

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS

ÉRICA ALMEIDA VISCONE

**AVALIAÇÃO IMUNOHISTOQUÍMICA DO ESTRESSE OXIDATIVO NO SISTEMA
NERVOSO CENTRAL DE CÃES POSITIVOS PARA CINMOSE**

UBERLÂNDIA

2020

ÉRICA ALMEIDA VISCONI

**AVALIAÇÃO IMUNOHISTOQUÍMICA DO ESTRESSE OXIDATIVO NO SISTEMA
NERVOSO CENTRAL DE CÃES POSITIVOS PARA CINOMOSE**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, da Faculdade de Medicina Veterinária, da Universidade Federal de Uberlândia como exigência parcial para obtenção do título de Mestre em Ciências Veterinárias.

Área de concentração: Saúde Animal

Orientador: Prof. Dr. Márcio de Barros Bandarra

Coorientadora: Profa. Dra. Aline Santana da Hora

UBERLÂNDIA

FEVEREIRO – 2020

Ficha Catalográfica Online do Sistema de Bibliotecas da UFU
com dados informados pelo(a) próprio(a) autor(a).

V824 2020	<p>Viscone, Érica Almeida, 1992- AVALIAÇÃO IMUNOHISTOQUÍMICA DO ESTRESSE OXIDATIVO NO SISTEMA NERVOSO CENTRAL DE CÃES POSITIVOS PARA CINOMOSE [recurso eletrônico] / Érica Almeida Viscone. - 2020.</p> <p>Orientador: Márcio de Barros Bandarra. Coorientadora: Aline Santana da Hora. Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de Uberlândia, Pós-graduação em Ciências Veterinárias. Modo de acesso: Internet. Disponível em: http://doi.org/10.14393/ufu.di.2020.9 Inclui bibliografia.</p> <p>1. Veterinária. I. Bandarra, Márcio de Barros, 1983-, (Orient.). II. Hora, Aline Santana da, 1978-, (Coorient.). III. Universidade Federal de Uberlândia. Pós-graduação em Ciências Veterinárias. IV. Título.</p> <p style="text-align: right;">CDU: 619</p>
--------------	--

Bibliotecários responsáveis pela estrutura de acordo com o AACR2:
Gizele Cristine Nunes do Couto - CRB6/2091
Nelson Marcos Ferreira - CRB6/3074



UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
 Secretaria da Coordenação do Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias
 BR 050, Km 78, Campus Glória, Uberlândia-MG, CEP 38400-902
 Telefone: (34) 2512-6811 - www.ppgcovev.ufu.br - mevet@ufu.br



ATA DE DEFESA - PÓS-GRADUAÇÃO

Programa de Pós-Graduação em:	CIÊNCIAS VETERINÁRIAS				
Defesa de:	DISSERTAÇÃO DE MESTRADO ACADÊMICO PPGCVET Nº 005/2020				
Data:	20 de fevereiro de 2020	Hora de início:	09:30	Hora de encerramento:	12:00
Matrícula do Discente:	11812MEV004				
Nome do Discente:	ÉRICA ALMEIDA VISCONE				
Título do Trabalho:	AVALIAÇÃO IMUNOHISTOQUÍMICA DO ESTRESSE OXIDATIVO NO SISTEMA NERVOSO CENTRAL DE CÃES POSITIVOS PARA CINOMOSE				
Área de concentração:	SAÚDE ANIMAL				
Linha de pesquisa:	CLÍNICA MÉDICA E INVESTIGAÇÃO ETIOLÓGICA				
Projeto de Pesquisa de vinculação:	MÉTODOS DIAGNÓSTICOS, ALTERAÇÕES HISTOPATOLÓGICAS E ULTRAESTRUTURAS EM ANIMAIS DOMÉSTICOS E SILVESTRES				

Reuniu-se no Anfiteatro/Sala de Reuniões da Reitoria da Universidade Federal de Uberlândia, Campus Santa Mônica, da Universidade Federal de Uberlândia, a Banca Examinadora, designada pelo Colegiado do Programa de Pós-graduação em Ciências Veterinárias, assim composta: Professores Doutores: Matias Pablo Juan Szabó - UFU; Gisele Fabrino Machado - UNESP ARAÇATUBA; Márcio de Barros Bandarra - UFU orientador(a) do(a) candidato(a). Ressalta-se que a Profa. Dra. Gisele Fabrino Machado participou da defesa por videoconferência desde a cidade de Araçatuba, SP e os demais membros da banca e o aluno participaram *in loco*.

Iniciando os trabalhos o(a) presidente da mesa, Dr(a). Márcio de Barros Bandarra, apresentou a Comissão Examinadora e o candidato(a), agradeceu a presença do público, e concedeu ao Discente a palavra para a exposição do seu trabalho. A duração da apresentação do Discente e o tempo de arguição e resposta foram conforme as normas do Programa.

A seguir o senhor(a) presidente concedeu a palavra, pela ordem sucessivamente, aos(as) examinadores(as), que passaram a arguir o(a) candidato(a). Ultimada a arguição, que se desenvolveu dentro dos termos regimentais, a Banca, em sessão secreta, atribuiu o resultado final, considerando o(a) candidato(a):

Aprovado(a).

Esta defesa faz parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Mestre.

O competente diploma será expedido após cumprimento dos demais requisitos, conforme as normas do Programa, a legislação pertinente e a regulamentação interna da UFU.

Nada mais havendo a tratar foram encerrados os trabalhos. Foi lavrada a presente ata que após lida e achada conforme foi assinada pela Banca Examinadora.

Documento assinado eletronicamente por Márcio de Barros Bandarra, Professor(a) do Magistério



Superior, em 20/02/2020, às 13:52, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



Documento assinado eletronicamente por **Matias Pablo Juan Szabo, Professor(a) do Magistério Superior**, em 20/02/2020, às 15:39, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



Documento assinado eletronicamente por **Gisele Fabrino Machado, Usuário Externo**, em 21/02/2020, às 12:45, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site https://www.sei.ufu.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0, informando o código verificador **1842203** e o código CRC **106DA17E**.

AGRADECIMENTOS

À minha mãe, Hélia de Fátima Almeida, pelo apoio incondicional, em todas as horas possíveis e imagináveis, por assistir cada treino de apresentação de artigos. Merece o título de mestre por isso. A minha avó, Jerônima Alves de Almeida, por estar ao meu lado desde que me entendo por gente. Aos meus familiares pelo incentivo.

Ao prof. Dr. Márcio de Barros Bandarra, meu orientador e amigo, pela confiança, por acreditar no meu potencial e comprar minhas ideias, por todos os ensinamentos, cafés, amizade e companheirismo. Por me apoiar em decisões (por mais difíceis que pudessem ser) e também compreendê-las, estando sempre disposto a ajudar no que fosse preciso.

À profa. Dra. Aline Santana da Hora, minha coorientadora, por aceitar prontamente embarcar nessa empreitada, pelos ensinamentos, por acreditar em mim e em meu trabalho, pelos puxões de orelha e pelos bons conselhos, pelas oportunidades e por me abrir as portas do vasto mundo da Biologia Molecular.

À toda equipe do Laboratório de Patologia Animal da Universidade Federal de Uberlândia, professores, residentes e alunos: a colaboração de vocês, cada um à sua maneira, foi de extrema valia. Em especial, Alessandra Castro, Lígia Assunção, Karina Braga, Lígia Gundim, Igor, Nicolle, Taís Meziara e Larissa Magalhães: vocês me proporcionaram momentos maravilhosamente inenarráveis!

Ao prof. Dr. Márcio Botelho de Castro e toda equipe do Laboratório de Patologia Veterinária da Universidade de Brasília que contribuíram, imensamente, com a realização da técnica de imunohistoquímica.

À equipe do Laboratório de Biologia Molecular Aplicada e Sorologia da Universidade de São Paulo: prof. Dr. Paulo Eduardo Brandão, Dra. Sueli Akemi Taniwaki Miyagi e Me. Sheila Oliveira de Souza Silva por possibilitarem a realização das técnicas biomoleculares e por todo ensinamento proporcionado.

Ao prof. Dr. José Eugênio Diniz Bastos por ser exemplo de pessoa e profissional, sempre com excelentes conselhos.

Aos meus amigos: Raioane, Hildeu, Ilária, Igor, Raísa e Otávio por estarem comigo de alguma forma, entenderem minhas ausências, segurarem minha barra e não desistirem de mim.

À Fundação de Desenvolvimento Agropecuário (FUNDAP), na pessoa do senhor Valter Marcelino, que viabilizou a compra de materiais dessa pesquisa.

À todas as pessoas da Universidade Federal de Uberlândia – Faculdade de Medicina Veterinária – Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, que fizeram parte dessa jornada em algum ponto.

Aos cães e aos vírus, fontes de inspiração deste estudo.

A todos, o meu mais sincero: Muito Obrigada! Sem vocês o caminho teria sido bem mais árduo!

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001.

*“Que nada nos defina, que nada nos sujeite.
Que a liberdade seja a nossa própria substância, já que viver é ser livre.”*
(Simone de Beauvoir)

RESUMO

A cinomose canina é uma doença causada pelo *Canine morbillivirus* (CM), um patógeno pantrópico que pode afetar o Sistema Nervoso Central (SNC), causando desmielinização. No entanto, a patogênese dessa lesão ainda precisa ser esclarecida. Amostras do SNC de 14 cães naturalmente infectados por CM foram analisadas para avaliar a correlação entre estresse oxidativo e desmielinização. Fragmentos de SNC desses cães foram submetidos à RT-PCR para detecção parcial do gene que codifica a nucleoproteína de CM; imunohistoquímica anti-CM para localizar as proteínas virais no tecido e imunohistoquímica anti-4-hidroxinonal (4-HNE) como marcador de produto da peroxidação lipídica. A presença de peroxidação lipídica foi comparada com a presença de desmielinização em cortes histológicos corados com HE. Foi possível a detecção de material gênico de CM em todas as amostras. Por meio dos resultados, observou-se que a área desmielinizada foi positiva para a presença de proteínas virais e células imunomarcadas para 4-HNE. Após a análise dos resultados, conclui-se que a presença do vírus gera estresse oxidativo que leva a peroxidação lipídica, causando danos aos tecidos e resulta em desmielinização. Logo, o estresse oxidativo desempenha um papel importante na patogênese da cinomose canina.

Palavras-chave: Cinomose canina, RT-PCR, imunohistoquímica, estresse oxidativo.

ABSTRACT

Canine Distemper is a disease caused by *Canine morbillivirus* (CM), a pantropic pathogen that can affect the Central Nervous System (CNS) causing demyelination. However, the pathogenesis of this lesion remains to be clarified. CNS fragments were submitted to RT-PCR for partial detection of the gene that encodes the CM nucleoprotein; anti-CM immunohistochemistry to locate viral proteins in the tissue and anti-4-hydroxynonenal immunohistochemistry (4-HNE) as a marker of lipid peroxidation product. Through the results, it was observed that the demyelinated area was positive for the presence of viral proteins and cells immunostained for 4-HNE. The results showed the presence of virus proteins in the demyelinated area with the presence of 4-HNE. Considering these results, we strongly believe that the virus' presence causes oxidative stress leading to lipid peroxidation, which causes tissue damage and results in demyelination. In conclusion, oxidative stress plays an important role in canine distemper pathogenesis.

Key-words: Canine distemper, RT-PCR, immunohistochemistry, oxidative stress.

LISTA DE FIGURAS

Figure 1: Immunoreactive cells to 4-HNE in the cerebellum of dogs with canine distemper.

Figure 2: Immunoreactive neurons and glial cells to 4-HNE in the cerebellum of dogs with canine distemper.

Figure 3: Immunoreactive cells to 4-HNE in the frontal lobe of dogs with canine distemper.

Figure 4: Viral protein in demyelinated area in cerebellum of dogs.

LISTA DE ABREVIATURAS

4-HNE: 4-hidroxinonenal

SNC: Sistema nervoso central

CM: *Canine morbillivirus*

RT-PCR: do inglês *Reverse transcription - polymerase chain reaction*

ELISA: do inglês *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*

ERO: Espécie reativa de oxigênio

SUMÁRIO

Capítulo 1

1. INTRODUÇÃO	14
2. REVISÃO DE LITERATURA	15
2.1 Cinomose	15
2.1.1 Infecção do Sistema Nervoso Central.....	16
2.1.2 Bainha de Mielina	16
2.1.3 Desmielinização no Sistema Nervoso Central	17
2.1.4 Resposta imune no Sistema Nervoso Central	18
2.1.5 Métodos diagnósticos	18
2.2 Estresse oxidativo e espécies reativas de oxigênio	19
2.2.1 Peroxidação lipídica e 4-hidroxinonenal	19
REFERÊNCIAS	19
Capítulo 2 - Evaluation of oxidative stress in brain of dogs with canine distemper...	24

1. INTRODUÇÃO

A cinomose canina é uma afecção decorrente da infecção pelo *Canine morbillivirus*. Apresenta distribuição mundial e é reconhecidamente uma das mais importantes doenças virais de cães (MILLER; ZACHARY, 2017). Esse vírus é capaz de infectar e causar doença em outros canídeos, além de membros das famílias *Felidae*, *Mustelidae*, *Ursidae*, *Procyonidae*, *Phocidae* e *Viverridae* pertencentes a ordem Carnivora e ainda algumas famílias pertencentes às ordens Rodentia, Primates, Artiodactyla e Proboscidea (MARTINEZ-GUTIERREZ; RUIZ-SAENZ, 2016). No Brasil, há descrição de cinomose canina nos estados do Rio Grande do Sul, Santa Catarina, Paraná, São Paulo, Rio de Janeiro, Rondônia, Mato Grosso (BUDASZEWSKI et al., 2014), Maranhão (BRITO et al., 2016) e Minas Gerais (BASTOS, 2018).

A cinomose afeta cães de maneira multissistêmica, o vírus é capaz de infectar células epiteliais, mesenquimais e hematopoiéticas. As principais manifestações clínicas incluem alterações do trato respiratório, gastrointestinal, imunossupressão e alterações neurológicas (CARVALHO et al., 2012). Os sinais neurológicos ocorrem com ou sem doença sistêmica precedente (VANDEVELDE; HIGGINS; OEVERMANN, 2012).

As alterações da doença no sistema nervoso central (SNC) geralmente são progressivas e evoluem para mau prognóstico (LAPPIN, 2015). Os animais podem apresentar convulsões, mioclonias, tremores, distúrbios de movimentos voluntários, andar em círculo, hiperestesia, paralisia e cegueira (MILLER; ZACHARY, 2017). As alterações mais importantes são os de defeitos na condução nervosa determinados pela desmielinização de axônios, que resulta em mioclonia (ECCO et al., 2016).

A desmielinização é o principal achado histopatológico da cinomose, consiste em áreas multifocais vacuolizadas em substância branca, localizadas, predominantemente, nas folhas cerebelares, entorno do quarto ventrículo, trato óptico e medula espinhal (VANDEVELDE; HIGGINS; OEVERMANN, 2012). Desmielinização, decorrente da infecção viral, é alvo de várias pesquisas e debates (PANIGASSI; MAIORKA, 2014).

O estresse oxidativo é um processo deletério que pode ser importante mediador no dano de estruturas celulares e, conseqüentemente, em várias doenças e no envelhecimento (VALKO et al., 2007). Sendo uma das principais vias de neurodegeneração, a injúria oxidativa pode causar danos no tecido nervoso através da oxidação direta de proteínas, DNA, lipídeos e, indiretamente, de mitocôndrias, provocando distúrbios no metabolismo energético (LASSMANN; VAN HORSSSEN, 2016). O SNC é objeto de estudo ideal para os efeitos da presença de radicais livres, devido à elevada quantidade de lipídeos nas membranas das células do tecido nervoso (ZARKOVIC; JAKOVCEVIC; ZARKOVIC, 2017). Na etiopatogenia de doenças neurodegenerativas, como Parkinson e Alzheimer, o estresse oxidativo contribui para lesão tecidual no sistema nervoso central e pode participar da desmielinização (KARADENIZ *et al.*, 2008).

Até o presente momento, não foram encontrados estudos que demonstrem a presença do estresse oxidativo na desmielinização, através da marcação do 4-hidroxinonal (4-HNE), produto da peroxidação lipídica, tendo o cão como modelo. Portanto, objetivou-se avaliar o estresse oxidativo, através da imunomarcação do 4-HNE, no encéfalo de cães naturalmente infectados por *Canine morbillivirus* e elencar a peroxidação lipídica como uma das possíveis causas de desmielinização.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Cinomose

O agente etiológico da cinomose, *Canine morbillivirus* – CM, previamente denominado como *Canine distemper virus*, pertence ao gênero *Morbillivirus*, família *Paramyxoviridae*. É um vírus composto por uma fita simples de RNA com polaridade negativa com nucleocapsídeo de simetria helicoidal; apresenta envelope composto por bicamada lipídica, originado da membrana plasmática da célula hospedeira (LAMB; PARKS, 2007; ICTV, 2018). O genoma viral contém 15.690 nucleotídeos, compondo seis genes que codificam: nucleocapsídeo (N), fosfoproteína (P), matriz (M), fusão (F), hemaglutinina (H), RNA polimerase RNA-dependente (L). O nucleocapsídeo de simetria helicoidal recobre o genoma viral (SAWATSKY; DELPEUT; VON MESSLING, 2011).

Por se tratar de um vírus pantrópico, a patogenia da cinomose é diversa e dinâmica (RENDON-MARIN et al., 2019), podendo afetar pele, olhos, coxins, glândulas exócrinas e endócrinas, trato gastrointestinal, respiratório, genitourinário e sistema nervoso (GREENE; VANDEVELDE, 2012). A disseminação viral acontece por contato direto de cães com secreções e excreções de animais infectados, além de aerossóis (ARNS et al., 2012). Após 24 horas, há replicação viral em tecido linfoide do trato respiratório superior. O vírus é carregado por células mononucleares e se dissemina para baço, fígado, tecido linfoide associado ao trato gastrointestinal e linfonodos mesentéricos, caracterizando a viremia primária (GREENE; VANDEVELDE, 2012). A progressão da doença depende da resposta imune do animal, a maioria dos animais desenvolve resposta celular e humoral contra a infecção, permanecendo assintomáticos. Porém, em animais com resposta imunológica comprometida, a infecção progride e as manifestações clínicas se correlacionam com os órgãos e/ou tecidos afetados (ARNS et al., 2012). Cães com resposta imune intermediária ou ruim apresentam disseminação viral sistêmica (GREENE; VANDEVELDE, 2012).

2.1.1 Infecção do Sistema Nervoso Central

Acredita-se que a infecção do sistema nervoso central (SNC), na maioria dos cães, acontece em uma fase precoce da doença, por meio de monócitos e linfócitos infectados (ECCO et al., 2016) quando a viremia tem magnitude suficiente, o que depende da resposta imune ineficiente do hospedeiro (GREENE; VANDEVELDE, 2012). Por via hematogena, carregado por células mononucleares, o vírus entra no parênquima do sistema nervoso e se deposita em espaços perivasculares. Via circulação sistêmica, o vírus infecta células do plexo coroide do quarto ventrículo, há replicação nas células epiteliais do plexo e se espalha pelo SNC através do líquido (GREENE; VANDEVELDE, 2012).

2.1.2 Bainha de Mielina

Durante o desenvolvimento do sistema nervoso, as células de Schwann no sistema nervoso periférico e os oligodendrócitos no SNC iniciam a síntese e o transporte de grandes quantidades de componentes da membrana da mielina para obter o envolvimento em espiral da membrana resultante ao redor do axônio (SIMONS; TROTTER, 2007). A bainha de mielina é interrompida, em intervalos

regulares, pelos nodos de Ranvier, fato esse que gera a condução saltatória do potencial de ação através do axônio levando a uma alta velocidade de propagação do impulso nervoso (KLEIN, 2006; KLEIN; CUNNINGHAM, 2008).

Grande parte da estrutura e função da mielina depende de seu conteúdo lipídico. Os lipídeos, portanto, têm utilidade na marcação da integridade da membrana da mielina e da função associada das fibras nervosas (CHRAST et al., 2011). Uma característica marcante da mielina é sua alta quantidade de lipídeos que corresponde a, aproximadamente, 70% do peso seco da membrana (NORTON; PODUSLO, 1973; CHRAST *et al.*, 2011). A mielina é de importância vital e consequências devastadoras das doenças desmielinizantes e dismielinizantes, nas quais a estrutura normal da mielina está comprometida, ressalta claramente sua importância (AGGARWAL; YURLOVA; SIMONS, 2011).

2.1.3 Desmielinização no Sistema Nervoso Central

No sistema nervoso central, o vírus, por mecanismos ainda não elucidados completamente, provoca grave desmielinização. Independentemente de sua causa, a desmielinização ocorre através de dois processos principais: dano da própria mielina ou células mielinogênicas (desmielinização primária) ou lesão axonal que promove um efeito secundário na degeneração mielínica (desmielinização secundária) (CARVALHO et al., 2012).

A leucoencefalite desmielinizante que acontece na cinomose foi dividida em fases de acordo com classificação histológica em: aguda, subaguda e crônica. As lesões agudas são caracterizadas por vacuolização da substância branca devido ao edema da bainha de mielina; células inflamatórias quase ausentes. Lesões subagudas apresentam perda progressiva da mielina, caracterizada por palidez ou ausência de eosinofilia no tecido; essas lesões ainda podem ser divididas de acordo com presença ou ausência de infiltrado de células inflamatórias. Lesões crônicas invariavelmente exibem manguitos perivasculares com mais de três camadas de células inflamatórias, acompanhando a desmielinização em curso e a perda axonal (VANDEVELDE; ZURBRIGGEN, 1995; VANDEVELDE; ZURBRIGGEN, 2005; LEMPP et al., 2014; ULRICH et al., 2014).

Estudos sugerem que, na fase aguda da doença, há transcrição viral sem tradução em oligodendrócitos (replicação restrita) podendo levar estas células a

desordem metabólica, que interfere na síntese e manutenção da mielina, o que resultaria em desmielinização. Na fase crônica, um mecanismo de reação “*bystander*” associado à resposta imune antiviral, onde a micróglia/macrófagos ativados secretando, dentre outros produtos, espécies reativas de oxigênio, seriam responsáveis pela destruição de oligodendrócitos e da bainha de mielina (VANDEVELDE; ZURBRIGGEN, 2005). Outros autores apontam que a desmielinização do SNC seria causada por desordem metabólica e por apoptose de oligodendrócitos, os quais produzem e mantêm a integridade da bainha de mielina, bem como por astrócitos com alterações funcionais que poderiam ajudar o vírus a se replicar e persistir no hospedeiro (PAN et al., 2013). Por outro lado, Ulrich et al. (2014) sugerem que, através de alterações em transcrições gênicas durante a leucoencefalite da cinomose, a desmielinização aconteça de forma bifásica, inicialmente com distrofia não-apoptótica de oligodendrócitos e, em sequência, uma onda autoimune com produção de imunoglobulinas e sistema complemento contra mielina.

2.1.4 Resposta imune no sistema nervoso central

Astrócitos têm papel importante na resposta cerebral à injúria e a doenças neurológicas. Essas células, em sua forma reativa, já foram encontradas antes do início da desmielinização evidente na lesão cerebral aguda de cães com cinomose (KLEMENS et al., 2019). A mielina é sensível a peroxidação lipídica causada por espécies reativas de oxigênio (ERO's) e a ativação da micróglia, frente a estímulos, pode ser uma importante fonte de ERO's durante a desmielinização aguda da doença (STEIN et al., 2004).

2.1.5 Métodos diagnósticos

A suspeita clínica de cinomose canina se dá por combinação do histórico do animal e sinais clínicos apresentados (GREENE; VANDEVELDE, 2012; LAPPIN, 2015; ECCO et al., 2016). O diagnóstico direto é obtido com a transcrição reversa seguida da reação em cadeia pela polimerase (RT-PCR) (ELIA et al., 2006), imunofluorescência, imunohistoquímica, ensaio de imunoabsorção enzimática (ELISA), e/ou imunocromatografia (GREENE; VANDEVELDE, 2012; LAPPIN, 2015; ECCO et al., 2016).

2.2 Estresse oxidativo e espécies reativas de oxigênio

Estresse oxidativo é uma condição na qual não há equilíbrio entre a produção de espécies reativas de oxigênio (ERO's) e o nível de antioxidantes, resultando em quantidade excessiva de ERO's (GANDHI; ABRAMOV, 2012), as quais podem provocar sérios danos ao organismo, reagindo com enzimas, lipídeos de membranas, ácidos nucleicos e danificando-os (NELSON; COX, 2014). Há muito se sabe que elevados níveis de radicais livre ou espécies reativas de oxigênio causam danos diretos ao lipídeos (AYALA; MUÑOZ; ARGÜELLES, 2014).

2.2.1 Peroxidação lipídica e 4-hidroxinonenal

A peroxidação lipídica pode ser descrita como um processo pelo qual oxidantes, como radicais livres ou espécies não-radicaais, atacam lipídeos contendo ligações duplas carbono-carbono, especialmente ácidos graxos poliinsaturados que envolvem abstração de hidrogênio de um carbono, resultando na inserção de oxigênio em radicais peroxila lipídicos e hidroperóxidos (AYALA; MUÑOZ; ARGÜELLES, 2014; YIN; XU; PORTER, 2011).

Aldeídos reativos altamente tóxicos, como 4-hidroxinonenal (4-HNE), são gerados durante a peroxidação lipídica (ZHENG et al., 2014). O 4-HNE derivado da peroxidação lipídica é um eletrófilo lipídico reativo prototípico que forma prontamente adutos covalentes com grupos funcionais nucleofílicos na macromolécula, como proteínas, DNA e lipídeos (ZHONG; YIN, 2015). A peroxidação lipídica é acelerada durante o estresse oxidativo e é uma fonte adicional de geração de ERO's (CSALA et al., 2015).

REFERÊNCIAS

ARNS, C. W., ALMEIDA, R. S., SPILKI, F. R., SANTOS, M. B. *Paramyxoviridae*. In. FLORES, E.F. **Virologia Veterinária – Virologia geral e doenças víricas** 2 ed. Editora UFSM: Santa Maria, 2012. cap. 27, p. 759 – 793.

BASTOS, José Eugênio Diniz. Caracterização clínica, anatomopatológica e hematológica de cães naturalmente infectados pelo vírus da cinomose e sua detecção no nó sinoatrial pela técnica de PCR. 2018. 56 f. Tese (Doutorado em

Ciências Veterinárias) - Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, 2018.
Acesso em: 14 out. 2019

<http://dx.doi.org/10.14393/ufu.te.2018.459>.

AGGARWAL, S.; YURLOVA, L.; SIMONS, M. Central nervous system myelin: structure, synthesis and assembly. *Trends in Cell Biology*, v. 21, n. 10, p. 585–593, out. 2011. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0962892411001176>>. Acesso em: 24 set. 2019.

<https://doi.org/10.1016/j.tcb.2011.06.004>

AYALA, A.; MUÑOZ, M. F.; ARGÜELLES, S. Lipid Peroxidation: Production, Metabolism, and Signaling Mechanisms of Malondialdehyde and 4-Hydroxy-2-Nonenal. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, v. 2014, p. 1–31, 2014. Disponível em: <<http://www.hindawi.com/journals/omcl/2014/360438/>>. Acesso em: 14 jan. 2020.

<https://doi.org/10.1155/2014/360438>

BRITO, L. *et al.* Aspectos epidemiológicos da cinomose em cães atendidos em um Hospital Veterinário no período de 2011 a 2013. *Pubvet*, v. 10, n. 7, p. 518–522, jul. 2016. Disponível em: <<http://www.pubvet.com.br/artigo/2895/p-styletext-align-justify-aligncenterstrongaspectos-epidemioloacutegicos-da-cinomose-em-catildees-atendidos-em-um-hospital-veterinaacuterio-no-periacuteodo-de-2011-a-2013strongp>>. Acesso em: 7 jan. 2020.

<https://doi.org/10.22256/pubvet.v10n7.518-522>

BUDASZEWSKI, R. DA F. *et al.* Genotyping of canine distemper virus strains circulating in Brazil from 2008 to 2012. *Virus Research*, v. 180, p. 76–83, fev. 2014. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S016817021300453X>>. Acesso em: 7 jan. 2020.

<https://doi.org/10.1016/j.virusres.2013.12.024>

ECCO, R.; VIOTT, A. M.; GRAÇA, D. L.; ALESSI, A. C. Sistema Nervoso. In: SANTOS, R. L.; ALESSI, A. C. **Patologia Veterinária**. 2 ed. Rio de Janeiro: Rocca, 2016. cap. 8.

GREENE, C.E.; VANDEVELDE, M. Canine distemper. In: GREENE, C.E. **Infectious Diseases of the Dog and Cat**. 4 th ed. Philadelphia: Elsevier Health Sciences, 2012. cap. 3, p. 25-42.

ICTV Master Species List 2018a v1. Disponível em:

<<https://talk.ictvonline.org/files/master-species-lists/m/msl/7992>>. Acesso em: 25 set. 2019.

CARVALHO, O. V. *et al.* Immunopathogenic and Neurological Mechanisms of Canine Distemper Virus. *Advances in Virology*, v. 2012, p. 1–10, 2012. Disponível em: <<http://www.hindawi.com/journals/av/2012/163860/>>. Acesso em: 26 nov. 2019.

<https://doi.org/10.1155/2012/163860>

CHRAST, R. *et al.* Lipid metabolism in myelinating glial cells: lessons from human inherited disorders and mouse models. *Journal of Lipid Research*, v. 52, n. 3, p. 419–434, mar. 2011. Disponível em: <<http://www.jlr.org/lookup/doi/10.1194/jlr.R009761>>. Acesso em: 24 set. 2019.

<https://doi.org/10.1194/jlr.R009761>

CSALA, M. *et al.* On the role of 4-hydroxynonenal in health and disease. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease*, v. 1852, n. 5, p. 826–838, maio 2015. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0925443915000241>>. Acesso em: 24 set. 2019.

<https://doi.org/10.1016/j.bbadis.2015.01.015>

ELIA, G. *et al.* Detection of canine distemper virus in dogs by real-time RT-PCR. *Journal of Virological Methods*, v. 136, n. 1–2, p. 171–176, set. 2006. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S016609340600156X>>. Acesso em: 24 set. 2019.

<https://doi.org/10.1016/j.jviromet.2006.05.004>

GANDHI, S.; ABRAMOV, A. Y. Mechanism of Oxidative Stress in Neurodegeneration. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, v. 2012, p. 1–11, 2012. Disponível em: <<http://www.hindawi.com/journals/omcl/2012/428010/>>. Acesso em: 24 set. 2019.

<https://doi.org/10.1155/2012/428010>

KARADENIZ, A. *et al.* Relationship between Canine Distemper and Oxidative Stress in dogs. *Revue Méd. Vét.*, p. 7, 2008.

KLEIN, B.G. Potenciais de Membrana: Geração e Condução dos Sinais Elétricos nos Neurônios. In: REECE, W.O. **Dukes, Fisiologia dos Animais Domésticos**. 12 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2006. cap. 43, p. 717 - 731.

KLEIN, B.G.; CUNNINGHAM, J. G. O Neurônio. In:_____. **Tratado de Fisiologia Veterinária**. 4 ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2008. cap. 4, p. 67 - 74.

KLEMENS, J. *et al.* Neurotoxic potential of reactive astrocytes in canine distemper demyelinating leukoencephalitis. **Scientific reports**, v. 9, n. 1, p. 1-16, 2019. Disponível em: <https://www.nature.com/articles/s41598-019-48146-9> Acesso em: 24 set.2019

<https://doi.org/10.1038/s41598-019-48146-9>

LAMB, R. A.; PARKS, G. D. *Paramyxoviridae: The Viruses and Their Replication*. In:KNIPE, D. M.; HOWLEY, P. M. **Fields Virology**. 5th ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 2007. p.1449-1496. v. 1.

LAPPIN, M. R. *Enfermidades Polissistêmicas Virais*. In: NELSON, R. W.; COUTO, C. G. **Medicina interna de pequenos animais**. 5 ed Rio de Janeiro: Elsevier, 2015. cap. 94, p. 1341 - 1355.

LASSMANN, H.; VAN HORSSSEN, J. Oxidative stress and its impact on neurons and glia in multiple sclerosis lesions. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease*, v. 1862, n. 3, p. 506–510, mar. 2016. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0925443915002902>>. Acesso em: 24 set. 2019.

<https://doi.org/10.1016/j.bbadis.2015.09.018>

LEMPP, C. *et al.* New Aspects of the Pathogenesis of Canine Distemper Leukoencephalitis. *Viruses*, v. 6, n. 7, p. 2571–2601, 2 jul. 2014. Disponível em: <<http://www.mdpi.com/1999-4915/6/7/2571>>. Acesso em: 24 set. 2019.

<https://doi.org/10.3390/v6072571>

MARTINEZ-GUTIERREZ, M.; RUIZ-SAENZ, J. Diversity of susceptible hosts in canine distemper virus infection: a systematic review and data synthesis. *BMC Veterinary Research*, v. 12, n. 1, p. 78, dez. 2016. Disponível em: <<http://bmcvetres.biomedcentral.com/articles/10.1186/s12917-016-0702-z>>. Acesso em: 24 set. 2019.

<https://doi.org/10.1186/s12917-016-0702-z>

MILLER, A. D; ZACHARY, J. F. Nervous System. In: ZACHARY, J. F. **Pathologic Basis of Veterinary Disease**. 6th ed. St. Louis: Elsevier, 2017. cap. 14, p. 805 - 907. <https://doi.org/10.1016/B978-0-323-35775-3.00014-X>

NELSON, D. L.; COX, M. M. Fosforilação Oxidativa e Fosforilação. In: _____. **Princípios de Bioquímica de Lehninger**. 6th ed. Porto Alegre: Artmed, 2014. cap. 19, p. 731-797.

NORTON, W. T.; PODUSLO, S. E. MYELINATION IN RAT BRAIN: METHOD OF MYELIN ISOLATION. *Journal of Neurochemistry*, v. 21, n. 4, p. 749–757, out. 1973. Disponível em: <<http://doi.wiley.com/10.1111/j.1471-4159.1973.tb07519.x>>. Acesso em: 13 jan. 2020.

<https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.1973.tb07519.x>

PAN, Y. *et al.* Pathogenesis of Demyelinating Encephalopathy in Dogs with Spontaneous Acute Canine Distemper. *Journal of Integrative Agriculture*, v. 12, n. 2, p. 334–343, fev. 2013. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S2095311913602336>>. Acesso em: 6 jan. 2020.

[https://doi.org/10.1016/S2095-3119\(13\)60233-6](https://doi.org/10.1016/S2095-3119(13)60233-6)

PANIGASSI, L. F. N.; MAIORKA, P. C. Cinomose Canina. In: JERICÓ, M.M. **Tratado de Medicina Interna de Cães e Gatos**. 1 ed. Roca, 2014. cap. 91, p. 805 – 807.v. 2.

RENDON-MARIN, S. *et al.* Tropism and molecular pathogenesis of canine distemper virus. *Virology Journal*, v. 16, n. 1, p. 30, dez. 2019. Disponível em: <<https://virologyj.biomedcentral.com/articles/10.1186/s12985-019-1136-6>>. Acesso em: 24 set. 2019.

<https://doi.org/10.1186/s12985-019-1136-6>

SAWATSKY, B.; DELPEUT, S.; VON MESSLING, V. Canine Distemper Virus. In: SAMAL, S. K. **The Biology of Paramyxoviruses**. Norfolk: Caister Academic Press, 2011. cap. 8, p. 275-291.

SIMONS, M.; TROTTER, J. Wrapping it up: the cell biology of myelination. *Current Opinion in Neurobiology*, v. 17, n. 5, p. 533–540, out. 2007. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0959438807001006>>. Acesso em: 13 jan. 2020.

<https://doi.org/10.1016/j.conb.2007.08.003>

STEIN, Veronika M. *et al.* Microglial cell activation in demyelinating canine distemper lesions. **Journal of neuroimmunology**, v. 153, n. 1-2, p. 122-131, 2004. Acesso em: 24 set. 2019.

<https://doi.org/10.1016/j.jneuroim.2004.05.001>

ULRICH, R. *et al.* Transcriptional Changes in Canine Distemper Virus-Induced Demyelinating Leukoencephalitis Favor a Biphasic Mode of Demyelination. *PLoS ONE*, v. 9, n. 4, p. e95917, 22 abr. 2014. Disponível em: <<http://dx.plos.org/10.1371/journal.pone.0095917>>. Acesso em: 24 set. 2019.

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0095917>

VALKO, M. *et al.* Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, v. 39, n. 1, p. 44–84, jan. 2007. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1357272506002196>>. Acesso em: 24 set. 2019.

<https://doi.org/10.1016/j.biocel.2006.07.001>

VANDEVELDE, M.; ZURBRIGGEN, A. The neurobiology of canine distemper virus infection. *Veterinary Microbiology*, v. 44, n. 2–4, p. 271–280, maio 1995. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/0378113595000212>>. Acesso em: 24 set. 2019.

[https://doi.org/10.1016/0378-1135\(95\)00021-2](https://doi.org/10.1016/0378-1135(95)00021-2)

VANDEVELDE, M.; HIGGINS, R. J.; OEVERMANN, A. Inflammatory Diseases. In: _____. **Veterinary neuropathology: essentials of theory and practice**. 1 ed. John Wiley & Sons, 2012. cap. 3, p. 48-80.

VANDEVELDE, MARC; ZURBRIGGEN, A. Demyelination in canine distemper virus infection: a review. *Acta Neuropathologica*, v. 109, n. 1, p. 56–68, jan. 2005.

Disponível em: <<http://link.springer.com/10.1007/s00401-004-0958-4>>. Acesso em: 24 set. 2019.

<https://doi.org/10.1007/s00401-004-0958-4>

YIN, H.; XU, L.; PORTER, N. A. Free Radical Lipid Peroxidation: Mechanisms and Analysis. *Chemical Reviews*, v. 111, n. 10, p. 5944–5972, 12 out. 2011. Disponível em: <<https://pubs.acs.org/doi/10.1021/cr200084z>>. Acesso em: 5 out. 2019.

<https://doi.org/10.1021/cr200084z>

ZARKOVIC, K.; JAKOVCEVIC, A.; ZARKOVIC, N. Contribution of the HNE-immunohistochemistry to modern pathological concepts of major human diseases. *Free Radical Biology and Medicine*, v. 111, p. 110–126, out. 2017. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0891584916310966>>. Acesso em: 24 set. 2019.

<https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2016.12.009>

ZHENG, R. *et al.* Differential metabolism of 4-hydroxynonenal in liver, lung and brain of mice and rats. *Toxicology and Applied Pharmacology*, v. 279, n. 1, p. 43–52, ago. 2014. Disponível em:

<<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0041008X14001823>>. Acesso em: 24 set. 2019.

<https://doi.org/10.1016/j.taap.2014.04.026>

ZHONG, H.; YIN, H. Role of lipid peroxidation derived 4-hydroxynonenal (4-HNE) in cancer: Focusing on mitochondria. *Redox Biology*, v. 4, p. 193–199, abr. 2015.

Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S2213231714001359>>. Acesso em: 24 set. 2019.

<https://doi.org/10.1016/j.redox.2014.12.011>

Capítulo 2 - Evaluation of oxidative stress in brain of dogs with canine distemper

(Artigo formatado nas normas da revista Veterinary Research)

Evaluation of oxidative stress in brain of dogs with canine distemper

Érica A. Viscone, Lígia A. Oliveira, Alexandra A. B. G. Pereira, Márcio B. Castro,

Paulo E. Brandão, Sueli A. T. Miyagi, Aline S. da Hora and Márcio B. Bandarra

Author information

School of Veterinary Medicine (FAMEV), Federal University of Uberlândia (UFU), Uberlândia – Minas Gerais, Brazil.

Érica A. Viscone – email: ericaviscone@gmail.com, Lígia A. Oliveira – email: ligiassuncao@hotmail.com, Aline S. da Hora - email: alinedahora@ufu.br, Márcio B. Bandarra – email: bandarramb@ufu.br

Veterinary Pathology Laboratory, University of Brasília (UnB), Brasília – Distrito Federal, Brazil.

Alexandra A. B. G. Pereira – email: ale_ariadine@hotmail.com, Márcio B. Castro – email: mbcastro@unb.br

Department of Preventive Veterinary Medicine and Animal Health, School of Veterinary Medicine, University of São Paulo (USP), São Paulo – SP, Brazil.

Paulo E. Brandão – email: paulo7926@usp.br, Sueli A. T. Miyagi – email: staniwaki@usp.br

Corresponding author

Correspondence to Érica A. Viscone

Abstract

Canine Distemper is a disease caused by *Canine morbillivirus* (CM), a pantropic virus

that can affect Central Nervous System (CNS) causing demyelination. However, the pathogenesis of this lesion remains to be clarified. Samples from CNS of 14 naturally infected dogs by CM were analyzed to evaluate the presence of oxidative stress and demyelination. RT-PCR assay was performed to confirm a diagnosis of canine distemper in CNS, performed immunohistochemistry anti-CM was used to localize the viral proteins in the tissue and anti-4-hydroxy-2-nonenal (4-HNE) as a marker of a product of lipid peroxidation. The results showed the presence of viral proteins in the demyelinated area with the presence of 4-HNE. Taken the results together, we strongly believe that the virus presence causes oxidative stress leading to lipid peroxidation, which causes tissue damage and result in demyelination. In conclusion, oxidative stress plays an important role in canine distemper pathogenesis.

Key-words: Canine distemper, RT-PCR, immunohistochemistry, oxidative stress.

Introduction

Canine morbillivirus - CM (also known as *Canine distemper virus*) belongs to genus *Morbillivirus*, family *Paramyxoviridae*, is a single-stranded, negative sense, RNA virus [1]. Viruses with a broad host range such as CM are highly contagious and cause high morbidity and mortality rates in wild and domestic animal populations. The capability of the virus to adapt to multiple species and evolve in those, makes CM not only a well-known pathogen of domestic dogs, but one of the most important pathogen of mammals with the ability to cross the species barrier [2].

CM induces multiple pathogenic effects and the use of diverse receptors delimits the viral tropism since lymphoid, epithelium, and central nervous system (CNS) cells have different receptors that are implicated in the infection [3]. The most common microscopic alteration of CNS is the demyelination [4] and many studies have

been performed to explain the pathogenesis of this alteration [5–9], however, the process is not completely understood.

CNS is an ideal target for free radical damage because of high levels of polyunsaturated lipids in membranes of the neuronal cells associated with relatively weak antioxidative defense and with a high metabolic rate of oxygen. Damage of brain structures due to oxidative stress and accumulation of reactive oxygen species (ROS) and reactive aldehydes is a common feature of ischemic, inflammatory, metabolic, degenerative and carcinogenic processes in the CNS [10]. Myelin is sensitive to ROS induced lipid peroxidation and virus-induced activated microglia represent a potent source of ROS generation in acute demyelinating distemper [11].

Oxidative stress (OS) is a condition in which the balance between production of ROS and level of antioxidants is significantly disturbed and results in damage to cells by the excessive ROS. It contributes to the development of neurodegeneration by altering the function of biomolecules. ROS may target several different substrates in the cell, causing protein, DNA, RNA oxidation, or lipid peroxidation [12]. Lipid peroxidation (LPO) generates highly toxic reactive aldehydes such as 4-hydroxy-2-nonenal (4-HNE) [13]. 4-HNE derives from omega-6-polyunsaturated fatty acids peroxidation, mainly of arachidonic and linoleic acid [14–16] and forms covalent adducts with nucleophilic functional groups in macromolecule such as proteins, DNA and lipids [17]. It is surmised that the aerobic organisms have created a fine defense network and sophisticated adaptive system during the course of evolution to cope with, or even utilize, the moderate level of LPO, but that excessive unregulated LPO leads to degenerative and pathological consequences [18].

The aim of this study was to evaluate the presence of 4-HNE in brain of dogs naturally infected by *Canine morbillivirus* and evaluate its contribution in demyelination

in canine distemper.

Materials and methods

Animals

All the experimental procedures were carried out in accordance with Animal Use Ethics Committee of Federal University of Uberlândia, under the protocol number A007/18.

Fourteen dogs, naturally infected by *Canine morbillivirus* were used. The animals died due to disease progression or euthanized due to a poor prognosis. Necropsy occurred at Animal Pathology Laboratory, Veterinary Hospital of Federal University of Uberlândia and was performed immediately post-mortem.

Histopathology

For histopathological analysis fragments of frontal lobe, from both sides, and cerebellum were collected, fixed in 10% neutral-buffered formalin, routinely processed, and embedded in paraffin. The 4- μ m-thick sections were mounted on glass slides and stained with hematoxylin and eosin (HE) for light microscopy [19].

4-HNE Immunohistochemistry

The immunohistochemistry (IHC) analysis were performed on the same fragments stained with HE. Briefly, for the IHC assay, formalin-fixed paraffin-embedded tissue sections (4 μ m thick) were prepared. Antigenic retrieval was performed by heat induction 96°C for 40 minutes in citrate buffer (monohydrate citrate, 10 mM, pH 6). Endogenous peroxidase activity was blocked with 5% hydrogen peroxide. A blocking step was performed using nonfat dry milk (5% w/v). Slides were incubated with the primary antibody polyclonal anti-4-HNE (1:200, Bioss, Woburn, MA,

USA), at room temperature for 2 hours. The reaction was revealed by EnVision™ FLEX, High pH Link (Dako-Agilent, Santa Clara, CA, USA). Slides were counterstained with Harris hematoxylin. Between each step the sections were rinsed with Phosphate Buffered Saline (PBS).

***Canine morbilivirus* Immunohistochemistry**

The IHQ analysis were performed in cerebellum tissue to detect the presence of virus protein. Briefly, for the IHC assay, formalin-fixed paraffin-embedded tissue sections (4 µm thick) were prepared. Antigenic retrieval was performed in pressure cook 121°C for 3 minutes in citrate buffer (monohydrate citrate, 10 mM, pH 6). Endogenous peroxidase activity was blocked with Immuno Detector Peroxidase Blocker for 5 minutes. A blocking step was performed using equine serum (1:9 Phosphate Buffered Saline). Slides were incubated with the primary antibody polyclonal anti-CDV (1:300, VMRD, Pullman, WA, USA), at 4 C° for 12 hours. Samples were rinsed in saline solution and added ImmunoDetector Bio SB Biotinylated Link for 10 minutes, rinsed with PBS and incubated with ImmunoDetector HRP Label (Bio SB, Santa Barbara, CA, USA) for 10 minutes. The reaction was revealed by diaminobenzidine (Buffer Substrate - Bio SB, Santa Barbara, CA, USA). Slides were counterstained with Harris hematoxylin.

Reverse Transcription–Polymerase Chain Reaction

A fragment of frontal lobe was collected and stored immediately at -80C° in cryotubes. RT-PCR target to nucleoprotein gene of CM was performed according to previous study [20]. Also, all samples were tested by RT-PCR for glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) gene as endogenous control [20].

RESULTS

Histopathology analysis

Characterization of histopathological alterations was performed in 42 slides. The alterations found in HE stain were presence of edema of myelin sheath, demyelination, astrogliosis with gemistocytes and inflammation: Gitter cells and mononuclear perivascular infiltration. The most common alteration found in the cerebellum was demyelination, present in all samples, followed by one or more inflammation signs in 78% (11/14) of samples. In all of the cases with inflammation, demyelinated areas was also present.

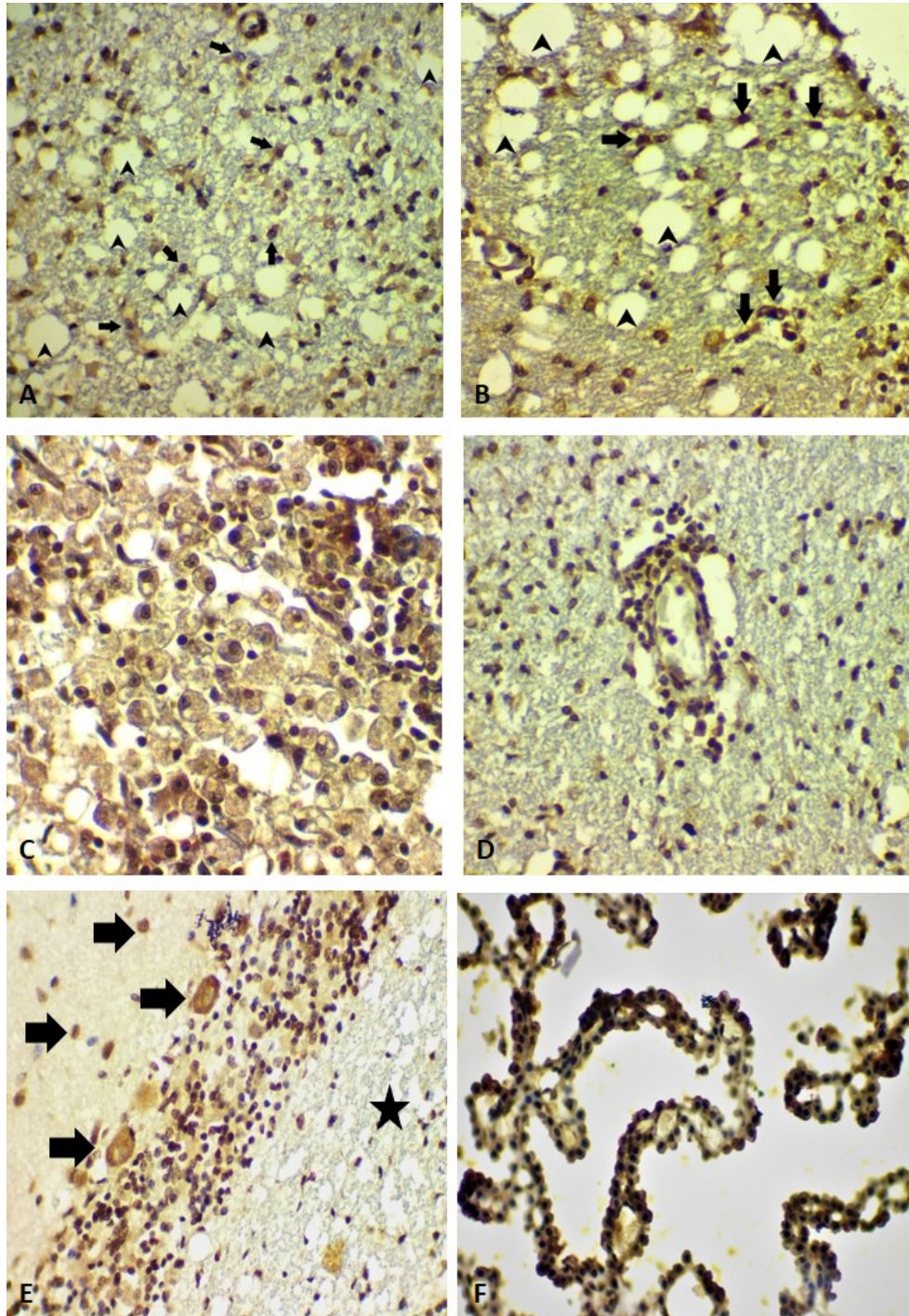
At the frontal lobe, demyelination occurred in 57% (8/14) of cases and inflammation in 43% (6/14). Demyelination concomitant with inflammation occurred in 36% (5/14) of samples.

4-HNE immunohistochemistry analysis

Characterization of oxidative stress performed in 42 slides by immunohistochemistry using antibody anti-4HNE. In general, most of the cells presented staining at some level. However, cells around and in the demyelinated areas were stained stronger.

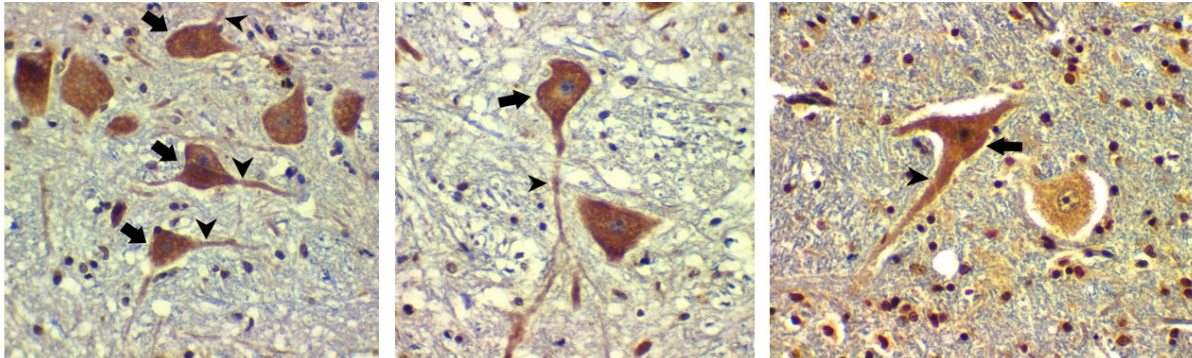
In cerebellum, 71% (10/14) of samples presented stained cells, most of them were hypertrophic astrocytes with compatible morphology to reactive astrocytes (gemistocytic astrocytes), presented in demyelinated areas. All of the samples showed neurons and astrocytes marked diffusely, but around demyelinated areas, they stained stronger. Inflammatory cells (activated macrophages/microglia, mononuclear and Gitter cells) stained in 57% (8/14) of cases. Choroid plexus marked in 50% (7/14) of cases (Figure 1). Neurons at pons had marked their respective axons (Figure 2).

Figure 1: Immunoreactive cells to 4-HNE in the cerebellum of dogs with canine distemper.



A – B: 4-HNE-stained astrocytes (arrows) into the demyelinated areas (arrowheads) (400x). C: 4-HNE-stained Gitter cells (400x). D: Perivascular Cuff with 4-HNE-stained mononuclear inflammatory cells (400x). E: 4-HNE-stained Purkinje and glia cells (arrows) around demyelinated area with poorly immunoreactivity (black star) (400x). F: 4-HNE-stained choroid plexus cells (400x).

Figure 2: Immunoreactive neurons and glial cells to 4-HNE in the cerebellum of dogs with canine distemper.

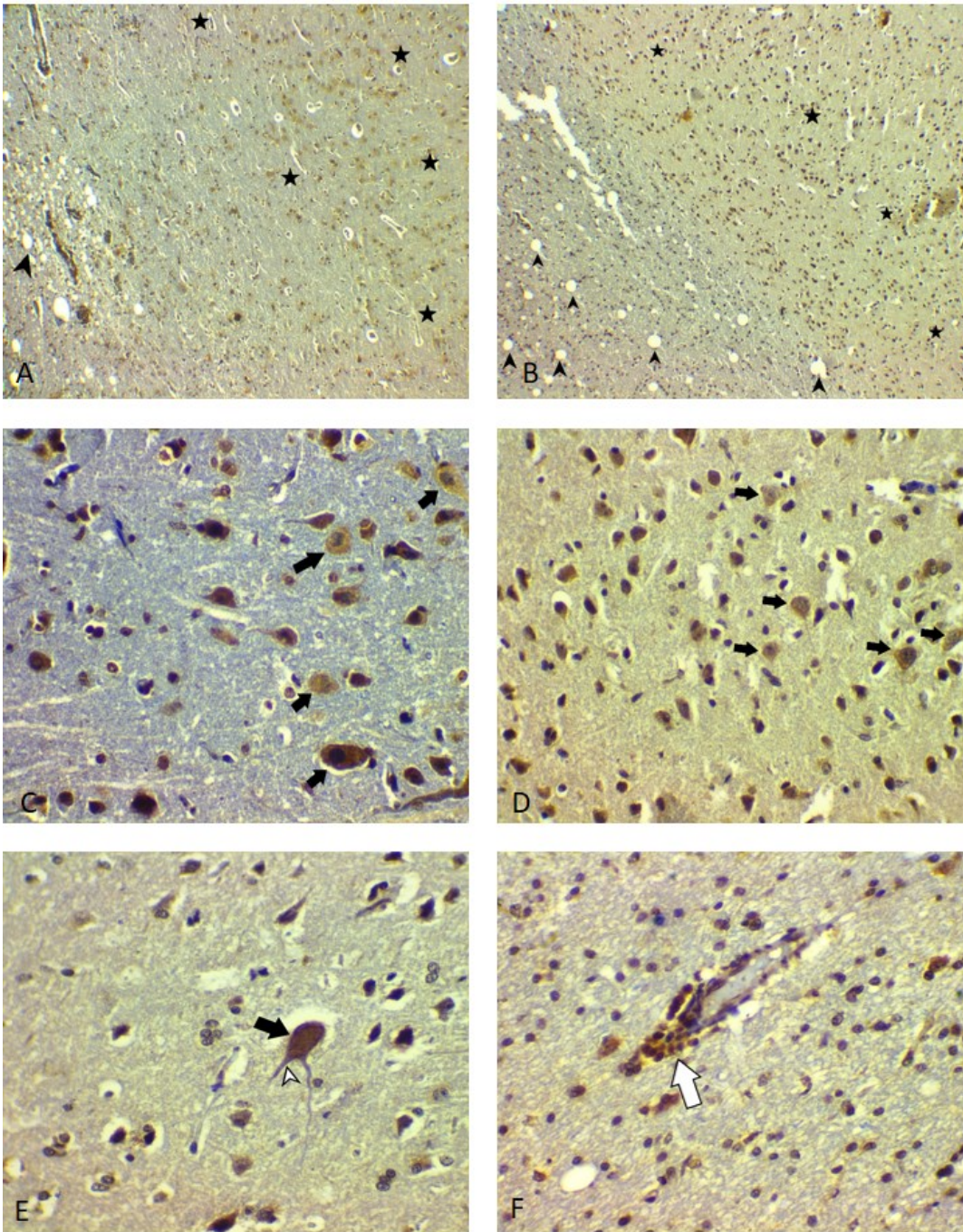


4-HNE-stained neurons with immunoreactivity in perikaryon (arrows) and axons (arrowheads) (400x).

Glial cells with immunoreactivity nearby the neurons.

At frontal lobe, all of the samples showed stained neurons, with some axons, in presence or not of demyelination. However, 36% (5/14) of the samples had stronger immunostaining around the demyelinated area. Into the demyelinated area, 28% (4/14) of the samples showed marked cells. Mononuclear inflammatory cells present in 36% (5/14) of the samples (Figure 3).

Figure 3: Immunoreactive cells to 4-HNE in the frontal lobe of dogs with canine distemper.

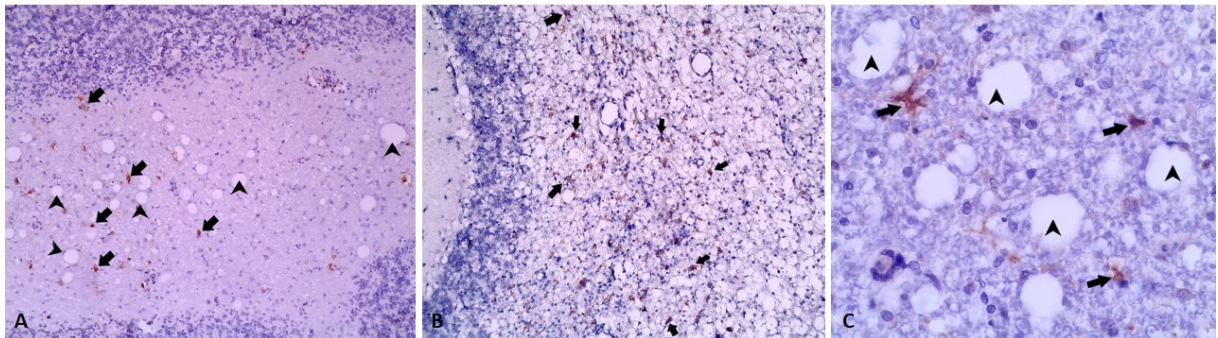


A-B: 4-HNE-stained neurons and glial cells (black stars) around demyelinated area with poorly immunoreactivity (arrowheads) (40x). C-D: 4-HNE-stained neurons (arrows) and glia cells (400x). E: 4-HNE-stained neuron with immunoreactivity in perikaryon (arrow) and axon (white arrowhead) (400x). F: Perivascular Cuff with 4-HNE-stained mononuclear inflammatory cells (white arrow) (400x).

***Canine morbillivirus* immunohistochemistry analysis**

To detect the presence of virus protein in cerebellum immunohistochemistry was performed. All samples showed reactivity anti-CM, stained in white matter into demyelinated areas.

Figure 4: Viral protein in demyelinated area in cerebellum of dogs.



A: presence of virus protein (arrows) in demyelinated area (arrowheads) (100x). B: presence of virus protein (arrows) in extensive demyelinated area (100x). C: presence of virus protein (arrows) in demyelinated area (arrowheads) (400x).

RT-PCR

For distemper all of the samples were positive in RT-PCR. All the 14 samples analyzed were positive to CM and endogenous control GAPDH gene in RNA extraction.

Discussion

The current study demonstrates that lipid peroxidation occurs in brain of dogs naturally infected by *Canine morbillivirus*. Neurons, glia cells, choroid plexus and inflammatory cells showed immunoreactivity to 4-HNE and the presence of this aldehyde might lead to demyelination. 4-HNE is recognized as one of the key culprits in cell and tissue damage caused by oxidative stress [21]. It is suggestive that the presence of the *Canine morbillivirus* in the brain can be a trigger to demyelination.

The initial trigger of oxidative injury induces different cascades of molecular events, leading to cell death and cell process degeneration, which may be different in different cell types [22]. This fact might explain the diffuse immunoreactivity in most of the cells types in the brain. At cerebellum, most of the samples showed neurons and glia cells stained around demyelinated area. At frontal lobe, most of the marked cells were neurons, in the presence or not of demyelination. Different populations of neurons, in different brain regions, have different morphologies and biochemical characteristics. Due to this diversity, it is very likely that each neuronal population has its own level of vulnerability to OS [23].

Reactive astrocyte were found already before the onset of overt demyelination in acute brain lesion of CM-infected dogs [24]. This study shows 4-HNE-stained astrocytes in the demyelinated areas, showing hypertrophic morphology, which leads us to think that these cells might begin a cascade process that culminates in tissue damage. Here, it is proposed that the demyelinating process starts at the astrocyte and spread to the tissue around, causing damage.

This can be explained by the fact that reactive astrocytes in canine distemper show neurotoxic properties, which have the potential to cause neurodegeneration, demyelination, and impaired remyelination [24]. Besides, excessive generation of free radicals induces glutathione depletion in both neurons and astrocytes; impairing neuronal viability as glutathione depletion leaves the neurons vulnerable to damage by oxidative stress [25]. Neurons and oligodendrocytes are the most vulnerable cells for oxidative injury, while astrocytes and microglia are much more resistant. These differences appear to be due to different intrinsic factors, such as differential expression of antioxidant defense molecules, to differences in the susceptibility for apoptosis induction and differences in the metabolic handling of divalent cations, such

as iron [22]. 4-HNE is present, at low concentrations, in almost all cells and tissue fluids under physiological conditions because of the natural occurrence of lipid peroxidation in aerobic biologic systems [21]. However, degradation of 4-HNE is slow in the brain; low rates of degradation suggest that 4-HNE accumulates in greater amounts in the brain during oxidative stress and may lead to increased susceptibility to tissue damage[13].

In this study was possible to observe axonal immunoreactivity to 4-HNE showing that not only OS can affect the perikaryon but also other structures which are involved by myelin. Axonal damage represents a key event in the initial disease phase and during the progression of demyelinating leukoencephalitis induced by *Canine morbillivirus*. Further investigations have to focus on the detailed molecular pathogenesis of axonal injury [4].

Choroid plexus expressed immunoreactivity do 4-HNE, showing that these cells also pass through oxidative stress maybe caused by virus infection. CM antigens are detect in a variety cell types in CNS, including choroid plexus, which has a receptor, nectin-4, that has an important role in the virus spread in CNS [26].

In conclusion, there is presence of 4-HNE in most of the cells in brain of dogs naturally infected by *Canine morbillivirus*. Due to the presence of virus protein found into demyelinated areas, detected by immunohistochemistry anti-CM, and the presence of 4-HNE immunoreactive cells in the same area, we conclude that the virus cause an oxidative stress leading to lipid peroxidation, which is involved in the tissue damage resulting in demyelinating process. This study provides a basis for further functional research into the role of oxidative stress in canine distemper.

Abbreviations

4-HNE: 4-hydroxy-2-nonenal

CEUA: Comitê de Ética na Utilização de Animais

CM: *Canine morbillivirus*

CNS: Central nervous system

DNA: Deoxyribonucleic acid

GAPDH: Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase

HE: Hematoxylin and eosin

IHQ: Immunohistochemistry

LPO: Lipid peroxidation

OS: Oxidative stress

PBS: Phosphate Buffered Saline

RNA: Ribonucleic acid

ROS: Reactive oxygen species

RT-PCR: Reverse transcription polymerase chain reaction

REFERENCES

1. ICTV Master Species List 2018a v1. In: Int. Comm. Taxon. Viruses ICTV. <https://talk.ictvonline.org/files/master-species-lists/m/msl/7992>. Accessed 25 Sep 2019
2. Duque-Valencia J, Sarute N, Olarte-Castillo XA, Ruíz-Sáenz J (2019) Evolution and Interspecies Transmission of Canine Distemper Virus—An Outlook of the Diverse Evolutionary Landscapes of a Multi-Host Virus. *Viruses* 11:582.
<https://doi.org/10.3390/v11070582>
3. Rendon-Marin S, da Fontoura Budaszewski R, Canal CW, Ruiz-Saenz J (2019) Tropism and molecular pathogenesis of canine distemper virus. *Virol J* 16:30.
<https://doi.org/10.1186/s12985-019-1136-6>
4. Lempp C, Spitzbarth I, Puff C, et al (2014) New Aspects of the Pathogenesis of Canine Distemper Leukoencephalitis. *Viruses* 6:2571–2601.
<https://doi.org/10.3390/v6072571>

5. Vandeveld M, Higgins RJ, Kristensen B, et al (1982) Demyelination in experimental canine distemper virus infection: Immunological, pathologic, and immunohistological studies. *Acta Neuropathol (Berl)* 56:285–293.

<https://doi.org/10.1007/BF00691260>

6. Vandeveld M, Zurbriggen A (2005) Demyelination in canine distemper virus infection: a review. *Acta Neuropathol (Berl)* 109:56–68.

<https://doi.org/10.1007/s00401-004-0958-4>

7. Pan Y, Liu X, Meng L, et al (2013) Pathogenesis of Demyelinating Encephalopathy in Dogs with Spontaneous Acute Canine Distemper. *J Integr Agric* 12:334–343.

[https://doi.org/10.1016/S2095-3119\(13\)60233-6](https://doi.org/10.1016/S2095-3119(13)60233-6)

8. Ulrich R, Puff C, Wewetzer K, et al (2014) Transcriptional Changes in Canine Distemper Virus-Induced Demyelinating Leukoencephalitis Favor a Biphasic Mode of Demyelination. *PLoS ONE* 9:e95917.

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0095917>

9. Attig, Spitzbarth, Kalkuhl, et al (2019) Reactive Oxygen Species Are Key Mediators of Demyelination in Canine Distemper Leukoencephalitis but not in Theiler's Murine Encephalomyelitis. *Int J Mol Sci* 20:3217.

<https://doi.org/10.3390/ijms20133217>

10. Zarkovic K, Jakovcevic A, Zarkovic N (2017) Contribution of the HNE-immunohistochemistry to modern pathological concepts of major human diseases. *Free Radic Biol Med* 111:110–126.

<https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2016.12.009>

11. Stein VM, Czub M, Schreiner N, et al (2004) Microglial cell activation in demyelinating canine distemper lesions. *J Neuroimmunol* 153:122–131.

<https://doi.org/10.1016/j.jneuroim.2004.05.001>

12. Gandhi S, Abramov AY (2012) Mechanism of Oxidative Stress in Neurodegeneration. *Oxid Med Cell Longev* 2012:1–11.

<https://doi.org/10.1155/2012/428010>

13. Zheng R, Dragomir A-C, Mishin V, et al (2014) Differential metabolism of 4-hydroxynonenal in liver, lung and brain of mice and rats. *Toxicol Appl Pharmacol* 279:43–52.

<https://doi.org/10.1016/j.taap.2014.04.026>

14. Esterbauer H, Schaur RJ, Zollner H (1991) Chemistry and biochemistry of 4-hydroxynonenal, malonaldehyde and related aldehydes. *Free Radic Biol Med* 11:81–128.

[https://doi.org/10.1016/0891-5849\(91\)90192-6](https://doi.org/10.1016/0891-5849(91)90192-6)

15. Guichardant M, Bernoud-Hubac N, Chantegrel B, et al (2002) Aldehydes from n-6 fatty acid peroxidation. Effects on aminophospholipids. Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids 67:147–149.

<https://doi.org/10.1054/plf.2002.0412>

16. Spickett CM (2013) The lipid peroxidation product 4-hydroxy-2-nonenal: Advances in chemistry and analysis. Redox Biol 1:145–152.

<https://doi.org/10.1016/j.redox.2013.01.007>

17. Zhong H, Yin H (2015) Role of lipid peroxidation derived 4-hydroxynonenal (4-HNE) in cancer: Focusing on mitochondria. Redox Biol 4:193–199.

<https://doi.org/10.1016/j.redox.2014.12.011>

18. Niki E (2009) Lipid peroxidation: Physiological levels and dual biological effects. Free Radic Biol Med 47:469–484.

<https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2009.05.032>

19. Fischer AH, Jacobson KA, Rose J, Zeller R (2008) Hematoxylin and Eosin Staining of Tissue and Cell Sections. Cold Spring Harb Protoc 2008:pdb.prot4986-pdb.prot4986.

<https://doi.org/10.1101/pdb.prot4986>

20. Furtado MM, Taniwaki SA, de Barros IN, et al (2017) Molecular detection of viral agents in free-ranging and captive neotropical felids in Brazil. J Vet Diagn Invest 29:660–668.

<https://doi.org/10.1177/1040638717720245>

21. Zhang H, Forman HJ (2017) 4-hydroxynonenal-mediated signaling and aging. Free Radic Biol Med 111:219–225.

<https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2016.11.032>

22. Lassmann H, van Horssen J (2016) Oxidative stress and its impact on neurons and glia in multiple sclerosis lesions. Biochim Biophys Acta BBA - Mol Basis Dis 1862:506–510.

<https://doi.org/10.1016/j.bbadis.2015.09.018>

23. Wang (2010) Selective neuronal vulnerability to oxidative stress in the brain. Front Aging Neurosci.

<https://doi.org/10.3389/fnagi.2010.00012>

24. Klemens J, Ciurkiewicz M, Chludzinski E, et al (2019) Neurotoxic potential of reactive astrocytes in canine distemper demyelinating leukoencephalitis. Sci Rep 9:11689.

<https://doi.org/10.1038/s41598-019-48146-9>

25. Abramov AY, Smulders-Srinivasan TK, Kirby DM, et al (2010) Mechanism of neurodegeneration of neurons with mitochondrial DNA mutations. *Brain* 133:797–807.

<https://doi.org/10.1093/brain/awq015>

26. Pratakpiriya W, Ping Teh AP, Radtanakatikanon A, et al (2017) Expression of canine distemper virus receptor nectin-4 in the central nervous system of dogs. *Sci Rep* 7:349.

<https://doi.org/10.1038/s41598-017-00375-6>

Funding

This study was financed in part by the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Finance Code 001.

Ethics declarations

Competing interests

The authors declare that they have no competing interests.

Availability of data and materials

The data collected in this project is shown in our results section. Further information can be available upon request.