



UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA ANIMAL TROPICAL

**MAPEAMENTO DE EPÍTOPOS REATIVOS PARA CÉLULAS T DO VÍRUS DA
CINOMOSE EM CÃES VACINADOS DA REGIÃO METROPOLITANA DO RECIFE**

CAMILA PEREIRA DOS SANTOS

RECIFE
2014



UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA ANIMAL TROPICAL

**MAPEAMENTO DE EPÍTOPOS REATIVOS PARA CÉLULAS T DO VÍRUS DA
CINOMOSE EM CÃES VACINADOS DA REGIÃO METROPOLITANA DO RECIFE**

CAMILA PEREIRA DOS SANTOS

Dissertação submetida à Coordenação do
Curso de Pós-Graduação em Ciência
Animal Tropical, como parte dos requisitos
para a obtenção do título de Mestre em
Ciência Animal Tropical.

Orientadora: Prof^ª. Dr^ª. Rita de Cássia
Carvalho Maia

RECIFE
2014

Ficha Catalográfica

S237m Camila Pereira dos Santos
Mapeamento de epítomos reativos para células T do vírus da cinomose em cães vacinados da região metropolitana do Recife / Camila Pereira dos Santos. -- Recife, 2014.
54 f.: il.

Orientador (a): Rita de Cássia Carvalho Maia.
Dissertação (Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal Tropical) – Universidade Federal Rural de Pernambuco, Departamento de Morfologia e Fisiologia Animal, Recife, 2014.
Inclui apêndice(s) e referências.

1. Cinomose 2. ELISPOT 3. Vacina I. Maia, Rita de Cássia Carvalho, orientadora II. Título

CDD 591.4

Dissertação à disposição na Biblioteca Central da Universidade Federal Rural de Pernambuco. A transcrição ou utilização de trechos deste trabalho é permitida, desde que respeitadas às normas de ética científica.

UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA ANIMAL TROPICAL

**MAPEAMENTO DE EPÍTOPOS REATIVOS PARA CÉLULAS T DO VÍRUS DA
CINOMOSE EM CÃES VACINADOS DA REGIÃO METROPOLITANA DO RECIFE**

Camila Pereira dos Santos
Recife, 24 de fevereiro de 2014

BANCA EXAMINADORA

Prof^a. Dr^a. Rita de Cássia Carvalho Maia (Orientadora)
Universidade Federal Rural de Pernambuco – UFRPE

Prof. Dr. Marcos Antonio Barbosa de Lima
Universidade Federal Rural de Pernambuco – UFRPE

Dr^a. Georgia de Freitas Guimarães
Pesquisadora Biogene Indústria e Comércio - Ltda

Prof^a. Dr^a. Luciana de Oliveira Franco
Universidade Federal Rural de Pernambuco - UFRPE

“Dê-me, Senhor, agudeza para entender, capacidade para reter, método e faculdade para aprender, sutileza para interpretar, graça e abundância para falar. Dê-me, Senhor, acerto ao começar, direção ao progredir e perfeição ao concluir”. São Tomás de Aquino

AGRADECIMENTOS

A Deus, que não se deixa vencer em generosidade e concedeu-me inúmeras graças para a execução e finalização desta dissertação;

À Nossa Senhora, Virgem Santíssima, Mãe do Sumo Bem, pela constante intercessão e graças alcançadas para meu pobre nada;

Aos meus pais, Marta e Francisco, que dedicam suas vidas para fazer felizes, eu e minha irmã, Cíntia;

À minha orientadora, Rita Maia, pela compreensão e incentivos sem iguais e raros no meio acadêmico. Obrigada por se interessar em conhecer os meus “achismos” e por compartilhar cada decisão durante este tempo. Obrigada por acreditar que o emprego não impediria a execução deste projeto. Obrigada por tanto carinho e cuidado neste caminhar. Impossível não querer ser alguém melhor da convivência com a senhora;

À professora Marleyne Amorim, coordenadora deste programa de Pós-Graduação, pelas resoluções de todos os intempéries acadêmicos e por atender sempre com solicitude a todos os pedidos;

Aos professores do PGCAT;

Aos colegas de turma, fiquem certos de que vibrarei com todas as conquistas dos agora cientistas e “não pesquisadores do IBGE”;

Aos colegas do Laboratório de Virologia Animal: Ana Cláudia, Ana Lisa, Cecília, Cosme, Dani, Inês, Karin, Luciana, Sérgio e ao professor Roberto Castro. Ainda que o convívio tenha diminuído, não deixei de perceber e me alegrar com a torcida de todos. Em especial, a Marcello e a Rebeka, que tanto se revezaram ajudando na realização de todas as etapas do experimento. Sem saber como poder retribuir-lhes. Se esta forma existir, por favor, me deixem saber. É fato que não conseguiria sem vocês;

A todos os pesquisadores, técnicos e alunos do Laboratório de Virologia e Terapia Experimental (Lavite), do Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães (CPqAM), Recife – PE, Brasil, por todo auxílio imprescindível para a execução da parte de bancada, em especial a Verônica e a Clintiano, que generosamente somaram a seus afazeres algumas atribuições para o sucesso da pesquisa;

Ao pesquisador, Eduardo Nascimento, que realizou a leitura das placas;

Aos proprietários que aceitaram participar da pesquisa e a seus cães;

À Fundação de Amparo a Ciência e Tecnologia de Pernambuco, pelo apoio financeiro do projeto que originou esta dissertação;

Ao casal, Ivone e Emanuel Santos, da Biogene Indústria e Comércio, Ltda, pelo apoio, dicas e por permitirem que me ausentasse do expediente para que pudesse cursar as disciplinas;

Ao amigo, Guilherme Boaviagem, pela tamanha disponibilidade e conhecimento compartilhado;

Aos amigos, Dani e Marcos Farias, pela acolhida, teto, mesa, internet e sobretudo pelas inspirações: Bia e Miguel. Não há aperseio que sobressaia aos sorrisos destes dois;

Às diretoras espirituais, Kamila Kuhnen e Luísa Almeida, certa de que estive em suas intenções e de que todas foram atendidas;

Às BFFs vets, Nair e Susu, obrigada de verdade por não medirem esforços e permitirem que seus cães participassem da pesquisa. Pomys, também não “sobreviveria” sem você;

Às amigas pela fé e as que acompanharam mais de perto, Carol, Gabow e Moniquita, muito bom poder partilhar qualquer coisa e em qualquer momento com vocês!;

A cada um que esteve presente na jornada rumo à conclusão desta dissertação e que sem querer deixei de citar.

FONTE FINANCIADORA

O projeto que originou esta dissertação teve o auxílio financeiro da Fundação de Amparo à Ciência e Tecnologia de Pernambuco (FACEPE).

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS	
LISTA DE QUADROS	
LISTA DE TABELAS	
ABREVIATURAS E DEFINIÇÕES	
RESUMO	
ABSTRACT	
1 INTRODUÇÃO	15
2 REVISÃO DA LITERATURA	17
2.1 Epidemiologia	17
2.2 Etiologia	18
2.3 Sinais Clínicos	18
2.4 Imunopatologia	19
2.5 Resposta Imune	20
2.6 Profilaxia	21
2.6.1 Medidas de Higiene	21
2.6.2 Vacinas	21
2.6.3 Vacinação	22
2.7 Mapeamento de Epítomos	23
2.8 Ensaio ELISPOT para IFN- γ	26
3 OBJETIVOS	28
3.1. Geral	28
3.2. Específicos	28
4 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	29
5 ARTIGO	35
6 CONCLUSÕES	47
APÊNDICES	

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Representação esquemática para explorar um peptídeo cobrindo uma sequência com 15 aminoácidos de comprimento e 11 sobreposições. As caixas representam os aminoácidos.	25
Figura 2	Matriz quadrada de peptídeos para mapeamento de epítomos. A intersecção entre os <i>pools</i> reativos indicam um peptídeo relevante (26).	26
Figura 3	Esquema de ensaio ELISPOT para IFN- γ .	27
Fig. 1.jpeg	Sequência em código de uma única letra da proteína H do CDV.	38

LISTA DE QUADROS

- Quadro 1** Matriz dos *pools* de peptídeos da proteína H do vírus da cinomose por peptídeo individual. 39
- Quadro 2** Modelo adotado para realização dos ensaios ELISPOT utilizando *pools* de peptídeos sintéticos para a proteína H do vírus da cinomose canina. 40
- Quadro 3** *Pools* mais reativos após análises estatísticas (hachurado) e peptídeos considerados potenciais candidatos a epítomos de células T (cinza). 42

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Frequência dos <i>pools</i> que apresentaram reatividade na população estudada.	41
Tabela 2	Sequência de peptídeos da proteína H do vírus da cinomose considerados potenciais candidatos a epítomos para células T através de ELISPOT para IFN- γ .	42

ABREVIATURAS E DEFINIÇÕES

ACK – Amônio – clorito – potássio (*ammonium-chloride-potassium*)

BCIP – Sal de p-toluidina 5-bromo-4-cloro-3'-indolfosfato (*5-bromo-4-chloro-3'-indolyphosphate p-toluidine salt*)

CDV – Vírus da cinomose canina (*canine distemper virus*)

CPqAM – Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães

DNA – Ácido desoxirribonucleico

ELISPOT – *Enzime-Linked ImmunoSPOT*

FIV – Vírus da Imunodeficiência Felina

HLA – Antígeno leucocitário humano

IFN-I – Interferon tipo I

IFN- γ – Interferon gamma

IgG – Imunoglobulina G

IgM – Imunoglobulina M

MHC – Complexo maior de histocompatibilidade

NBT – Cloreto de tetrazólio nitro-azul (*nitro-blue tetrazolium chloride*)

PBMC – Células mononucleares sanguíneas periféricas

PBS – Tampão fosfato salino (*phosphate buffered saline*)

PMA – Forbol-12-miristato-13-acetato (*phorbol-12-myristate-13-acetate*)

RNA – Ácido ribonucleico

rpm – Rotações por minuto

RPMI – *Rose Roswell Park Memorial Institute*

SFM – Meio livre de soro (*Serum-free media*)

SNC – Sistema nervoso central

RESUMO

A cinomose canina é uma infecção de distribuição mundial causada pelo vírus da cinomose canina (CDV). A ocorrência do vírus já foi relatada em 12 famílias de mamíferos, principalmente nos da ordem Carnívora, e entre eles, a doença resultante está bem descrita nos caninos domésticos. Nesta espécie, a vacinação representa a melhor forma de controlá-la. Vislumbra-se que as vacinas disponíveis no mercado atualmente, recombinantes ou contendo vírus vivos atenuados, serão substituídas por vacinas baseadas em epítomos antigênicos específicos. Desta forma, visando oferecer subsídios para o desenvolvimento de novas vacinas, o mapeamento de epítomos reativos para as células T do CDV foi realizado através de ensaios de *Enzyme-Linked immunospot* (ELISPOT) para IFN- γ utilizando-se 119 peptídeos sintéticos da hemaglutinina viral agrupados em 22 *pools* em formato de matrizes para testar a resposta imune de 32 animais vacinados contra cinomose canina. De acordo com os critérios estabelecidos para identificação de *pools* reativos, 26 animais apresentaram pelo menos um *pool* reativo, um *pool* não foi reativo em nenhum ensaio e seis *pools* de peptídeos foram mais frequentes. O cruzamento entre os *pools* reativos mais frequentes revelou nove peptídeos, os quais concluímos que devem ser considerados potenciais candidatos a epítomos para as células T do CDV e que, portanto, poderão ser utilizados na formulação de uma nova vacina de DNA anti-cinomose.

Palavra-chave: peptídeos, vacina, hemaglutinina, resposta imune, ELISPOT, IFN- γ

ABSTRACT

Canine distemper is a worldwide infectious disease caused by the canine distemper virus (CDV). The occurrence of the virus was reported in 12 families of mammals, mainly in the order Carnivora, among which the resulting disease is best described in domestic dogs. In this species, vaccination is the most effective way of control. One sees that the vaccines currently available on the market, containing recombinant or attenuated live virus, will be replaced by vaccines based on specific antigenic epitopes. Therefore, in order to offer subsidies for the development of new vaccines, the mapping of reactive epitopes to T cells of CDV was performed by *Enzyme-Linked immunospot* (ELISPOT) assays for IFN- γ using 119 synthetic peptides of viral hemagglutinin grouped in 22 pools in matricial form to test the immune response of animals vaccinated against distemper 32. Based on the criteria for identification of reactive pools, 26 animals had shown at least one reactive pool, one pool was not reactive in any trial and six pools of peptides were most frequent. The crossmatch between the most common reactive pools revealed nine peptides, which we conclude that must be considered potential candidates for epitopes to T cells CDV and, therefore, may be used in the formulation of a new anti-canine distemper DNA vaccine.

Key-words: peptides, vaccine, hemagglutinin, immune response, ELISPOT, IFN- γ

1 INTRODUÇÃO

A cinomose é uma enfermidade causada pelo vírus da cinomose canina (CDV). Diversas espécies da ordem Carnivora são suscetíveis à infecção e as taxas de mortalidade variam muito entre elas (SEKI et al., 2003). Entre os caninos domésticos a cinomose é apontada como a segunda doença infecciosa de maior relevância (DEEM, 2000; NEGRÃO et al., 2006).

Esta doença caracteriza-se por alterações sistêmicas, respiratórias, gastrointestinais e neurológicas, associadas ou não (GEBARA et al., 2004, AMUDE et al., 2007; HASS, 2008). Cães de qualquer idade, raça e sexo, com maior predileção por filhotes e animais não vacinados, especialmente os com menos de três meses de idade, podem ser acometidos (SILVA et al., 2007).

A vacinação continua sendo a primeira medida contra o CDV, no entanto, medidas sanitárias, como evitar contato entre animais em períodos de surto, podem ajudar a controlar a transmissão da infecção (RIKULA; NUOTIO; SIHVONEN, 2007; KAPIL e YEARY 2011).

A maioria das vacinas encontradas no mercado atualmente contêm estirpes do vírus vivo atenuado (PATEL et al., 2012). Casos suspeitos de doença pós-vacinal já foram reportados, portanto, verifica-se a necessidade de construção de vacinas mais seguras e eficazes (MARTELLA et al, 2011).

As linhas de pesquisas mais avançadas em doenças virais visam à produção de uma vacina cuja principal característica é a capacidade de estimular resposta contra epítomos relevantes do vírus, além de mediar à produção de anticorpos neutralizantes contra a infecção. O primeiro passo para a criação destas vacinas é a realização de ensaios de células T que determinem se os peptídeos derivados da proteína terapêutica contêm sequências com uma propensão para estimular uma resposta imune celular (DE GROOT e SCOTT , 2007). Estudos prévios para a identificação de epítomos relevantes do vírus da cinomose já foram feitos para a proteína do nucleocapsídeo (N), fosfoproteína (P) e proteína de fusão (F), mas ainda não para o fator de ligação viral, a proteína hemaglutinina (H) (YOSHIDA et al.1999; GHOSH; WALKER; JACKSON, 2001; SUGAI et al., 2009).

A proteína H desempenha um papel importante na estimulação da imunidade celular uma vez que controla a especificidade do hospedeiro e o tropismo celular e induz a maioria dos anticorpos neutralizantes de CDV (VON MESSLING et al.,2001; KAPIL e YEARY 2011). Esta parece ser uma glicoproteína de classe II com um único domínio hidrófobo grande o suficiente para abranger a membrana lipídica localizado próximo do terminal N da proteína (aminoácidos

35 a 55) e um grande ectodomínio C- terminal (CURRAN; CLARKE; RIMA, 1991; ZIPPERLE et al., 2010).

Assim sendo, realizamos o mapeamento de epítomos da proteína H do vírus da cinomose canina que são reconhecidos pelos linfócitos T CD4+ e T CD8+ através da técnica de *Enzyme-Linked immunospot* (ELISPOT) para IFN- γ com intuito de identificar peptídeos de relevância imunogênica e que poderão ser utilizados para a produção de uma nova vacina de DNA anti-cinomose.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Epidemiologia

Conhecida desde 1760, a cinomose canina é a doença infecciosa de distribuição mundial mais importante dos cães domésticos e de outros carnívoros, sendo sua taxa de mortalidade a segunda maior após a raiva (ETTINGER e FELDMAN, 1997; MURPHY, 1999; DEEN; SPELMAN; YATES, 2000).

A infecção já foi descrita nas famílias *Felidae* (leões, leopardos, cheetas), *Mustelidae* (furões, martas), *Viverridae* (“binturongs”, pequenos mamíferos carnívoros que vivem na Ilha de Bornéu), *Procyonidae* (guaxinins), *Ursidae* (urso), *Hyaenidae* (hiena), *Ailuridae* (panda vermelho), *Myrmecophagidae* (urso formigueiro), *Delphinidae* (golfinhos), *Phocidae* (focas) e *Cebidae* (macaco-de-cheiro) e diferentes espécies da família *Canidae* (cães domésticos, coiotes, lobos). (JONES; HUNT; KING, 2000; NELSON e COUTO, 2001, HIRSH e ZEE, 2003).

Nas últimas décadas, vem ocorrendo em um número significativo de novas espécies de hospedeiro como em macacos rhesus e macacos cinomolgos na China e no Japão, respectivamente (SEKI et al., 2003; KAMEO et al., 2012). Além disto, há relatos de diversos surtos em todo o mundo, como em leões no Parque Nacional Serengeti, na Tanzânia, em focas no Lago Baikal, na Rússia; em raposas-da-ilha, na Califórnia e em cães, no Alasca, Estados Unidos da América (SEKI et al., 2003; MAES et al., 2003; LAN et al., 2006; KAMEO et al., 2012).

No Brasil, a doença é endêmica, chegando a representar, 6% de todas as ocorrências clínicas de cães e em um estudo da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM), Santa Maria - RS, verificou-se que a doença foi a responsável por 11% das mortes dos cães necropsiados que foram atendidos no hospital veterinário da UFSM durante um período de 2 anos (HEADLEY e GRAÇA, 2000; NEGRÃO et al., 2006).

Cães domésticos de qualquer sexo, raça ou faixa etária podem ser acometidos, porém, filhotes entre três e seis meses de idade são mais frequentemente infectados, uma vez que a imunidade materna transferida pelo colostro ou através da placenta declina neste período, e, que o sistema imune ainda não está apto para suportar uma infecção por vírus patogênico e virulento (BIAZZONO; HAGIWARA; CORRÊA, 2001; FENNER, 2003; QUINN et al., 2005).

2.2 Etiologia

A etiologia da cinomose foi demonstrada em 1906 por Carré (MURPHY, 1999). É causada pelo vírus da cinomose (CDV), que pertence ao gênero *Morbilivirus* da família *Paramyxoviridae* (GREENE, 2006).

O CDV é envelopado, com genoma de RNA de fita simples negativa não segmentada e envolta por um nucleocapsídeo de simetria helicoidal (TATSUO e YANAGI, 2002). Este agente é pleomórfico, de tamanho que varia entre 150 e 300 nm e seu capsídeo é composto por seis polipeptídeos, compartilhados entre todos os morbilivírus: as proteínas “N” (nucleoproteína), “P” (fosfoproteína), “M” (protetora da matriz), “L” (grande proteína), sendo as principais: a “F” (fusão), responsável pela fusão nas células infectadas e a “H” (hemaglutinina), responsável pela adsorção aos sítios receptores das células suscetíveis (DIALLO, 1990; CURRAN; CLARKE; RIMA, 1991; HIRSH e ZEE, 2003).

2.3 Sinais Clínicos

O curso da infecção e os sinais clínicos da cinomose foram descritos pela primeira vez por Edward Jenner em 1809 (MURPHY, 1999). A doença clínica varia de acordo com a cepa do vírus, a idade e a condição imune do hospedeiro (NELSON e COUTO, 2001). Após exposição ao CDV, ocorrem febre transitória e perfil de leucopenia sem sinais evidentes da doença. Tosse, diarreia, vômito, anorexia, desidratação e perda de peso com debilidade, caracterizam o quadro inicial da doença (ETTINGER e FELDMAN, 1997). No entanto, provavelmente, 50 a 70% das infecções são inaparentes (DUNN, 2001). No sistema linfático, observa-se um esgotamento de linfócitos (HIRSH e ZEE, 2003). Na pele, com maior frequência na região abdominal, pode ocorrer uma dermatite vesicular e pustular (JONES; HUNT; KING, 2000). Nos coxins há uma intensa proliferação da camada de queratina da epiderme levando a uma lesão clinicamente observada pelo espessamento e endurecimento destes chamada de “doença da almofada dura” (JONES; HUNT; KING, 2000). Esta lesão também pode ser vista no focinho (QUINN et al., 2005). O tropismo do vírus para o esmalte dos dentes durante o desenvolvimento deste órgão determina necrose do mesmo gerando irregularidades na superfície dentária, como as que foram observadas em animais que se recuperaram, como uma hipoplasia

(ETTINGER e FELDMAN, 1997; JONES; HUNT; KING, 2000). Detecção do RNA viral em células ósseas metafisárias indicou que a osteopatia metafisária também pode ser consequência desta infecção (ETTINGER e FELDMAN, 1997).

Um outro sinal é a reação inflamatória na glândula lacrimal produzida pelo CDV que caracteriza uma conjuntivite bilateral que progride de serosa para mucopurulenta, evidenciando-se assim, como um dos sinais, a secreção ocular (GELLAT, 2003). Coriorretinite multifocal e neurite óptica podem ser observadas quando do aparecimento agudo de cegueira e midríase bilateral (ETTINGER E FELDMAN, 1997; GELLAT, 2003).

Tosse crônica, com corrimento nasal e sons pulmonares ásperos característicos de broncopneumonia purulenta, em que brônquios e alvéolos estão ocupados com neutrófilos, mucina e debris teciduais são devido às infecções bacterianas secundárias (ETTINGER E FELDMAN, 1997; JONES; HUNT; KING, 2000).

No sistema nervoso central (SNC), o CDV possui afinidade por partes mielinizadas do cérebro e da medula espinhal (JONES; HUNT; KING, 2000). Lesões provocadas pelo antígeno viral em macrófagos meníngeos, células endoteliais, gigantes e neuronais originam os sinais neurológicos vistos na doença: mioclonia, convulsões, hiperestesia, paresia, incoordenação e andar em círculos (ETTINGER E FELDMAN, 1997; FENNER, 2003; HIRSH e ZEE, 2003). Estas lesões variam em intensidade e abrangência e estão diretamente relacionadas com a gravidade e a duração da doença clínica (JONES; HUNT; KING, 2000).

Os linfócitos infectados cruzam a barreira hematológica ou penetram no líquido cefalorraquidiano e transpõem a barreira entre o útimo e o cérebro. Uma vez no SNC, os vírus saem dos linfócitos e entram nos neurônios e na glia onde se replicam e provocam desmielinização, a qual é resultado da infecção restritiva dos oligodendrócitos e de necrose subsequente (ETTINGER e FELDMAN, 1997; NELSON e COUTO, 2001).

Mesmo aqueles cães que desenvolveram imunidade parcial após exposição ao vírus, podem sofrer lesão no SNC por causa do dano imunológico à substância branca e da inflamação secundária (NELSON e COUTO, 2001).

2.4 Imunopatologia

As vias de entrada do vírus podem ser conjuntival, digestiva e respiratória, sendo esta, a principal (APPEL e CARMICHAEL, 1979; ETTINGER e FELDMAN, 1997; GRENE, 2006).

Após inalação, o CDV é fagocitado pelos macrófagos e em 24 horas carregado pelos vasos linfáticos para as tonsilas, linfonodos faríngeos e brônquicos, onde se replicam (NELSON e COUTO, 2001).

O vírus entra nos linfócitos após a ligação da proteína H ao receptor principal para o vírus, a molécula de ativação para sinalização de linfócitos (SLAM) ou CD150 (SYKES, 2010; MARTELLA et al., 2011). Esta é uma glicoproteína de membrana envolvida na ativação de linfócitos e expressa em várias células do sistema imune, como células T ativadas, células B, monócitos e células dendríticas e sua expressão parece ser *up* regulada em resposta à infecção por CDV (WENZLOW et al., 2007; SYKES, 2010, PATEL et al., 2012; CARVALHO et al.,2012).

Uma vez o vírus ligado à célula hospedeira, a proteína H sofre alterações estruturais e transmite um sinal para a proteína F, a qual serve como uma mediadora para ajudar as membranas virais e as das células hospedeiras a se fundirem umas com as outras, permitindo a propagação viral (CARVALHO et al.,2012).

Células T CD4+ são preferencialmente esgotadas durante a fase aguda, a qual é seguida por depleção das células T CD8+ (SYKES, 2010). Esta linfocitólise resulta em imunossupressão e formação escassa de anticorpos neutralizantes, assim, o resultado da infecção dependerá da velocidade em que o hospedeiro é capaz de eliminar o vírus antes de ele ter tempo suficiente para causar lesões graves no sistema imune. (DUNN, 2001;SYKES, 2010).

2.5 Resposta imune

O sistema imune inato é a primeira linha de defesa do hospedeiro contra o CDV e, também é o responsável pela produção de citocinas (por exemplo, IFN-I) que ativarão a resposta imune adaptativa mediada por células. No entanto, este vírus tem como características lesar a imunidade inata nas fases iniciais da infecção devido ao seu elevado linfotropismo, e gerar interrupções em funções essenciais de células imunitárias (CÉSPEDES; CRUZ; NAVARRO, 2010).

Segundo Beineke et al. (2009) e Carvalho et. al (2012) as respostas imune humoral e mediada pelas células T são cruciais para a eliminação deste vírus. Geralmente, a proteção humoral contra cinomose ocorre pela produção de anticorpos contra as nucleoproteínas virais,

seguida do desenvolvimento de anticorpos específicos para as proteínas do envelope viral (CARVALHO et al., 2012). A ausência de uma resposta imune humoral eficaz conduz a doença clínica aguda, frequentemente de curso fatal, ao passo que anticorpos IgM anti-CDV com títulos detectáveis aos 10-14 dias pós-infecção, promovem a eliminação ou persistência viral, respectivamente (BEINEKE et al., 2009; KAPIL e YEARY, 2011) .

Cães vacinados e infectados exibem uma resposta imune mediada por células T específicas contra o CDV independentemente da concentração de anticorpos (BEINEKE et al., 2009). Portanto, a importância da resposta imunitária celular na cinomose é evidenciada por meio de imunidade protetora na ausência de resposta humoral mediada pelos anticorpos mensuráveis (CARVALHO et al., 2012). Uma forte resposta imune mediada pelas células T específicas contra o CDV causa a eliminação viral em cães convalescentes (KAPIL e YEARY, 2011). Animais que se recuperaram de uma infecção pelo CDV adquirem imunidade duradoura (HIRSH e ZEE, 2003). No entanto, cães não vacinados ou não regularmente vacinados, podem não possuir imunidade e apresentar a infecção (TIPOLD; VANDEVELDE; JAGGY, 1992).

2.6 Profilaxia

2.6.1 Medidas de Higiene

O controle, devido à natureza lábil do vírus que sobrevive em exsudados aproximadamente 20 minutos e não é resistente a maioria dos desinfetantes utilizados em hospitais, pode ser alcançado pelo isolamento estrito e a desinfecção (com compostos de amônio quaternário, como o cloreto de benzalcônio 0,05%, por exemplo) (DUNN, 2001; NELSON e COUTO, 2001; QUINN et al., 2005, KAPIL e YEARY, 2011). Em caso de reterem-se os animais, deve-se vacinar todo o lote, separar os cães sadios dos doentes, não permitir a entrada de novos animais e um mês após a recuperação do último caso, o canil deve ser limpo e desinfetado (DUNN, 2001).

2.6.2 Vacinas

As tentativas iniciais para a produção de ferramentas de imunização contra o CDV foram feitas em 1920 por Puntoni e por Laidlaw e Dunkin, usando material cerebral inativado em

formalina de cães infectados ou a administração paralela de material cerebral infeccioso e de soros hiperimunes (MARTELLA et al., 2011).

A introdução das vacinas vivas modificadas contra este vírus na década de 1950 e sua ampla utilização até os dias atuais tem ajudado a manter a doença sob controle (MARTELLA et al., 2011). Ainda assim, nas regiões onde a vacinação de cães jovens não é executada ou está mal cronometrada, as epidemias continuam a ocorrer (SYKES, 2010).

As vacinas podem ser produzidas a partir do vírus adaptado ao ovo ou à cultura de células aviárias (linhagem *Onderspoort*) ou, a partir de vírus adaptado à cultura de células caninas (linhagem *Rockborn*), sendo as primeiras consideradas as mais seguras (QUINN et al., 2005). Vacinas atenuadas geram respostas celular (linfócitos T auxiliar e T citotóxico) e (linfócitos B, anticorpos) além de imunidade de mucosas (FLORES, 2007). No entanto, tem como desvantagem a capacidade demonstrada do vírus vivo atenuado em reverter, causar doença e mesmo mortalidade em cães sensíveis (FLORES, 2007; QUINLEY et al., 2013).

A vacina também pode ser recombinante entre o CDV e o poxvírus do canário, como a Recombitek[®]C6/CV, Merial Saúde Animal Ltda (FLORES, 2008; CÉSPEDES; CRUZ; NAVARRO, 2010). Esta contém poxvírus de canário vivo modificado com dois genes do vírus da cinomose canina: as proteínas de fusão e hemaglutinina que serão expressas e apresentadas induzindo respostas de linfócitos T e B (QUINLEY et al., 2013). A indução de resposta imunológica contra os antígenos do poxvírus é irrelevante pois este não é um vírus de cães (FLORES, 2007). Apresentam a vantagem de não sofrerem interferência da imunidade passiva materna, pois os animais geralmente não possuem imunidade contra antígenos do vírus vetor e são seguras, pois não há replicação do vírus, portanto, nenhuma possibilidade de causar doença viral (FLORES, 2007; QUINLEY et al., 2013).

2.6.3 Vacinação

A cobertura vacinal de 95% dos cães domesticados é necessária para controlar cinomose nestes pets, portanto, a vacinação é a principal medida contra o vírus (FLORES, 2007, RIKULA; NUOTIO; SIHVONEN, 2007).

A idade em que os filhotes tornam-se suscetíveis a cinomose é proporcional ao título de anticorpos de sua progenitora, bem como com a transferência colostrálica de anticorpos a eles, e, em mínima proporção, pela placenta (ETTINGER E FELDMAN, 1997; BIAZZONO;

HAGIWARA; CORRÊA, 2001). Os anticorpos maternos são absorvidos no intestino, a partir de colostro durante os 2 primeiros dias de vida e são extintos entre 6 e 12 semanas mais tarde (KAPIL e YEARY, 2011).

De acordo com Biazzone, Hagiwara e Corrêa (2001), o cão deve ser vacinado quando se tornar soronegativo, assegurando-se desta maneira, a máxima resposta sorológica pós-vacinal associada com a proteção de mais longa duração. Como na prática clínica é difícil estabelecer-se este período recomendam-se múltiplas vacinações em intervalos que variam entre os autores de 21 a 30 dias, sendo que a primeira deve ser realizada entre 6 e 8 semanas de vida, seguidos de dois reforços: o primeiro entre a 10^a e 12^a semanas de vida e o segundo após a 13^a semana de idade, entre a 14^a e 16^a semanas de vida, seguidas então, da revacinação anual (BIAZZONO; HAGIWARA; CORRÊA, 2001; NELSON e COUTO, 2001; DUNN, 2001; SHERDING e BICHARD, 2003; QUINN et al., 2005). A vacinação de reforço anual ainda é discutida no meio científico, sendo que dados sugerem que não é necessária por no mínimo três ou sete anos (NELSON e COUTO, 2001; DUNN, 2001; MARTELLA, 2011).

Complicações pós-vacinais são raras mas passíveis de ocorrer, principalmente se o hospedeiro for imunocomprometido ou co-infectado com o parvovírus canino e caracterizam-se por uma encefalite e trombocitopenia moderada ou transitória (NELSON e COUTO, 2001; DUNN, 2001).

Falhas vacinais não são incomuns, as quais estão relacionadas tanto à vacina como ao hospedeiro. Dentre elas, citam-se com maior frequência a interferência de anticorpos maternos, que podem bloquear o vírus vacinal e a inativação da vacina por manipulação inapropriada (DUNN, 2001; NELSON e COUTO, 2001; EGHAFFONA; JACOB; YAH, 2007).

Como recomendações, deve-se evitar a vacinação: se a temperatura corpórea for igual ou maior que 39,9°C; em cadelas prenhes ou que amamentam neonatos; em cães com sinais clínicos sugestivos de parvovirose e a vacinação de espécies exóticas com vacinas de vírus vivos modificados (NELSON e COUTO, 2001, DUNN, 2001, HIRSH e ZEE, 2003).

2.7 Mapeamento de epítomos

Uma sequencia curta de aminoácidos que mantém a capacidade estimuladora para células T, é chamada de epítomo ou peptídeo imunodominante (LI PIRA et al., 2010). Originalmente,

este fora definido como a parte de um antígeno que define a ligação para uma imunoglobulina e, consiste de uma parte de uma proteína processada e partes da proteína complexo maior de histocompatibilidade (MHC) expressa pelo hospedeiro (LUNDEGAARD; LUND; NIELSEN, 2012). A proteína nativa a partir da qual se origina o epítipo é o antígeno, assim sendo, pode-se dizer que o epítipo é um subtipo do antígeno (LUNDEGAARD; LUND; NIELSEN, 2012).

Ensaio de células T podem determinar se os peptídeos derivados de uma proteína contêm sequências com uma propensão para estimular uma resposta de anticorpos (DE GROOT e SCOTT, 2007). Portanto, o mapeamento de epítipos para células T em antígenos proteicos derivados de agentes patogênicos relevantes implica na identificação de sequências de aminoácidos que são reconhecidos por células T CD4 + ou T CD8 + e é importante para a compreensão do desenvolvimento da imunidade mediada por células (LI PIRA et al., 2010; WANG et al., 2011).

A abordagem comumente utilizada para este fim envolve a produção de um painel completo de peptídeos com um determinado comprimento e uma sequência de sobreposição pré-determinada que abrange a proteína candidata (LI PIRA et al., 2010). Um epítipo com uma sequência que abrange dois peptídeos sequenciais seria dispensada se não fosse abrangida pela sequência de sobreposição (LI PIRA et al., 2010). Portanto, a sobreposição entre os peptídeos vizinhos é importante no que diz respeito à capacidade dos peptídeos cobrirem todos epítipos possíveis ao longo de uma dada sequência de aminoácidos (HOFFMEISTER, 2003). Assim, para cobrir cada determinante antigênico possível dentro de uma dada sequência antigênica é necessário o uso de peptídeos com sobreposição de $(n-1)$, onde n é o número de aminoácidos (DONALD e LEHMANN, 2003).

Geralmente, peptídeos com 15-20 aminoácidos de comprimento são utilizados quando um antígeno completo, ou mesmo um proteoma viral completo, é explorado (LUNDEGAARD; LUND; NIELSEN, 2012).

No entanto, esta sobreposição não deve ser mais curta do que o comprimento típico de peptídeos apresentados ao MHC de classe I (isto é, nove aminoácidos) menos um (isto é, oito aminoácidos) (HOFFMEISTER, 2003). Uma sobreposição de oito aminoácidos garante que todos os trechos possíveis dos nove aminoácidos estejam contidos na varredura (HOFFMEISTER, 2003). Para o MHC de classe II, os peptídeos apresentados com esta sobreposição seriam muito curtos, já que o comprimento de um epítipo típico para este,

excedem nove aminoácidos (HOFFMEISTER, 2003). Desta forma, idealmente, para o rastreio, uma combinação de peptídeos mais longos e mais curtos poderiam ser utilizados, assegurando peptídeos ideais para estimulação de células-T CD4+ e T CD8+ (KIECKER, et al., 2004). Kiecker et al. (2004), sugere que se devem utilizar peptídeos com comprimentos de 15 aminoácidos com 11 sobreposições (Fig. 1).

Figura 1 - Representação esquemática para explorar um peptídeo cobrindo uma sequência com 15 aminoácidos de comprimento e 11 sobreposições. As caixas representam os aminoácidos.

Sequência do aminoácido primário



Fonte: adaptado de HOFFMEISTER, 2003.

Para reduzir o esforço experimental consideravelmente, os peptídeos são reunidos em amostras com até 64 peptídeos em *pools* (LUNDEGAARD; LUND; NIELSEN, 2012). O objetivo de usar *pools* de peptídeos é determinar quais peptídeos são estimulantes sem ter que testar cada peptídeo individualmente (HOFFMEISTER, 2003).

A forma mais eficiente para que as reuniões de peptídeos se sobreponham de forma que cada peptídeo individual esteja contido em exatamente dois *pools* e o número de *pools* é mínimo, é utilizando uma matriz quadrada ou retangular (Fig. 2) (DONALD e LEHMANN, 2003; HOFFMEISTER, 2003).

Com tal matriz, as intersecções dos *pools* positivos correspondem aos peptídeos estimulantes (DONALD e LEHMANN, 2003; HOFFMEISTER, 2003).

Figura 2 - Matriz quadrada de peptídeos para mapeamento de epítomos. A intersecção entre os *pools* reativos indicam um peptídeo relevante (26).

Pools verticais
↓

		V1	V2	V3	V4	V5	V6	V7	V8	V9	V10
Pools horizontais →	H11	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
	H12	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20
	H13	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30
	H14	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40
	H15	41	42	43	44	45	46	47	48	49	50
	H16	51	52	53	54	55	56	57	58	59	60
	H17	61	62	63	64	65	66	67	68	69	70
	H18	71	72	73	74	75	76	77	78	79	80

Fonte: LI PIRA et al., 2010.

2.8 Ensaio ELISPOT para IFN- γ

Vários ensaios medem diferentes recursos da ativação das células T que se seguem ao reconhecimento de antígenos, dentre eles, o ELISPOT (LI PIRA et al., 2010).

O ensaio ELISPOT para IFN- γ é amplamente utilizado para quantificar a imunidade antígeno-específica no nível de uma única célula, sendo realizado com uma amostra recentemente obtida com menos do que 24 h de cultura ou amostra crioconservada (DONALD e LEHMANN, 2003; MOODIE et al., 2010).

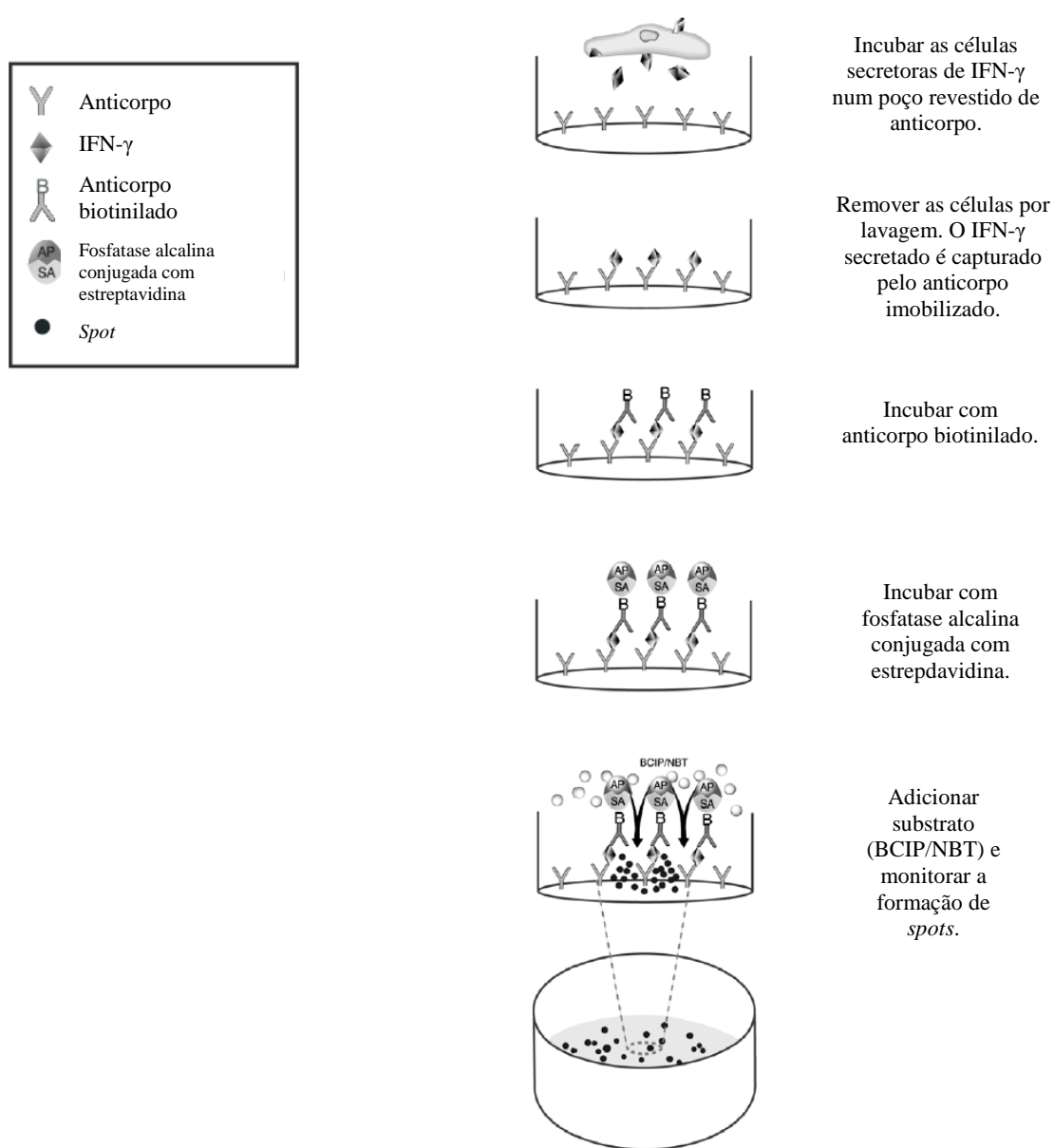
Células secretoras de interferon são incubadas em uma placa de 96 poços revestida de anticorpos anti-IFN- γ . O interferon secretado é então capturado e as células são removidas por lavagem. Em seguida, procede-se uma nova incubação, desta vez, com anticorpo biotilado. Posteriormente, realiza-se uma lavagem para remover qualquer anticorpo biotilado não ligado e adiciona-se a fosfatase alcalina conjugada com estreptavidina (R&D SYSTEM, 2010).

A enzima não ligada é subsequentemente removida através de lavagem e a secreção de IFN- γ por células individuais são visualizadas como manchas (*spots*) reveladas usando uma enzima marcada com anticorpos monoclonais anti-IFN- γ (BCIP/NBT) (Fig. 3) (MIYAHIRA, 1995; R&D SYSTEM, 2010). As manchas podem ser contadas com um sistema automatizado

(leitor ELISPOT) ou manualmente, utilizando-se um estereomicroscópio (R&D SYSTEM, 2010).

Esta técnica destaca-se, pois quando o ensaio é realizado utilizando 3×10^5 de PBMC por poço, o limite de detecção é de 1 em 3×10^5 , o que é uma ou duas ordens de grandeza mais sensível do que técnicas baseadas em citometria de fluxo (DONALD e LEHMANN, 2003). Além disto, ainda quando comparado a estas técnicas, o ensaio é executado em menos tempo, é mais barato e quantifica diretamente o número de células efetoras (SCHEIBENBOGEN et al., 2000; DEAN; LAVOY; BURKHARD, 2004).

Figura 3 - Esquema de ensaio ELISPOT para IFN- γ .



Fonte: adaptado de R&D SYSTEM, 2010.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

- Mapear epítomos da proteína H do vírus da cinomose reconhecidos pelas células TCD4+ e TCD8+ em uma coorte de animais vacinados na cidade do Recife.

3.2 Objetivos Específicos

- Validar epítomos para serem futuramente utilizados em uma nova vacina de DNA anti-cinomose;
- Determinar a produção de anticorpos contra cinomose em uma coorte de animais vacinados;

4 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AMUDE, A.; CARVALHO, G. A.; ALFIERI, A. A.; ALFIERI, A.. *Virus isolation and molecular characterization of canine distemper virus by RT-PCR from a mature dog with multifocal encephalomyelitis. Brazilian Journal of Microbiology.* 2007, vol.38, n.2, pp. 354-356.

APPEL, M.J.; CARMICHAEL, L.E. *Sistêmica viral disease.* In: CATCOTT, E.J. *Canine Medicine.* 4. ed. Santa Barbara: **American Veterinary Publications.** 1979. p. 17-48.

BEINEKE, A.;PUFF, C., SEEHUSEN, F.; BAUMGÄRTNER, W. Pathogenesis and immunopathology of systemic and nervous canine distemper. *Veterinary Immunology and Immunopathology.* 2009;127(1-2):1–18. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19019458>>. Acesso em 26 de Dezembro de 2013.

BIAZZONO, L.; HAGIWARA, M. K.; CORRÊA, A. R. Avaliação da resposta imune humoral em cães jovens imunizados contra a cinomose com vacina de vírus atenuado. *Brazilian Journal of Veterinary Research Animal Science.* São Paulo, 2001, v. 38, n. 5, p. 245-250.

CARVALHO, O. V., BOTELHO, C.V., FERREIRA, C.G.T., SCHERER, P.O.; SOARES-MARTINS, J.A. P.;ALMEIDA, M. R.; JÚNIOR, A. S., *Immunopathogenic and neurological mechanisms of canine distemper virus. Advances in Virology.* 2012;2012:163860. Disponível em: <<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3501799 &tool=pmcentrez&rendertype=abstract>>. Acesso em: 9 de janeiro de 2014.

CÉSPEDES, P. F.; CRUZ, P.; NAVARRO, C. O. Modulación de la respuesta inmune durante la infección por virus distemper canino : implicancias terapéuticas y en el desarrollo de vacunas Modulation of immune response during canine distemper virus infection : therapeutic and vaccine development implica. *Archives of Medicine Veterinary,* 2010, v.48, 15–28.

CURRAN, M.D.; CLARKE, D.K.; RIMA, B. K. *The nucleotide sequence of the gene encoding the attachment protein H of canine distemper virus The sequence of the H gene and flanking sequences in the F and L genes of canine distemper virus (CDV) sites in the extracellular domain and , like all other. Journal of General Virology.* 1991: v. 72, 443–447.

DE GROOT, A. S.; SCOTT, D. W. *Immunogenicity of protein therapeutics. Trends in Immunology.* 2007;28(11):482–90. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17964218>>. Acesso em: 16 de janeiro de 2014.

DEAN, G.; LAVOY, A.; BURKHARD, M.J. *Peptide mapping of feline immunodeficiency virus by IFN-gamma ELISPOT. Veterinary Immunology and Immunopathology*. 2004, v.100(1-2):49–59. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15182995>>. Acesso em: 15 de janeiro de 2014.

DEEN, S.L.; SPELMAN, L.H.; YATES, R.A.. *Canine distemper in terrestrial carnivores: a review. Journal of Zoo and Wildlife Medicine*, 2000, v.31, p. 441-451.

DIALLO, A. *Morbillivirus group: genome organization and proteins. Veterinary Microbiology*. Amsterdã, 1990, v.23, n. 1-4p 155±163.

DONALD, A. ; LEHMANN, P. V. *T-cell epitope mapping using the ELISPOT approach. Methods*, 2003, v.29(3), 260–269. doi:10.1016/S1046-2023(02)00348-1.

DUNN, J.K. **Tratado de Medicina de pequenos animais**. São Paulo: Roca, 2001, pp.920-924.

EGHAFONA, N. O.; JACOB, J.; YAH, S. C. *Evaluation of post-vaccination immunity to canine distemper and parvoviruses in Benin City, Nigeria. African Journal of Biotechnology*. 2007, v. 6 (16), pp. 1898-1904.

ETTINGER, S.J.; FELDMAN, E.C. **Tratado de medicina interna veterinária**. São Paulo: 4ª ed. Editora Manole, 1997, p. 1562-67.

FENNER, WILLIAM R. **Consulta Rápida em Clínica Veterinária**. Rio de Janeiro – RJ, 3ª edição. Editora Guanabara Koogan, 2003. pp 428-429.

FLORES, E. F. **Virologia veterinária**. Santa Maria. Ed. da UFSM, 2007, pp 674- FLORES, E. FLORES, E. **Virologia veterinária**. Santa Maria. Ed. da UFSM, 2007, pp 674-677.

GEBARA, C.M.S.; WOSIACKI, S.R.; NEGRÃO, F.J.; ALFIERI, A.A.; ALFIERI, A.F. Lesões histológicas no sistema nervoso central de cães com encefalite e diagnóstico molecular da infecção pelo vírus da cinomose canina. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, 2004, vol.56, n.2, pp. 168-174. ISSN 0102-0935.

GELATT, K. N. **Manual de Oftalmologia Veterinária**. 3. ed. São Paulo: Manole, 2003. p. 462.

GHOSH, S.; WALKER, J.; JACKSON, D. C. *Identification of canine helper T-cell epitopes from the fusion protein of canine distemper virus. Immunology*, 2001, v. 104, 58–66.

GREENE, C.E. *Infectious Disease of the Dog and Cat*. St. Louis, Missouri., Editor Saunders Elsevier: 2006, p. 25-41.

HASS, R.; MARTENS, W.; GREISER-WILKE, I. ; MAMAEV; L.; BUTINA, T.; D. MAACK, D.; BARRETT, T.. Níveis de anticorpos contra o vírus da cinomose canina e o parvovírus canino em cães não vacinados e vacinados. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, 2008, vol.60, n.1, pp. 270-274. ISSN 0102-0935.

HEADLEY, S. A.; GRAÇA, D. L.. *Canine distemper: epidemiological findings of 250 case*. **Brazilian Journal of Veterinary Research Animal Science**, 2000, vol.37, n.2, pp. 00-00. ISSN 1413-9596.

HIRSH, D.C.; ZEE, Y. C. **Microbiologia Veterinária**. Rio de Janeiro, RJ, Guanabara Koogan, 2003. 1084p.

HOFFMEISTER, B. *Mapping T cell epitopes by flow cytometry*. **Methods**. 2003;29(3):270–281. Disponível em: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1046202302003493>>. Acesso em: 16 de janeiro de 2014.

JONES, T. C; HUNT, R. D.; KING, N.W. **Patologia Veterinária**. Rio de Janeiro, RJ, 6ª Ed. Ed. Manole, 2000.

KAMEO, Y.; NAGAO, Y.; NISHIO, Y.; SHIMODA, H.; NAKANO, H.; SUZUKI, K.; MAEDA, K. *Epizootic canine distemper virus infection among wild mammals*. **Veterinary Microbiology**, 2012, 154(3-4), 222–229. doi:10.1016/j.vetmic.2011.07.006.

KAPIL, S.; YEARY T. J. *Canine distemper spillover in domestic dogs from urban wildlife*. **Veterinary Clinical North American Small Animal Practice**. 2011;41(6):1069–86. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22041204>>. Acesso em: 9 de janeiro de 2014.

KIECKER, F.; STREITZ, M.; AY, B.; CHEREPNEV, G.; VOLK, H-D.; VOLKMER-ENGERT, R.; KERN, F. *Analysis of antigen-specific T-cell responses with synthetic peptides--what kind of peptide for which purpose?* **Human Immunology**. 2004;65(5):523–36. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1517245>>. Acesso em: 16 de janeiro de 2014.

LAN, N. T.; YAMAGUCHI, R.; INOMATA, A.; FURUYA, Y.; UCHIDA, K.; SUGANO, S. & TATEYAMA, S. *Comparative analyses of canine distemper viral isolates from clinical cases of canine distemper in vaccinated dogs*. **Veterinary Microbiology**, 2006.115(1-3), 32–42. doi:10.1016/j.vetmic.2006.01.010.

LI PIRA, G.; IVALDI, F.; MORETTI, P.; MANCA, F. *High throughput T epitope mapping and vaccine development. Journal of Biomedicine & Biotechnology*, 2010, 325720. doi:10.1155/2010/325720.

LUNDEGAARD, C.; LUND, O.; NIELSEN, M. *Predictions versus high-throughput experiments in T-cell epitope discovery: competition or synergy? Expert Review Vaccines*, 2012, v. 11 pp. 43–54 <http://dx.doi.org/10.1586/erv.11.160>.

MAES, R. K.; WISE, A. G.; FITZGERALD, S. D.; RAMUDO, A.; KLINE, J.; VILNIS, A. & BENSON, C. *A canine distemper outbreak in Alaska: diagnosis and strain characterization using sequence analysis. Journal of Veterinary Diagnostic Investigation : Official Publication of the American Association of Veterinary Laboratory Diagnosticians, Inc*, 2003,15, 213–220. doi:10.1177/104063870301500302

MARTELLA, V.; BLIXENKRONE-MØLLERB, M.; ELIA, G.; LUCENTEA, M. S.; CIRONEA, F.; DECAROA, N.; NIELSEN, L.; BÁNYAIC, K.; CARMICHAEL, L.E.; BUONAVOGLIA, C. *Lights and shades on an historical vaccine canine distemper virus, the Rockborn strain. Vaccine*. 2011; v. 29(6):1222–7. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21167117>>. Acesso em: 9 de janeiro de 2014.

MELO, A. B. Avaliação da resposta imunológica induzida pela vacina da febre amarela em humanos. 2011. Tese (Doutorado em Biotecnologia). RENORBIO. Recife, 2011.

MOODIE, Z.; PRICE, L.; GOUTTEFANGEAS, C.; MANDER, A.; JANETZKI, S.; LÖWER, M.; WELTERS, M. J. P.; OTTENSMEIER, C.; VAN DER BURG, S. H.; BRITTEN, C. M. *Response definition criteria for ELISPOT assays revisited. Cancer Immunology and Immunotherapy*. 2010; v. 59(10):1489–501. Disponível em: <<http://www.pubmedcentral.nih.gov/article-render.fcgi?artid=2909425&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>>. Acesso em: 9 de janeiro de 2014.

MURPHY, F.G., et al. *Veterinary Virology*. San Diego– California, 3ª Edição. Editora A. Press, 1999. pp 411-428.).

NEGRÃO, F.J.; WOSIACKI, S.H.; ALFIERI, A.A.; ALFIERI, A.F. Perfil de restrição de um fragmento do gene da hemaglutinina amplificado pela RT-PCR a partir de estirpes vacinais e selvagens do vírus da cinomose canina. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*, 2006, v. 58, n.6, pp. 1099-1106. ISSN 0102-0935.

NELSON, R. W.; COUTO, C. G. *Medicina interna de pequenos animais*. Rio de Janeiro, 3ª edição, Editora Elsevier, 2001, pp 1235-1237.

PATEL, J.R.; HELDENS, J.G.M.; BAKONYI, T.; RUSVAI, M. *Important mammalian veterinary viral immunodiseases and their control*. **Vaccine**, 2012, v.30(10):1767–81. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22261411>>. Acesso em: 9 de janeiro de 2014.

QUINLEY, N.; MAZET, J. A K.; RIVERA, R.; SCHMITT, T. L.; DOLD, C.; MCBAIN, J.; YOCHER, P. K. *Serologic response of harbor seals (*Phoca vitulina*) to vaccination with a recombinant canine distemper vaccine*. **Journal of Wildlife Diseases**, 2013, v. 49(3), 579–86. doi:10.7589/2012-06-156.

QUINN, P. J.; MARKEY, B. K; CARTER, M.E.; DONNELLY, W.C.J; LEONARD, F. C.; MAGUIRE, D.. **Microbiologia Veterinária e Doenças Infecciosas**. Porto Alegre, RS, Editora Artmed, 2005. pp 375-379.

R&D SYSTEM. McKinley Place NE ,614, Minneapolis. 2010. United States of America. **Manual de instruções**.

RIKULA, U.; NUOTIO, L.; SIHVONEN, L., *Vaccine coverage, herd immunity and occurrence of canine distemper from 1990-1996 in Finland*. **Vaccine**. 2007;25(47):7994–8. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17928108>>. Acesso em: 9 de janeiro de 2014.

SCHEIBENBOGEN , C.; ROMERO, P.; RIVOLTINI , L.; HERR, W.; SCHMITTEL , A.; CEROTTINI , J-C.; WOELFEL , T.; EGGERMONT, A. M.M.; KEILHOLZ, U. *Quantitation of antigen-reactive T cells in peripheral blood by IFN- γ gamma-ELISPOT assay and chromium-release assay: a four-centre comparative trial*. **Journal of Immunological Methods**. 2000, v. 244(1-2):81–9. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11033021>>. Acesso em: 9 de janeiro de 2014.

SEKI, F.; ONO, N.; YAMAGUCHI, R. & YANAGI, Y. *Efficient Isolation of Wild Strains of Canine Distemper Virus in Vero Cells Expressing Canine SLAM (CD150) and Their Adaptability to Marmoset B95a Cells*. **Journal of Virology**, 2003 v.77(18), 9943–9950. doi:10.1128/JVI.77.18.9943.

SHERDING, R. G., BICHARD, S. J. **Manual Saunders. Clínica de Pequenos Animais**. São Paulo, Editora Roca, 2003. P. 120-123.

SILVA M.C.; FIGHERA R.A.; BRUM J.S.; GRAÇA, D.L.; KOMMERS G.D.; IRIGOYEN L.F.; BARROS, C.S.L. Aspectos clínicos patológicos de 620 casos neurológicos de cinomose em cães. **Pesquisa Veterinária Brasileira**. Rio de Janeiro, 2007, v. 27, n. 5.

SUGAI, A SUGAI, A; KOORIYAMA, T.; SATO, H.; YONEDA, M.; KAI, C. *Epitope mapping*

of canine distemper virus phosphoprotein by monoclonal antibodies. *Microbiology and Immunology*, 2009, v. 53(12), 667–674. doi:10.1111/j.1348-0421.2009.00176.x

SYKES, J. E. Immunodeficiencies caused by infectious diseases. *The Veterinary Clinics of North America Small Animal Practice*, 2010, v. 40(3), 409–423. doi:10.1016/j.cvsm.2010.01.006.

TATSUO, H.; Y. YANAGI. The morbillivirus receptor SLAM (CD150). *Microbiology and Immunology*, 2002 v. 46(3): 135-42.

TIPOLD, A., VANDEVELDE, M., JAGGY, A. 1992. Neurological manifestations of canine distemper virus infection. *Journal Small Animal Practice*, v. 33, p. 466-470.

VON MESSLING, V.; ZIMMER, G.; HERRLER, G.; HAAS, L.; CATTANEO, R. The hemagglutinin of canine distemper virus determines tropism and cytopathogenicity. *Journal of Virology*, 2010, v. 75(14), 6418–6427. doi:10.1128/JVI.75.14.6418

WANG, Y.-X.; ZHOU, Y.-J.; LI, G.-X.; ZHANG, S.-R.; JIANG, Y.-F.; XU, A.-T.; TONG, G.-Z. (2011). Identification of immunodominant T-cell epitopes in membrane protein of highly pathogenic porcine reproductive and respiratory syndrome virus. *Virus Research*, v.158(1-2), 108–115. doi:10.1016/j.virusres.2011.03.018.

WENZLOW, N.; PLATTET, P.; WITTEK, R.; ZURBRIGGEN, A.; GRÖNE, A.. Immunohistochemical demonstration of the putative canine distemper virus receptor CD150 in dogs with and without distemper. *Veterinary Pathology*, 2007, v. 44(6), 943–8. doi:10.1354/vp.44-6-943.

YOSHIDA, E.; SHIN, Y. S.; IWATSUKI, K.; GEMMA, T.; MIYASHITA, N.; TOMONAGA, K.; KAI, C. Epitopes and nuclear localization analyses of canine distemper virus nucleocapsid protein by expression of its deletion mutants. *Veterinary Microbiology*, 1999, v. 66(4), 313–320.

ZIPPERLE, L.; LANGEDIJK, J. P. M.; ORVELL, C.; VANDEVELDE, M.; ZURBRIGGEN, A.; PLATTET, P. Identification of key residues in virulent canine distemper virus hemagglutinin that control CD150/SLAM-binding activity. *Journal of Virology*, 2010, v. 84(18), 9618–24. doi:10.1128/JVI.01077-10.

5 ARTIGO

MAPEAMENTO DE EPÍTOPOS REATIVOS DA PROTEÍNA H DO VÍRUS DA CINOMOSE CANINA



Artigo submetido à revista *Archives of Virology*, ISSN 0304-8608, fator de impacto 2.030 em 2012 e qualis B1 na Área de Medicina Veterinária.

Mapeamento de epítomos da proteína H do vírus da cinomose canina

Camila Pereira dos Santos¹, Rita de Cássia Carvalho Maia¹, Laura Helena Vega Gonzales Gil², Ernesto Torres de Azevedo Marques Júnior², Andrea Barbosa de Melo², Clintiano da Silva Curvêlo², Verônica Gomes da Silva²

¹Departamento de Medicina Veterinária, Universidade Federal Rural de Pernambuco, Rua Dom Manoel de Medeiros, s/n, Dois Irmãos - CEP: 52171-900 - Recife/PE, Brasil

²Laboratório de Virologia e Terapia Experimental, Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães, Av. Professor Moraes Rego, s/n - Campus da UFPE, Cidade Universitária - CEP: 50.670-420 - Recife/PE, Brasil

+55 81 3320 6402

camilapereira.mrc@gmail.com

Resumo A cinomose canina é uma infecção de distribuição mundial causada pelo vírus da cinomose canina (CDV). A ocorrência do vírus já foi relatada em 12 famílias de mamíferos, principalmente nos da ordem Carnivora, e entre eles, a doença resultante está bem descrita nos caninos domésticos. Nesta espécie, a vacinação representa a melhor forma de controlá-la. Vislumbra-se que as vacinas disponíveis no mercado atualmente, recombinantes ou contendo vírus vivos atenuados, serão substituídas por vacinas baseadas em epítomos antigênicos específicos. Desta forma, visando oferecer subsídios para o desenvolvimento de novas vacinas, o mapeamento de epítomos reativos para as células T do CDV foi realizado através de ensaios de Enzyme-Linked immunospot (ELISPOT) para IFN- γ utilizando-se 119 peptídeos sintéticos da hemaglutinina viral agrupados em 22 pools em formato de matrizes para testar a resposta imune de 32 animais vacinados contra cinomose canina. De acordo com os critérios estabelecidos para identificação de pools reativos, 26 animais apresentaram pelo menos um pool reativo, um pool não foi reativo em nenhum ensaio e seis pools de peptídeos foram mais frequentes. O cruzamento entre os pools reativos mais frequentes revelou nove peptídeos, os quais concluímos que devem ser considerados potenciais candidatos a epítomos para as células T do CDV e que, portanto, poderão ser utilizados na formulação de uma nova vacina anti-cinomose.

Palavras-chave: peptídeos, vacina, hemaglutinina, resposta imune, ELISPOT, IFN- γ

Introdução

A cinomose é uma doença causada pelo *vírus da cinomose canina* (CDV), um morbilivírus da família *Paramyxoviridae* [1-3]. Este agente possui genoma de RNA de fita simples negativa não segmentada, que codifica seis proteínas estruturais: “N” (nucleoproteína), “O” (fosfoproteína),

“M” (protetora da matriz) e “L” (grande proteína), “H” (hemaglutinina) e “F” (fusão) [4-8].

Considerada uma das principais infecções virais em cães e em outros carnívoros em todo o mundo, é a segunda doença infecciosa com maior relevância entre caninos domésticos, devido às suas altas taxas de morbidade e mortalidade [9,10].

A vacinação continua a ser a principal medida contra a afecção [11]. No entanto, falhas vacinais não são incomuns, estando relacionadas tanto à vacina como ao hospedeiro. Por outro lado, é assumido que, ocasionalmente, as vacinas em utilização não protegem adequadamente contra infecções de cepas de campo mesmo quando aplicadas corretamente [12].

Uma possível razão para o insucesso da vacinação pode estar no fato de haver variação das proteínas H entre as estirpes de CDV utilizadas em vacinas e as das estirpes de tipo selvagem correntemente circulantes [13]. A proteína H é uma glicoproteína chave para o CDV, uma vez que este se liga as células do hospedeiro através de sua ligação à molécula de sinalização ativação de linfócitos (SLAM ou CD150) e, logo, uma resposta imune adequada do hospedeiro contra ela, pode prevenir uma infecção por este vírus [3].

Sabe-se que existe um interesse crescente em vacinações baseadas em peptídeos individualizados já que epítomos cuidadosamente selecionados podem ser utilizados para induzir uma resposta imunitária mais potente e eficaz contra agentes infecciosos [14,15]. O primeiro passo para a criação destas vacinas é a realização de ensaios de células T que determinem se os peptídeos derivados da proteína terapêutica contêm sequências com uma propensão para estimular uma resposta de anticorpo [16]. Uma forte resposta imune mediada pelas células T específicas de CDV causa a eliminação viral em cães convalescentes [17].

Desta forma, realizamos o mapeamento de epítomos reativos à proteína H do CDV que são reconhecidos pelos linfócitos T CD4+ e T CD8+, através da técnica de ELISPOT (Enzyme-linked immunosorbent spot), com o intuito de oferecer subsídios fundamentais para o desenvolvimento de uma vacina mais segura e eficiente contra este vírus.

Materiais e Métodos

População de estudo

A população do estudo foi constituída por 32 cães de todas as faixas etárias e raças que não atenderam aos critérios de exclusão, vacinados pelo menos uma vez contra cinomose e domiciliados na Região Metropolitana do Recife, Pernambuco, Brasil.

Critérios de exclusão de amostra

Foram excluídos do estudo, os animais que se encontraram em pelo menos uma das seguintes situações:

- gestantes;
- indicação de soro anti-cinomose;

- portadores de câncer ou doenças autoimunes ou desnutrição grave ou imunodeficiência;
- sob o uso de corticóide ou imunossupressores.

Protocolo de Separação de Células Sanguíneas Mononucleares Periféricas (PBMCs)

A separação das PBMCs foi feita através de gradiente de centrifugação com Ficoll-Hypaque (Ficoll Paque PLUS - GE Healthcare Life Sciences) no Laboratório de Virologia e Terapia Experimental (Lavite) do Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães (CPqAM), Campus da UFPE – Recife, Pernambuco, Brasil.

As amostras sanguíneas foram diluídas em tampão fosfato salino (PBS), pH 7,2, estéril, na proporção de 1:1. Em seguida, o sangue diluído foi transferido cuidadosamente para um tubo contendo Ficoll na mesma proporção do volume inicial de sangue, sem que houvesse mistura entre eles e foram centrifugados por 30 minutos, a 2.000 rotações por minuto (rpm).

Terminada a centrifugação, aspirou-se o anel de células mononucleares e transferindo-se para outro tubo, adicionou-se a este, um volume de PBS necessário para completar 15mL. Foi realizada então, uma nova centrifugação, por 5 min a 1.500 rpm.

Desprezou-se o sobrenadante formado e adicionou-se 1 mL de tampão ACK para lisar células vermelhas incubando-se por 3 minutos. Durante este tempo, a cada minuto, homogeneizava-se o tubo. Depois da incubação, completou-se o volume para 10 mL, com 9 mL de meio Roswell Park Memorial Institute (RPMI) e realizou-s outra centrifugação por 5 min a 1500 rpm.

O sobrenadante resultante foi desprezado e adicionou-se 1 mL de meio de cultura livre de soro (SFM), suspendendo o pellet. Uma alíquota de 100µL desta amostra foi diluída em 900 µL de SFM para quantificação e análise de sua viabilidade através do ViCell® (Analisador de Viabilidade Celular, Biosystems™, BD). Mais 4 mL de SFM foi adicionado ao pellet e de acordo com a viabilidade celular, ajustou-se a concentração de células para 2×10^6 /poço.

Peptídeos sintéticos

Foram sintetizados 119 peptídeos (GenScript® USA Inc.) a partir da sequência da proteína H do *vírus da cinomose canina* (Figura 1).

```

1 mlpqqdkvga fykdnarans tklslvtegh ggrpppyllf vllillvgil allaitgvrf
61 hqvstsnmef srllkedmek seavhhqvid vltplfkiig deiglrlpqq lneikqfilq
121 ktnffnpre fdfrdlhwi nppstvkvnf tnycesigir kaiasaanpi llsalsggrs
181 difpphrscg attsvgkvfp lsvslmsli srtsevinml taisdgvvgk tyllvpddie
241 refdtreirv feigfikrwl ndmllqttn ymvlpknska kvctiavgel tlaslvees
301 tvllyhdssg sqdgilvvtl gifwatpmdh ieevipvahp smkkihithn rgfikdsiat
361 wmvpalasek qeeqkgcles acqrktypmc ngaswepfgg rqlpsygrlt lpldasvdlq
421 lnisftygpv ilngdgmddy espllsgwl tippkdgts glinkagrgd qftvlpvlt
481 fapressgnc ylpqtsqii drdvliesni vvlptqsiry viatydisrs dhaivyyvyd
541 pirtisytlp frlttkgrpd flriecfvwd dnlwchqfyr feadianstt svenlvirif
601 scnr

```

Fig.1. jpeg Sequência em código de uma única letra da proteína de H do CDV.

Fonte: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/protein/BAF03641.1>

Estes foram arranjados em uma extensão de 15 mers com uma sobreposição de 11 aminoácidos, o que representa um bom estímulo para as células T CD4+ e TCD8+ considerando que o núcleo (core) de aminoácidos de cada peptídeo é suficiente para preencher as fendas de MHC de classe I (8-9-mers) e II (11-15-mers) [17].

Os peptídeos foram diluídos em dimetilsulfóxido a 10% para uma concentração final de 10µL/mL.

Em seguida estes peptídeos foram agrupados em pools e combinados em matrizes (Quadro 1).

Pool	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
12	1 – 15	6 – 20	11 – 25	16 – 30	21 – 35	26 – 40	31 – 45	36 – 50	41 – 55	46 – 60	51 – 65
13	56 – 70	61 – 75	66 – 80	71 – 85	76 – 90	81 – 95	86 – 100	91 – 105	96 – 110	101 – 115	106 – 120
14	111 – 125	116 – 130	121 – 135	126 – 140	131 – 145	136 – 150	141 – 160	146 – 160	151 – 165	156 – 170	161 – 175
15	166 – 180	171 – 185	176 – 190	181 – 195	186 – 200	191 – 205	196 – 210	201 – 215	206 – 220	211 – 225	216 – 230
16	221 – 235	226 – 240	231 – 245	236 – 250	241 – 255	246 – 260	251 – 265	256 – 270	261 – 275	266 – 280	271 – 285
17	276 – 290	281 – 295	286 – 300	291 – 305	296 – 310	301 – 315	306 – 320	311 – 325	316 – 330	321 – 335	326 – 340
18	331 – 345	336 – 350	341 – 355	346 – 360	351 – 365	356 – 370	361 – 375	366 – 380	371 – 385	376 – 390	381 – 395
19	386 – 400	391 – 405	396 – 410	401 – 415	406 – 420	411 – 425	416 – 430	421 – 435	426 – 440	431 – 445	436 – 450
20	441 – 455	446 – 460	451 – 465	456 – 470	461 – 475	466 – 480	471 – 485	476 – 490	481 – 495	486 – 500	491 – 505
21	496 – 510	501 – 515	506 – 520	511 – 525	516 – 530	521 – 535	526 – 540	531 – 545	536 – 550	541 – 555	546 – 560
22	551 – 565	556 – 570	561 – 575	566 – 580	571 – 585	576 – 590	581 – 595	586 – 600	591 – 604		

Quadro 1. Matriz dos pools de peptídeos da proteína H do vírus da cinomose por peptídeo individual (15 aminoácidos com 11 sobreposições).

ELISPOT para IFN- γ

Os ensaios ELISPOT para IFN- γ foram realizados utilizando-se o kit Canine IFN-gamma ELISpot SixPak, R&D Systems, Inc.

Todos os poços de cada placa foram preenchidos com 200µL de meio de cultura RPMI estéril e estas foram incubadas durante aproximadamente 20 minutos à temperatura ambiente e protegidas da luz.

Em seguida, aspirou-se o meio de cultura a partir das cavidades e adicionaram-se 100µL de RPMI contendo um pool de peptídeos em cada poço ou 100µL de células apropriadas ou controles a cada poço (Quadro 2).

O controle positivo foi realizado com phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA) + ionomicina. Como controle negativo, apenas as células de cada cão respectivamente, foram adicionadas.

PLACA ELISPOT												
Pool 1	Pool 1	Pool 2	Pool 2	Pool 3	Pool 3	Pool 4	Pool 4	Pool 5	Pool 5	Pool 6	Pool 6	
Pool 7	Pool 7	Pool 8	Pool 8	Pool 9	Pool 9	Pool 10	Pool 10	Pool 11	Pool 11	Pool 12	Pool 12	
Pool 13	Pool 13	Pool 14	Pool 14	Pool 15	Pool 15	Pool 16	Pool 16	Pool 17	Pool 17	Pool 18	Pool 18	
Pool 19	Pool 19	Pool 20	Pool 20	Pool 21	Pool 21	Pool 22	Pool 22	Positivo	Negativo	Negativo	Negativo	Cão 1
Pool 1	Pool 1	Pool 2	Pool 2	Pool 3	Pool 3	Pool 4	Pool 4	Pool 5	Pool 5	Pool 6	Pool 6	
Pool 7	Pool 7	Pool 8	Pool 8	Pool 9	Pool 9	Pool 10	Pool 10	Pool 11	Pool 11	Pool 12	Pool 12	
Pool 13	Pool 13	Pool 14	Pool 14	Pool 15	Pool 15	Pool 16	Pool 16	Pool 17	Pool 17	Pool 18	Pool 18	
Pool 19	Pool 19	Pool 20	Pool 20	Pool 21	Pool 21	Pool 22	Pool 22	Positivo	Negativo	Negativo	Negativo	Cão 2

Quadro 2. Modelo adotado para realização dos ensaios ELISPOT utilizando pools de peptídeos sintéticos para a proteína H do vírus da cinomose canina.

As placas foram incubadas em uma incubadora de CO₂ umidificado a 37 °C, overnight. Cada cavidade foi aspirada e procedeu-se a lavagem da placa enchendo cada poço com o tampão de lavagem (250 - 300µL) por quatro vezes. Após a última lavagem, removeu-se qualquer tampão de lavagem residual por inversão da placa contra toalhas de papel limpas.

Adicionaram-se 100µL de anticorpo de detecção diluído em cada poço e incubou-se cada placa a 2° C - 8° C, overnight. A lavagem foi repetida conforme descrição acima e adicionaram-se 100µL de estreptavidina-AP diluído a cada poço, incubando-se durante 2 horas à temperatura ambiente. Procedeu-se outra lavagem, igual às anteriores. Distribuiu-se 100 µL de BCIP / NBT cromógeno em cada poço e incubou-se durante 1 hora à temperatura ambiente, protegendo cada placa da luz.

A solução de cromógeno foi descartada das microplacas e estas foram lavadas com água destilada. Em seguida, foram invertidas e batidas para remover o excesso de água.

Removeram-se os drenos subterrâneos de plástico flexível, a partir do fundo da placas, limpando-se a parte inferior destas completamente com toalhas de papel e secando-as completamente a 37° C por 15 - 30 minutos.

Por fim, a leitura das placas foi realizada no Immunospot Series 3B Analyzer ELISPOT (Cellular Technologies Ltd, Shaker Heights, OH) com a ajuda do software Immunospot versão 3.0 (Cellular Technologies Ltd).

Sorologia

A sorologia para detecção do nível de anticorpos produzidos nos animais do estudo foi realizado por imunoensaio cromatográfico através do teste comercial Anigen Rapid CDV Ab Test®, Anigen, Animal Genetics, Inc., que detecta qualitativamente e quantitativamente o anticorpo IgG do *vírus da cinomose canina* em sangue, soro e plasma.

Para todos os animais, utilizou-se amostra de sangue total e procedeu-se de acordo com o manual de instruções do produto. A interpretação dos resultados também foi realizada em conformidade com as instruções do fabricante e os títulos foram classificados como baixo (1:16),

médio (1:64) ou alto (1:128).

Resultados

Respostas de células T

Os critérios para identificação dos pools de peptídeos reativos se deu através da combinação das seguintes equações:

- Média no número de spots (peptídeos) – 2 x o desvio padrão > média do número de spots do controle negativo;
- Média no nº de spots > média do número de spots do controle negativo + 2x desvio-padrão;
- Média do número de spots - média do número de spots do controle negativo > 10;

Seis animais foram excluídos deste estudo por não apresentarem reatividade para nenhum dos pools. Desta forma, oito animais apresentaram um pool reativo e 18 indivíduos foram reativos para mais de dois pools, sendo que um animal reagiu para 17 dos 22 pools analisados.

A identificação dos pools reativos obedecendo aos critérios citados possibilitou verificar a frequência com que estes apareceram na população estudada e que um pool (11) não foi reativo em nenhum ensaio (Tabela 1).

Tabela 1. Frequência dos pools que apresentaram reatividade na população estudada.

Pool	Nº de Animais Positivos	Frequência (%)
2, 10	1	3,85
8, 12, 19	2	7,69
6, 20	3	11,54
17,18	4	15,38
1, 7, 14, 16	5	19,23
3, 9, 15	6	23,08
5, 13	7	26,92
2, 21	8	30,77
22	10	38,46
4	13	50

Estabeleceu-se o ponto de corte de 25%, a fim de identificar os pools mais frequentes neste estudo. Seis pools foram identificados: 2, 4, 5, 13, 21 e 22. O cruzamento destes revelou

nove peptídeos (13, 15, 16, 101, 103, 104, 112, 114, 115) que foram considerados potenciais candidatos a epítomos de células T (Quadro 3).

Pool	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
12	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
13	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22
14	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33
15	34	35	36	37	38	39	40	41	42	43	44
16	45	46	47	48	49	50	51	52	53	54	55
17	56	57	58	59	60	61	62	63	64	65	66
18	67	68	69	70	71	72	73	74	75	76	77
19	78	79	80	81	82	83	84	85	86	87	88
20	89	90	91	92	93	94	95	96	97	98	99
21	100	101	102	103	104	105	106	107	108	109	110
22	111	112	113	114	115	116	117	118	119		

Quadro 3. Pools mais reativos após análises estatísticas (hachurado) e peptídeos considerados potenciais candidatos a epítomos de células T (cinza).

As sequências destes peptídeos podem ser visualizadas na tabela a seguir (Tabela 2):

Tabela 2. Sequência de peptídeos da proteína H do vírus da cinomose considerados potenciais candidatos a epítomos para células T através de ELISPOT para IFN- γ .

Peptídeo	Sequência														
13	H	Q	V	S	T	S	N	M	E	F	S	R	L	L	K
15	S	R	L	L	K	E	D	M	E	K	S	E	A	V	H
16	E	D	M	E	K	S	E	A	V	H	H	Q	V	I	D
101	D	R	D	V	L	I	E	S	N	I	V	V	L	P	T
103	V	V	L	P	T	Q	S	I	R	Y	V	I	A	T	Y
104	Q	S	I	R	Y	V	I	A	T	Y	D	I	S	R	S
112	K	G	R	P	D	F	L	R	I	E	C	F	V	W	D
114	C	F	V	W	D	D	N	L	W	C	H	Q	F	Y	R
115	D	N	L	W	C	H	Q	F	Y	R	F	E	A	D	I

Resposta Imune Humoral

Quanto ao perfil sorológico dos animais participantes do ensaio ELISPOT, 84,4% (27/32) dos cães exibiram titulação média de anticorpos (1:64 – 1:16), 9,36% (3/32) exibiram titulação baixa (1:16), 3,12% (1/32) titulação alta (1:64) e 3,12% (1/32) não apresentaram anticorpos tituláveis no teste.

Discussão

Embora as cepas vacinais do CDV não mudaram nos últimos 60 anos, há potencial para novas variantes antigênicas do vírus surgirem em torno do mundo [18]. Sendo assim, devido à distribuição global da infecção e a suscetibilidade de uma grande variedade de espécies, exigem-se novas vacinas seguras e eficazes para a proteção e a erradicação deste vírus [19].

O conhecimento de antígenos e epítomos específicos tem sido utilizado para orientar a concepção de vacinas que consistem apenas nos antígenos relevantes [15]. Portanto, o mapeamento de epítomos para células T em antígenos proteicos derivados do *vírus da cinomose canina*, que permitam a identificação de sequências de aminoácidos que são reconhecidos por células T CD4 + ou T CD8 +, podem fornecer orientações para a construção de uma nova vacina [20,21].

Estudos prévios para a identificação de epítomos relevantes deste agente já foram feitos para a proteína do nucleocapsídeo, fosfoproteína e proteína de fusão [22-24]. O fator de ligação viral, a proteína H, foi escolhido para ser mapeada, com base em estudos que demonstraram que este polipeptídeo desempenha um papel importante na estimulação da imunidade celular, uma vez que controla a especificidade do hospedeiro e o tropismo celular e induz a maioria dos anticorpos neutralizantes de CDV [1,18].

Várias ferramentas de predição de epítomos estão disponíveis. Uma delas, o ensaio ELISPOT, baseia-se no princípio do ELISA para detecção de secreção de citocinas induzidas por antígenos presas por um anticorpo imobilizado e visualizadas por um segundo anticorpo acoplado a enzima e tem como vantagens sobre os ensaios tradicionais (como a citometria de fluxo), o fato de ser realizado em menos tempo, ser mais barato e sensível e quantificar diretamente o número de células efectoras [20, 25,26].

O ensaio ELISPOT para IFN- γ detecta a liberação de IFN- γ em resposta ao antígeno no nível de uma única célula, permitindo desse modo, o cálculo direto das frequências de ativação das células T [27,28]. O IFN- γ não é expresso em leucócitos do sangue periférico de cães com cinomose, portanto, ao utilizar esta técnica, nossos resultados expressam com fidelidade a quantificação da ativação de células T que reconheceram os peptídeos imunogênicos [29].

Os animais deste estudo foram imunizados pelo menos uma vez na vida e há pelo menos um mês da coleta, com vacinas contendo vírus vivos modificados (Nobivac[®] Canine, MSD Saúde Animal; Vencamax[®], Laboratórios Vencofarma do Brasil, LTDA; Vanguard Plus[®], Laboratórios Pfizer Ltda; Bio Max[®], Lema Injex Biologic) ou recombinante (Recombiteck[®] C6/CV, Merial Inn) contra o *vírus da cinomose canina*.

O intervalo de tempo entre a vacinação e a obtenção de sangue periférico como fonte de PBMC para ensaios de proliferação in vitro, é crucial para a detecção de atividade de células T, possivelmente porque quantidades muito pequenas de vírus vivos presentes na vacina requerem este tempo para replicar em níveis suficientes para estimulação de uma resposta imune [24]. Desta forma, uma resposta imune prévia conhecida frente ao vírus é interessante para ensaios ELISPOT IFN- γ .

Neste trabalho, foi realizada a titulação de anticorpos IgG contra o CDV, a fim de asse-

gurar a presença de resposta imune das células B frente aos peptídeos sintetizados. Segundo Monti [30], a maioria dos autores determina 1:100 como título satisfatório para proteção contra a infecção. No nosso estudo, apenas 1 animal apresentou títulos acima de 1:100 (1:128). Ainda assim, 25 animais que apresentaram títulos abaixo de 1:100 e o único animal imunizado um mês antes da coleta e que não exibiu título vacinal, apresentaram resposta a pelo menos um pool de peptídeos, evidenciando mais uma vez a importância da resposta imunitária celular na cinomose na ausência de resposta humoral mediada pelos anticorpos mensuráveis [8].

Dos animais (6) que não apresentaram reatividade a algum pool e que foram excluídos do estudo, todos exibiram título médio (entre 1:16 a 1:64) de anticorpo vacinal, sendo fatores que podem ser apontados para tal, a presença de uma elevada resposta inespecífica (background), baixa viabilidade celular ou ainda sem resposta específica [31].

Neste estudo, seis pools de peptídeos foram reconhecidos em culturas contendo tanto CD4+ quanto CD8+, pode sugerir que estes epítomos são reconhecidos por ambos os subconjuntos de células T, assim como DEAN [20] demonstrou na realização de mapeamento epítomos para o *vírus da imunodeficiência felina* (FIV). Seria interessante, num outro momento, determinar para qual tipo de célula T os epítomos aqui sugeridos são mais imunogênicos. Além disto, como perspectiva, sugere-se que os nove peptídeos considerados candidatos potenciais a epítomos de células T, sejam testados individualmente.

Conclusão

O mapeamento de epítomos reativos para as células T CD4+ e TCD8+ através da técnica ELISPOT para IFN- γ , possibilitou a identificação de nove peptídeos da proteína H do CDV, que foram considerados de relevância imunogênica e, portanto, potenciais candidatos para a produção de novas vacinas baseadas em epítomos antigênicos específicos contra a cinomose canina.

Agradecimentos

Agradecemos a Fundação de Amparo a Ciência e Tecnologia do Estado de Pernambuco (FACEPE) pelo apoio financeiro.

Os autores declaram não haver conflitos de interesse.

Referências

- [1] Von Messling, V., Zimmer, G., Herrler, G., Haas, L., & Cattaneo, R. (2001). The hemagglutinin of canine distemper virus determines tropism and cytopathogenicity. *J. Virol.*, 75(14), 6418–6427. doi:10.1128/JVI.75.14.6418
- [2] Greene, C.E (2006). *Infectious Disease of the Dog and Cat*. St. Louis, Missouri.
- [3] Martella, V., Blixenkrone-Møller, M., Elia, G., Lucente, M. S., Cirone, F., Decaro, N., Buonavoglia C. ((2011). Lights and shades on an historical vaccine canine distemper virus, the

Rockborn strain. *Vaccine*, 29(6), 1222–7. doi:10.1016/j.vaccine.2010.12.001

[4] Diallo, A (1990). Morbillivirus group: genome organization and proteins. *Veterinary Microbiology*. Amsterdã.

[5] Curran, M. D., Clarke, D. K., & Rima, B. K. (1991). The nucleotide sequence of the gene encoding the attachment protein H of canine distemper virus The sequence of the H gene and flanking sequences in the F and L genes of canine distemper virus (CDV) sites in the extracellular domain and , like all other, *J. Gen. Virol.* 443–447.

[6] Tatsuo, H. and Y. Yanagi. The morbillivirus receptor SLAM (CD150). *Microb and Immuno*, 2002 v. 46(3): 135-42.

[7] Hirsh, D.C.; Zee, Y. C.(2003). *Microbiologia Veterinária*. Rio de Janeiro, RJ.

[8] Carvalho OV, Botelho CV, Ferreira CGT, et al (2014). Immunopathogenic and neurological mechanisms of canine distemper virus. *Adv. Virol.* 2012;2012:163860. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3501799&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>. Accessed January 9, 2014.

[9] Deen, S.L.; Spelman, L.H.; Yates, R.A.(2000). Canine distemper in terrestrial carnivores: a review. *J. Zoo and Wild Med*, v.31, p. 441-451.

[10] Negrao, F.J.; Wosiacki, S.H.; Alfieri, A.A.; Alfieri, A.F (2006) Perfil de restrição de um fragmento do gene da hemaglutinina amplificado pela RT-PCR a partir de estirpes vacinais e selvagens do vírus da cinomose canina. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*, vol.58, n.6, pp. 1099-1106. ISSN 0102-0935.

[11] Rikula U, Nuotio L, Sihvonon L (2007). Vaccine coverage, herd immunity and occurrence of canine distemper from 1990-1996 in Finland. *Vaccine.*;25(47):7994–8. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17928108>. Accessed January 9, 2014.

[12] Haas L, Martens W, Greiser-Wilke I, et al (1997). Analysis of the haemagglutinin gene of current wild-type canine distemper virus isolates from Germany. *Virus Res.*;48(2):165–171.

[13] Nielsen L, Jensen TH, Kristensen B, et al (2012). DNA vaccines encoding proteins from wild-type and attenuated canine distemper virus protect equally well against wild-type virus challenge. *Arch. Virol.* ;157(10):1887–1896. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22714870>. Accessed December 26, 2013.

[14] Hoffmeister B (2003). Mapping T cell epitopes by flow cytometry. *Methods.*;29(3):270–281. Available at: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1046202302003493>. Accessed January 16, 2014.

[15] Lundegaard, C, O. Lund, M. Nielsen (2012). Predictions versus high-throughput experiments in T-cell epitope discovery: competition or synergy? *Expert Rev Vaccines*, 11, pp. 43–54 <http://dx.doi.org/10.1586/erv.11.160>;

[16] De Groot AS, Scott DW (2007). Immunogenicity of protein therapeutics. *Trends Immunol.*;28(11):482–90. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17964218>. Accessed January 16, 2014.

[17] Kiecker F, Streitz M, Ay B, et al (2004). Analysis of antigen-specific T-cell responses with synthetic peptides--what kind of peptide for which purpose? *Hum. Immunol.*;65(5):523–36. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15172453>. Accessed January 16, 2014.

[18] Kapil S, Yeary TJ. (2011) Canine distemper spillover in domestic dogs from urban wildlife. *Vet. Clin. North Am. Small Anim. Pract.*;41(6):1069–86. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22041204>. Accessed January 9, 2014.

[19] Patel JR, Heldens JGM, Bakonyi T, Rusvai M (2012). Important mammalian veterinary viral immunodiseases and their control. *Vaccine.*;30(10):1767–81. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22261411>. Accessed January 9, 2014.

- [20] Dean G a, LaVoy A, Burkhard MJ (2004). Peptide mapping of feline immunodeficiency virus by IFN-gamma ELISPOT. *Vet. Immunol. Immunopathol.*;100(1-2):49–59. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15182995>. Accessed January 15, 2014.
- [21] Li Pira, G.; Ivaldi, F.; Moretti, P.; Manca, F(2010). High throughput T epitope mapping and vaccine development. *J. Biomed & Biotech*, 325720. doi:10.1155/2010/325720.
- [22] Yoshida E, Shin YS, Iwatsuki K, et al (1999). Epitopes and nuclear localization analyses of canine distemper virus nucleocapsid protein by expression of its deletion mutants. *Vet. Microbiol.*; 66(4):313–320.
- [23] Sugai a, Kooriyama T, Sato H, Yoneda M, Kai C. (2009). Epitope mapping of canine distemper virus phosphoprotein by monoclonal antibodies. *Microbiol Immunol.* 53(12):667–674. Available at: <http://www3.interscience.wiley.com/journal/122602466/abstract?CRETRY=1&SRETRY=0>
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=19954454. Accessed December 26, 2013.
- [24] Ghosh, S., Walker, J., Jackson, D. C., & Technology, V. (2001). Identification of canine helper T-cell epitopes from the fusion protein of canine distemper virus, *Immuno*; 58–66.
- [25] Letsch A, Scheibenbogen C (2003). Quantification and characterization of specific T-cells by antigen-specific cytokine production using ELISPOT assay or intracellular cytokine staining. *Methods.*;31(2):143–149. Available at: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1046202303001245>. Accessed January 10, 2014.
- [26] Scheibenbogen C, Romero P, Rivoltini L, et al (2000). Quantitation of antigen-reactive T cells in peripheral blood by IFN- γ -ELISPOT assay and chromium-release assay: a four-centre comparative trial. *J. Immunol. Methods.*;244(1-2):81–9. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11033021>.
- [27] Schmittel a, Keilholz U, Scheibenbogen C.(1997). Evaluation of the interferon-gamma ELISPOT-assay for quantification of peptide specific T lymphocytes from peripheral blood. *J. Immunol. Methods.*;210(2):167–74. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9520299>.
- [28] Moodie Z, Price L, Gouttefangeas C, et al (2010). Response definition criteria for ELISPOT assays revisited. *Cancer Immunol. Immunother.*;59(10):1489–501. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2909425&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>. Accessed January 9, 2014.
- [29] Beineke a, Puff C, Seehusen F, Baumgärtner W(2009). Pathogenesis and immunopathology of systemic and nervous canine distemper. *Vet. Immunol. Immunopathol.*;127(1-2):1–18. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19019458>. Accessed December 26, 2013.
- [30] Monti, F. S.(2004). Anticorpos contra o vírus da cinomose em cães vacinados em diferentes estabelecimentos da área urbana do município de Viçosa/MG. Dissertação Universidade Federal de Viçosa.
- [31] Souza, J. R (2011). Mapeamento de epítomos reativos para as células T das proteínas não estruturais NS1 e NS3 do vírus dengue 3. Tese, Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães.

6 CONCLUSÕES

- A coorte de cães vacinados estudada apresentou média de produção de anticorpos abaixo do nível protetor contra a infecção;
- 26 animais apresentaram resposta de células T a pelo menos um *pool* de peptídeos através do mapeamento de epítomos reativos para as células T CD4+ e T CD8+ da proteína H do vírus da cinomose pela técnica de ELISPOT para IFN- γ ;
- A validação dos resultados deste ensaio revelou nove peptídeos, os quais devem ser considerados como epítomos candidatos para utilização em uma nova vacina de DNA anti-cinomose;

APÊNDICE A –TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Nome da Pesquisa: Coorte Clínica de Cinomose: “Mapeamento de Epítomos Reativos para Células T do Vírus da Cinomose em Cães Vacinados na Cidade do Recife”

Instituições Executoras: Departamento de Medicina Veterinária/UFRPE e Centro de Pesquisa Aggeu Magalhães/ FIOCRUZ

Prezado Senhor (a),

Estamos realizando um estudo sobre o vírus da Cinomose para conhecer mais sobre a doença e sua vacina. Sabemos que a cinomose é uma doença causada por um vírus e que é transmitida aos cães pelo contato direto ou durante a gravidez.

Com essa pesquisa pretendemos ampliar os conhecimentos sobre a vacina e de que forma ela poderia ser aperfeiçoada, assim como ajudar no desenvolvimento de melhores vacinas contra outras doenças.

Assim sendo, o que precisamos fazer é coletar amostras de sangue ao longo, através de punção venosa com material descartável, de animais que sejam trazidos ao médico veterinário para se vacinar contra a cinomose, e que sejam autorizados por seus proprietários a participar da pesquisa, bem como realizar uma breve entrevista através de um questionário. Queremos também esclarecer que os riscos são mínimos, pois a coleta de sangue é um método rotineiramente utilizado para vários tipos de exames diagnósticos e a punção venosa será feita por profissional experiente, com seringas e agulhas descartáveis.

Ao permitir que o seu cão participe do estudo, o senhor(a) estará contribuindo para o melhor conhecimento da vacinação contra a Cinomose e terá garantido os seguintes direitos:

1. A garantia de receber esclarecimentos a qualquer dúvida sobre os procedimentos, risco e benefícios relacionados com a pesquisa;
2. A liberdade de retirar seu consentimento para que seu cão continue participando do estudo a qualquer momento que desejar;
3. A segurança de que seu cão não será identificado e que será mantido o caráter confidencial da informação relacionada com a sua privacidade
4. Receber o resultado do teste de detecção de anticorpos, para acompanhar a proteção da vacina no seu animal.

Solicitamos ainda a sua autorização para que os materiais coletados, questionário e amostras de sangue de seu cão passem a fazer parte dos bancos de dados e de amostras das instituições e que possam ser usados em estudos posteriores, respeitando as mesmas garantias acima descritas. Solicitamos autorizar também a utilização das informações destas pesquisas em publicações científicas sem que o nome de seu cão apareça. Esclarecemos que as amostras biológicas ficarão sob a guarda do Departamento de Medicina Veterinária/UFRPE e do Laboratório de Virologia e Terapia Experimental - LAVITE do CPqAM/FIOCRUZ.

Concordância do responsável pelo animal participante da pesquisa:

Eu, _____, RG N° _____,
domiciliado à Rua _____, n° _____,
Bairro _____, Município/UF, _____,
CEP: _____, tendo recebido as informações e ciente dos direitos acima
relacionados, como responsável por _____, da raça canina _____, de
cor _____, concordo com a sua participação nesta pesquisa.

Assinatura: _____ . Data: _____ .

Assinatura de um membro da equipe: _____

Nome do Pesquisador responsável: Rita de Cássia Maia. Telefone: 81-3320-6428

APÊNDICE B – QUESTIONÁRIO: “Mapeamento de Epítomos Reativos para Células T do Vírus da Cinomose em Cães Vacinados na Cidade do Recife”

OBSERVAÇÃO: Esta ficha só deve ser preenchida se o animal preencher **TODOS** os requisitos abaixo relacionados:

- () É residente na Região Metropolitana do Recife;
- () Há indicação de profilaxia anti-cinomose – esquema 1 ou 3 doses, ou reforço;
- () Não há indicação de soro anti-cinomose;
- () Não é gestante;
- () Não é portador de câncer, ou doença auto-imune, ou desnutrição grave, ou imunodeficiência;
- () Não usa corticóide ou imunossupressores.

DADOS DE IDENTIFICAÇÃO

Nº de registro:

Local da Coleta: **Data da coleta:**/...../.....

Nome:

Idade: (em anos completos) **Sexo:** () Masculino () Feminino

Endereço residencial: **Complemento:**.....

Bairro:..... **Telefone residencial:** (.....).....

Cor e raça:

HISTÓRIA CLÍNICA E VACINAL

Tomou alguma outra vacina recentemente? Sim Não Qual?.....

Nos últimos 15 dias teve:

Febre? Sim Não

Diarréia? Sim Não

Vômito? Sim Não

Infecções? Sim Não

O animal tem alguma doença? Sim Não Qual?

O animal tem alguma alergia? Sim Não A quê?.....

Toma alguma medicação regularmente? Sim Não Qual?.....

Marca / Lote da vacina:

**APÊNDICE C- SEQUENCIAS DE PEPTÍDEOS SINTETIZADOS A PARTIR DA
PROTEÍNA H DO VÍRUS DA CINOMOSE CANINA**

Peptídeos CDV	Sequência
1 to 15	M L P Y Q D K V G A F Y K D N
6 to 20	D K V G A F Y K D N A R A N S
11 to 25	F Y K D N A R A N S T K L S L
16 to 30	A R A N S T K L S L V T E G H
21 to 35	T K L S L V T E G H G G R R P
26 to 40	V T E G H G G R R P P Y L L F
31 to 45	G G R R P P Y L L F V L L I L
36 to 50	P Y L L F V L L I L L V G I L
41 to 55	V L L I L L V G I L A L L A I
46 to 60	L V G I L A L L A I T G V R F
51 to 65	A L L A I T G V R F H Q V S T
56 to 70	T G V R F H Q V S T S N M E F
61 to 75	H Q V S T S N M E F S R L L K
66 to 80	S N M E F S R L L K E D M E K
71 to 85	S R L L K E D M E K S E A V H
76 to 90	E D M E K S E A V H H Q V I D
81 to 95	S E A V H H Q V I D V L T P L
86 to 100	H Q V I D V L T P L F K I I G
91 to 105	V L T P L F K I I G D E I G L
96 to 110	F K I I G D E I G L R L P Q K
101 to 115	D E I G L R L P Q K L N E I K
106 to 120	R L P Q K L N E I K Q F I L Q
111 to 125	L N E I K Q F I L Q K T N F F
116 to 130	Q F I L Q K T N F F N P N R E
121 to 135	K T N F F N P N R E F D F R D
126 to 140	N P N R E F D F R D L H W C I
131 to 145	F D F R D L H W C I N P P S T
136 to 150	L H W C I N P P S T V K V N F
141 to 160	N P P S T V K V N F T N Y C E
146 to 160	V K V N F T N Y C E S I G I R
151 to 165	T N Y C E S I G I R K A I A S
156 to 170	S I G I R K A I A S A A N P I
161 to 175	K A I A S A A N P I L L S A L

166 to 180 A A N P I L L S A L S G G R G
171 to 185 L L S A L S G G R G D I F P P
176 to 190 S G G R G D I F P P H R C S G
181 to 195 D I F P P H R C S G A T T S V
186 to 200 H R C S G A T T S V G K V F P
191 to 205 A T T S V G K V F P L S V S L
196 to 210 G K V F P L S V S L S M S L I
201 to 215 L S V S L S M S L I S R T S E
206 to 220 S M S L I S R T S E V I N M L
211 to 225 S R T S E V I N M L T A I S D
216 to 230 V I N M L T A I S D G V Y G K
221 to 235 T A I S D G V Y G K T Y L L V
226 to 240 G V Y G K T Y L L V P D D I E
231 to 245 T Y L L V P D D I E R E F D T
236 to 250 P D D I E R E F D T R E I R V
241 to 255 R E F D T R E I R V F E I G F
246 to 260 R E I R V F E I G F I K R W L
251 to 265 F E I G F I K R W L N D M P L
256 to 270 I K R W L N D M P L L Q T T N
261 to 275 N D M P L L Q T T N Y M V L P
266 to 280 L Q T T N Y M V L P K N S K A
271 to 285 Y M V L P K N S K A K V C T I
276 to 290 K N S K A K V C T I A V G E L
281 to 295 K V C T I A V G E L T L A S L
286 to 300 A V G E L T L A S L C V E E S
291 to 305 T L A S L C V E E S T V L L Y
296 to 310 C V E E S T V L L Y H D S S G
301 to 315 T V L L Y H D S S G S Q D G I
306 to 320 H D S S G S Q D G I L V V T L
311 to 325 S Q D G I L V V T L G I F W A
316 to 330 L V V T L G I F W A T P M D H
321 to 335 G I F W A T P M D H I E E V I
326 to 340 T P M D H I E E V I P V A H P
331 to 345 I E E V I P V A H P S M K K I
336 to 350 P V A H P S M K K I H I T N H
341 to 355 S M K K I H I T N H R G F I K
346 to 360 H I T N H R G F I K D S I A T
351 to 365 R G F I K D S I A T W M V P A

356 to 370 D S I A T W M V P A L A S E K
361 to 375 W M V P A L A S E K Q E E Q K
366 to 380 L A S E K Q E E Q K G C L E S
371 to 385 Q E E Q K G C L E S A C Q R K
376 to 390 G C L E S A C Q R K T Y P M C
381 to 395 A C Q R K T Y P M C N Q A S W
386 to 400 T Y P M C N Q A S W E P F G G
391 to 405 N Q A S W E P F G G R Q L P S
396 to 410 E P F G G R Q L P S Y G R L T
401 to 415 R Q L P S Y G R L T L P L D A
406 to 420 Y G R L T L P L D A S V D L Q
411 to 425 L P L D A S V D L Q L N I S F
416 to 430 S V D L Q L N I S F T Y G P V
421 to 435 L N I S F T Y G P V I L N G D
426 to 440 T Y G P V I L N G D G M D Y Y
431 to 445 I L N G D G M D Y Y E S P L L
436 to 450 G M D Y Y E S P L L N S G W L
441 to 455 E S P L L N S G W L T I P P K
446 to 460 N S G W L T I P P K D G T I S
451 to 465 T I P P K D G T I S G L I N K
456 to 470 D G T I S G L I N K A G R G D
461 to 475 G L I N K A G R G D Q F T V L
466 to 480 A G R G D Q F T V L P H V L T
471 to 485 Q F T V L P H V L T F A P R E
476 to 490 P H V L T F A P R E S S G N C
481 to 495 F A P R E S S G N C Y L P I Q
486 to 500 S S G N C Y L P I Q T S Q I R
491 to 505 Y L P I Q T S Q I R D R D V L
496 to 510 T S Q I R D R D V L I E S N I
501 to 515 D R D V L I E S N I V V L P T
506 to 520 I E S N I V V L P T Q S I R Y
511 to 525 V V L P T Q S I R Y V I A T Y
516 to 530 Q S I R Y V I A T Y D I S R S
521 to 535 V I A T Y D I S R S D H A I V
526 to 540 D I S R S D H A I V Y Y V Y D
531 to 545 D H A I V Y Y V Y D P I R T I
536 to 550 Y Y V Y D P I R T I S Y T H P
541 to 555 P I R T I S Y T H P F R L T T

546 to 560	S Y T H P F R L T T K G R P D
551 to 565	F R L T T K G R P D F L R I E
556 to 570	K G R P D F L R I E C F V W D
561 to 575	F L R I E C F V W D D N L W C
566 to 580	C F V W D D N L W C H Q F Y R
571 to 585	D N L W C H Q F Y R F E A D I
576 to 590	H Q F Y R F E A D I A N S T T
581 to 595	F E A D I A N S T T S V E N L
586 to 600	A N S T T S V E N L V R I R F
591 to 604	S V E N L V R I R F S C N R
