importantes da CC é a imunossupressão que se desenvolve no animal, tornando-o susceptível a uma série de infecções secundárias (Appel, 1969; Krakowka, Higgins e Koestner, 1980; Svansson, Blixenkrone-Moller *et al.*, 1993).

A introdução de vacinas de vírus atenuado na década de 1950 e o seu extensivo uso ajudaram grandemente a manter a doença sobre controle (Appel, 1987; Appel e Summers, 1995). Inesperadamente, a incidência das doenças relacionadas ao VCC na população canina tem aumentado no mundo nas últimas décadas, e vários episódios de cinomose canina em animais vacinados tem sido relatados (Blixenkrone-Moller, Svansson *et al.*, 1993; Decaro, Camero *et al.*, 2004).

Flutuações temporais na prevalência da doença tem sido observadas, com um aumento da frequência durante o inverno (Martella, Elia *et al.*, 2008).

2.1. Patogenia

O vírus está presente em todas as secreções dos animais infectados durante a fase sistêmica da doença e a transmissão natural é usualmente pela inalação de gotículas contaminadas (Greene, 1990). A transmissão pode também ocorrer via transplacentária (Krakowka, Confer *et al.*, 1974). Após infectar animais susceptíveis, o VCC infecta e se replica em monócitos e macrófagos localizados ao longo do epitélio respiratório (Krakowka, Higgins e Metzler, 1980) e se dissemina até o tecido linfático local (Appel, 1969). Em 24 horas, o vírus é encontrado nos linfonodos bronquiais e tonsilas; em seis dias, todos os tecidos linfáticos já se mostram infectados e desenvolve-se viremia (Appel, 1969) (**FIGURA 2**). Entre cinco a sete dias após a infecção o vírus já é observado em células da medula e tecido ósseos (Baumgartner, Boyce *et al.*, 1995). No sexto dia após a infecção, o vírus é encontrado em leucócitos no sangue circulante (Appel, 1969). Porém, o vírus pode ser encontrado no sangue dos animais tão cedo quanto 2-3 dias após a infecção (Krakowka, Higgins e Metzler, 1980). Em casos fatais, antígenos virais estão presentes nos leucócitos desde a primeira semana de infecção até a morte (Krakowka, Ringler *et al.*, 1987). Segundo os mesmos autores, nos cães que sobrevivem à infecção, os leucócitos permanecem infectados por somente uma a três semanas. Entre seis e nove dias após a infecção, o vírus se espalha dos tecidos linfáticos para as estruturas epiteliais e células mesenquimais (Appel, 1969). Isso provavelmente ocorre em qualquer animal independentemente das conseqüências da doença (Krakowka, Higgins e Metzler, 1980). Defesas inespecíficas tais como mucosas íntegras, sistema fagocitário atuante, nutrição adequada, entre outros, também contribuem na resolução da cinomose. Os cães que não produzem anticorpos neutralizantes, morrem (Iwatsuki, Okita *et al.*, 1995).

Quanto à imunidade celular, Krakowka *et al.* (1980) sugerem que os linfócitos T citotóxicos provavelmente lisam, matam ou inativam células-alvo infectadas pelo VCC, reduzindo assim a fonte interna de infecção viral. Se o vírus atinge células epiteliais e neurônios antes da formação de níveis de anticorpos protetores, então o vírus persiste a despeito dos anticorpos, a menos que a célula seja destruída. Tal persistência do vírus pode explicar a encefalite tardia ou a hiperqueratose dos coxins plantares nos quais o vírus fica restrito aos neurônios e substância branca do encéfalo e células epidérmicas (Appel, 1969).

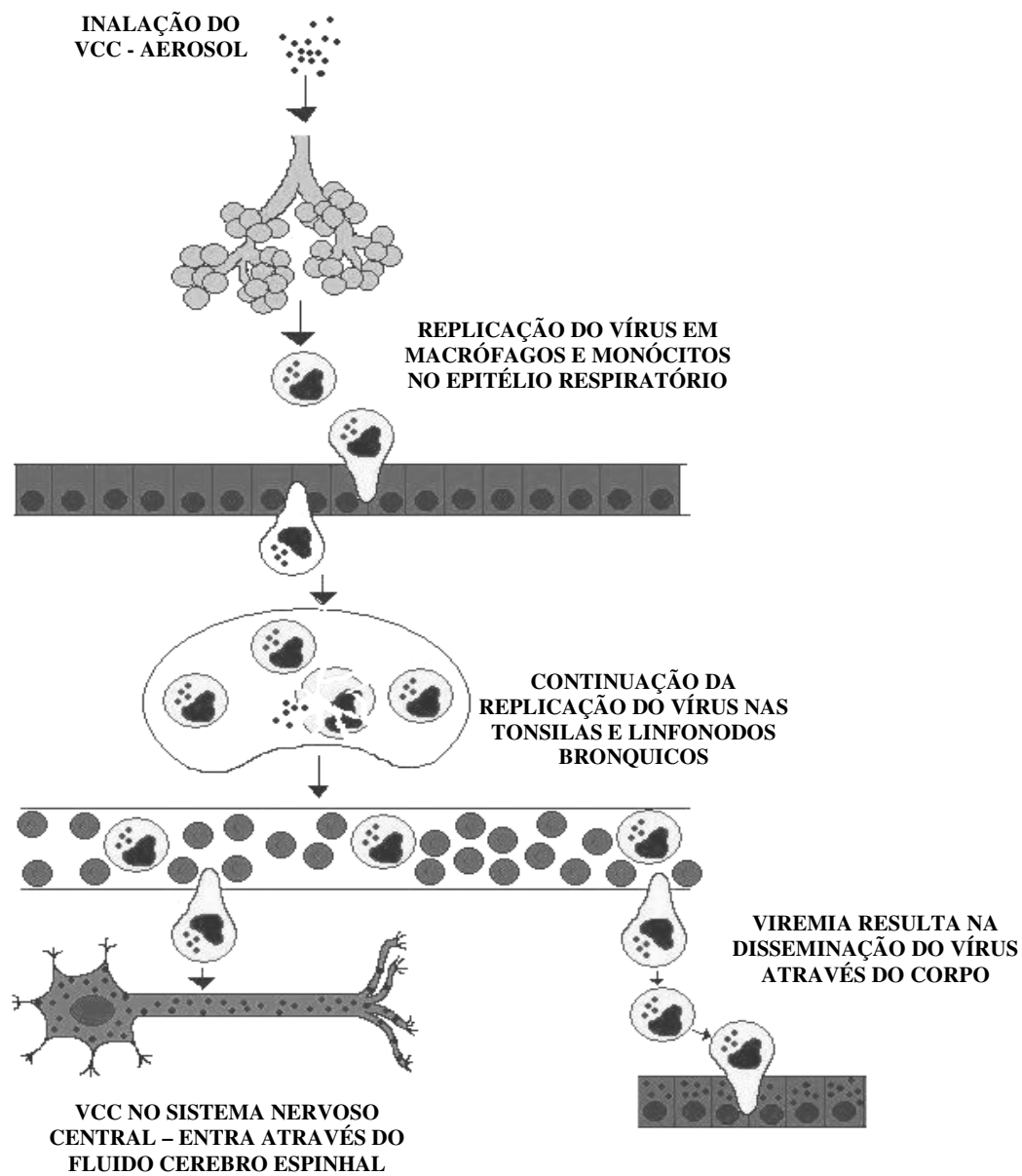


FIGURA 2 – Patogenia do VCC. Via de entrada e de proliferação do vírus. (Fonte: <http://cheval.vet.gla.ac.uk/vetscape/vet-x/lions/>, Professor Norman Weight, Glasgow Veterinary School, adaptado).

2.2. Diagnóstico

A infecção pelo VCC deve ser considerada no diagnóstico de qualquer condição febril em filhotes com sintomas multisistêmicos, que tenha uma história de vacinações inadequadas e possibilidades de exposição ao vírus. Vários testes laboratoriais estão disponíveis para confirmar a infecção pelo VCC. Imunofluorescência direta (IFD) em esfregaços conjuntivais, nasais e vaginais não é sensível e pode detectar o vírus somente dentro de 3 semanas após a infecção, quando o vírus ainda está presente nas células epiteliais (Martella, Elia *et al.*, 2008).

Altos títulos de anticorpos contra o VCC podem ser detectados por vários meses após a vacinação, ou após infecção clínica ou subclínica, pela técnica de ELISA, neutralização viral ou imunofluorescência indireta (IFI). A imunoglobulina M (IgM) vírus-específica, persiste por no mínimo 3 meses após a infecção e pode ser reconhecida por ELISA e utilizada como marcação de infecção recente pelo vírus (Martella, Elia *et al.*, 2008).

O isolamento viral em cultivo celular a partir de amostras clínicas é muito trabalhoso. Diagnósticos moleculares, como RT-PCR convencional, RT-PCR *nested* e PCR em tempo real são sensíveis e específicos (Frisk, König *et al.*, 1999; Rzezutka e Mizak, 2002; Shin, Cho *et al.*, 2004; Elia, Decaro *et al.*, 2006; Saito, Alfieri *et al.*, 2006), sendo que a técnica de PCR em tempo real quantitativo é capaz de diagnosticar e quantificar o VCC até mesmo em animais sem suspeitas da infecção (Del Puerto, Vasconcelos, Moro, Alves *et al.*, 2010).

2.3. Tratamento

Não há medicamentos anti-virais ou agentes quimioterápicos de valor prático para o tratamento específico da cinomose em cães. Antibióticos de amplo espectro são indicados para o controle das infecções bacterianas secundárias, assim como líquidos, eletrólitos, vitaminas do complexo B e complementos nutricionais são indicados como terapia auxiliar. O tratamento da doença consiste em bons cuidados de enfermagem, com suporte nutricional, consumo de fluidos adequados e a manutenção da limpeza das descargas dos olhos e nariz (Birchard e Sherding, 2003; Martella, Elia *et al.*, 2008).

3. Morte celular

3.1. Necrose

A necrose, morte patológica ou acidental, é um processo passivo, catabólico e degenerativo. A célula é impedida de manter os processos vitais devido às lesões físicas ou químicas causadas por fatores externos, como temperaturas extremas, radiações, traumas, produtos tóxicos ou falta de O₂. As lesões podem ainda ter origem biológica, como nas infecções por bactérias ou vírus (Horta e Yong, 1999).

O primeiro sinal de necrose é a turbidez da mitocôndria, seguida pela turgidez da célula com rompimento da membrana plasmática e liberação dos constituintes do citoplasmas, como enzimas proteolíticas, levando a uma resposta inflamatória local (Huppertz, Frank *et al.*, 1999; Perez, 2002). Áreas de condensação da cromatina com dissolução lenta do núcleo (cariólise) e degradação aleatória do DNA, embora não tão intensa quando comparada com a apoptose, também estão presentes na necrose com produtos de degradação heterogêneos em tamanho (Darzynkiewicz, Juan *et al.*, 1997) (**FIGURA 3**).

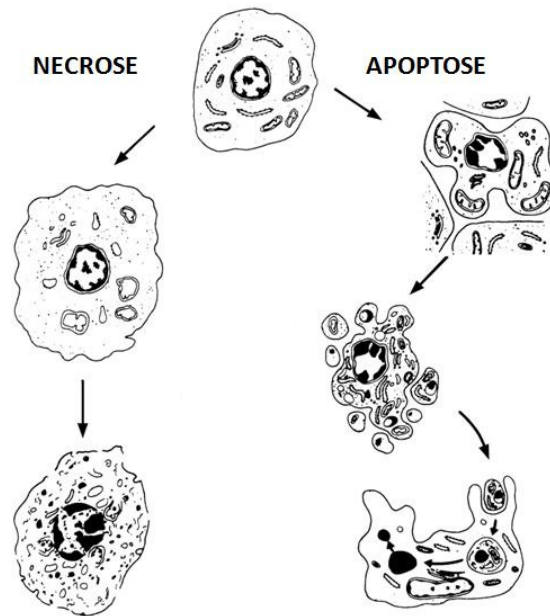


FIGURA 3 – Principais diferenças morfológicas entre necrose e apoptose. (Fonte: <http://www.imm.ki.se/sft/text/enews4.htm>, adaptado).

3.2. Apoptose

Ao contrário da necrose a apoptose é um tipo de morte celular dependente de energia e síntese protéica (Kerr e Searle, 1972). Em organismos multicelulares a homeostase é mantida através do balanço entre proliferação celular e apoptose (Li e Yuan, 2008). A apoptose tem grande importância fisiológica ao participar no desenvolvimento embrionário e na organogênese, na

renovação de células epiteliais, na involução cíclica dos órgãos reprodutivos na senilidade, na hipotrofia induzida pela remoção de fatores de crescimento ou de hormônios, na involução de alguns órgãos e ainda na regressão de tumores (Kerr, 1999). Desta forma, é um tipo de morte desejável, programada e seletiva, que envolve células isoladas sendo regulada intrínseca e extrínsecamente (Mcconkey, 1993).

Morfológicamente ocorre redução do volume celular, condensação da cromatina (picnose), modificações no citoesqueleto com formação de bolhas (“blebbings”), fragmentação do DNA em regiões específicas (nucleossomos) e fragmentação de núcleos e organelas envoltos por membrana que formam os corpos apoptóticos (Wyllie, Kerr *et al.*, 1980; Alison e Sarraf, 1992) (**FIGURA 3**).

A condensação da cromatina inicia-se na região periférica do núcleo, se assemelhando à meia lua ou ferradura de cavalo. O DNA picnótico exibe uma hipercondensação corando-se intensamente com sondas fluorescentes. O envelope nuclear desintegra-se, e as lamininas sofrem degradação proteolítica, seguida de fragmentação do núcleo (cariorrhexis) (Darzynkiewicz, Juan *et al.*, 1997).

A ativação de nucleases é a responsável pela clivagem do DNA entre os nucleossomos gerando fragmentos de 200 pares de bases ou múltiplos deles, o que permite que o DNA de uma célula apoptótica tenha forma de “escada” quando analisado em eletroforese de gel de agarose (Saraste, 1999).

Além da preservação da integridade estrutural e funcional da membrana plasmática na fase inicial da apoptose há também preservação das organelas celulares (mitocôndria e lisossomos). Ocorre também mobilização do íon cálcio intracelular, diminuição de microtúbulos e desorganização de fosfolípidos na membrana plasmática, permitindo a translocação de fosfatidilserina (PS) da superfície interna da membrana para a superfície externa (Darzynkiewicz, Juan *et al.*, 1997).

3.2.1. Vias de ativação da apoptose

Um dos principais passos da apoptose é a ativação das caspases, as quais medeiam a maioria das mudanças morfológicas observadas no processo. As caspases são proteases do tipo cisteína que desempenham um papel fundamental nas clivagens proteolíticas do processo apoptótico (Chang e Yang, 2000; Grutter, 2000). Estas proteínas são sintetizadas na sua forma inativa (pró-caspases) e são ativadas (caspases) após sinais de morte celular (Spanos, Rice *et al.*, 2002).

Atualmente há descrito 12 tipos de caspases em mamíferos classificadas em dois principais grupos: Caspases iniciadoras (Caspases -1, -2, -4, -5, -8, -9, -10, -11 e -12) e Caspases efetoras

(Caspases 3, -6 e -7). As caspases iniciadoras possuem um prodomínio longo que contém uma região de interação proteína-proteína, que pode ser o domínio DED (domínio efetor de morte) ou o CARD (domínio de recrutamento de caspase) (**FIGURA 4**). As caspases efetoras com um prodomínio curto (**FIGURA 4**) desempenham um papel na fase de execução clivando vários tipos de substratos celulares, e são tipicamente ativadas pelas caspases iniciadoras, que iniciam o processo de morte. Após a ativação das caspases efetoras o mecanismo de ativação da apoptose torna-se irreversível (Li e Yuan, 2008). A Caspase 3 ativa participa da clivagem de várias proteínas envolvidas no reparo do DNA (PARP), ciclo celular (cdc 27), citoesqueleto e organização nuclear (ICAD e CAD) (Chang e Yang, 2000; Grutter, 2000).

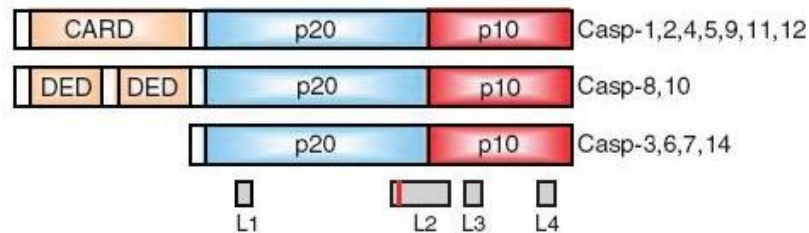


FIGURA 4 – Estrutura e organização dos domínios das caspases de mamíferos, e a localização dos centros catalíticos (L1-L4). (Fonte: J. Li and J. Yuan, Caspases in apoptosis and beyond, 2008, Oncogene, v. 27, 6194–6206).

Porém, a apoptose pode também ocorrer independentemente da ativação de caspases (Donovan e Cotter, 2004). O gene p53 está envolvido na regulação do ciclo celular, no reparo do DNA e na apoptose (Schuler, Bossy-Wetzel *et al.*, 2000). Entretanto, alguns modelos de estudo têm identificado vias de apoptose independentes de p53.

Para melhor compreensão pode-se dividir a ativação da apoptose em duas vias: a via extracelular (via extrínseca) e a intracelular (via intrínseca).

A via extrínseca da apoptose, também conhecida como “via do receptor de morte” é iniciada por sinais externos à célula, como radicais livres, agentes químicos, físicos ou biológicos que vão estimular os receptores da superfície celular. Os receptores de morte são proteínas da família transmembrana tipo I, caracterizados pela presença de repetições ricas em cisteína no domínio extracelular e pelo módulo de interação proteína-proteína conhecido como domínio de morte (DD)

(FIGURA 5). Os membros da família de receptores de morte incluem o receptor do fator de morte tumoral 1 (TNFR1 – também conhecido como DR1, CD120a, p55 e p60), Fas (também conhecido como DR2, APO-1 e CD95), DR3 (também conhecido como APO-3, LARD, TRAMP e WSL1), receptor relacionado ao ligante indutor de apoptose TNF 1 (TRAILR1 – também conhecido como DR4 e APO-2), TRAILR2 (também conhecido como DR5, KILLER e TRICK2), DR6, receptor ectodisplasina A (EDAR) e receptor do fator de crescimento do nervo (Lavrik, Golks *et al.*, 2005).

A ligação ao receptor de morte do ligante (como por exemplo o receptor Fas e seu ligante FasL), cliva a pró-Caspase 8 que forma Caspase 8, a forma ativa dessa proteína iniciadora, que ativa a Caspase 3, que é uma caspase efetora que ativa endonucleases que iniciam o processo de clivagem do DNA (Chang e Yang, 2000). **(FIGURA 6).**

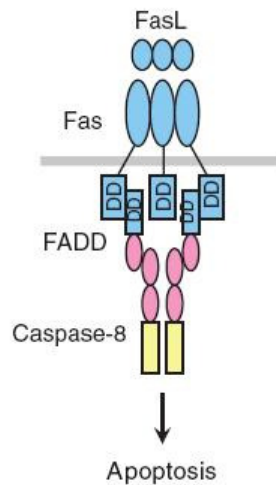


FIGURA 5 – Domínio de morte (DD) do receptor Fas recruta a proteína adaptadora FADD, que via seu domínio efetor de morte (DED), recruta e ativa Caspase 8. (Fonte: J. Li and J. Yuan, Caspases in apoptosis and beyond, 2008, Oncogene, v. 27, 6194–6206).

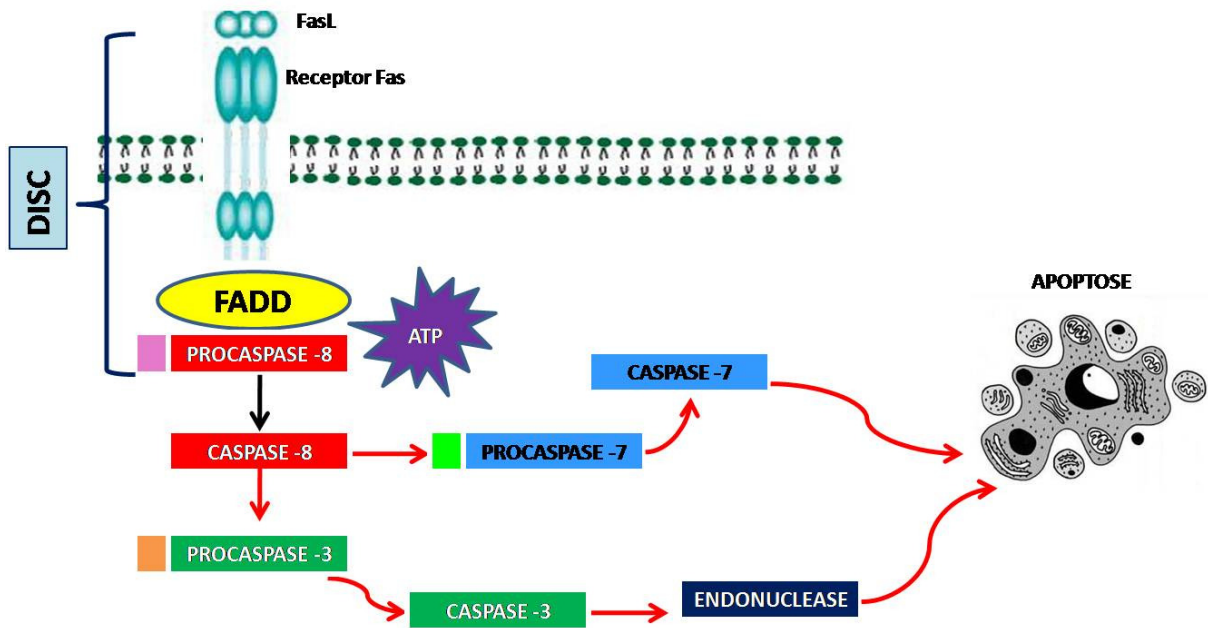


FIGURA 6 – Via de ativação das caspases. Representação esquemática da via extrínseca. Complexo sinalizador de indução de morte (DISC). (Fonte: Helen Lima Del Puerto).

A via intrínseca da apoptose, ou via mitocondrial, é ativada em resposta a vários tipos de estresse intracelular, incluindo a falta de fatores de crescimento, danos no DNA, estresse no retículo endoplasmático, dentre outros. O estresse celular leva a alterações morfofuncionais da mitocôndria com liberação do citocromo C, que acoplado à molécula adaptadora (Apaf – fator de ativação da apoptose), irá ativar a pró-Caspase 9, formando o apoptossomo, um complexo apoptossômico, responsável pela ativação da Caspase 9 que ativará a pro-Caspase 3 (Chang e Yang, 2000; Grutter, 2000) (**FIGURA 7**). A família de proteínas Bcl-2 consiste de membros anti-apoptóticos (ex. Bcl-2) e pró-apoptóticos (ex.: Bax, Bim) que determinam a sobrevivência ou morte para a célula (Tsujiimoto e Shimizu, 2000). Bax é um membro pró-apoptótico que forma homo e heterodímeros. A dimerização de Bax resulta em sua translocação (Gross, Jockel *et al.*, 1998) e inserção na membrana mitocondrial (Suzuki, Youle *et al.*, 2000) com conseqüente disfunção mitocondrial e liberação dos fatores apoptóticos, como citocromo C (Figura 3). Esses fatores induzem a cascata proteolítica das caspases, condensação da cromatina, e fragmentação do DNA, levando a morte celular (Wang, 2001; Adams, 2003; Cory, Edwards *et al.*, 2003). O fator de indução da apoptose (AIF) e a proteína Diablo (SMAC Diablo) são outros fatores mitocondriais que também vão levar a ativação da apoptose (Schultz, Chehab *et al.*, 2000).

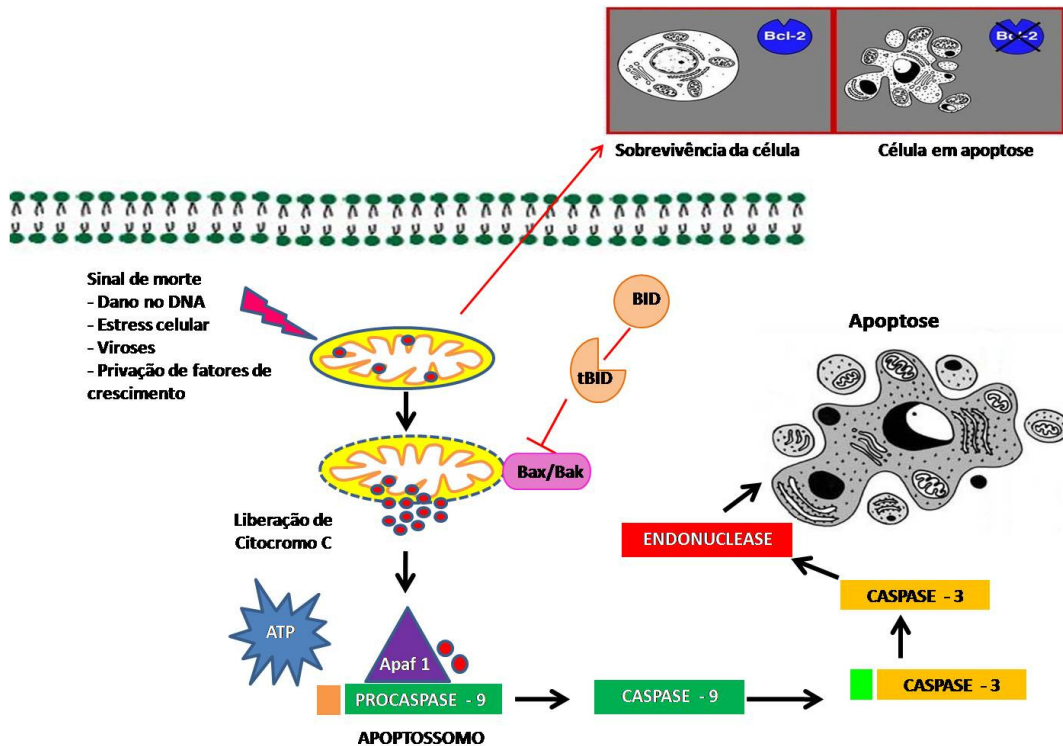


FIGURA 7 – Via de ativação das caspases. Representação esquemática da via intrínseca. Diversos estímulos ou a ativação de proteínas, alteram a permeabilidade da membrana mitocondrial, levando a liberação de citocromo c para o citosol e a formação do apoptossomo. Caspase 9 ativa propaga a cascata proteolítica de eventos futuros de ativação de caspases efetoras. (Fonte: Helen Lima Del Puerto).

3.2.2. Mecanismos de ativação da apoptose

Para melhor compreensão da apoptose é importante entender o mecanismo de ativação deste processo, bem como a cascata de proteínas específicas a ele relacionado. A regulação e execução da apoptose é atribuída principalmente a duas grandes famílias: A Bcl-2 e as Caspases (Alison e Sarraf, 1992; Adams, 2003).

3.2.2.1. Proteínas Bcl-2

Esta família está subdividida em dois grupos: pró-apoptóticas (Bax, Bad, Bid, Bcl-xS, Bak, Box, Bik, Blk, Bim, Hrk, BNIP3), localizadas principalmente na membrana externa da mitocôndria;

e anti-apoptóticas (Bcl-2, Bcl-x1, A1, Mcl-1), localizadas no envelope nuclear e no retículo endoplasmático (Petit, Zamzami *et al.*, 1997; Mignotte e Vayssiere, 1998). O balanço de proteínas pró e anti-apoptóticas é o que determina se a célula entrará ou não em apoptose (Spanos, Rice *et al.*, 2002).

Estas proteínas estão ligadas às mudanças na permeabilidade da membrana mitocondrial, porém também podem estar envolvidas na ativação das Caspases. A proteína Bcl-2 inibe a apoptose diretamente bloqueando as Caspases, e indiretamente impedindo a liberação de citocromo C (Mignotte e Vayssiere, 1998). O citocromo C é uma importante proteína que participa da ativação da apoptose via alteração da permeabilidade da membrana mitocondrial (Mignotte e Vayssiere, 1998).

O AIF (Fator de indução apoptótico) também é liberado pela mitocôndria, translocando-se para o núcleo e induzindo a condensação e a fragmentação nuclear (Chang e Yang, 2000).

3.2.2.2. Caspases

As caspases são proteases que utilizam a cisteína como grupo nucleofílico na clivagem de substratos, desencadeando a apoptose (Chang e Yang, 2000; Grutter, 2000). Estas proteases são sintetizadas como precursores inativos (pró-caspases) e são ativadas (caspases) somente quando a célula recebe sinal de morte (Li e Yuan, 2008).

Dentre as caspases efetoras, a Caspase 3 foi identificada como sendo uma protease que inativa a poli ADP ribose polimerase (PARP). A PARP atua no núcleo catalizando a ribosilação do ADP de histonas e de outras proteínas envolvidas no reparo do DNA. Uma das hipóteses é que a clivagem e a inativação desta proteína levam a uma injúria letal do DNA, contribuindo para o mecanismo de apoptose. Entretanto, foi demonstrado que células enucleadas, bem como células deficientes em PARP e outras proteínas de reparo, são capazes de sofrer morte celular programada apresentando sinais morfológicos clássicos de apoptose (Chang e Yang, 2000).

A fragmentação do DNA também é realizada por intermédio do complexo Fator de fragmentação do DNA, ou complexo Dnase regulado pela Caspase 3 (DFF). O DFF está presente na célula na forma inativa, formado pela subunidade inibitória (ICAD) e ativa (CAD). A pró-Caspase 3, ativada pelo apoptossomo (Apaf + citocromo C + Caspase 9) é responsável pela degradação do ICAD liberando a porção ativa do DFF, o qual no núcleo realiza a degradação e a condensação do DNA (Chang e Yang, 2000; Zhang, Wu *et al.*, 2004). Proteínas do citoesqueleto também são clivadas pela Caspase 3, produzindo alterações celulares típicas da apoptose, como a formação de “blebbings” e corpos apoptóticos (Saraste, 1999; Chang e Yang, 2000; Zhang, Wu *et al.*, 2004).

3.2.3. Métodos de Detecção da Apoptose

A apoptose representa um processo ativo de remoção celular que freqüentemente requer ativação gênica, síntese protéica e ativação de endonucleases (Cotton, Ikle *et al.*, 1997). Morfológicamente, este processo é caracterizado pela condensação da cromatina, diminuição do citoplasma, formação de vesículas a partir da membrana e finalmente, formação dos corpos apoptóticos (Badley, Pilon *et al.*, 2000).

Baseadas na detecção de tais alterações morfológicas, diferentes metodologias como eletroforese, microscopia eletrônica e citometria de fluxo, são amplamente empregadas na avaliação da apoptose (Schmid, Krall *et al.*, 1992; Koopman, Reutelingsperger *et al.*, 1994).

A fragmentação do DNA por endonucleases, por exemplo, é classicamente demonstrada por eletroforese como uma graduação típica de DNA (Koopman, Reutelingsperger *et al.*, 1994), enquanto o percentual de fragmentação pode ser determinado por métodos colorimétricos após a separação dos fragmentos por ultracentrifugação (Nicoletti, Migliorati *et al.*, 1991).

A principal falha desses métodos, posto que são desenvolvidos com todo o extrato nuclear, é a incapacidade em determinar diretamente o percentual de fragmentos nucleares e de reconhecer as células apoptóticas em populações celulares heterogêneas (Nicoletti, Migliorati *et al.*, 1991). Além disso, a clivagem internucleossomal detectada por eletroforese e por coloração histoquímica do núcleo pelo método de TUNEL (terminal deoxynucleotidyltransferase-mediated dUTP-biotin nick end labeling) (Lassus e Hibner, 1998; Loo e Rillema, 1998; Tonetti, Cortellini *et al.*, 1998), por exemplo, não permitem distinguir entre a célula necrótica e a apoptótica (Charriaut-Marlangue e Ben-Ari, 1995; McCarthy e Evan, 1998). Tal constatação deve-se ao fato de que os meios proteolíticos que operam na necrose podem também promover a ativação de enzimas que clivam o DNA em fragmentos internucleossomais indistinguíveis daqueles observados durante a apoptose (Dong, Saikumar *et al.*, 1997).

A utilização de microscopia eletrônica associada a corantes fluorescentes (Telford, King *et al.*, 1992; Schmid, Uittenbogaart *et al.*, 1994), embora permita detectar o processo apoptótico por criteriosa avaliação morfológica (Gougeon, Olivier *et al.*, 1991), torna-se inapropriado na quantificação da apoptose, posto que a marcação das células, geralmente realizada através de marcadores não vitais, ocorre somente após o dano da membrana (Koopman, Reutelingsperger *et al.*, 1994).

As metodologias que incluem a avaliação e quantificação das populações celulares por citometria de fluxo fornecem análises mais precisas e reproduzíveis do processo de morte celular

por apoptose (Nicoletti, Migliorati *et al.*, 1991; Olivier, 1995; Petit, Lecoeur *et al.*, 1995). Na citometria de fluxo, a redução do volume celular e o aumento da granulosidade das células apoptóticas podem ser avaliados a partir de modificações nos padrões FSC (forward scatter) e SSC (side scatter) de dispersão da luz, respectivamente (Brown, Sun *et al.*, 1993).

Entre os marcadores nucleares e corantes fluorescentes comumente utilizados nos ensaios de verificação e quantificação da apoptose por citometria de fluxo, destacam-se: iodeto de propídio, brometo de etídio, homodímero de etídio, 7-aminoactinomicina D (7-AAD), *acridine orange* (Lecoeur e Gougeon, 1996; Cotton, Ikle *et al.*, 1997), anexina-V-FITC e calceína AM (Gatti, Belletti *et al.*, 1998).

4. Vírus da cinomose canina e apoptose

Sabe-se que a infecção de células Vero pelo VCC causa alterações no citoesqueleto da célula (Howard, Eckert *et al.*, 1983), e que a ruptura do citoesqueleto induz apoptose mediada por Caspase 3 (Suria, Chau *et al.*, 1999). A proteína Bim, uma proteína pró-apoptótica e membro da família Bcl-2 atua monitorando o citoesqueleto, e quando alguns processos celulares vitais são perturbados, essa classe de proteínas atua como ligante de morte que contra-ataca a atividade das Bcl-2 anti-apoptóticas (Spanos, Rice *et al.*, 2002).

Trabalhos recentes avaliando a patogenia da CC em condições de infecção natural ou experimental demonstraram que a apoptose está envolvida na patogenia da imunossupressão (Moro, Martins, Alves, Santos, Nunes *et al.*, 2003; Kumagai, Yamaguchi *et al.*, 2004), assim como no processo de desmielinização característico da cinomose (Moro, Martins, Alves, Santos, Del Puerto *et al.*, 2003).

Guo *et al.* (2000) observaram que a infecção pelo VCC em células Vero induz apoptose, assim como Schobesberger *et al.* (2005) observaram que a depleção de linfócitos na infecção pelo VCC ocorre por apoptose (Guo e Lu, 2000; Schobesberger, Summerfield *et al.*, 2005). Kajita *et al.* (2006) relataram a ativação das Caspases 3 e -8 no processo de apoptose induzida pelo VCC em células Vero com 48 horas de infecção pelo vírus. Recentemente também foi revelado que a apoptose induzida pelo VCC em cães naturalmente infectados pelo vírus ativa a expressão gênica de Caspase 3 e Caspase 8 em tecido linfóide e cerebelo (Del Puerto, Vasconcelos, Moro, Milsted *et al.*, 2010).

Mas no entanto, pouco se sabe dos mecanismos iniciais de ativação da apoptose e suas vias, e a pesquisa com animais experimentalmente infectados é limitada por questões éticas. Portanto, o uso das células Vero como modelo experimental permite a avaliação dessas vias apoptóticas

durante uma linha de tempo, e com todas as variáveis sobre controle, o que não é possível com o animal, visto que na infecção natural as amostras se diferem no tempo e estágio da infecção introduzindo variáveis de difícil controle. O presente trabalho avaliou o processo de apoptose ao decorrer do tempo após a infecção de células Vero pelo vírus da cinomose canina.

OBJETIVOS

1.1. Objetivo geral

Avaliar os mecanismos envolvidos na apoptose induzida pelo vírus da cinomose canina na infecção de células Vero (*in vitro*), utilizando como modelo de estudo as células Vero.

1.2. Objetivos específicos

Para alcançar o objetivo geral, os seguintes objetivos específicos foram propostos:

- a) Avaliar a expressão das proteínas Caspase 3 e Caspase 8 através de imunocitoquímica de células Vero com 24 horas de infecção pelo vírus da cinomose canina.
- b) Avaliar os transcritos dos genes pró-apoptóticos: Caspase 3, Caspase 8, Caspase 9, Bax e receptor Fas; e os transcritos do gene anti-apoptótico: Bcl-2; em células Vero infectadas pelo vírus da cinomose canina nos tempos de 3, 6, 9, 24, 30 e 48 horas de infecção.
- c) Avaliar quantitativamente as células Vero em apoptose, pela contagem de células com pelo menos duas características morfológicas, após a infecção pelo vírus da cinomose canina nos tempos de 3, 6, 9, 24, 30 e 48 horas, em lamínulas coradas com DAPI, Giemsa e Cristal violeta.
- d) Avaliar e quantificar através de citometria de fluxo a apoptose de células Vero infectadas pelo vírus da cinomose canina após 3, 6, 9, 24, 30 e 48 horas de infecção.

MATERIAL E MÉTODOS

1. Cultivo de células Vero (células de rim de macaco verde africano)

Células da linhagem Vero (ATCC, CLL-81, USA), gentilmente cedidas pelo Professor Rômulo Cerqueira Leite, do Departamento de Medicina Veterinária Preventiva da Escola de Veterinária da UFMG, foram cultivadas em meio essencial mínimo (Modified Eagle's medium-MEM) (MEM –Sigma Aldrich Co., St. Louis, MO, U.S.A), suplementado com 5% de soro fetal bovino (SBF) (Sigma Aldrich Co., St. Louis, MO, U.S.A), 0,5% de anfotericina B (50µg) e 1% de penicilina e estreptomicina (200UI e 200µg, respectivamente) em garrafas de 75 e 150cm². As células foram incubadas em estufa com 5% de CO₂ a 37°C.

2. Cultivo do vírus da cinomose canina (VCC) em célula Vero

A amostra de VCC Lederle (ATCC VR-128™) com título de 2×10^5 , 5 TCID₅₀/mL foi cultivada em célula Vero em garrafas de 150 cm² de área de cultivo com uma concentração de 50.000 células/cm². A monocamada, com 70 a 90% de confluência, recebeu 5 mL do inóculo diluído em MEM contendo 0,5% de anfotericina B e 1% penicilina-estreptomicina na proporção de 1:2. Seguida uma hora de adsorção em estufa com 5% de CO₂ a 37°C e sendo homogeneizado a cada 15 min. O inóculo foi retirado e acrescentado MEM com 3% de SBF e mantido em estufa a 37°C por três dias. Após o aparecimento do efeito citopático (ECP) característico, com a formação de sincícios e destruição de aproximadamente 75% da monocamada, seguiu-se três ciclos de congelamento e descongelamento. O sobrenadante foi aliquoteado em criotubos de 1,0 mL, titulado e armazenado a – 80°C.

3. Titulação do vírus da cinomose canina (VCC)

A suspensão viral foi titulada em microplacas com 96 poços, com uma monocamada previamente preparada com uma concentração celular de 50.000 células/cm² (16.000 cel/poço). Foram feitas nove diluições seriadas decimais (10⁻¹ a 10⁻⁹) do vírus em MEM sem SBF e distribuídas, em octoduplicatas de cada diluição (50 µL). Três colunas foram reservadas para controle de célula. Adicionou-se 50µL de MEM com 5% de SBF, 0,5% de anfotericina B e 1% penicilina-estreptomicina. Após cinco dias de cultivo em estufa de CO₂ a 37°C a leitura foi realizada avaliando o ECP, formação de sincício, arredondamento celular e destruição da

monocamada. O título foi obtido (10^{-5} , 5TCID₅₀/mL) segundo Reed e Muench (Reed e Muench, 1938).

4. Imunocitoquímica

4.1. Cultivo das células Vero

Para o cultivo das células Vero foram utilizadas placas de 24 poços (TPP[®], Trasadingen, Switzerland), e lamínulas de vidro circular de 13 mm (Glasscyto, São Paulo, SP). As lamínulas foram tratadas com uma solução de álcool/éter (1:1) por 24 horas para a remoção de gordura, e em seguida as lamínulas foram autoclavadas para a esterilização. Em capela de fluxo laminar, as lamínulas foram colocadas em cada um dos poços da placa de 24 poços, e em seguida células Vero na densidade de 5×10^4 células/cm²/poço foram plaqueadas sobre as lamínulas de vidro.

Após a incubação das células por 24 horas a 37°C e 5% de CO₂ em MEM com 5% de SBF, e 0,5% de anfotericina B (50µg) e 1% de penicilina e estreptomicina (200UI e 200µg, respectivamente), a monocamada com 80-90% de confluência foram infectadas com o VCC-Lederle, na proporção de 3:1 (MEM sem SBF : VCC), em um volume final de 300 µL, a uma multiplicidade de infecção (MOI) de 0.1. Após 1 hora de adsorção do vírus nas células Vero o meio foi retirado e substituído por 1 ml de MEM com 5% de SBF. Em cada placa de 24 poços, 12 poços foram inoculados com o vírus da cinomose canina, e os outros 12 poços foram utilizados como controle, recebendo apenas o MEM sem soro. Após a infecção as placas foram retiradas no tempo de 24 horas. O meio foi retirado, e as células foram lavadas 2 X com PBS ++ (anexo). Em seguida acrescentou-se 400µL de paraformaldeído 4% em cada poço para a fixação das células, e em seguida a placa foi armazenadas à 4°C.

4.2. Cultivo das células HeLa

As células HeLa são células de tumor do colo uterino humano, e que na presença da droga cisplatina entra em apoptose (Liu, Xing *et al.*, 2005). Com o objetivo de utilizar um controle positivo para a imunocitoquímica cultivou-se células HeLa e adicionou-se cisplatina.

As células HeLa foram utilizadas para a padronização da reação de imunocitoquímica, visto que o anticorpo primário anti-Caspase 3 e 8 utilizado no trabalho eram para a localização da Caspases 3 e 8, e as células Vero, alvo em nosso estudo, são células de macaco.

Para o cultivo das células HeLa para os ensaios de imunocitoquímica foram utilizadas placas de 24 poços (TPP[®], Trasadingen, Switzerland), e lamínulas de vidro circular de 13 mm (Glasscyto,

São Paulo, SP). As lamínulas foram tratadas com uma solução de álcool/éter (1:1) por 24 horas para a remoção de gordura, e em seguida as lamínulas foram autoclavadas para a esterilização. Em capela de fluxo laminar as lamínulas foram colocadas em cada um dos poços da placa de 24 poços, e em seguida células HeLa na densidade de 5×10^4 células/cm²/poço foram plaqueadas sobre as lamínulas de vidro.

Após a incubação das células por 24 horas a 37°C e 5% de CO₂ em MEM com 5% de SBF, retirou-se o meio e adicionou-se sobre a monocamada, com 80-90% de confluência, a droga cisplatina a uma concentração de 5µg/mL em um volume final de 300 µL por poço. Após 1 hora adicionou-se aos poços 700 µL de MEM com 5% de SBF.

Células HeLa, cultivadas nas mesmas condições descritas acima, foram infectadas com o VCC-Lederle, na proporção de 3:1 (MEM sem soro : VCC), em um volume final de 300 µL, a uma multiplicidade de infecção (MOI) de 0.1. Após 1 hora de adsorção do vírus nas células HeLa o meio foi retirado e substituído por 1 ml de MEM com 5% de SBF.

Em cada placa de 24 poços, 8 poços foram tratados com a droga cisplatina, 8 poços foram inoculados com o VCC, e os outros 8 poços foram utilizados como controle. As placas foram retiradas no tempo de 24 horas, e após a remoção do meio as células foram lavadas 2 X com PBS +/- (anexo). Em seguida acrescentou-se 400µL de paraformoldeído 4% em cada poço para a fixação das células, e a placa foi armazenada a 4°C até a utilização das lamínulas na imunocitoquímica.

4.3. Sistema avidina-biotina-peroxidase

O método de imunocitoquímica utilizado foi o da avidina-biotina-peroxidase. O tecido (imunohistoquímica), ou as células (imunocitoquímica), são incubados com um anticorpo primário (mono ou policlonal) específico para a proteína ou peptídeo em estudo. Em seguida, aplica-se o anticorpo secundário (que tem o anticorpo primário como alvo) previamente ligado a uma molécula de biotina. Ao final, o tecido é incubado em uma solução contendo o complexo macromolecular formado por avidina e biotina complexada com peroxidase (complexo avidina-biotina-peroxidase, ou ABC). A avidina presente neste complexo atua como amplificador de efeito, pois cada uma de suas moléculas que se acopla à biotina do anticorpo secundário liga-se simultaneamente a três outras moléculas de biotina conjugadas à peroxidase do complexo ABC. A peroxidase age sobre um substrato, o cromógeno 3,3'-diaminobenzidina (DAB) catalizando a reação deste com o peróxido de hidrogênio, formando um produto insolúvel, corado em tonalidade amarronzada, que pode ser visualizado ao microscópio de luz. Desta forma, os sítios antigênicos

presentes nos tecidos são localizados indiretamente pela visualização deste produto de reação do anticorpo primário-anticorpo secundário-complexo peroxidase que se precipita no local onde se encontra o antígeno (FIGURA 8).

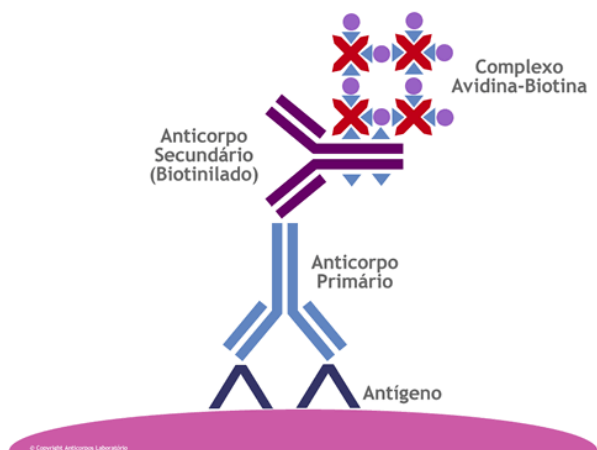


FIGURA 8 – Representação esquemática do princípio da imunocitoquímica pelo método da avidina-biotina-peroxidase. Observa-se o efeito amplificador da avidina que se liga à biotina do anticorpo secundário e a outras três moléculas de biotina do complexo ABC. A peroxidase reage com a 3,3'-diaminobenzidina (DAB) corando os sítios antigênicos. (Fonte: <http://www.anticorpos.com.br/exames/imuno-histoquimica>).

4.4. Protocolo da imunocitoquímica

As células fixadas com paraformaldeído 4% foram lavadas 3 vezes com TBS (anexo), e em seguida permeabilizadas com TBS+BSA 2%+Triton 0.1% (anexo) por 10 minutos. A primeira etapa foi de inibição da peroxidase endógena a fim de evitar sua reação com o substrato fora dos sítios antigênicos específicos. Para isso as lamínulas foram incubadas por 5 minutos com Peroxidase Block (NovocastraTM Peroxidase Detection System – RE7101), e em seguida lavadas 2 vezes com TBS. A segunda etapa foi a incubação com um bloqueador de proteína (NovocastraTM Peroxidase Detection System - Protein Block – RE7102) por 5 minutos, para suprimir ligações não específicas dos reagentes subsequentes. Posteriormente as células foram lavadas 2 vezes por 5 minutos com TBS.

A etapa seguinte foi a incubação das lamínulas com o anticorpo primário, específico para os antígenos pesquisados. Os anticorpos foram diluídos em TBS nas proporções sugeridas nas instruções de uso dos anticorpos (NovocastraTM). Nesta etapa as lamínulas foram viradas sobre 25

μL da solução do anticorpo, sobre um plástico *insufilm* esticado sobre a tampa de uma placa, e incubadas por 1 hora. Para evitar evaporação e ressecamento a incubação foi feita numa câmara úmida. A câmara que utilizamos consistiu em uma caixa plástica retangular rasa, forrada com papel umedecido em água destilada.

Findo o tempo de incubação com o anticorpo primário, as lâminulas foram lavadas 2 vezes por 5 minutos com TBS, e passou-se para a incubação com o anticorpo secundário biotilado (Novocastra™ Peroxidase Detection System – RE7103), aplicando-se 1 gota sobre um plástico *insufilm* esticado sobre a tampa de uma placa, as lamínulas foram viradas sobre a gota por 30 minutos a temperatura ambiente. Terminada a incubação e lavado o excedente de anticorpo secundário 2 vezes por 5 minutos com TBS, passamos à próxima etapa que foi a incubação das lamínulas por 30 minutos com Streptavidina-HRP (Novocastra™ Peroxidase Detection System – RE7104).

Finalmente, após 2 lavagens por 5 minutos em TBS, as lamínulas foram coradas por uma solução contendo 25 μL de 3,3'-diaminobenzidina (Cromógeno DAB) (Novocastra™ Peroxidase Detection System) em 475 μL de tampão do DAB (Novocastra™ Peroxidase Detection System – RE7106), preparado 50 minutos antes e mantida ao abrigo da luz. Concluída a imunocoloração, as lamínulas foram lavadas 2 vezes por 5 minutos em TBS, e montadas sobre uma lâmina com Entellan® (Merck, Darmstadt, Germany).

4.4.1. Coloração para Caspase 3 (CPP32)

Foi utilizado o anticorpo monoclonal anti-proteína Caspase 3 de mamífero produzido em camundongo pela Novocastra Laboratories (Novocastra Laboratories, Newcastle, UK). Com base nas especificações do anticorpo, as amostras foram incubadas com o anticorpo primário na concentração 1:50 durante 1 hora, à temperatura ambiente, em câmara úmida. O controle negativo consistiu em lamínulas incubados com TBS+BSA 2% (anexo). O anticorpo secundário biotilado anti-IgM de camundongo produzido em cabra, e anti-IgG de camundongo produzido em cavalo (Novocastra Laboratories, Newcastle, UK), em solução salina tamponada com Tris, com estabilizador de proteína e ProClin™ 950 a 0,35%, foi utilizado diretamente sobre as lamínulas, e incubado durante 30 minutos à temperatura ambiente, em câmara úmida.

Foi considerada reação positiva para a proteína Caspase 3, todas as células que apresentaram cor acastanhada com contornos nítidos e homogêneos no núcleo e citoplasma.

4.4.2. Coloração para Caspase 8

Foi utilizado o anticorpo monoclonal anti-proteína Caspase 8 humana produzido em camundongo pela Novocastra Laboratories (Novocastra Laboratories, Newcastle, UK). Com base nas especificações do anticorpo, as amostras foram incubadas com o anticorpo primário na concentração 1:30 durante 1 hora, à temperatura ambiente, em câmara úmida. O controle negativo consistiu em lamínulas incubadas com TBS+BSA 2% (anexo). O anticorpo secundário biotilado anti-IgM de camundongo produzido em cabra, e anti-IgG de camundongo produzido em cavalo (Novocastra Laboratories, Newcastle, UK), em solução salina tamponada com Tris, com estabilizador de proteína e ProClin™ 950 a 0,35%, foi utilizado diretamente sobre as lamínulas, e incubado durante 30 minutos à temperatura ambiente, em câmara úmida.

Foi considerada reação positiva para a proteína Caspase 8, todas as células que apresentaram cor acastanhada com contornos nítidos e homogêneos no citoplasma.

4.5. Leitura das lâminas

Posteriormente as células foram examinadas em microscópio de luz (Zeiss Axioplan 2, Alemanha), no Laboratório Professora Conceição Machado, no Departamento de Morfologia do ICB/UFMG, utilizando-se objetiva de 60 X 1,23 e 60x. As imagens foram capturadas utilizando-se o programa Axion Vision Release 4.7.2, através da câmara digital acoplada ao sistema MC 200 chip.

A coloração padrão nuclear e citoplasmática da Caspase 3, e citoplasmática da Caspase 8 permitiu distinguir células positivas e negativas. Os controles negativos foram utilizados para, comparativamente, detectar se houve coloração inespecífica.

5. PCR em tempo real

5.1. Cultivo das células Vero

As células Vero foram plaqueadas em placas de 6 poços (TPP®, Trasadingen, Switzerland) em uma densidade de 5×10^4 células/cm², e após terem crescido por 24 horas em MEM com 5% de SBF a monocamada com 80-90% de confluência foram infectadas com o VCC-Lederle, a uma multiplicidade de infecção (MOI) de 0.1. O vírus com o título de 10^5 era retirado do freezer -80°C e colocado imediatamente no gelo. Posteriormente, em um tubo eppendorf de 2 mL o vírus foi diluído em MEM sem SBF em uma proporção de 3:1 (MEM sem SBF : vírus), em um volume final de 500 µL por poço. O meio com 5% de SBF foi retirado dos poços, os poços lavados 2 vezes com

PBS 1X estéril, e em seguida 500 µL do vírus adicionado em cada poço. Como controle negativo era adicionado 500 µL de MEM sem SBF. Após 1 hora de adsorção do vírus o meio foi retirado dos poços das células infectadas e das células controle, e foram adicionados 1 mL de MEM com 5% de SBF.

A partir da troca do meio, foi iniciada a contagem de tempo, e as placas foram retiradas para a extração de RNA nos tempos de 3, 6, 9, 15, 24, 30 e 48 horas. (FIGURA 9).

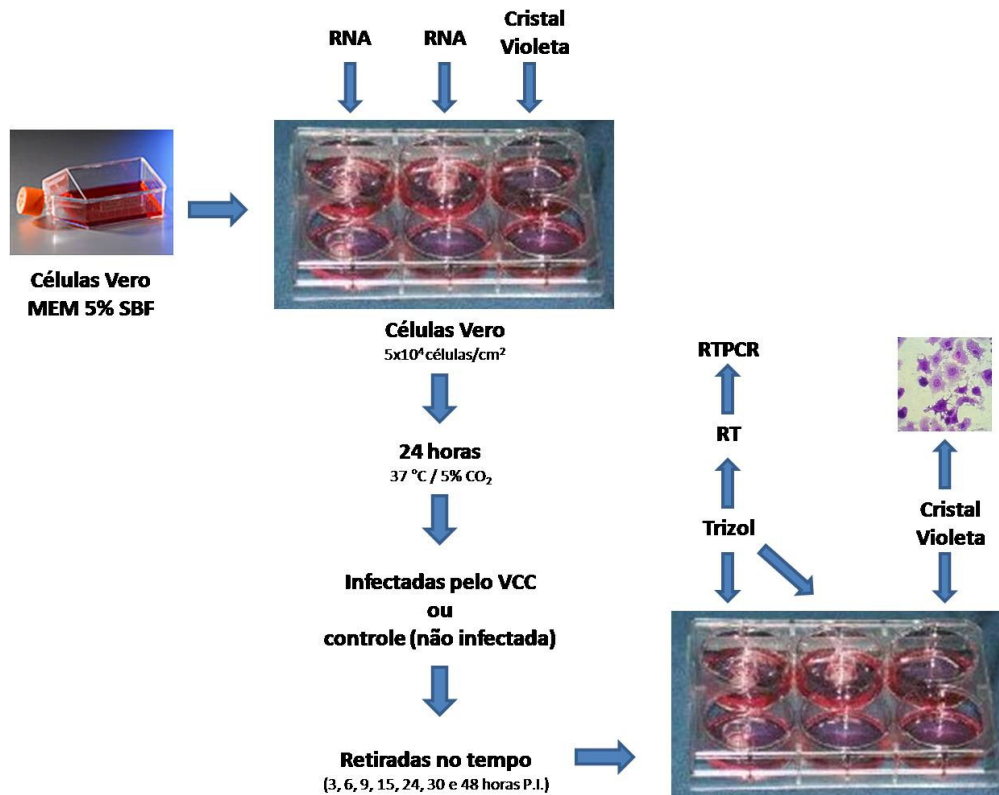


FIGURA 9 – Estratégia utilizada para os ensaios de infecção das células Vero para extração de RNA e coloração com cristal violeta. (Fonte: Helen Lima Del Puerto).

5.2. Extração de RNA total

Com o objetivo de avaliar a expressão de genes pró-apoptóticos (Caspase 3, -8, -9, Bax e receptor Fas), e anti-apoptóticos (Bcl-2), o RNA total foi isolado das células infectadas pelo VCC e das células controle.

Para a extração do RNA total o meio foi retirado dos poços e 500 µL de Trizol[®] (Invitrogen Life Technologies, Carlsbad, CA, USA) foi adicionado. Utilizando-se uma ponteira de 1000 µL

com barreira o poço foi lavado várias vezes com o Trizol[®] para garantir que as células se soltassem da placa, e em seguida transferido para o segundo poço que também foi lavado várias vezes com o Trizol[®]. O volume final de 1000 µL foi transferido para um tubo eppendorf de 2 mL e armazenado no gelo. Todo esse procedimento foi realizado na capela de fluxo laminar para evitar contaminações.

Posteriormente, o RNA total foi isolado das células utilizando-se o protocolo para o reagente Trizol[®] (Invitrogen Life Technologies, Carlsbad, CA, USA), sem modificações. Ao término do protocolo o RNA total foi quantificado no NanoDrop (Thermo Fisher Scientific, Wilmington, Delaware, USA), utilizando-se uma alíquota de 1 µL. Com o objetivo de eliminar uma possível contaminação por DNA genômico, as amostras de RNA foram tratadas com TURBO DNA-free kit (Ambion Inc., Foster, California, USA), e em seguida requantificadas no NanoDrop.

5.3. Síntese do cDNA pela transcrição reversa (RT)

A síntese do cDNA foi feita a partir de 2 µg de RNA total em 60µL de volume da reação final (33 ng RNA/µL), utilizando oligonucleotídeos complementares reversos (anti-senso) ao RNAm dos genes alvos (**TABELA 1**). O RNA foi inicialmente desnaturado a 70°C por 10 minutos juntamente com os iniciadores reversos (25 pmols de cada) (**TABELA 1**). Em seguida foi incubado com a transcriptase reversa na presença do tampão RT (KCl 50 mM, Tris-HCl 20 mM, pH 8,4), 4 µL de dNTP mix (250 µM de cada), 40 U de inibidor de RNase e água livre de RNase para completar o volume final. A reação foi incubada (60 µL) a 43°C por 1 hora, finalizada a 4°C e utilizada imediatamente para a PCR ou armazenada a -80°C até o uso. Todos os reagentes foram provenientes da Invitrogen[™] (SuperScript[™] First-Strand Synthesis System for RT-PCR).

5.4. Oligonucleotídeos Específicos

Os oligonucleotídeos iniciadores designados para a transcrição reversa, PCR convencional e PCR em tempo real foram por nós estudados e selecionados com base na análise da sequência descrita no GeneBank, obtida através do Blast (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/blast.cgi>). As sequências foram posteriormente analisadas através do site da empresa IDT – Integrated DNA technologies (<http://www.idtdna.com>) que permitiu a elaboração dos iniciadores para as regiões alvo de cada gene de acordo com as nossas especificações para as condições de cada iniciador. (**TABELA 1**)

Os iniciadores foram sintetizados pela Invitrogen, recebidos liofilizados, e em seguida dissolvidos em H₂O estéril-filtrada para alíquotas com uma concentração final de 100 pmol/µl

(concentração para estoque), em seguida diluídas para 10 pmol/ μ l (concentração de uso para a PCR convencional), e diluídas para 1 pmol/ μ l (concentração de uso para a PCR em tempo real), no dia da PCR em tempo real. Para o aliquotamento dos iniciadores foram utilizadas ponteiras com barreira, e todo o manuseio ocorreu em capela de fluxo não utilizada para manuseio de fragmentos de PCR.

A localização e seqüência dos oligonucleotídeos sintetizados estão apresentados na **TABELA 1**.

TABELA 1. Oligonucleotídeos iniciadores utilizados para a reação de PCR para a amplificação específica do cDNA do nucleocapsídeo do VCC e dos genes alvos relacionados a apoptose.

Iniciadores	Sequência de nucleotídeos (nt)	Tamanho	Fragmento amplificado
VCC02 (anti-senso)	5'-TAG CAT AAC TCC AGA GCA ATG-3'	20 nt	319 pb
VCC01 (senso)	5'-CAG CAC CGT ACA TGG TTA TC-3'	20 nt	
REVVCCIN (anti-senso)	5'-TAG CAT AAC TCC AGA GCA ATG-3'	21 nt	83 pb
BCL2CF-F1 (senso)	5'- CAT GCC AAG AGG GAA ACA CCA GAA - 3'	24 nt	76 pb
BCL2CF-R2 (anti-senso)	5'- GTG CTT TGC ATT CTT GGA TGA GGG - 3'	24 nt	
CASP3-F1 (senso)	5'- TTC ATT ATT CAG GCC TGC CGA GG -3'	24 nt	83 pb
CASP3-R2 (anti-senso)	5'- TTC TGA CAG GCC ATG TCA TCC TCA -3'	24 nt	
CASP8-F1 (senso)	5'- ACA AGG GCA TCA TCT ATG GCT CTG A-3'	25 nt	70 pb
CASP8-R2 (anti-senso)	5'- CCA GTG AAG TAA GAG GTC AGC TCA T-3'	25 nt	
CASP9-F1 (senso)	5'- TCA GTG ACG TCT GTG TTC AGG AGA- 3'	24 nt	97 pb
CASP9-R2 (anti-senso)	5'- TTG TTG ATG ATG AGG CAG TAG CCG - 3'	24 nt	
S26-F1 (senso)	5'- CGT GCT TCC CAA GCT GTA CGT GA-3'	24 nt	75 pb
S26-R2 (anti-senso)	5'- CGA TTC CGG ACT ACC TTG CTG TG -3'	23 nt	
Fas-F1 (senso)	5'- AAT AAA CTG CAC CCG GAC CCA GAA - 3'	24 nt	93 pb
Fas-R2 (anti-senso)	5'- GTG CAA GGG TCA CAG TGT TCA CAT - 3'	24 nt	
Bax-F1 (senso)	5'- ACA GTA ACA TGG AGC TGC AGA GGA -3'	24 nt	88 pb
Bax-R2 (anti-senso)	5'- AAC ATG TCA GCT GCC ACT CGG AAA -3'	24 nt	

5.5. PCR em tempo real

As amostras de cDNA resultantes da RT foram submetidas a reação em cadeia da polimerase (PCR) em tempo real realizada no equipamento de Sistema de PCR em tempo real ABI PRISM[®] 7500 Sequence Detection System (Laboratório de Genética Animal da Escola de Medicina Veterinária/UFMG), utilizando-se o SYBR Green PCR Master Mix Kit (Invitrogen Life Technologies, Carlsbad, CA, USA) (Contêm: Marcador SYBR Green 1, AmpliTaq Gold DNA Polimerase, dNTPs (com dUTP), Referência Passiva 1, Tampão otimizado) que contém todos os componentes necessários para a reação de PCR em tempo real.

As amostras foram aplicadas em placas de 96 poços (ABI PRISM[®] 96-Well Optical Reaction Plate with Barcode, Invitrogen Life Technologies, Carlsbad, CA, USA), em duplicada, em um volume final de reação de 20 µL. Em cada placa avaliava-se 3 genes alvos, sendo que um deles sempre era o gene de referência S26 como normalizador (ver exemplo na **FIGURA 10**). Em cada poço foram pipetados 5 µL de amostra, e adicionado posteriormente 15 µL do Mix contendo 10 µL do SYBR Green PCR Master Mix Kit, 1,5 µL de cada iniciador (senso e anti-senso) (1,5 pmol/cada), e o volume completado com H₂O para PCR. A placa foi selada com adesivo óptico (ABI PRISM[®] Optical Adhesive Covers, Invitrogen Life Technologies, Carlsbad, CA, USA), e recebia um *spin* para trazer todo o volume para o fundo do poço. Em seguida a placa era encaixada no equipamento de PCR em tempo real para dar-se início a leitura. Durante todo o processo luvas, máscara, ponteiros com barreira eram utilizadas, e toda a pipetação era feita em capela de fluxo para evitar-se contaminação.

As reações de PCR em tempo real ocorreram no seguinte ciclo termal: [estágio 1] um ciclo de 52°C/2 min.; [estágio 2] um ciclo a 95°C/10 min.; [estágio 3] 40 ciclos de 95°C/0,15 min. e 50°C/1 min. Ao término da ciclagem foi realizada a curva de *melting* a 60°C por 1 minuto, para a construção da curva de dissociação, que tem por objetivo determinar a especificidade dos fragmentos amplificados.

5.6. Análise estatística

O Teste t não pareado foi utilizado para avaliar a expressão dos transcritos dos genes alvos, comparando-se o grupo positivo (VCC+) com o grupo negativo (VCC-). Os resultados foram considerados estatisticamente significantes quando o valor de $p < 0.05$. As análises estatísticas foram realizadas pelo programa GraphPad Prism 5. Os resultados normalizados foram expressos pelo ΔCT do gene alvo – ΔCT do normalizador (S26) para os genes alvos (Livak e Schmittgen, 2001). Os

dados gráficos foram expressos como média \pm E.P.M. (Erro Padrão da Média) de $1/\Delta CT$ ($2^{-\Delta\Delta CT}$), o qual é diretamente proporcional a expressão relativa do gene.

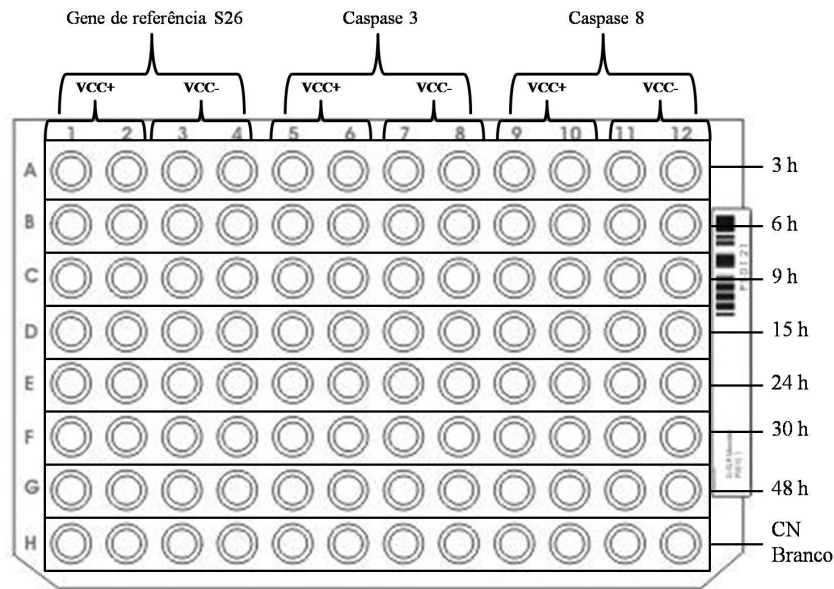


FIGURA 10 – Diagrama esquemático representando a estratégia utilizada para a montagem da placa para a reação de PCR em tempo real.

6. Detecção do VCC - PCR convencional

Com o objetivo de uma rápida detecção do VCC nas amostras de células Vero, o cDNA foi submetido a uma reação em cadeia da polimerase (PCR) para confirmação da infecção, ou não (controle), nas células Vero.

Para a detecção do VCC foram utilizados os oligonucleotídeos iniciadores VCC01 e VCC02 (**TABELA 1**), que amplificam um fragmento alvo de 319 pb, dentro da região que codifica a nucleoproteína viral - Nucleocapsídeo.

As reações de PCR foram feitas em um volume final de 15 μ l seguindo uma adaptação do protocolo sugerido pela InvitrogenTM. Os volumes e as concentrações finais dos reagentes utilizados na PCR estão relacionados na **QUADRO 1**. Com exceção do cDNA, todos os reagentes foram reunidos inicialmente num mix, que foi agitado suavemente e pipetado nos tubos. Cada tubo recebeu 10 μ l do mix inicial e 5 μ l de cDNA.

QUADRO 1

Resumo do protocolo de PCR para amplificação de cDNA.

<i>Mix</i>	<i>Volume</i>	<i>Concentração final</i>
Tampão 10x sem MgCl ₂	1,5 µL	1x
MgCl ₂ 50 mM	1,5 µL	1,5 mM
dNTP <i>mix</i> (10mM cada)	2,0 µL	0,2 mM
Iniciador senso (10 pmols)	2,0 µL	20 pmols
Iniciador anti-senso (10 pmols)	2,0 µL	20 pmols
cDNA	5,0 µL	165 ng
Taq Polimerase (5 UI/ µl)	0.3 µL	1 unidade
<i>Volume final</i>	<i>15 µL</i>	-

As reações de PCR foram conduzidas num termociclador modelo PTC-100 (MJ Research Inc., Watertown MA, USA), e o protocolo utilizado no diagnóstico do VCC encontra-se resumido no **QUADRO 2**.

QUADRO 2

Programação adotada para os ciclos da PCR.

Desnaturação	Anelamento	Extensão	Ciclos	Extensão Final
Inicial - 93°C 1 min	56°C 1 min	72°C 1 min	40	72°C 4 min

6.1. Eletroforese dos produtos da PCR

Os produtos de PCR foram identificados por eletroforese em gel de poliacrilamida para permitir a identificação do fragmentos amplificado. O gel foi preparado a 8% para observação do fragmento de 319 pb do VCC. Utilizaram-se 4 ml de solução estoque de acrilamida 30%; 3 ml de tampão de corrida (TAE 1X); 110 µl de persulfato de amônio 10%; 10 µl de TEMED (catalizador) e água destilada (q.s.p). Foram utilizados 2 µl (100 ng) de marcador 50 pb DNA ladder, e 3 µl de amostras para os produtos de PCR. Após corrida de eletroforese em tampão TAE 1X/ 50 minutos / 100 volts, o gel foi fixado por 10 minutos em etanol (10%), ácido acético (0,5%) e q.s.p. 100 ml de água destilada. Em seguida, foi realizada a impregnação por 10 minutos em nitrato de prata (0,1%).

Ao final lavou-se o gel em água destilada por 3 a 5 minutos e revelou-se o mesmo por 10 minutos em solução contendo hidróxido de sódio (3,6%), formol (0,3%) e q.s.p. 100 ml de água destilada.

O gel foi visualizado e fotografado através de transiluminação por luz branca, no sistema de fotografia UVIsave (Uvitec), no Laboratório de Sinalização de Cálcio, no Departamento de Fisiologia do ICB-UFMG.

7. Índice apoptótico

7.1. Cultivo de células Vero

As células Vero foram cultivadas nas mesmas condições como descrito para as reações de imunocitoquímica (**FIGURA 11**).

7.2. Coloração das lamínulas com DAPI

Para os eventos que caracterizam a apoptose avaliamos os núcleos apoptóticos pela condensação e fragmentação da cromatina, através da utilização do corante fluorescente DAPI que permite a visualização nuclear. Nas células em apoptose a condensação do núcleo acarreta em uma fluorescência bem intensa, de fácil visualização. Foram contadas 100 células em 3 diferentes campos por condição de experimento.

O meio foi retirado dos poços, e cada poço lavado 2 vezes com PBS +/- 1X estéril (anexo). Após as lavagens as lamínulas foram fixadas com 400 µL de paraformaldeído 4% (em cada poço), por no mínimo 30 minutos. Em seguida o paraformaldeído foi descartado e cada poço lavado 3 vezes com 500 µL de PBS +/- 1X estéril. Sobre um Parafilm esticado sobre a tampa de uma placa, foram pipetados 20 µL de DAPI para cada lamínula, diluído 1000 vezes em PBS +/- 1X, em uma concentração final de 0,03 mM/mL. As lamínulas foram transferidas para o parafilm de maneira que o lado em que as células aderiram estivesse em contato com a gota de DAPI. As lamínulas foram incubadas no escuro por 1 minuto no DAPI e em seguida transferidas novamente para a placa de cultura com a superfície de crescimento voltada para cima, e em seguida lavadas 4 vezes com PBS +/- 1X. As lamínulas foram secas encostando-se a borda das mesmas em um papel absorvente, e em seguida montadas em lâminas de microscopia, com óleo de montagem *antifade* (Invitrogen Life Technologies, Carlsbad, CA, USA), e as bordas seladas com esmalte. As lâminas foram guardadas em caixa escura e resfriada (-20°C).

7.2.1. Leitura das lâminas

Posteriormente as células foram examinadas em microscópio de fluorescência (Zeiss Axioplan 2, Alemanha), utilizando filtro de excitação e emissão de 380 e 430 nm, no Laboratório Professora Conceição Machado, no Departamento de Morfologia do ICB/UFMG, utilizando-se objetiva de 40 X 0,75 e 60 X 1,23 . As imagens foram capturadas utilizando-se o programa Axion Vision Release 4.7.2, através da câmera digital acoplada ao sistema MC 200 chip. A coloração nuclear com DAPI permitiu distinguir células normais das células em apoptose.

Foram contadas 100 células para cada tempo e tratamento (infectada pelo VCC e controle). Para cada tempo e tratamento o experimento foi realizado em triplicata. A diferença entre os tempos e grupos foram determinados utilizando-se o Teste t de *Student*.

7.3. Coloração das lamínulas com Giemsa

Com o objetivo de visualizar a morfologia das células normais ou em apoptose as células Vero foram coradas com Giemsa. As células em apoptose foram quantificadas pelo número de células contendo alterações citoplasmáticas (retração celular, formação de corpos apoptóticos) e nucleares indicativas de apoptose (condensação da cromatina e fragmentação nuclear).

O meio foi retirado dos poços, e cada poço lavado 2 vezes com PBS +/- 1X estéril (anexo). Após as lavagens, as lamínulas foram fixadas com 500 µL de metanol fresco (em cada poço), por 10 minutos. Em seguida o metanol foi descartado e cada poço lavado 1X com 500 µL de metanol fresco. Imediatamente o corante Giemsa (200 µL) foi adicionado de modo a evitar a absorção de água pelo metanol residual. Após 2 minutos, o corante foi diluído com 800 µL de água destilada e agitado gentilmente por mais 2 minutos para remover a camada de resíduos do corante. Em seguida as células foram lavadas gentilmente até que toda a coloração rósea fosse removida. Ao término as lamínulas foram retiradas dos poços, a borda seca enconstando-as em papel absorvente, e montadas em lâminas de microscopia com Entellan® (Merck, Darmstadt, Germany).

7.3.1. Leitura das lâminas

Posteriormente as células foram examinadas em microscópio de fluorescência (Zeiss Axioplan 2, Alemanha), utilizando luz branca, no Laboratório Professora Conceição Machado, no Departamento de Morfologia do ICB/UFMG, utilizando-se objetiva de 40 X 0,75 e 60 X 1,23 . As imagens foram capturadas utilizando-se o programa Axion Vision Release 4.7.2, através da câmera digital acoplada ao sistema MC 200 chip. A coloração com Giemsa permitiu distinguir células normais das células em apoptose.

Foram contadas 100 células para cada tempo e tratamento (infectada pelo VCC e controle). Para cada tempo e tratamento o experimento foi realizado em triplicata. A diferença entre os tempos e grupos foram determinados utilizando-se o Teste t de Student.

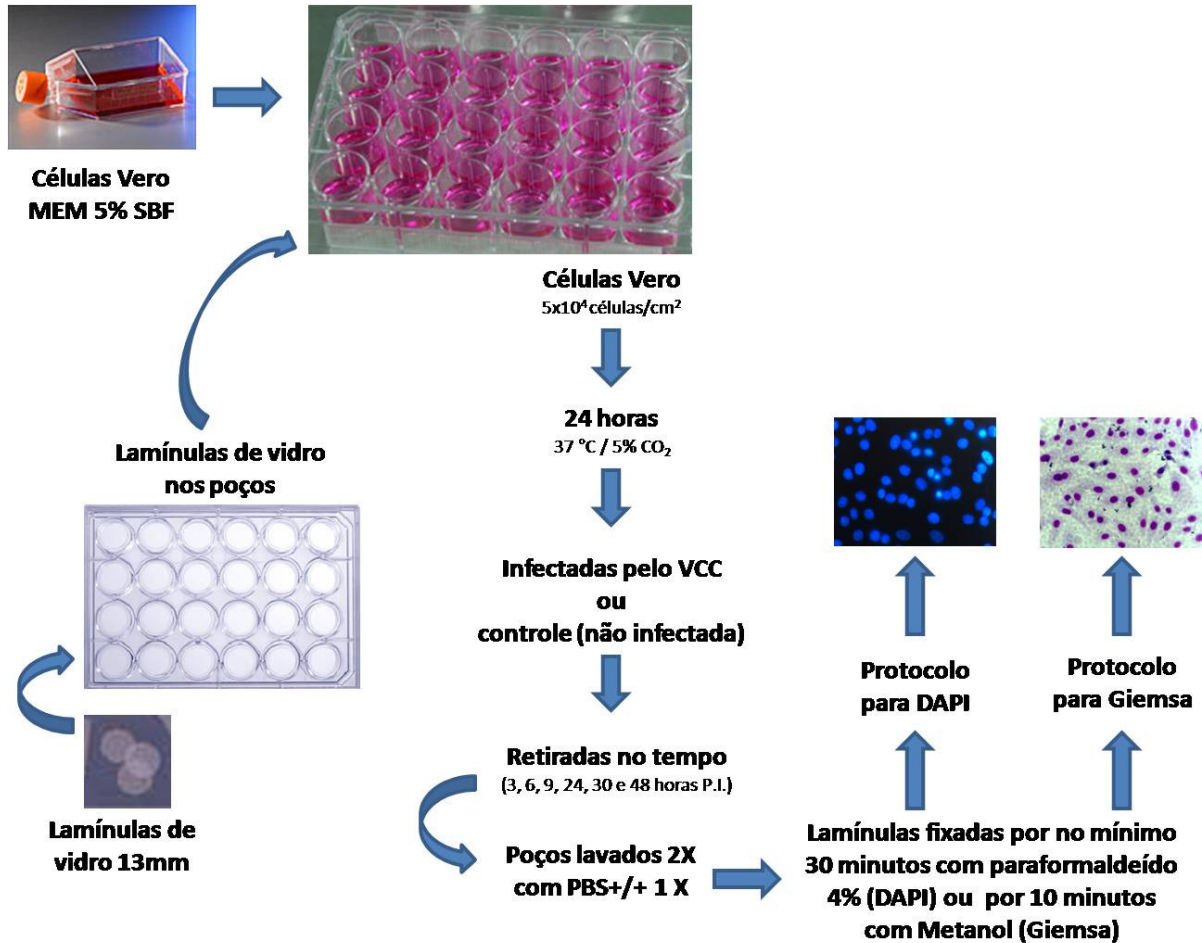


FIGURA 11 – Esquema representando a estratégia utilizada para os ensaios de infecção das células Vero para coloração das lamínulas com DAPI e Giemsa. (Fonte: Helen Lima Del Puerto).

7.4. Coloração com cristal violeta

As células Vero foram plaqueadas em placas de 6 poços (TPP[®], Trasadingen, Switzerland) em uma densidade de 5×10^4 células/cm², e após terem crescido por 24 horas em MEM com 5% de SBF a monocamada com 80-90% de confluência foram infectadas com o VCC-Lederle, a uma multiplicidade de infecção (MOI) de 0.1. O vírus com o título de 10^5 era retirado do freezer -80°C e colocado imediatamente no gelo. Posteriormente, em um tubo eppendorf de 2 mL o vírus foi diluído em MEM sem SBF em uma proporção de 3:1 (MEM sem SBF : vírus), em um volume final de 500 µL por poço. O meio com 5% de SBF foi retirado dos poços, os poços lavados 2 vezes com PBS 1X estéril, e em seguida 500 µL do vírus foi adicionado em cada poço. Como controle negativo era adicionado 500 µL de MEM sem SBF. Após 1 hora de adsorção do vírus o meio foi retirado dos poços com as células infectadas e com as células controle, e foram adicionados 1 mL de MEM com 5% de SBF.

A partir da troca do meio, foi iniciada a contagem de tempo, e as placas foram retiradas para a coloração com cristal violeta nos tempos de 3, 6, 9, 24, 30 e 48 horas. (**FIGURA 10**).

Para a coloração com cristal violeta o meio foi retirado dos poços, e em seguida os poços foram lavados 2X com PBS 1X estéril. Posteriormente foi adicionado aos poços 1 ml de Metanol, e as células fixadas por 5 minutos. Após os 5 minutos o metanol foi retirado e 400 µL de cristal violeta foi adicionado em cada poço, e as células coradas por 5 minutos. Ao término da coloração o cristal violeta era retirado e os poços lavados por várias vezes com água destilada, cuidadosamente, para preservar a monocamada. Ao final as placas eram guardadas para a visualização das células em microscópio de luz invertido.

7.4.1. Leitura das placas

Posteriormente as placas foram examinadas em microscópio invertido (OLYMPUS - IX50/IX70) com captura de imagem pelo software (IMAGE PROPLUS), no Departamento de Bioquímica, ICB/UFMG. A coloração com cristal violeta permitiu distinguir células normais das células em apoptose.

Foram contadas 100 células para cada tempo e tratamento (infectada pelo VCC e controle). A diferença entre os tempos e grupos foram determinados utilizando-se o Teste t de *Student*.

7.5. Análise estatística

Os dados foram expressos como média \pm E.P.M. (Erro Padrão da Média) da contagem das células em 3 preparações (DAPI, Giemsa e Cristal violeta). As comparações dos grupos/tempo de células infectadas e controle foi realizada empregando-se o teste *t* de *Student* pareado. As diferenças foram consideradas estatisticamente significativas para $P < 0,05$.

8. Citometria de fluxo

Para analisar a fase do ciclo celular das células Vero infectadas pelo vírus da cinomose canina, e das células Vero controle, e observar se houve parada no ciclo celular em G0/G1 ou apoptose (população subdiploide), foi feita análise por citometria de fluxo descrita por Vindelov (Vindelov, Christensen *et al.*, 1983) (**FIGURA 12**). O ensaio no citômetro de fluxo foi utilizado para detectar e quantificar as células em apoptose.

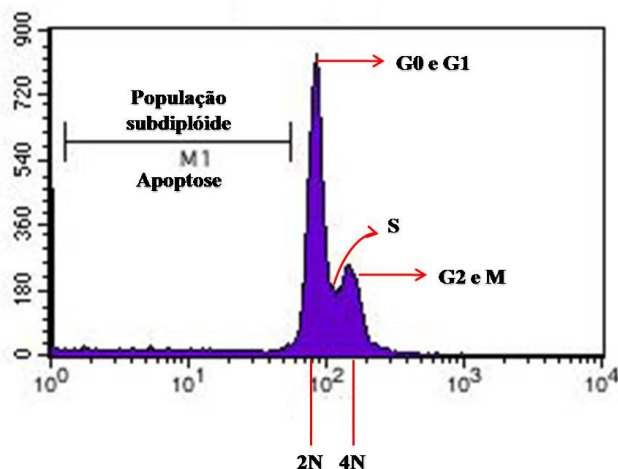


FIGURA 12 – Diagrama da análise das células em apoptose através da citometria de fluxo avaliando o ciclo celular. Os núcleos encontrados na linha M1 são contados como núcleos apoptóticos. 2N = população diplóide, 4N = população tetraplóide (logo após a duplicação do DNA na fase S). (Fonte: Helen Lima Del Puerto).

8.1. Cultivo das células Vero e infecção pelo VCC

As células Vero (5×10^4 células/cm²) foram plaqueadas em placas individuais de 60 X 1,23 10mm, com área de crescimento de 9,2 cm² (TPP®, Trasadingen, Switzerland). O experimento consistiu em avaliar a fragmentação nuclear das células Vero infectadas pelo VCC nos tempos de 3,

6, 9, 24, 30 e 48 horas. Paralelamente utilizamos células Vero não infectadas pelo VCC como controle nos mesmos tempos (**FIGURA 13**).

Após as células terem crescido por 24 horas em MEM com 5% SBF, a monocamada com 80-90% de confluência foram infectadas com o VCC-Lederle, a uma multiplicidade de infecção (MOI) de 0.1; ou com meio sem o vírus para o controle. O vírus com o título de 10^5 era retirado do freezer -80°C e colocado imediatamente no gelo. Posteriormente, em um tubo eppendorf de 2 mL o vírus foi diluído em MEM sem SBF em uma proporção de 3:1 (MEM sem SBF : vírus), em um volume final de 300 μL por poço. O meio com 5% de SBF foi retirado dos poços, os poços lavados 2 vezes com PBS 1X estéril, e em seguida 300 μL do vírus adicionado em cada poço. Como controle negativo era adicionado 300 μL de MEM sem SBF. Após 1 hora de adsorção do vírus o meio era retirado dos poços das células infectadas e das células controle, e eram adicionados 1 mL de MEM com 5% de SBF.

A partir da troca do meio, foi iniciada a contagem de tempo, e as placas foram retiradas para o ensaio no citômetro de fluxo nos tempos de 3, 6, 9, 24, 30 e 48 horas (**FIGURA 13**).

8.2. Leitura no citômetro de fluxo

Nos tempos determinados pelo experimento duas placas eram retiradas, a do grupo controle e a do grupo infectados pelo VCC. O meio era retirado da cada placa e transferido para um tubo eppendorf de 2 mL, que em seguida era centrifugado a 3.000 g por 3 minutos. O sobrenadante era descartado e as células eram ressuspensas em 100 μL de solução fluorocrômica hipotônica (HFS, hypotonic fluorochromic solution - 0,1% citrato de sódio, 0,1% Triton X-100, 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ iodeto de propídeo) (anexo). Concomitantemente 400 μL da solução era adicionada na monocamada das células, e ambos incubados por no mínimo 4 horas a 4°C , e protegidos da luz com papel alumínio. Ao término da incubação retirava-se o volume de 400 μL da placa, e transferia-se para o tubo eppendorf de 2 mL juntamente com o volume de 100 μL armazenado no tubo.

Finalmente o volume final de 500 μl era transferido para um tubo de leitura para o citômetro, e as células eram analisadas quanto a porcentagem de apoptose, de acordo com o protocolo descrito por Nicoletti et al., com algumas adaptações (Nicoletti, Migliorati *et al.*, 1991). A leitura foi realizada no citômetro de fluxo FACScan Flowcytometer, BD, no Laboratório de Imunorregulação e Vacinas, coordenado pelo Prof. Ricardo Toshio Fujiwara, no Departamento de Parasitologia ICB/UFMG.

No citômetro de fluxo foram lidos 15.000 eventos (células), e um histograma foi gerado ao final da leitura através do software CellQuest (Wang e Zheng, 2002).

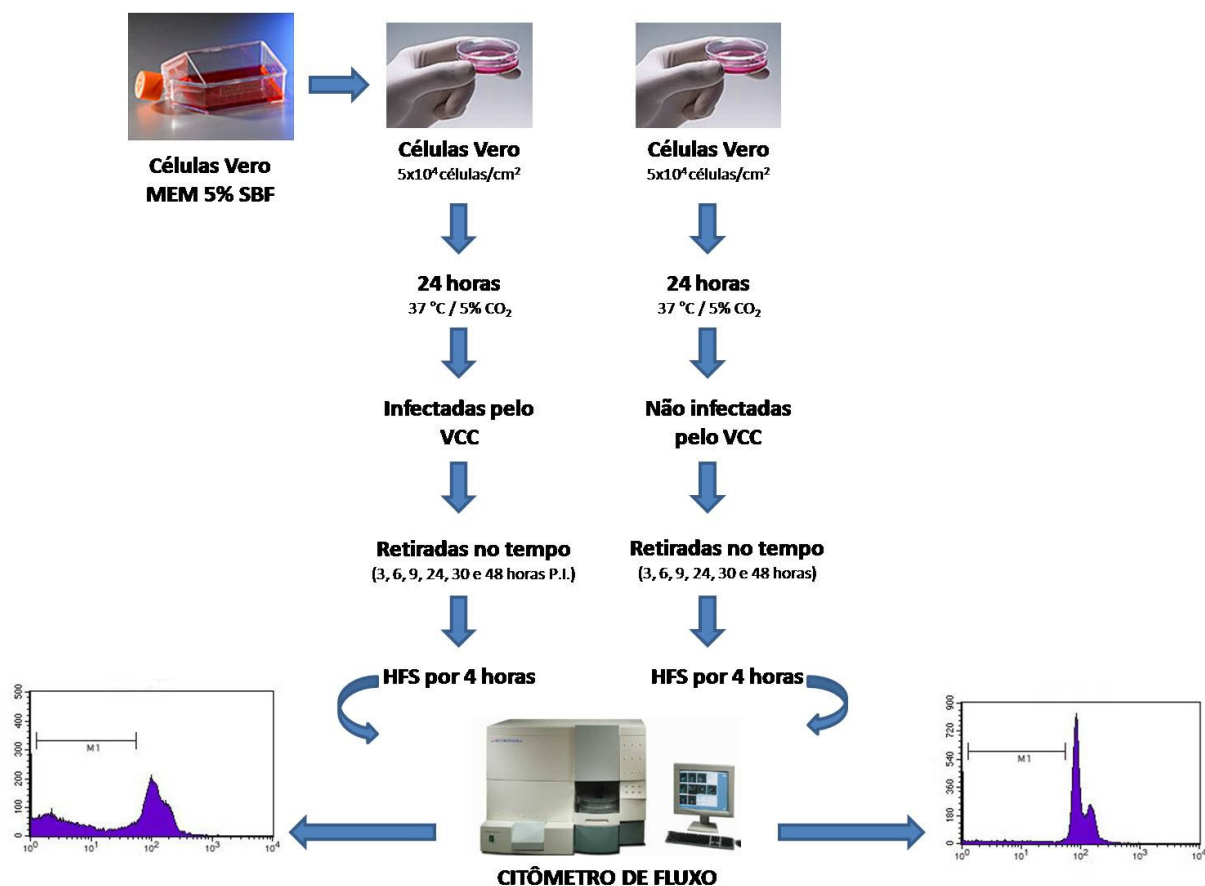


FIGURA 13 – Estratégia utilizada para os ensaios de infecção das células Vero para análise no citômetro de fluxo. (Fonte: Helen Lima Del Puerto).

8.3. Análise estatística

Os ensaios foram realizados em duplicatas e a média de cada experimento era calculada, sendo que os ensaios foram repetidos três vezes. Os dados foram expressos como média \pm E.P.M. (Erro Padrão da Média), e as comparações dos grupos/tempo de células infectadas e controle foi realizada empregando-se o teste *t* de *Student* pareado. As diferenças foram consideradas estatisticamente significativas para $P < 0,05$.

RESULTADOS

1. Imunocitoquímica

1.1. Imunolocalização das Caspase 3 e 8 em HeLa tratada com cisplatina

A expressão imunocitoquímica das Caspase 3 e Caspase 8 (identificada pela coloração acastanhada) nas células HeLa tratadas por 24 horas com a droga cisplatina ocorreu tanto com anticorpos primários anti-Caspase 3 quanto com anti-Caspase 8 (**FIGURA 14b e 14d**). Entretanto, não houve expressão imunocitoquímica das proteínas Caspase 3 e Caspase 8 nas células HeLa controle, ou seja, que não receberam a droga (**FIGURA 14a e 14c**).

A marcação da Caspase 3 nas células HeLa tratadas com a droga cisplatina ocorreu predominantemente no citoplasma, mas também foi observada no núcleo, principalmente em células que já possuíam as características morfológicas típicas de células em apoptose (retração celular e intensa condensação da cromatina). Já a marcação da Caspase 8 nas células HeLa tratadas com a droga cisplatina ocorreu predominantemente no citoplasma, e com ausência de marcação nuclear.

O controle negativo da reação de imunocitoquímica consistiu na ligação do anticorpo secundário sem a incubação com o anticorpo primário, para verificar se ocorria alguma ligação inespecífica do anticorpo secundário, não apresentou coloração acastanhada, indicando reação negativa (**FIGURA 15**).

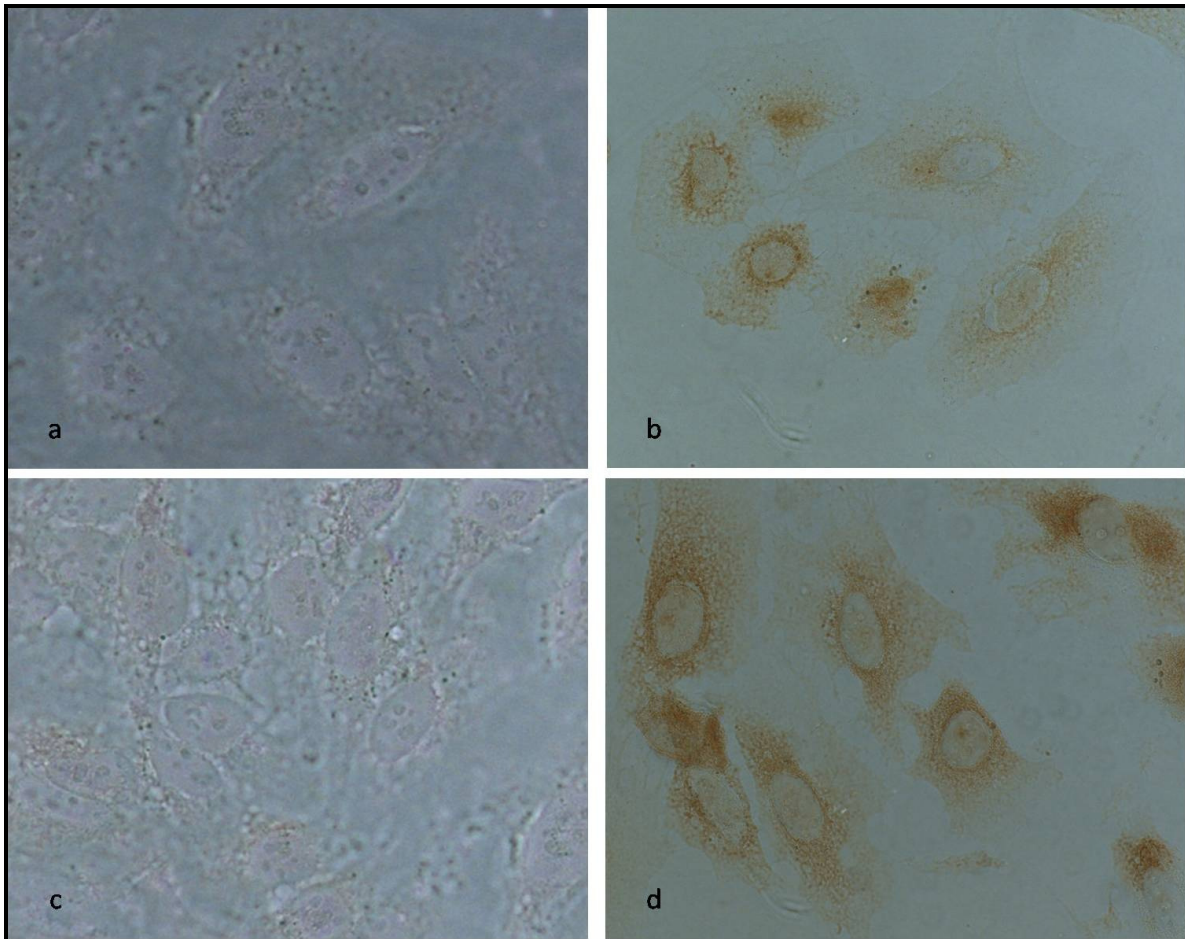


FIGURA 14 – Micrografia (imunocitoquímica de Caspases 3 e 8) em células HeLa tratadas e não tratadas com a droga cisplatina. **a** – HeLa sem cisplatina marcada para Caspase 3; **b** – HeLa com cisplatina marcada para Caspase 3; **c** – HeLa sem cisplatina marcada para Caspase 8; **d** – HeLa com cisplatina marcada para Caspase 8. A coloração acastanhada nuclear e citoplasmática indica a presença da proteína Caspase 3 (**b**), e a coloração acastanhada citoplasmática indica a presença da proteína Caspase 8 (**d**). Objetiva de Objetiva de 63 X 1.23.

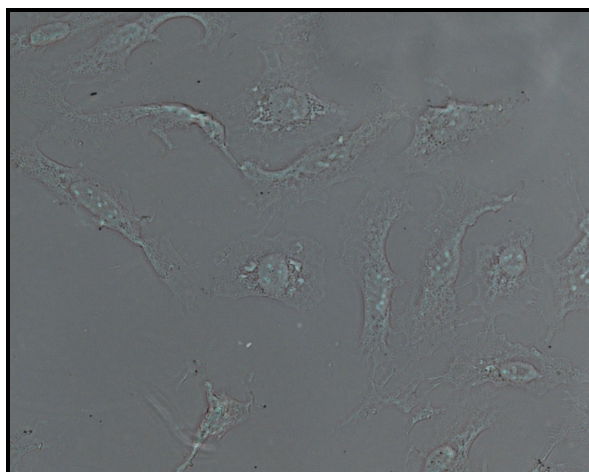


FIGURA 15 – Micrografia de células HeLa tratadas com a droga cisplatina incubada somente com o anticorpo secundário. A coloração castanha foi ausente indicando que não ocorreu ligação inespecífica do anticorpo secundário. Objetiva de 63 X 1.23.

1.2. Imunolocalização das Caspase 3 e 8 em HeLa infectada pelo VCC

A expressão imunocitoquímica da Caspase 3, identificada pela coloração acastanhada, em células HeLa infectadas por 24 horas pelo VCC ocorreu com a utilização dos anticorpos primários anti-Caspase 3 produzidos em camundongo, e foi revelada através dos anticorpos secundários biotinizados anti-IgM de camundongo produzido em cabra, e anti-IgG de camundongo produzido em cavalo (**FIGURA 16a**). Não houve expressão imunocitoquímica da proteína Caspase 8 nas células HeLa infectadas pelo VCC (**FIGURA 16b**).

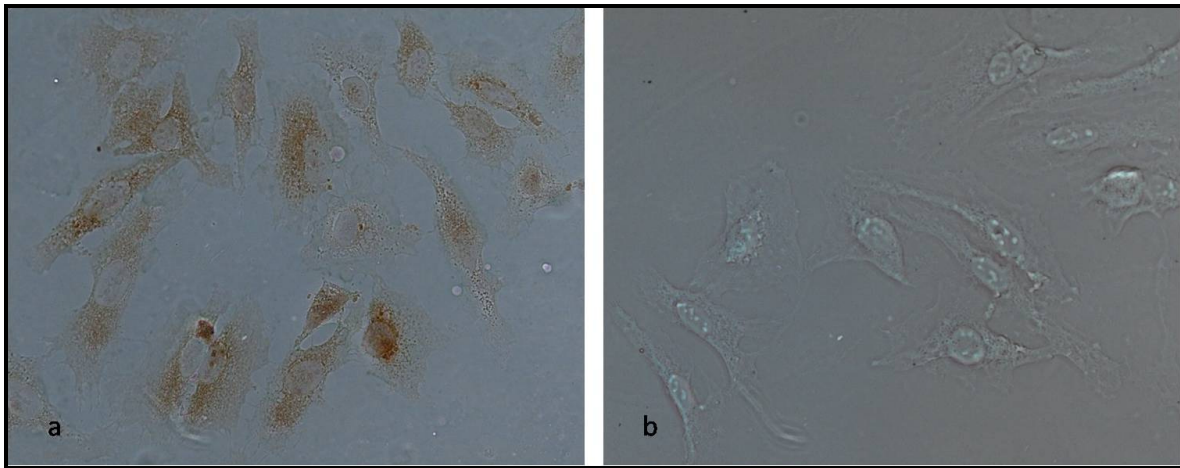


FIGURA 16 – Micrografia (imunocitoquímica de Caspases 3 e 8) de células HeLa infectadas pelo VCC. **a** – HeLa infectada pelo VCC marcada para Caspase 3; **b** – HeLa infectada pelo VCC marcada para Caspase 8. A coloração castanha nuclear e citoplasmática indica a presença da proteína Caspase 3 (**a**), e a ausência da coloração castanha em (**b**) indica a ausência da proteína Caspase 8. Objetiva de 40 X 0,75.

1.3. Imunolocalização das Caspase 3 e 8 em células Vero infectadas pelo VCC

A expressão imunocitoquímica das proteínas Caspase 3 e Caspase 8, caracterizada pela coloração acastanhada, em células Vero infectadas por 24 horas com o VCC foi detectada pelos anticorpos primários anti-Caspase 3 e anti-Caspase 8 produzidos em camundongo, e foi revelada através dos anticorpos secundários biotinizados anti-IgM de camundongo produzido em cabra, e anti-IgG de camundongo produzido em cavalo (**FIGURA 17b e 17d**).

Também foi observado a imunolocalização das proteínas Caspase 3 e Caspase 8 nas células Vero controle, que não receberam o VCC, no entanto a marcação foi menos intensa quando comparado com as células Vero infectadas pelo VCC (**FIGURA 17a e 17c**).

A marcação das Caspases 3 nas células Vero ocorreu predominantemente no citoplasma, mas também foi observada no núcleo, principalmente em células que já possuíam as características morfológicas típicas de células em apoptose (retração celular e intensa condensação da cromatina). Entretanto a marcação da Caspase 8 nas células Vero ocorreu predominantemente no citoplasma, e com ausência de marcação nuclear.

O controle negativo da reação de imunocitoquímica, que consistiu na ligação do anticorpo secundário sem a incubação com o anticorpo primário, em células Vero controle (**FIGURA 18a**), e em células Vero infectadas pelo VCC (**FIGURA 18b**), para verificar se ocorria alguma ligação

inespecífica do anticorpo secundário nas células, não apresentou coloração acastanhada, indicando reação negativa (**FIGURA 18**).

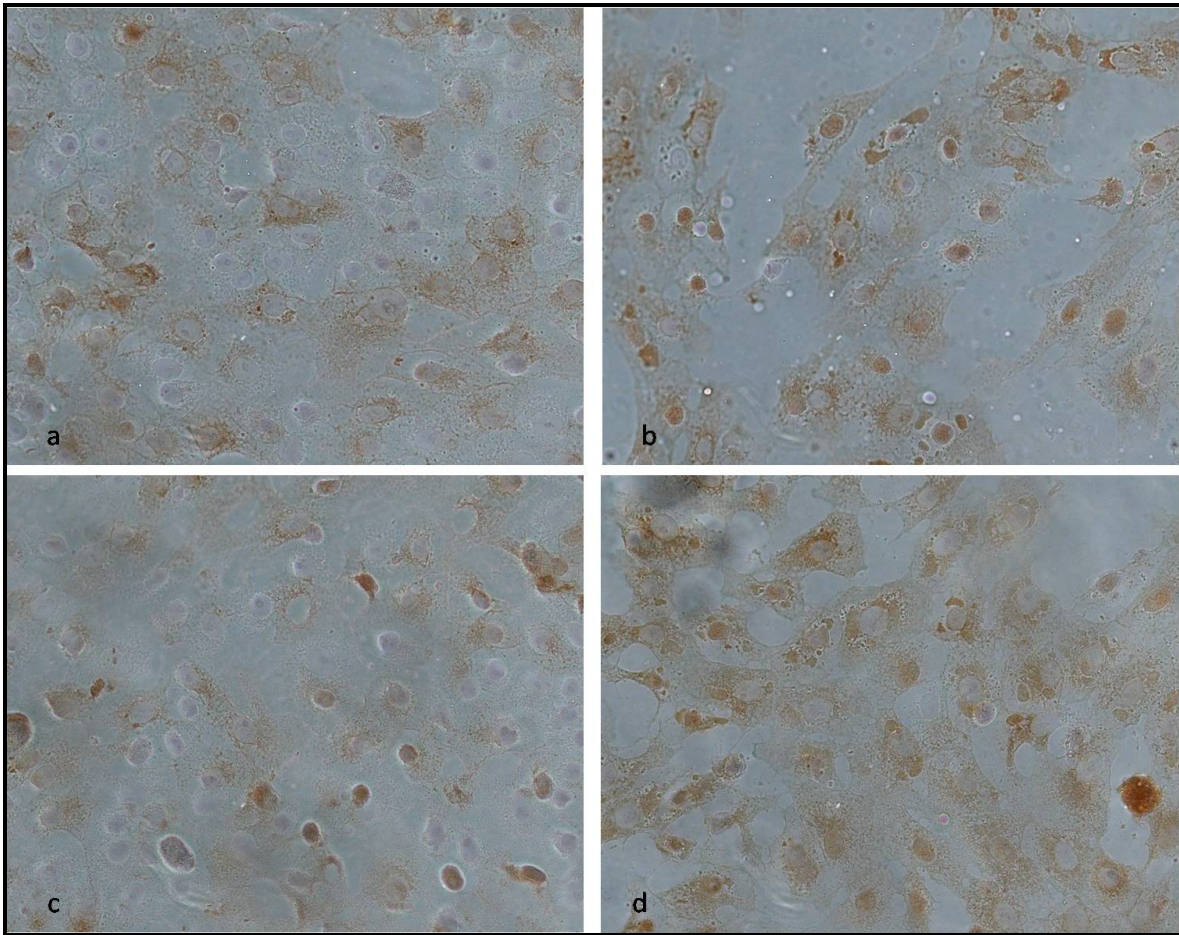


FIGURA 17 – Micrografia (imunocitoquímica de Caspases 3 e 8) de células Vero infectadas e não infectadas pelo VCC. **a** – célula Vero controle (não infectada com o VCC), marcada para Caspase 3; **b** – célula Vero infectada com o VCC marcada para Caspase 3; **c** – célula Vero controle (não infectada com o VCC), marcada para Caspase 8; **d** – célula Vero infectada com o VCC marcada para Caspase 8. A coloração castanha nuclear e citoplasmática indica a presença da proteína Caspase 3 (**a** e **b**), e a coloração castanha citoplasmática indica a presença da proteína Caspase 8 (**c** e **d**). Objetiva de 40 X 0,75.

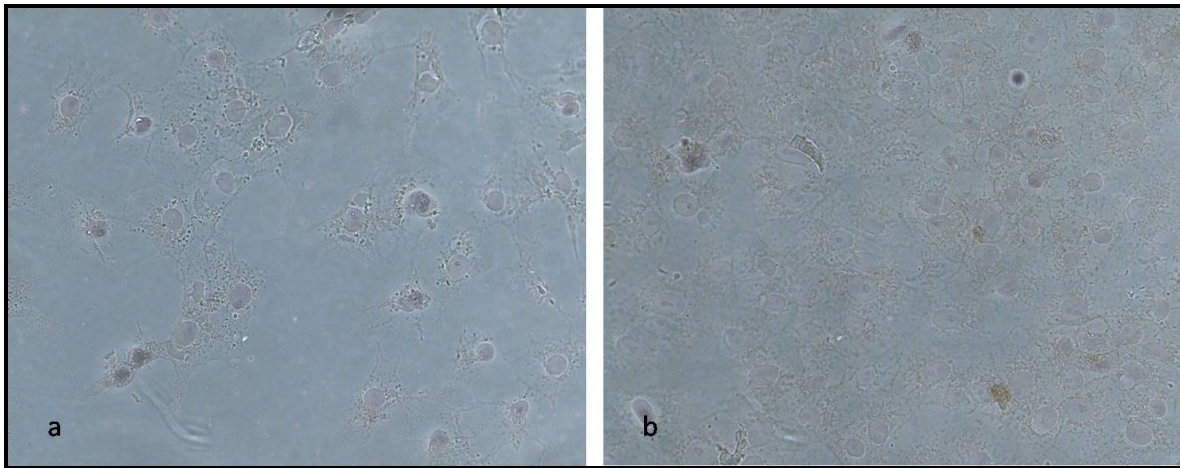


FIGURA 18 – Micrografia (imunocitoquímica de Caspases 3 e 8) de células Vero infectadas e não infectadas pelo VCC. As células foram incubadas somente com o anticorpo secundário. A coloração castanha foi ausente indicando que não há ligação inespecífica do anticorpo secundário. **a** – célula Vero infectada com o VCC; **b** – célula Vero controle (não infectada com o VCC). Objetiva de 40 X 0,75.

2. RT-PCR Convencional

Os resultados da RT-PCR convencional utilizando os iniciadores VCC01 e VCC02 (**TABELA 1**), confirmaram a presença do vírus da cinomose canina nas células Vero infectadas pelo VCC, e confirmaram a ausência do vírus da cinomose canina nas células Vero não infectadas (controle) pelo VCC. Após a reação de PCR, as amostras foram aplicadas em gel de poliacrilamida 8% corado com nitrato de prata (**FIGURA 19**).

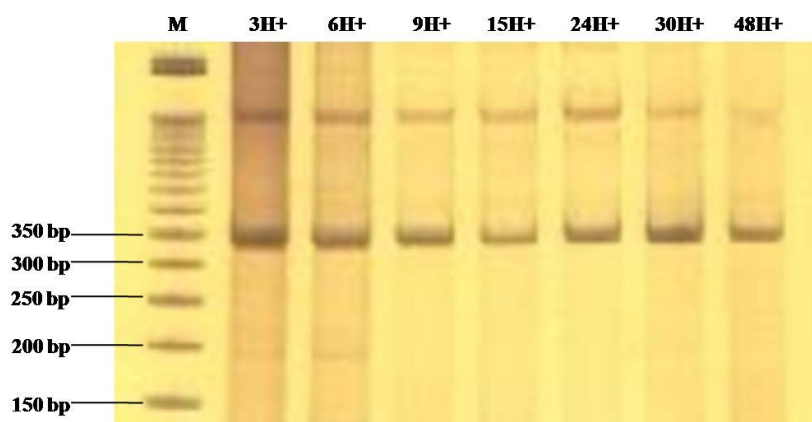


FIGURA 19 – Resultado do diagnóstico do VCC em células Vero infectadas pelo VCC-Lederle, nos tempos de 3, 6, 9, 15, 24, 30 e 48 horas (H+ = Infectado pelo VCC). 3 μ l do resultado da PCR convencional foi aplicado e visualizado por impregnação com nitrato de prata em gel de poliacrilamida 8% após eletroforese a 100V/50 minutos. O fragmento específico amplificado do VCC contém 319 pb. (M) marcador de 50 pb (0.3 μ g).

3. PCR em tempo real

Os resultados da quantificação relativa dos genes alvos através da PCR em tempo real foram obtidos através do ΔC_T do gene de referência S26, e dos genes alvos: Caspase 3, Caspase 8, Caspase 9, receptor Fas, Bax e Bcl-2. A quantificação relativa fez uma análise comparativa do ácido nucléico dos genes alvo com o do controle endógeno ou do calibrador.

Para a obtenção dos resultados desse trabalho utilizou-se o método C_T comparativo, onde o controle endógeno foi utilizado para normalizar a expressão dos genes alvos (média do C_T gene alvo – média do C_T controle endógeno) gerando o ΔC_T . Utilizando-se o ΔC_T calculamos o $\Delta\Delta C_T$ (ΔC_T amostra – ΔC_T do calibrador (amostra de referência)). Ao final utilizamos a fórmula $2^{-\Delta\Delta C_T}$ para chegarmos a quantificação relativa de cada gene alvo.

Os resultados da média das triplicatas foram lançados no programa *GraphPad Prism 5*, e utilizamos o Test t pareado para avaliar se os resultados foram estatisticamente significantes.

O valor do *slope* < -2.0 em cada reação, e representou uma eficiência de 100% ($E = 10^{(-1/\text{slope})}$) das reações. A curva de dissociação foi única para cada fragmento e confirmaram a especificidade dos genes alvos (**FIGURA 20 e 21**).

Os resultados da expressão relativa dos genes Caspase 9, Bax e Bcl-2 não demonstraram nenhuma alteração significativa ($P > 0.05$) quando comparado as células Vero infectadas pelo VCC com as células Vero controle nos tempos de 3, 6, 9, 15, 24, 30 e 48 horas.

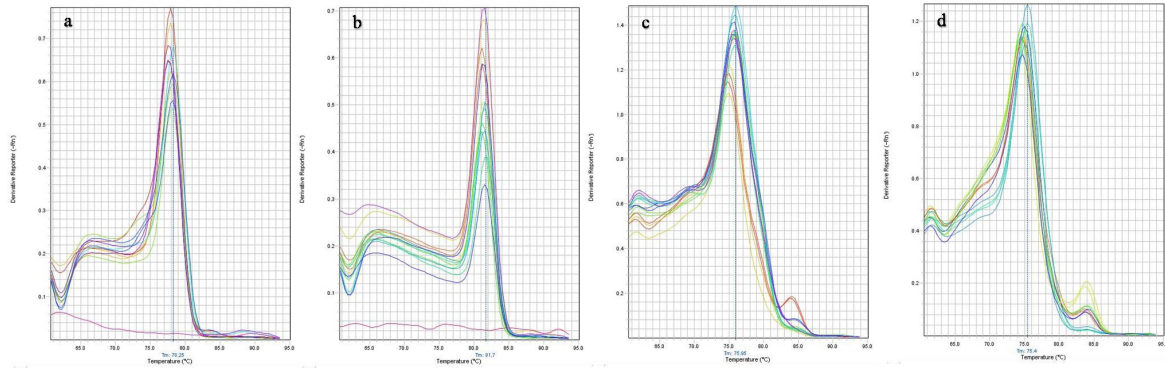


FIGURA 20 – Curvas de dissociação. (a), (b), (c) e (d) mostram as curvas de dissociação para os fragmentos amplificados de S26, Bax, Bcl-2 e rFas, respectivamente, como checagem do tamanho dos fragmentos amplificados. (a) 78,25 °C, (b) 81,7°C, (c) 75,95 °C e (d)75,4 °C.

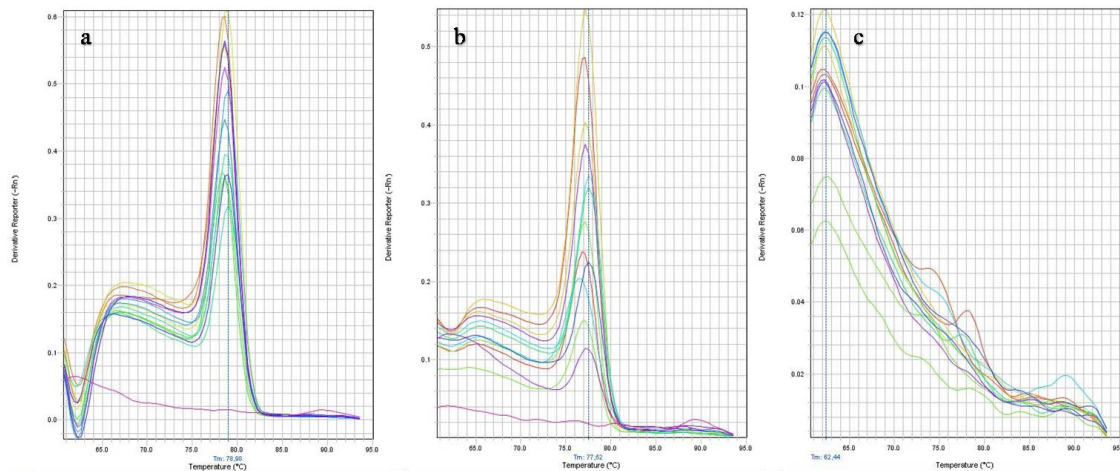


FIGURA 21 – Curvas de dissociação. (a), (b) e (c) mostram as curvas de dissociação para os fragmentos amplificados da Caspase 3, Caspase 8 e Caspase 9, respectivamente, como checagem do tamanho dos fragmentos amplificados. (a) 78,98 °C, (b) 77,52°C e (c) demonstra que não houve nenhuma amplificação para Caspase 9.

No entanto, ocorreu um aumento significativo na expressão dos genes da Caspase 3, Caspase 8 e do receptor Fas em células Vero infectadas pelo VCC, quando comparado com as células Vero controle para cada tempo respectivo pós-infecção. Os **GRÁFICOS 1, 2 e 3** mostram os resultados da expressão relativa desses genes.

A expressão do gene da Caspase 3 foi maior nas células Vero infectadas pelo VCC nos tempos de 3, 6, 15 e 24 horas p.i. ($P < 0.05$) (diferença de expressão = 19,3; 14,36; 4,46 e 5,98, respectivamente – **GRÁFICO 1a, 1b, 1d e 1e**) quando comparado com as células Vero controle nos mesmos tempos. O tempo de 9 horas p.i. apresentou uma tendência de maior expressão de Caspase 3 nas células Vero infectadas quando comparada com a célula Vero controle ($P = 0.0644$) (**GRÁFICO 1c**). O tempo de 30 horas p.i. não apresentou aumento significativo na expressão do gene da Caspase 3 (**GRÁFICO 1f**).; e o tempo de 48 horas p.i. apresentou uma baixa na expressão do gene da Caspase 3, mas que não foi estatisticamente significante (**GRÁFICO 1g**).

A expressão do gene da Caspase 8 foi significativamente maior nas células Vero infectadas pelo VCC nos tempos de 3, 6 e 15 horas p.i. ($P < 0.05$) (diferença de expressão = 7,5; 6,04 e 1,91, respectivamente - **GRÁFICO 2a, 2b e 2d**) que no controle nos mesmos tempos p.i. Os tempos de 9, 24, 30 e 48 horas p.i. não apresentaram aumento ou diminuição significativa ($P > 0.1$) na expressão do gene da Caspase 8 quando comparado-se as células Vero infectadas com as células Vero controle (**GRÁFICO 2c, 2e, 2f e 2g**).

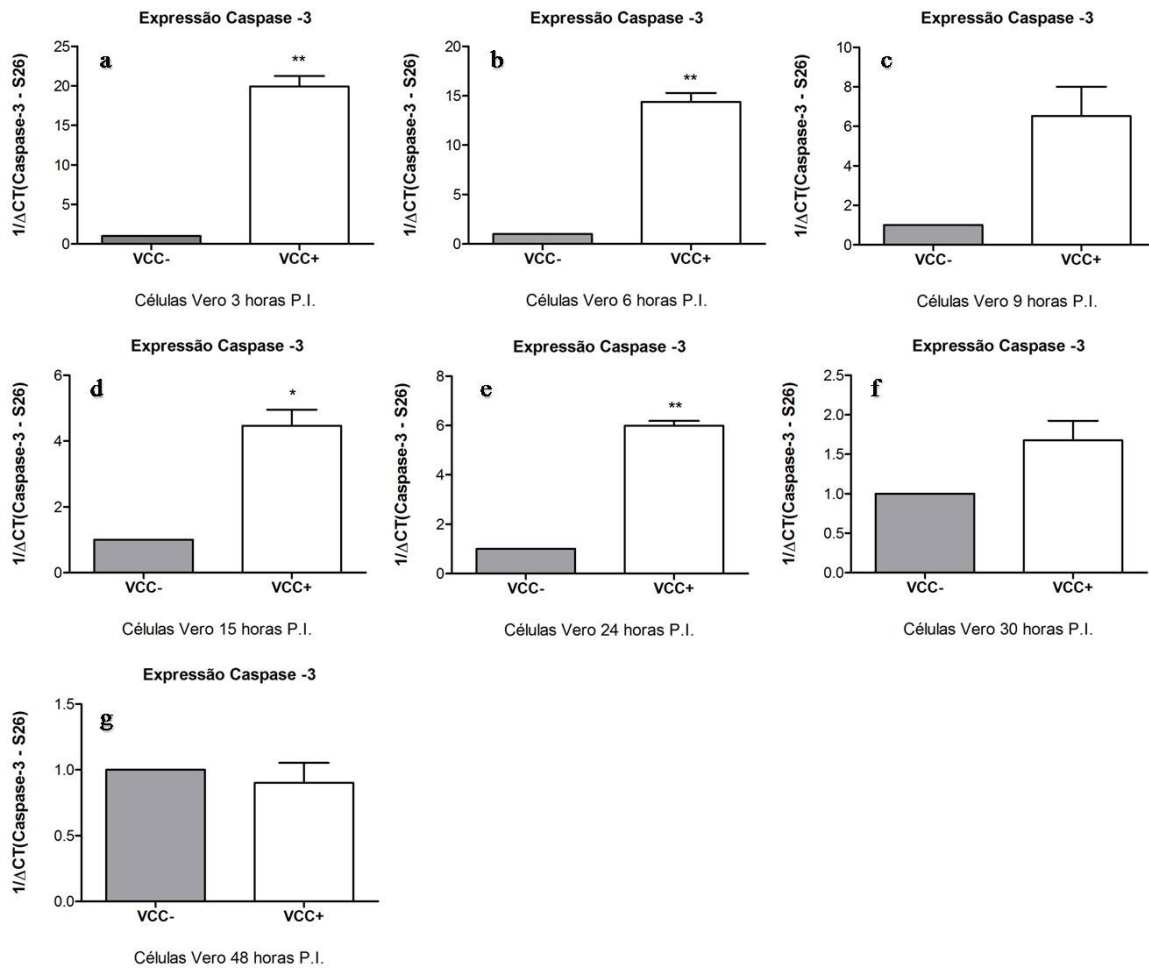


GRÁFICO 1 – Expressão da Caspase 3 nas células Vero com 3, 6, 9, 15, 24, 30 e 48 horas p.i. com o VCC (VCC+), comparando-se com as células Vero controle (VCC-). Os dados foram expressos como média \pm E.P.M. (Erro Padrão da Média) de $1/\Delta CT (2^{-\Delta\Delta CT})$, diretamente proporcional à expressão relativa do gene. Observou-se um aumento na expressão da Caspase 3 nos tempos de 3, 6, 15 e 24 horas p.i. * $p < 0.05$ (Teste t pareado), ** $p < 0.01$ (Teste t pareado).

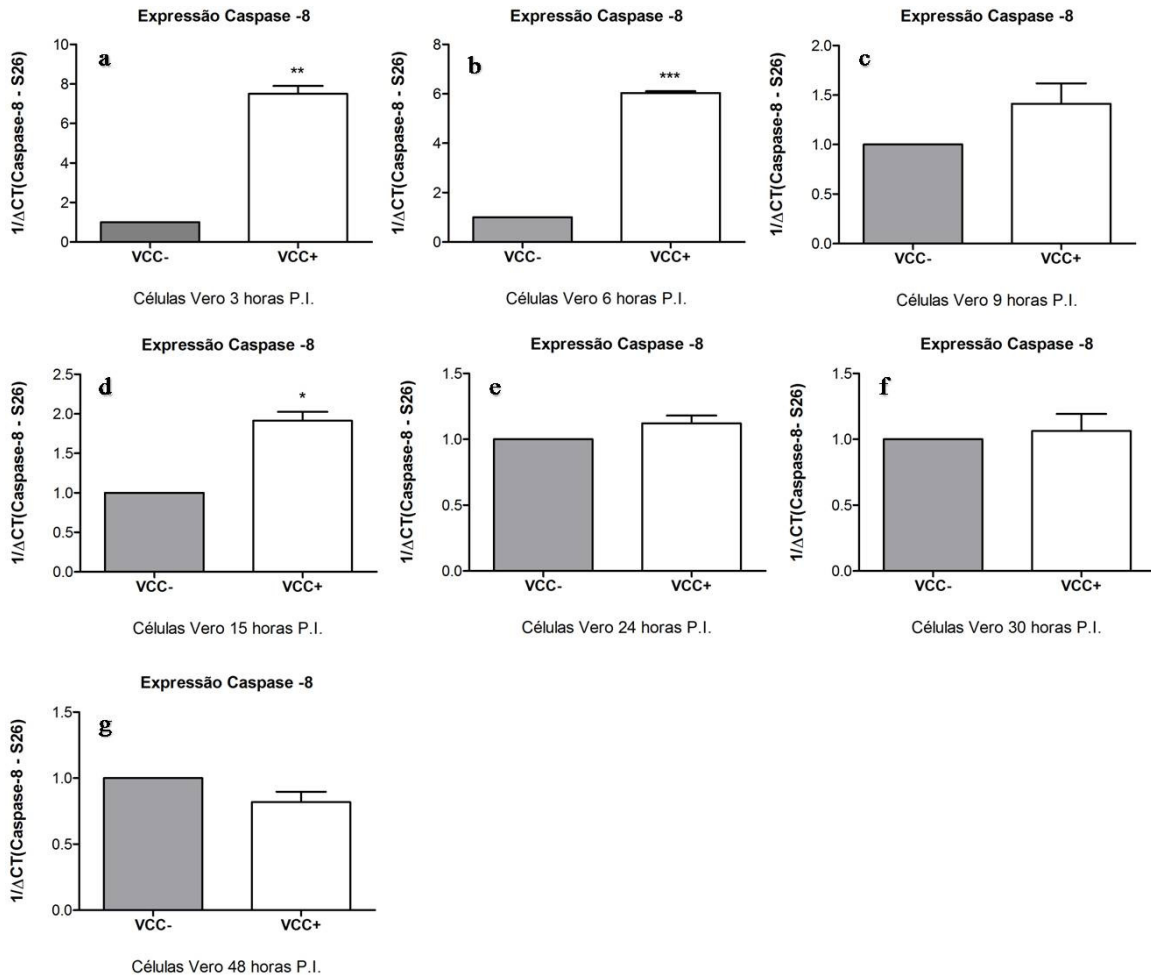


GRÁFICO 2 – Expressão da Caspase 8 nas células Vero com 3, 6, 9, 15, 24, 30 e 48 horas p.i. com o VCC (VCC+), comparando-se com as células Vero controle (VCC-). Os dados foram expressos como média \pm E.P.M. (Erro Padrão da Média) de $1/\Delta CT (2^{-\Delta\Delta CT})$, diretamente proporcional à expressão relativa do gene. Observou-se um aumento na expressão da Caspase 8 nos tempos de 3, 6 e 15 horas p.i. * $p < 0.05$ (Teste t pareado), ** $p < 0.01$ (Teste t pareado) e *** $p < 0.001$ (Teste t Pareado).

A expressão do gene para o receptor de morte Fas (rFas) foi significativamente maior nas células Vero infectadas pelo VCC nos tempos de 15 e 24 horas p.i. ($P < 0.05$) (diferença de expressão = 2,74 e 1,88, respectivamente - **GRÁFICO 3a e 3b**) quando comparado com as células Vero controle nos mesmos tempos p.i. Os tempos de 3, 6, 9, 30 e 48 horas p.i. não apresentaram aumento ou diminuição significativa na expressão do gene ($P > 0.1$) quando comparado com as células Vero controle.

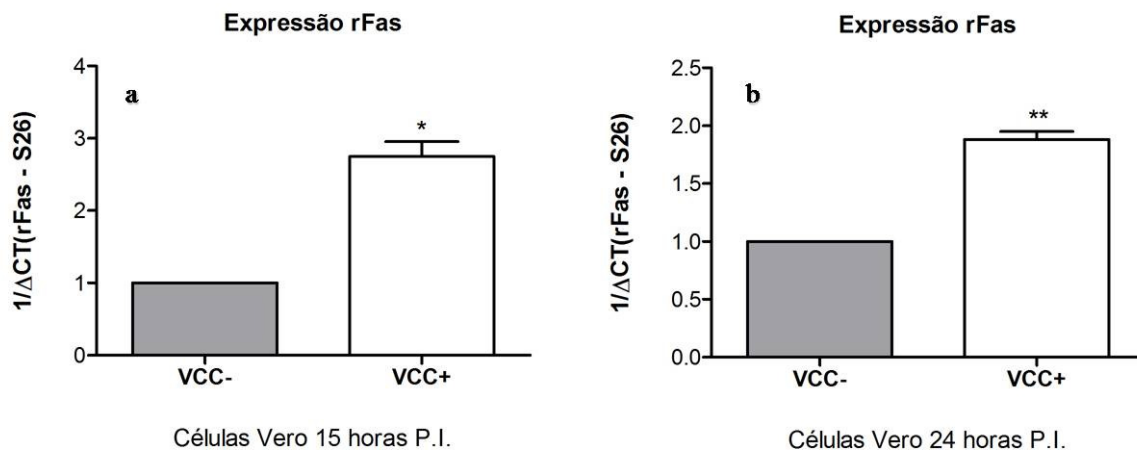


GRÁFICO 3 – Expressão do rFas nas células Vero com 15 horas p.i. (a) e com 24 horas p.i. (b), comparando-se as células Vero controle (VCC-) com as células Vero infectadas pelo VCC (VCC+). Os dados foram expressos como média \pm E.P.M. (Erro Padrão da Média) de $1/\Delta CT$ ($2^{-\Delta\Delta CT}$), diretamente proporcional à expressão relativa do gene. * $p < 0.05$ (Teste t pareado), ** $p < 0.01$ (Teste t pareado).

4. Índice apoptótico

4.1. Coloração com DAPI

O número total de células foi obtido por contagem direta dos núcleos das células marcadas e não marcadas (ou núcleos apoptóticos para análise da apoptose celular) (**FIGURA 22**).

Os resultados da contagem dos núcleos revelaram as seguintes proporções de núcleos apoptóticos: 3 horas (VCC- 0% e VCC+ 2%); 6 horas (VCC- 1% e VCC+ 4%); 9 horas (VCC- 3% e VCC+ 6%); 24 horas (VCC- 3% e VCC+ 10%); 30 horas (VCC- 4% e VCC+ 14%) e 48 horas (VCC- 5% e VCC+ 17%).

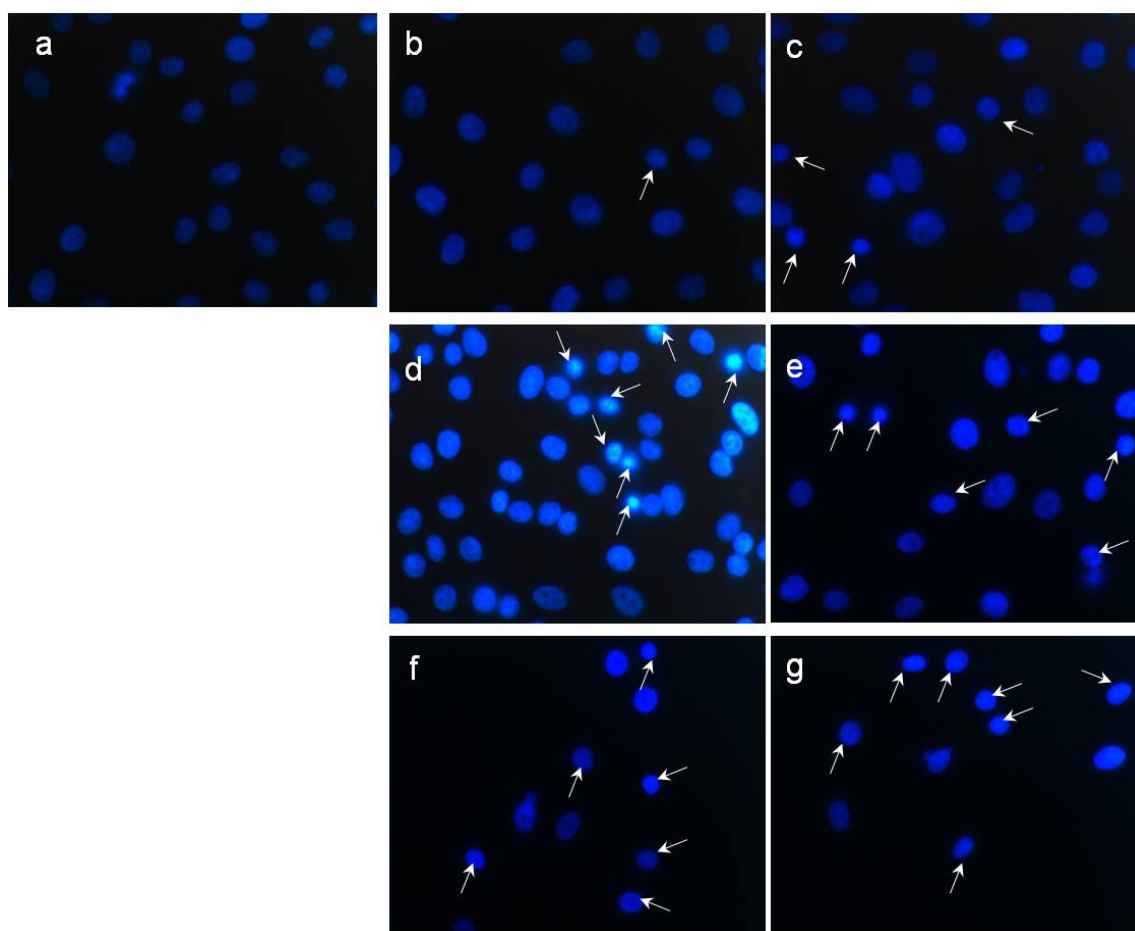


FIGURA 22 – Micrografia (Coloração com DAPI) de células Vero em apoptose após a infecção do vírus da cinomose canina nos tempos de 3, 6, 9, 24, 30 e 48 horas p.i.: (a) Controle VCC-, (b) 3h VCC+ (2%), (c) 6h VCC+ (4%), (d) 9h VCC+ (6%), (e) 24h VCC+ (10%), (f) 30h VCC+ (14%) e (g) 48h VCC+ (17%). As setas brancas indicam os núcleos apoptóticos. Objetiva 40 X 0,75.

4.2. Coloração com Giemsa

O número total de células foi obtido por contagem direta das células com características morfológicas de apoptose (**FIGURA 23**).

Os resultados da contagem das células revelaram nas células Vero controle e células Vero infectadas pelo VCC, nos tempos de 3 a 48 horas, as seguintes proporções de células em apoptose: 3 horas (VCC- 2% e VCC+ 3%); 6 horas (VCC- 1% e VCC+ 2%); 9 horas (VCC- 2% e VCC+ 6%); 24 horas (VCC- 4% e VCC+ 12%); 30 horas (VCC- 3% e VCC+ 17%) e 48 horas (VCC- 7% e VCC+ 18%).

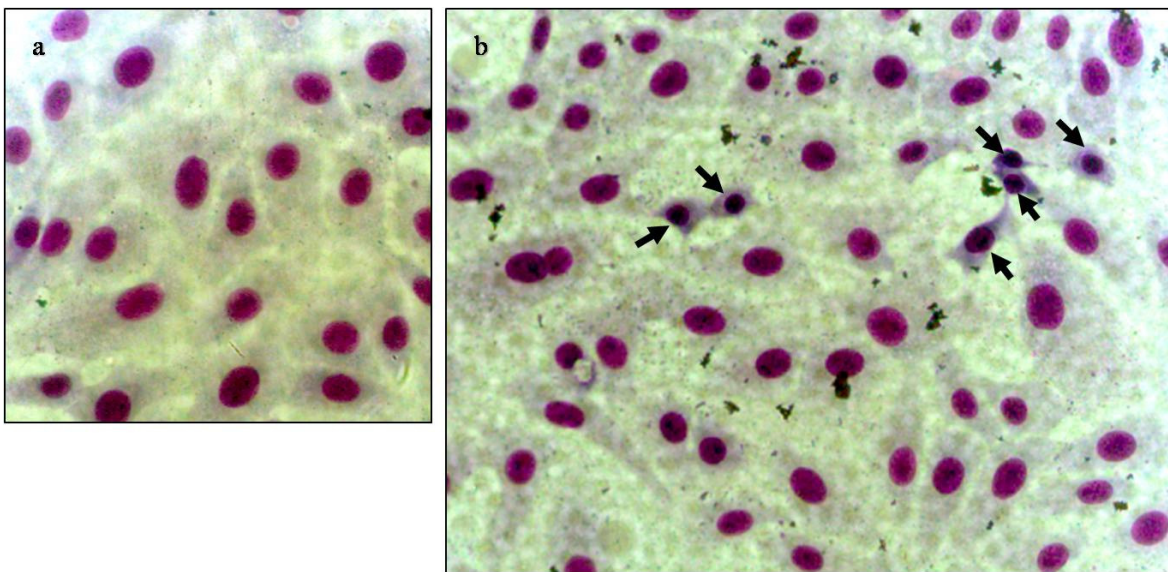


FIGURA 23 – Micrografia (coloração com Giemsa) de células Vero controle 9 horas (**a**) e Célula Vero infectada com o VCC com 9 horas (**b**). As setas pretas indicam células com características morfológicas de apoptose (condensação da cromatina, retração celular e nuclear, perda de estruturas juncionais com individualização celular e anoiquia). Objetiva 40 X 0,75.

A coloração com o corante Giemsa também revelou corpúsculos de inclusão nas células Vero infectadas pelo VCC, predominantemente após 24 horas p.i. (**FIGURA 24**).

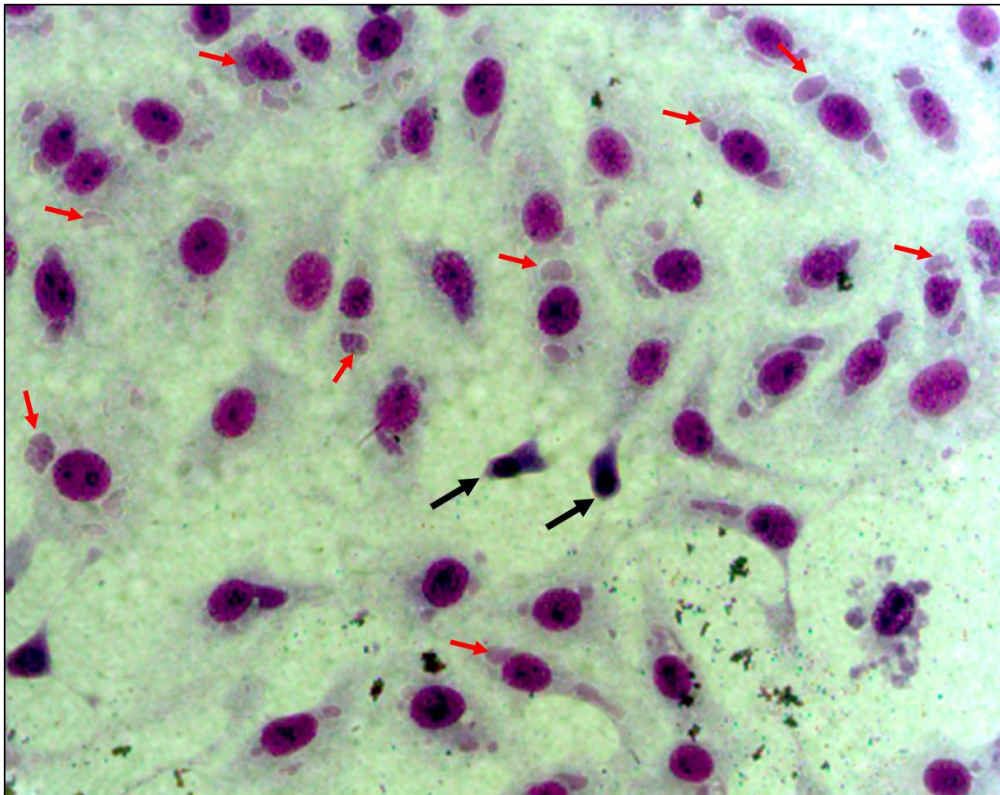


FIGURA 24 – Micrografia (coloração com o corante Giemsa) de células Vero com 24 horas de infecção pelo VCC. Observar as setas vermelhas que indicam os corpúsculos de inclusão; e as setas pretas indicam células com características morfológicas de apoptose (condensação da cromatina, retração celular e nuclear, perda de estruturas juncionais com individualização celular e anoiquia). Objetiva 40 X 0,75.

4.3. Coloração com Cristal Violeta

Avaliou-se os núcleos apoptóticos pela condensação e fragmentação da cromatina, e a retração celular através da utilização do corante cristal violeta que permite a coloração rápida das células diretamente na placa de cultivo celular, e a visualização citoplasmática e nuclear (**FIGURA 25**).

Os resultados da contagem das células revelaram nas células Vero controle e células Vero infectadas pelo VCC, nos tempos de 3 a 48 horas, as seguintes proporções de células em apoptose: 3 horas (VCC- 1% e VCC+ 1%); 6 horas (VCC- 2% e VCC+ 3%); 9 horas (VCC- 2% e VCC+ 8%); 24 horas (VCC- 1% e VCC+ 11%); 30 horas (VCC- 1% e VCC+ 18%) e 48 horas (VCC- 3% e VCC+ 17%).

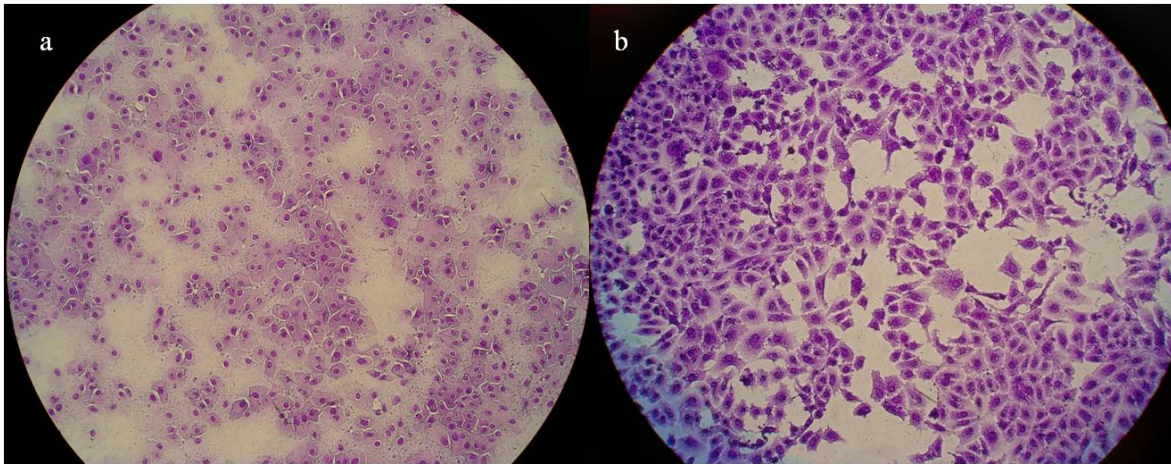


FIGURA 25 – Micrografia (coloração com o cristal violeta) de monocamada de células Vero infectadas pelo VCC (**b**) e controle (**a**), em uma placa de 6 poços com 24 horas p.i. Observar a monocamada de células preservadas em (**a**), e o início da destruição da monocamada, sendo possível visualizar células com características morfológicas de apoptose em (**b**). Objetiva 20X.

4.4. Índice apoptótico final

O índice apoptótico das células Vero controle (VCC-) e das infectadas pelo VCC (VCC+) nos tempos de 3, 6, 9, 24, 30 e 48 horas obtido através da contagem de células em apoptose em 3 diferentes técnicas (DAPI, Giemsa e Cristal violeta), está representado no **GRÁFICO 4**.

Os resultados demonstraram que não houve diferença estatística no índice apoptótico nos tempos de 3 e 6 horas ($P > 0.05$), comparando controle com infectados. No entanto, a análise estatística demonstrou diferença significativa nos tempos de 9, 24, 30 e 48 horas p.i. ($P < 0.05$) (**GRÁFICO 5**).

O resultado final da porcentagem de células em apoptose, da média de 300 células contadas por tempo e tratamento (controle/infectada) foram: 3 horas p.i. = 2%; 6 horas p.i. = 3%; 9 horas p.i. = 6,67%; 24 horas p.i. = 11%; 30 horas p.i. = 16,34% e 48 horas p.i. = 17,34% (**FIGURA 27**).

Células Vero

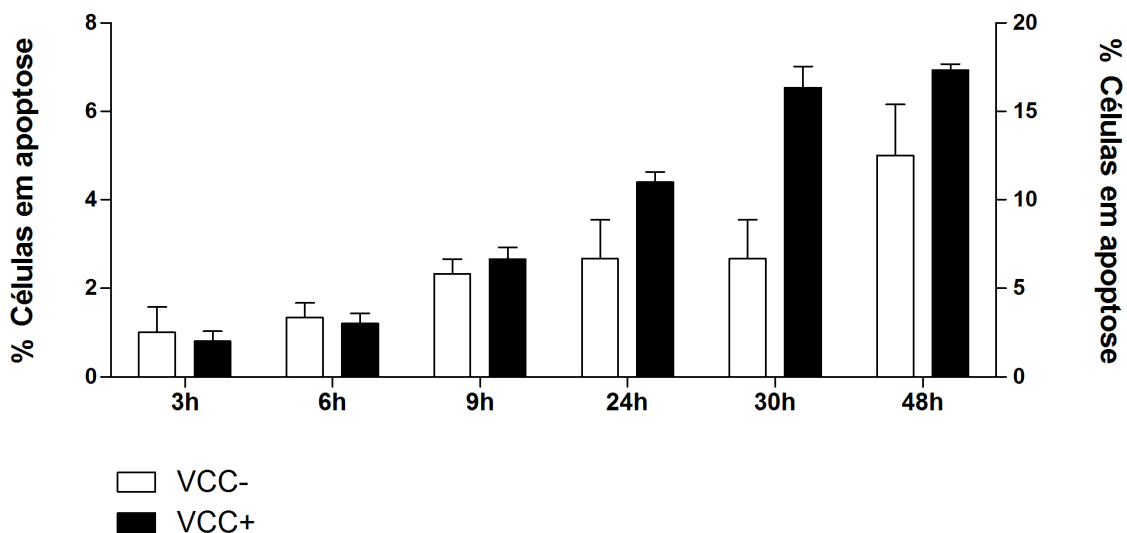


GRÁFICO 4 – Média do índice apoptótico (número de células em apoptose/número de células totais) a partir da contagem de 300 células. Células Vero controle (VCC-) e células Vero infectadas pelo VCC (VCC+). Os dados foram expressos como média \pm E.P.M. (Erro Padrão da Média).

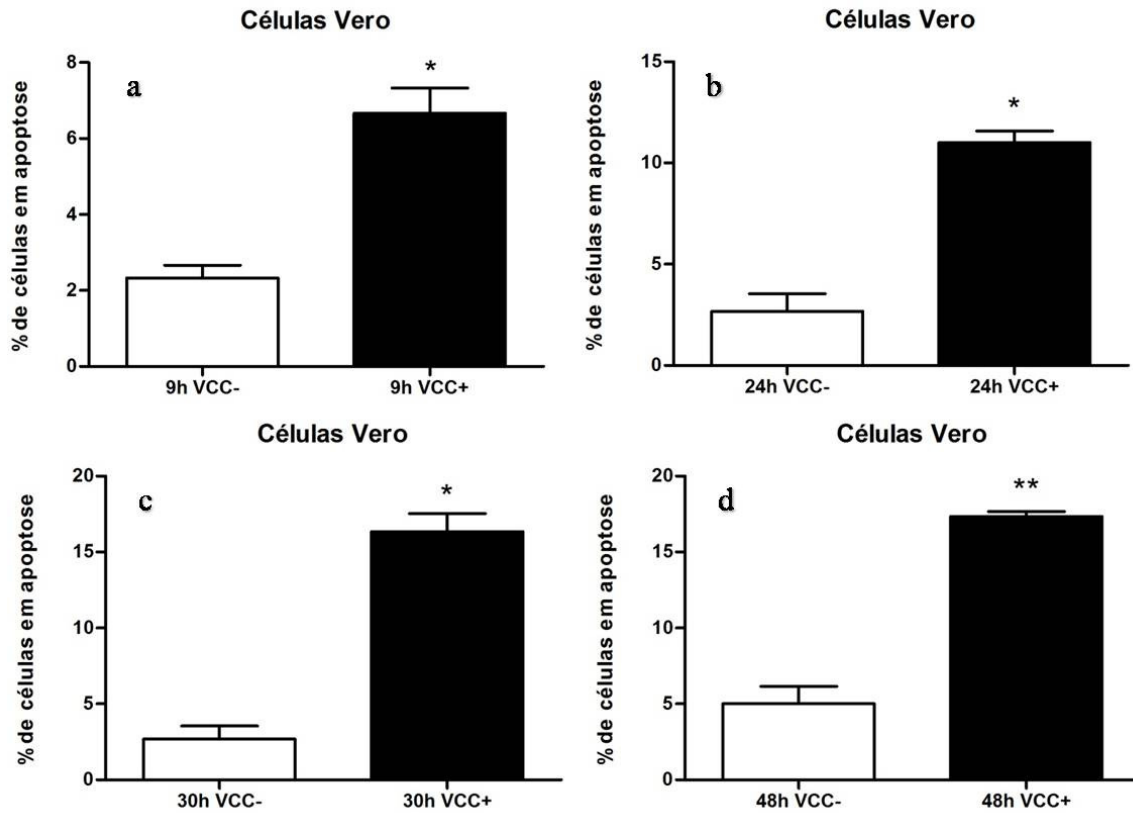


GRÁFICO 5 – Índice apoptótico das células Vero controle (VCC-) e células Vero infectadas (VCC+) nos tempos de 9 **(a)**, 24 **(b)**, 30 **(c)** e 48 **(d)** horas p.i. **(a)** 6,67%; **(b)** 11%; **(c)** 16,34% e **(d)** 17,34%. Os dados foram expressos como média \pm E.P.M. (Erro Padrão da Média). * $p < 0.05$ (Teste t pareado), ** $p < 0.01$ (Teste t pareado).

5. Citometria de fluxo

Foram realizados 3 experimentos independentes, e cada experimento em duplicata. Os resultados das leituras no citômetro de fluxo, utilizando a marcação dos núcleos com Iodeto de Propídeo (P.I) foi capaz de revelar a posição do ciclo celular que as células se encontravam, e as populações de células com conteúdo de DNA subdiploide. O histograma revelou a porcentagem de células em apoptose, indicando as células com DNA subdiploide (**FIGURA 26 e 27**). Comparando-se o grupo controle com o grupo infectado, observou-se que o vírus induz fragmentação nuclear, uma característica da apoptose, tirando as células dos picos de G1/Go, S ou G2/M, e deslocando-as para M1, onde são marcadas as populações de células com DNA subdiploide. Os resultados dos histogramas dos tempos de 3, 6, 9, 24, 30 e 48 pós infecção pelo VCC indicam que a apoptose é crescente em decorrer do curso da infecção do VCC nas células Vero, com uma queda das células em apoptose após o tempo de 30 horas de infecção quando comparado com o tempo de 24 horas (**GRÁFICO 6**).

As porcentagens de células em apoptose após a infecção do vírus da cinomose canina nos tempos de 3, 6, 9, 24, 30 e 48 horas, com seus respectivos controles, são: 3h vcc- = 4,69%; 3h vcc+ = 19,82%; 6h vcc- = 7,19%; 6h vcc+ = 22%; 9h vcc- = 7,20% e 9h vcc+ = 33,36%; 24h vcc- = 4,08% e 24h vcc+ = 55,59%; 30h vcc- = 2,28% e 30h vcc+ = 52%; 48h vcc- = 9,25% e 48h vcc+ = 37,35%.

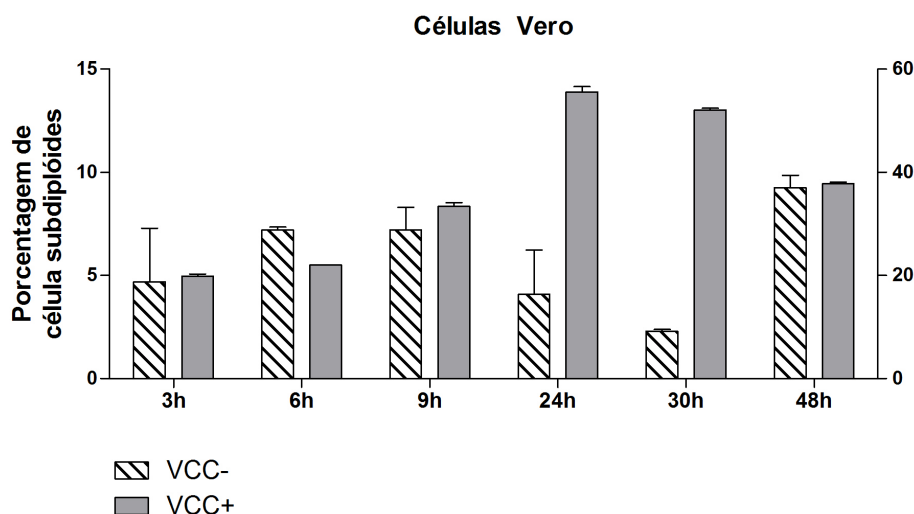


GRÁFICO 6 – Médias de células subdiploides em células Vero infectadas pelo VCC (VCC+) e em células Vero controle (VCC-). Os dados foram expressos como média \pm E.P.M. (Erro Padrão da Média). $p < 0,05$ (Teste t pareado).

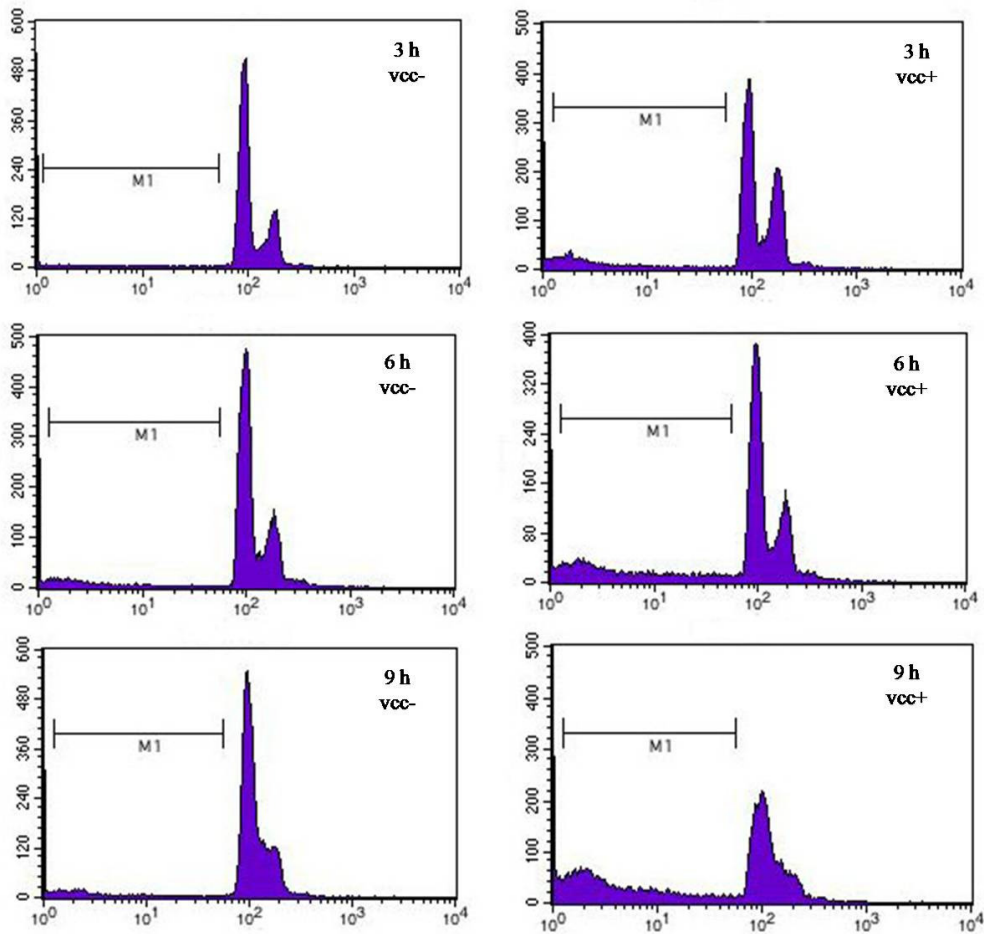


FIGURA 26 – Intensidade de fluorescência do iodeto de propídeo em células Vero infectadas pelo VCC e em células Vero controle, em diferentes tempos pós infecção, mostrando a porcentagem de células com conteúdo de DNA subdiploide (M1), ou seja, em apoptose. Os tempos representados são de 3, 6 e 9 horas, grupo controle VCC-, e o grupo infectado VCC+.

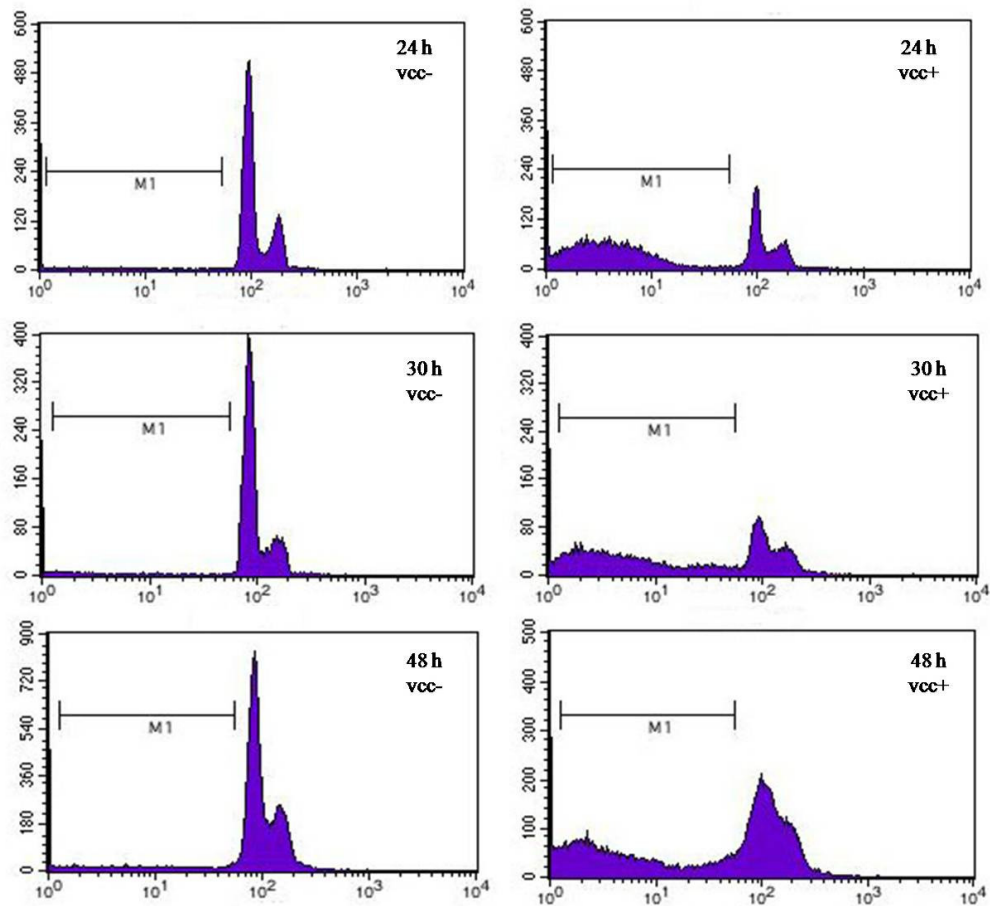


FIGURA 27 – Intensidade de fluorescência do iodeto de propídeo em células Vero infectadas pelo VCC e em células Vero controle, em diferentes tempos pós infecção, mostrando a porcentagem de células com conteúdo de DNA subdiploide (M1), em apoptose. Os tempos representados são de 24, 30 e 48 horas, grupo controle VCC-, e o grupo infectado VCC+.

DISCUSSÃO

A cinomose canina é uma doença imunossupressiva que induz apoptose em tecido linfóide e cerebelo de cães (Moro, Martins, Alves, Santos, Del Puerto *et al.*, 2003; Moro, Martins, Alves, Santos, Nunes *et al.*, 2003). A apoptose induzida em linfonodo e cerebelo de cães naturalmente infectados com o VCC está associada com a expressão de Caspase 3 e Caspase 8 (Del Puerto, Vasconcelos, Moro, Milsted *et al.*, 2010). Schobesberger e colaboradores (2005) também reportaram que a infecção pelo VCC causa apoptose em linfócitos 3 dias após a infecção.

A apoptose também foi observada em células Vero com 48 horas de infecção pelo vírus da cinomose canina (Kajita, Katayama *et al.*, 2006) através da observação da ativação das proteínas Caspase 3 e -8 por método colorimétrico enzimático. Entretanto até o momento os mecanismos de ativação dos genes envolvidos nas vias de apoptose nas células Vero infectadas pelo VCC-Lederle não haviam sido descritos em uma escala de tempo crescente pós-infecção. Assim este estudo relata pela primeira vez a cinética da expressão de genes pró e anti-apoptóticos em uma escala de tempo contemplando os períodos de 3, 6, 9, 15, 24, 30 e 48 horas após a infecção pelo vírus da cinomose canina.

5.1. Imunocitoquímica

A expressão das Caspase 3 e 8 em células Vero ocorreu em 24 horas de infecção pelo VCC-Lederle, como detectado pela imunocitoquímica, indicando que o vírus ativa tais caspases nas células Vero, como parte do mecanismo de indução da apoptose. Esses resultados são consistentes com os resultados encontrados por Kajita e colaboradores (2006) que usaram um teste colorimétrico enzimático para constatar a ativação de Caspase 3 e Caspase 8 em células Vero infectadas por 48 horas pelo VCC-Ond (Onderstepoort). Também foi observado uma marcação menos intensa de Caspase 3 e -8 em algumas células Vero controle, o que concorda com os resultados da citometria de fluxo, o qual revelou cerca de 8% de apoptose nas células controle com 24 horas de cultivo, enquanto as células infectadas apresentaram uma média de 54% de apoptose. Nas lâminas das células Vero controle a monocamada estava preservada, e a marcação das caspases ocorreu em células sem morfologia típica de apoptose. Por outro lado nas células Vero infectadas pelo VCC, todas as células estavam marcadas, algumas com morfologia típica de apoptose, e com a monocamada já estava destruída pela infecção viral (**FIGURA 17**).

As reações de imunocitoquímica padronizadas com células HeLa sem nenhum tratamento (controle negativo), células HeLa tratadas com cisplatina (controle positivo) e células HeLa

infectadas pelo VCC. A cisplatina é uma droga anti-tumoral, utilizada desde a década de 1970 no tratamento do câncer (Gonzalez, Fuertes *et al.*, 2001). É um agente que danifica o DNA utilizada no tratamento de vários tumores (Cohen e Lippard, 2001), conhecida por agir sinergicamente quando administrada em combinação com várias drogas quimioterápicas, e tem se tornado uma parte padrão na terapia do câncer (Liu, Xing *et al.*, 2005). Estudos tem revelado que a cisplatina induz apoptose em células normais e tumorais pelas vias dependente e não dependente de Caspase 3 (Henkels e Turchi, 1999; Cummings e Schnellmann, 2002). A imunocitoquímica revelou a presença de Caspase 3 e -8 nas células HeLa tratadas com cisplatina (controle positivo), e nenhuma marcação em células HeLa controle negativo (**FIGURA 14**). Quando infectadas pelo VCC as células HeLa apresentaram marcação positiva para Caspase 3, e marcação negativa para Caspase 8 (**FIGURA 16**). Não há nenhum relato na literatura da indução de apoptose pelo VCC em células HeLa, portanto mais estudos são necessários para descrever esse mecanismo de apoptose na infecção pelo VCC em células HeLa.

5.2. PCR em tempo real

Demonstrou-se que a expressão de mRNA do gene para Caspase 3 foi 19 vezes maior nas células Vero com 3 horas de infecção quando comparadas com as células Vero controle no mesmo tempo. No decorrer da infecção, a expressão da Caspase 3 foi decrescente nos tempos de 6, 9, 15, 24, 30 e 48 (14,36; 6,53; 4,46; 5,98; 1,67 e 0,9, respectivamente), mas ainda maior que os seus respectivos controles, com um ligeiro aumento na expressão no tempo de 24 horas quando comparado com o tempo de 15 horas (**GRÁFICO 1**).

De maneira similar a expressão de mRNA do gene para Caspase 8 foi 2,7 vezes maior nas células Vero com 3 horas de infecção quando comparadas com as células Vero controle no mesmo tempo. No decorrer da infecção, a expressão da Caspase 8 manteve-se sempre maior nas células infectadas pelo VCC em comparação com seus respectivos controles, exceto no tempo de 48 horas que a expressão gênica da Caspase 8 apresentou-se menor. Este fato pode ser reflexo da deficiência na célula infectada em sintetizar suas próprias proteínas, visto que o vírus passa a comandar a síntese protéica da célula hospedeira (**GRÁFICO 2**).

A apoptose pode ocorrer sem a síntese de novas caspases, e a regulação da transcrição das caspases tem uma importante função em certas circunstâncias. A expressão basal de caspases é baixa, mas estímulos patológicos, como isquemia, aumentam a transcrição de caspase -11 (Li e Yuan, 2008). O que observamos na infecção pelo vírus da cinomose *in vivo* e *in vitro* foi o aumento na expressão das Caspases 3 e Caspase 8 pela presença do vírus.

Curiosamente, as células Vero com 15 e 24 horas de infecção pelo VCC-lederle aumentaram a expressão gênica do receptor Fas de 2,74 vezes no tempo de 15 horas, e de 1,88 vezes no tempo de 24 horas quando comparado com seus respectivos controles (**GRÁFICO 3**). Kajita e colaboradores (2006) relataram aumento na expressão do receptor Fas em células Vero infectadas pelo VCC-Ond com 48 de infecção, através de uma RT-PCR semi-quantitativa. No tempo de 48 horas houve um ligeiro aumento na expressão gênica do receptor Fas (1,1), mas que não foi estatisticamente significativa. Ao tempo de 15 horas pós-infecção ocorreu um pequeno aumento na expressão do gene para Caspase 8, quando comparando-se ao tempo de 9 horas, de 1,83 para 2,43 vezes. Em seguida caiu novamente no tempo de 24 horas pós-infecção para 1,36. Esse aumento aconteceu exatamente no tempo em que iniciou-se uma maior expressão do gene para o receptor Fas, parecendo haver aí uma associação.

Esses resultados podem indicar a possibilidade da infecção pelo VCC-Lederle em células Vero ativar a apoptose via Caspase 8 mediada pelo receptor de morte Fas. No caso do vírus do sarampo, também do gênero *Morbillivirus*, células mononucleares de sangue periférico (Vuorinen, Peri *et al.*, 2003), e células dendríticas (Servet-Delprat, Vidalain *et al.*, 2000) infectadas sofrem apoptose em células T não infectadas através do receptor de morte Fas e o seu ligante (FasL) (Servet-Delprat, Vidalain *et al.*, 2000). No entanto, a participação da via Fas-FasL na apoptose das células Vero infectadas com o VCC-Lederle fica dependente da ação da expressão de FasL em células Vero, ato que ainda não ocorreu. Com respeito ao vírus parainfluenza tipo 1 murino, também da subfamília Paramixovirinae, foi demonstrado que a apoptose das células hospedeiras *in vitro* depende da Caspase 8 mas não requer o Fas ligante (Bitzer, Prinz *et al.*, 1999). Estes autores conjecturaram que a Caspase 8 poderia ser ativada pelo Apaf-1 nas células infectadas. Neste estudo o VCC-Lederle aumentou a expressão de receptor Fas com 15 e 24 horas após a infecção, sendo que o maior aumento da expressão de Caspase 8 ocorreu na fase inicial da infecção, com 3 horas. Isto sugere que a expressão do mRNA do receptor Fas seria uma resposta tardia da célula à infecção pelo VCC, já que não se avaliou a proteína e sim o mRNA. Estudos futuros para clarificar o papel do receptor Fas no mecanismo de apoptose na infecção pelo VCC são necessários, vez que não há relatos da expressão do ligante do receptor Fas (FasL) em células Vero.

Outra alternativa para a indução da apoptose é a via intrínseca (mitocondrial). Nessa via, danos no DNA induz a expressão de p53, o que resulta na ativação de Bax. Bax ativa a liberação de citocromo C da mitocôndria, que subsequentemente ativa Caspase 3 através da formação do complexo apoptossômico e ativação de Caspase 9 (Adams, 2003; Cory, Edwards *et al.*, 2003). No presente estudo, não houve alteração significativa na expressão dos genes pró-apoptóticos Bax e Caspase 9, e do gene anti-apoptótico Bcl-2, em células Vero infectadas pelo VCC-Lederle nos

tempos de 3, 6, 9, 24, 30 e 48 horas pós-infecção. No trabalho descrito por Kajita e colaboradores (2006), um RT-PCR convencional semi-quantitativo foi realizado para análise da expressão de Bcl-2 e Bax, e os resultados não demonstraram nenhuma mudança na expressão dos genes de Bcl-2 e Bax com 48 horas após a infecção das células Vero pelo VCC. Esses resultados indicam que a via intrínseca da apoptose não está envolvida nos mecanismos de apoptose induzida pela infecção do VCC.

5.3. Índice apoptótico e citometria de fluxo

As contagens de células Vero infectadas pelo VCC em apoptose revelaram um número crescente no decorrer do tempo pós-infecção (**GRÁFICO 4**), com percentuais de apoptose nos tempos pós-infecção 3, 6, 9, 25, 30 e 48 horas de 2%; 3%; 6,67%; 11%; 16,34% e 17,34%, respectivamente. Mas comparando-se as células Vero do grupo infectado com grupo controle nos tempos de 3 e 6 horas, as células em apoptose não apresentaram diferença nesses dois tempos iniciais ($p>0.05$).

No entanto, as células Vero infectadas pelo VCC com conteúdo de DNA subdiploide pela citometria de fluxo aumentaram de maneira crescente indicando apoptose até o tempo de 24 horas. No tempo de 30 e 48 horas a porcentagem de células em apoptose caiu comparando-se com o tempo de 24 horas (**GRÁFICO 6**). Mas ainda assim houve um aumento na apoptose induzida pelo VCC em todos os tempos, exceto nos tempos iniciais de 3 e 6 horas pós-infecção que não apresentaram diferenças entre o grupo infectado e o controle. Tais resultados concordam com os resultados do índice apoptótico pela contagem direta das células.

Assim o índice apoptótico e citometria de fluxo foram concordantes, ainda que a porcentagem de células em apoptose pela contagem das células com morfologia típica de apoptose foram menores do que citômetro de fluxo. As células Vero infectadas pelo VCC aderidas na lamínula, quando em apoptose, se retraem e podem se desprender (pela perda de contato com as células vizinhas). Isto impossibilita a contagem dessas células que se desprenderam para o sobrenadante, o que ainda é possível pela citometria de fluxo, que conta tanto as células aderidas quanto as células que já estão em suspensão.

Tanto os índices apoptóticos quanto a citometria de fluxo mostraram elevação crescente da apoptose em células Vero infectadas pelo VCC-Lederle com o decorrer do tempo, enquanto os resultados da expressão dos genes pró-apoptóticos Caspase 3 e Caspase 8 apresentaram valores decrescentes com o decorrer do tempo pós-infecção.

Assim, no início da infecção pelo VCC-Lederle nas células Vero, nos tempos de 3 e 6 horas, inicia-se a ativação na expressão de genes apoptóticos (Caspase 8 e Caspase 3), que aumenta a síntese das pró-Caspases 3 e 8, que culmina com a ativação das caspases 8 (iniciadora), e 3 (efetora), desencadeando a morte celular por apoptose. A partir do tempo de 9 horas pós infecção, esse mecanismo de morte ativado já começa a ser visualizado com intensidade pelas alterações morfológicas típicas do processo de apoptose (retração celular, condensação da cromatina, núcleo picnótico, perda da adesão com as células vizinhas), que aumenta gradativamente ao decorrer do tempo pós infecção.

Baseado nos presentes achados *in vivo* (Del Puerto, Vasconcelos, Moro, Milsted *et al.*, 2010) e *in vitro*, podemos concluir que o VCC induz apoptose pela ativação de Caspase 3, através da sinalização da Caspase 8, ao invés da sinalização mitocondrial.

CONCLUSÃO

Baseado nos resultados desse trabalho, pode-se concluir que:

- O vírus da cinomose canina ativa Caspase 8 iniciadora; que por sua vez ativa a Caspase 3 efetora, como demonstrado pela imunocitoquímica, e pela expressão dos respectivos genes quantificados pela PCR em tempo real. Portanto, a provável via de ativação da apoptose na infecção *in vitro* pelo VCC é uma via independente da via mitocondrial.
- A infecção das células Vero pelo VCC ativa a expressão de genes pró-apoptóticos (Caspase 8 e Caspase 3) no início do curso da infecção, aumentando a disponibilidade das Caspases no processo de morte celular por apoptose.
- A apoptose induzida pelo VCC *in vivo* é tempo dependente, com um aumento crescente durante o curso da infecção nas células Vero.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Adams, J. M. Ways of dying: multiple pathways to apoptosis. Genes Dev, v.17, n.20, Oct 15, p.2481-95. 2003.
- Alison, M. R. e C. E. Sarraf. Apoptosis: a gene-directed programme of cell death. J R Coll Physicians Lond, v.26, n.1, Jan, p.25-35. 1992.
- Appel, M. J. Pathogenesis of canine distemper. Am J Vet Res, v.30, n.7, Jul, p.1167-82. 1969.
- _____. Canine Distemper Virus. In: M. J. Appel (Ed.). Virus infection of carnivores. Amsterdam: Elsevier, 1987. Canine Distemper Virus, p.133-159
- Appel, M. J. e B. A. Summers. Pathogenicity of morbilliviruses for terrestrial carnivores. Vet Microbiol, v.44, n.2-4, May, p.187-91. 1995.
- Badley, A. D., A. A. Pilon, *et al.* Mechanisms of HIV-associated lymphocyte apoptosis. Blood, v.96, n.9, Nov 1, p.2951-64. 2000.
- Baumgartner, W., R. W. Boyce, *et al.* Metaphyseal bone lesions in young dogs with systemic canine distemper virus infection. Vet Microbiol, v.44, n.2-4, May, p.201-9. 1995.
- Beineke, A., C. Puff, *et al.* Pathogenesis and immunopathology of systemic and nervous canine distemper. Vet Immunol Immunopathol, v.127, n.1-2, Jan 15, p.1-18. 2009.
- Birchard, S. J. e R. G. Sherding. Clinica de pequenos animais. São Paulo: Rocca. 2003 (Clinica de pequenos animais)
- Bitzer, M., F. Prinz, *et al.* Sendai virus infection induces apoptosis through activation of caspase-8 (FLICE) and caspase-3 (CPP32). J Virol, v.73, n.1, Jan, p.702-8. 1999.
- Blixenkrone-Moller, M., V. Svansson, *et al.* Studies on manifestations of canine distemper virus infection in an urban dog population. Vet Microbiol, v.37, n.1-2, Oct, p.163-73. 1993.
- Brown, D. G., X. M. Sun, *et al.* Dexamethasone-induced apoptosis involves cleavage of DNA to large fragments prior to internucleosomal fragmentation. J Biol Chem, v.268, n.5, Feb 15, p.3037-9. 1993.
- Chang, H. Y. e X. Yang. Proteases for cell suicide: functions and regulation of caspases. Microbiol Mol Biol Rev, v.64, n.4, Dec, p.821-46. 2000.
- Charriaut-Marlangue, C. e Y. Ben-Ari. A cautionary note on the use of the TUNEL stain to determine apoptosis. Neuroreport, v.7, n.1, Dec 29, p.61-4. 1995.

Cohen, S. M. e S. J. Lippard. Cisplatin: from DNA damage to cancer chemotherapy. Prog Nucleic Acid Res Mol Biol, v.67, p.93-130. 2001.

Cory, A. H., C. C. Edwards, *et al.* Inhibitors of diverse metabolic steps cause increased apoptosis in deoxyadenosine-resistant mouse leukemia L1210 cells that lack p53 expression: convergence at caspase-3 activation. Adv Enzyme Regul, v.43, p.29-45. 2003.

Cotton, M. F., D. N. Ikle, *et al.* Apoptosis of CD4+ and CD8+ T cells isolated immediately *ex vivo* correlates with disease severity in human immunodeficiency virus type 1 infection. Pediatr Res, v.42, n.5, Nov, p.656-64. 1997.

Cummings, B. S. e R. G. Schnellmann. Cisplatin-induced renal cell apoptosis: caspase 3-dependent and -independent pathways. J Pharmacol Exp Ther, v.302, n.1, Jul, p.8-17. 2002.

Darzynkiewicz, Z., G. Juan, *et al.* Cytometry in cell necrobiology: analysis of apoptosis and accidental cell death (necrosis). Cytometry, v.27, n.1, Jan 1, p.1-20. 1997.

Decaro, N., M. Camero, *et al.* Canine distemper and related diseases: report of a severe outbreak in a kennel. New Microbiol, v.27, n.2, Apr, p.177-81. 2004.

Del Puerto, H. L., A. C. Vasconcelos, *et al.* Canine distemper virus detection in asymptomatic and nonvaccinated dogs. Brazilian Journal of Veterinary Research, v.30, n.2, p.139-144. 2010.

_____. Caspases -3/-8/-9, Bax and Bcl-2 expression in cerebellum, lymph node and leukocytes of dogs naturally infected with canine distemper virus Genetics and Molecular Research, v.9, n.1. 2010.

Dong, Z., P. Saikumar, *et al.* Internucleosomal DNA cleavage triggered by plasma membrane damage during necrotic cell death. Involvement of serine but not cysteine proteases. Am J Pathol, v.151, n.5, Nov, p.1205-13. 1997.

Donovan, M. e T. G. Cotter. Control of mitochondrial integrity by Bcl-2 family members and caspase-independent cell death. Biochim Biophys Acta, v.1644, n.2-3, Mar 1, p.133-47. 2004.

Elia, G., N. Decaro, *et al.* Detection of canine distemper virus in dogs by real-time RT-PCR. J Virol Methods, v.136, n.1-2, Sep, p.171-6. 2006.

Frisk, A. L., M. Konig, *et al.* Detection of canine distemper virus nucleoprotein RNA by reverse transcription-PCR using serum, whole blood, and cerebrospinal fluid from dogs with distemper. J Clin Microbiol, v.37, n.11, Nov, p.3634-43. 1999.

Gatti, R., S. Belletti, *et al.* Comparison of annexin V and calcein-AM as early vital markers of apoptosis in adherent cells by confocal laser microscopy. J Histochem Cytochem, v.46, n.8, Aug, p.895-900. 1998.

Gonzalez, V. M., M. A. Fuertes, *et al.* Is cisplatin-induced cell death always produced by apoptosis? Mol Pharmacol, v.59, n.4, Apr, p.657-63. 2001.

Gordon, M. T., S. C. Bell, *et al.* Prevalence of canine distemper antibodies in the pagetic population. J Med Virol, v.40, n.4, Aug, p.313-7. 1993.

Gougeon, M. L., R. Olivier, *et al.* [Demonstration of an engagement process towards cell death by apoptosis in lymphocytes of HIV infected patients]. C R Acad Sci III, v.312, n.11, p.529-37. 1991.

Greene, C. E., Apple, M. J. Canine Distemper. In: C. E. Greene (Ed.). Infectious diseases of the dog and cat. Philadelphia: W.B. Saunders, 1990. Canine Distemper, p.226-241

Gross, A., J. Jockel, *et al.* Enforced dimerization of BAX results in its translocation, mitochondrial dysfunction and apoptosis. Embo J, v.17, n.14, Jul 15, p.3878-85. 1998.

Grutter, M. G. Caspases: key players in programmed cell death. Curr Opin Struct Biol, v.10, n.6, Dec, p.649-55. 2000.

Guo, A. e C. Lu. Canine distemper virus causes apoptosis of Vero cells. J Vet Med B Infect Dis Vet Public Health, v.47, n.3, Apr, p.183-90. 2000.

Henkels, K. M. e J. J. Turchi. Cisplatin-induced apoptosis proceeds by caspase-3-dependent and -independent pathways in cisplatin-resistant and -sensitive human ovarian cancer cell lines. Cancer Res, v.59, n.13, Jul 1, p.3077-83. 1999.

Horta, M. F. e J. D. Yong. Apoptose: quando a célula programa a própria morte. Ciência Hoje, v.25, n.150, p.38-45. 1999.

Howard, J. M., B. S. Eckert, *et al.* Comparison of cytoskeletal organization in canine distemper virus-infected and uninfected cells. J Gen Virol, v.64 (Pt 11), Nov, p.2379-85. 1983.

Hoyland, J. A., J. A. Dixon, *et al.* A comparison of in situ hybridisation, reverse transcriptase-polymerase chain reaction (RT-PCR) and in situ-RT-PCR for the detection of canine distemper virus RNA in Paget's disease. J Virol Methods, v.109, n.2, May, p.253-9. 2003.

Huppertz, B., ;, H. G. Frank, *et al.* The apoptosis cascade morphological and immunohistochemical methods for its visualization. Anatomy & Embriology, v.200, n.1, p.1-18. 1999.

Iwatsuki, K., M. Okita, *et al.* Immunohistochemical analysis of the lymphoid organs of dogs naturally infected with canine distemper virus. J Comp Pathol, v.113, n.2, Aug, p.185-90. 1995.

Kajita, M., H. Katayama, *et al.* Canine distemper virus induces apoptosis through caspase-3 and -8 activation in vero cells. J Vet Med B Infect Dis Vet Public Health, v.53, n.6, Aug, p.273-7. 2006.

Kerr, J. F. A personal account of events leading to the definition of the apoptosis concept. Results Probl Cell Differ, v.23, p.1-10. 1999.

Kerr, J. F. e J. Searle. A suggested explanation for the paradoxically slow growth rate of basal-cell carcinomas that contain numerous mitotic figures. J Pathol, v.107, n.1, May, p.41-4. 1972.

Koestner, A. Animal model of human disease: subacute sclerosing panencephalitis, multiple sclerosis; animal model: distemper-associated demyelinating encephalomyelitis. Am J Pathol, v.78, n.2, Feb, p.361-4. 1975.

Koopman, G., C. P. Reutelingsperger, *et al.* Annexin V for flow cytometric detection of phosphatidylserine expression on B cells undergoing apoptosis. Blood, v.84, n.5, Sep 1, p.1415-20. 1994.

Krakovka, S., A. Confer, *et al.* Evidence for transplacental transmission of canine distemper virus: two case reports. Am J Vet Res, v.35, n.9, Sep, p.1251-3. 1974.

Krakovka, S., R. J. Higgins, *et al.* Canine distemper virus: review of structural and functional modulations in lymphoid tissues. Am J Vet Res, v.41, n.2, Feb, p.284-92. 1980.

_____. Plasma phase viremia in canine distemper virus infection. Am J Vet Res, v.41, n.1, Jan, p.144-6. 1980.

Krakovka, S. e A. Koestner. Age-related susceptibility to infection with canine distemper virus in gnotobiotic dogs. J Infect Dis, v.134, n.6, Dec, p.629-32. 1976.

Krakovka, S., S. S. Ringler, *et al.* Immunosuppression by canine distemper virus: modulation of in vitro immunoglobulin synthesis, interleukin release and prostaglandin E2 production. Vet Immunol Immunopathol, v.15, n.3, Jun, p.181-201. 1987.

Kumagai, K., R. Yamaguchi, *et al.* Lymphoid apoptosis in acute canine distemper. J Vet Med Sci, v.66, n.2, Feb, p.175-81. 2004.

Lamb, R. A., R. G. Paterson, *et al.* Paramyxovirus membrane fusion: lessons from the F and HN atomic structures. Virology, v.344, n.1, Jan 5, p.30-7. 2006.

Lassus, P. e U. Hibner. Detection and quantification of apoptosis in transiently transfected adherent cells. Nucleic Acids Res, v.26, n.22, Nov 15, p.5233-4. 1998.

Lavrik, I., A. Golks, *et al.* Death receptor signaling. J Cell Sci, v.118, n.Pt 2, Jan 15, p.265-7. 2005.

Lecoœur, H. e M. L. Gougeon. Comparative analysis of flow cytometric methods for apoptosis quantitation in murine thymocytes and human peripheral lymphocytes from controls and HIV-infected persons. Evidence for interference by granulocytes and erythrocytes. J Immunol Methods, v.198, n.1, Oct 30, p.87-99. 1996.

Li, J. e J. Yuan. Caspases in apoptosis and beyond. Oncogene, v.27, n.48, Oct 20, p.6194-206. 2008.

Liu, Y., H. Xing, *et al.* The Mechanism of Cisplatin-induced Apoptosis in HeLa Cells. Chinese Journal of Clinical Oncology, v.2, n.6, p.866-869. 2005.

Livak, K. J. e T. D. Schmittgen. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. Methods, v.25, n.4, Dec, p.402-8. 2001.

Loo, D. T. e J. R. Rillema. Measurement of cell death. Methods Cell Biol, v.57, p.251-64. 1998.

Martella, V., G. Elia, *et al.* Canine distemper virus. Vet Clin North Am Small Anim Pract, v.38, n.4, Jul, p.787-97, vii-viii. 2008.

Mccarthy, N. J. e G. I. Evan. Methods for detecting and quantifying apoptosis. Curr Top Dev Biol, v.36, p.259-78. 1998.

Mcconkey, D. J. Cellular signaling in cell death. New Horiz, v.1, n.1, Feb, p.52-9. 1993.

Mignotte, B. e J. L. Vayssiere. Mitochondria and apoptosis. Eur J Biochem, v.252, n.1, Feb 15, p.1-15. 1998.

Moro, L., A. S. Martins, *et al.* Apoptosis in the cerebellum of dogs with distemper. J Vet Med B Infect Dis Vet Public Health, v.50, n.5, Jun, p.221-5. 2003.

_____. Apoptosis in canine distemper. Arch Virol, v.148, n.1, Jan, p.153-64. 2003.

Moss, W. J. e D. E. Griffin. Global measles elimination. Nat Rev Microbiol, v.4, n.12, Dec, p.900-8. 2006.

Nicoletti, I., G. Migliorati, *et al.* A rapid and simple method for measuring thymocyte apoptosis by propidium iodide staining and flow cytometry. J Immunol Methods, v.139, n.2, Jun 3, p.271-9. 1991.

Norrby, E., J. Kovamees, *et al.* Humanized animal viruses with special reference to the primate adaptation of morbillivirus. Vet Microbiol, v.33, n.1-4, Nov, p.275-86. 1992.

O'driscoll, J. B. e D. C. Anderson. Past pets and Paget's disease. Lancet, v.2, n.8461, Oct 26, p.919-21. 1985.

Olivier, R. Flow cytometry technique for assessing effects of N-acetylcysteine on apoptosis and cell viability of human immunodeficiency virus-infected lymphocytes. Methods Enzymol, v.251, p.270-8. 1995.

Perez, F. Es la muerte importante para la vida? Veterinária México, v.33, n.2, p.161-162. 2002.

Petit, P. X., H. Lecoecur, *et al.* Alterations in mitochondrial structure and function are early events of dexamethasone-induced thymocyte apoptosis. J Cell Biol, v.130, n.1, Jul, p.157-67. 1995.

Petit, P. X., N. Zamzami, *et al.* Implication of mitochondria in apoptosis. Mol Cell Biochem, v.174, n.1-2, Sep, p.185-8. 1997.

Reed, L. J. e H. Muench. A simple method of estimating fifty percent endpoints. Am. J. Hygiene, v.27, n.3, p.493-497. 1938.

Rzezutka, A. e B. Mizak. Application of N-PCR for diagnosis of distemper in dogs and fur animals. Vet Microbiol, v.88, n.1, Aug 2, p.95-103. 2002.

Saito, T. B., A. A. Alfieri, *et al.* Detection of canine distemper virus by reverse transcriptase-polymerase chain reaction in the urine of dogs with clinical signs of distemper encephalitis. Res Vet Sci, v.80, n.1, Feb, p.116-9. 2006.

Saraste, A. Morphologic criteria and detection of apoptosis. Herz, v.24, n.3, May, p.189-95. 1999.

Schmid, I., W. J. Krall, *et al.* Dead cell discrimination with 7-amino-actinomycin D in combination with dual color immunofluorescence in single laser flow cytometry. Cytometry, v.13, n.2, p.204-8. 1992.

Schmid, I., C. H. Uittenbogaart, *et al.* A rapid method for measuring apoptosis and dual-color immunofluorescence by single laser flow cytometry. J Immunol Methods, v.170, n.2, Apr 15, p.145-57. 1994.

Schobesberger, M., A. Summerfield, *et al.* Canine distemper virus-induced depletion of uninfected lymphocytes is associated with apoptosis. Vet Immunol Immunopathol, v.104, n.1-2, Mar 10, p.33-44. 2005.

Schuler, M., E. Bossy-Wetzel, *et al.* p53 induces apoptosis by caspase activation through mitochondrial cytochrome c release. J Biol Chem, v.275, n.10, Mar 10, p.7337-42. 2000.

- Schultz, L. B., N. H. Chehab, *et al.* p53 binding protein 1 (53BP1) is an early participant in the cellular response to DNA double-strand breaks. J Cell Biol, v.151, n.7, Dec 25, p.1381-90. 2000.
- Servet-Delprat, C., P. O. Vidalain, *et al.* Consequences of Fas-mediated human dendritic cell apoptosis induced by measles virus. J Virol, v.74, n.9, May, p.4387-93. 2000.
- Shell, L. G. Canine Distemper. In: (Ed.). Comp. Cont. Educ. Pract. Vet, v.12, 1990. Canine Distemper, p.173-179
- Shin, Y. J., K. O. Cho, *et al.* Comparison of one-step RT-PCR and a nested PCR for the detection of canine distemper virus in clinical samples. Aust Vet J, v.82, n.1-2, Jan-Feb, p.83-6. 2004.
- Spanos, S., S. Rice, *et al.* Caspase activity and expression of cell death genes during development of human preimplantation embryos. Reproduction, v.124, n.3, Sep, p.353-63. 2002.
- Summers, B. A., H. A. Greisen, *et al.* Canine distemper encephalomyelitis: variation with virus strain. J Comp Pathol, v.94, n.1, Jan, p.65-75. 1984.
- Suria, H., L. A. Chau, *et al.* Cytoskeletal disruption induces T cell apoptosis by a caspase-3 mediated mechanism. Life Sci, v.65, n.25, p.2697-707. 1999.
- Suzuki, M., R. J. Youle, *et al.* Structure of Bax: coregulation of dimer formation and intracellular localization. Cell, v.103, n.4, Nov 10, p.645-54. 2000.
- Svansson, V., M. Blixenkrone-Moller, *et al.* Infection studies with canine distemper virus in harbour seals. Arch Virol, v.131, n.3-4, p.349-59. 1993.
- Telford, W. G., L. E. King, *et al.* Comparative evaluation of several DNA binding dyes in the detection of apoptosis-associated chromatin degradation by flow cytometry. Cytometry, v.13, n.2, p.137-43. 1992.
- Tipold, A., Vandeveld, M., Jaggy, A. Neurological manifestations of canine distemper virus infection. In: (Ed.). J. Small Anim. Pract., v.33, 1992. Neurological manifestations of canine distemper virus infection, p.466-470
- Tonetti, M. S., D. Cortellini, *et al.* In situ detection of apoptosis at sites of chronic bacterially induced inflammation in human gingiva. Infect Immun, v.66, n.11, Nov, p.5190-5. 1998.
- Tsujimoto, Y. e S. Shimizu. Bcl-2 family: life-or-death switch. FEBS Lett, v.466, n.1, Jan 21, p.6-10. 2000.

Vindelov, L. L., I. J. Christensen, *et al.* Limits of detection of nuclear DNA abnormalities by flow cytometric DNA analysis. Results obtained by a set of methods for sample-storage, staining and internal standardization. Cytometry, v.3, n.5, Mar, p.332-9. 1983.

Von Messling, V., G. Zimmer, *et al.* The hemagglutinin of canine distemper virus determines tropism and cytopathogenicity. J Virol, v.75, n.14, Jul, p.6418-27. 2001.

Vuorinen, T., P. Peri, *et al.* Measles virus induces apoptosis in uninfected bystander T cells and leads to granzyme B and caspase activation in peripheral blood mononuclear cell cultures. Eur J Clin Invest, v.33, n.5, May, p.434-42. 2003.

Wang, X. The expanding role of mitochondria in apoptosis. Genes Dev, v.15, n.22, Nov 15, p.2922-33. 2001.

Wang, Y. Y. e X. X. Zheng. A flow cytometry-based assay for quantitative analysis of cellular proliferation and cytotoxicity in vitro. J Immunol Methods, v.268, n.2, Oct 15, p.179-88. 2002.

Wyllie, A. H., J. F. Kerr, *et al.* Cell death: the significance of apoptosis. Int Rev Cytol, v.68, p.251-306. 1980.

Zhang, C. L., L. J. Wu, *et al.* Oridonin induces apoptosis of HeLa cells via altering expression of Bcl-2/Bax and activating caspase-3/ICAD pathway. Acta Pharmacol Sin, v.25, n.5, May, p.691-8. 2004.

ANEXO

PREPARO DAS SOLUÇÕES

Tampão PBS 10X

- 80,0g NaCl

- 2,0g KCl

- 14,4g Na₂HPO₄ (Se dihidratado, usar 18g) – dissolver aos poucos.

- 2,4g KH₂PO₄

800 mL de água miliQ

Completar o volume para 1000 mL e esterilizar por autoclavagem. Estocar em geladeira.

Tampão PBS 1X

Diluir a partir do PBS 10X

100ml de PBS 10X + 800ml de água miliQ

Ajustar o pH para 7.4

Completar o volume para 1000ml

Esterilizar por autoclavagem

Tampão TBS

(50 mM Tris-HCl, 0,15 M NaCl – pH 7,6)

Volume final: 500ml

- 3,94g de Tris HCl

- 4,38g de NaCl

500 ml de água destilada

Tampão TBS + BSA 2%

Volume final: 200ml

- 4g de BSA (Albumina de soro bovino)

200 ml de TBS

Tampão TBS + BSA 2% + Triton 0,1%

Volume final: 100ml

- 100 µl de Triton

- 9,9 ml de tampão TBS-BSA 2%

Tampão PBS +/- (Cálcio e magnésio)

Medir 100 ml de PBS 10X em 800 ml de H₂O deionizada, adicionar 50 ml de CaCl₂/MgCl₂ 40 X 0,75 e completar o volume para 1000 ml.

Tampão TAE 50 X

Volume final: 500mL

- 121g Tris Base
- 28,5mL Ácido acético glacial
- 50mL de EDTA 0,5M pH 8,0

Completar o volume com H₂O milli-Q. Filtrar em nitrocelulose, e estocar à temperatura ambiente.

Obs.: Para o preparo da solução de uso (TAE 1X), diluir em H₂O milli-Q.