Universidade Federal Rural de Pernambuco

Programa de Pós-graduação em Ciência Animal Tropical

Neuroadaptação de cepa selvagem do CDV em camundongos (*Mus musculus*) e análise filogenética do gene Hemaglutinina em amostras de campo detectadas no Brasil

Vanessa Alessandra de Barros Portela

Recife, 2018

Universidade Federal Rural de Pernambuco

Programa de Pós-graduação em Ciência Animal Tropical

Neuroadaptação de cepa selvagem do CDV em camundongos (*Mus musculus*) e análise filogenética do gene Hemaglutinina em amostras de campo detectados no Brasil

Vanessa Alessandra de Barros Portela

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.

Orientador: Rita de Cássia Carvalho Maia.

Co-orientadores: Lindomar José Pena; José Wilton Pinheiro Júnior.

Recife, 2018

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal Tropical, como parte dos requisitos necessários à obtenção do grau de Mestre em Ciência Animal Tropical, outorgado pela Universidade Federal Rural de Pernambuco, à disposição na Biblioteca Central desta universidade. A transcrição ou utilização de trechos deste trabalho é permitida, desde que respeitadas às normas de ética científica.

Vanessa Alessandra de Barros Portela

Prof. Dra. Rita de Cássia Carvalho Maia

Prof. Dr. Lindomar José Pena

Prof.Dra. Luciana de Oliveira Franco

Prof. Dr. José Wilton Pinheiro Júnior

AGRADECIMENTOS

Agradeço a minha família por todo apoio, paciência e força transmitidos.

Ao Igor pela parceria de vida, por toda paciência e compreensão.

A minha parceria da peleja da vida acadêmica, minha prima Mariana, que começou seu próprio sonho junto com o meu e juntas conseguimos vencer essa batalha.

A minha orientadora Rita de Cássia Carvalho Maia, por todo companheirismo, ensinamento e principalmente por todo o suporte todos esses anos.

Aos meus co-orientadores Lindomar José Pena e José Wilton Pinheiro Júnior, por todos os conhecimentos cedidos, e agradeço de forma especial ao Professor Lindomar José Pena por ter me inserido no LAViTE e aberto às portas de seu grupo de pesquisa, e principalmente ter aceitado e contribuído com todos os recursos possíveis para que esse sonho fosse realizado.

A UFRPE e em especial ao Departamento de Medicina Veterinária, e toda equipe do setor de Medicina Veterinária Preventiva.

Ao Programa de Pós-graduação em Ciência Animal Tropical e ao professor Anísio Soares pela oportunidade.

Aos funcionários e membros do Departamento de Virologia do Instituto Aggeu Magalhães (IAM/FIOCRUZ-PE), e ao Núcleo de Plataformas Tecnológicas do IAM/FIOCRUZ-PE, e um agradecimento especial aos novos amigos conquistados, vocês tornaram os dias mais leves e sempre me ajudaram em tudo o que eu precisei.

Aos parceiros de execução da pesquisa, Klarissa Miranda Guarines, Adalúcia da Silva, Edmilson F. de Oliveira-Filho, Cláudia Kathariny da Silva Farias e Rafael Borges Rosa, por toda paciência e tempo doado para que essa pesquisa funcionasse.

Um agradecimento especial para o Team Lindomar, vocês foram meus parceiros em tudo o que eu precisei tanto física como emocionalmente.

Agradeço também ao Dr. Otávio Valério, por ter me doado seus materiais de pesquisa, por todo tempo cedido e por todas as oportunidades que me proporcionou.

Ao Tecsa laboratórios pela confiança e parceria, imprescindíveis para a execução do trabalho.

Agradeço a CAPES pelo apoio financeiro.

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS 8
LISTA DE TABELAS 9
ABREVIATURAS E DEFINIÇÕES 10
RESUMO 11
ABSTRACT 12
QUALIFICAÇÃO DO PROBLEMA 13
REVISÃO DE LITERATURA 15
1- Morfologia e classificação taxonômica 15
2- Proteínas virais 16
2.1- Proteínas do complexo RNP (Ribonucleoproteínas) 16
2.2- Proteínas do envelope 17
3- Genotipagem 19
4- Variabilidade genética 20
5- Hospedeiros e fatores epidemiológicos 21
6- Patogenia 22
6.1- Disseminação viral no SNC 23
6.2- Resposta imunológica 24
7- Diagnóstico laboratorial 25
7.1 Imunofluorescência 25
7.2- Sorologia 25
7.3-Isolamento viral 25
7.4- RT-PCR 26
8- Controle e profilaxia 26
OBJETIVOS 29

Geral: 29

Específicos: 29

ARTIGOS CIENTÍFICOS 30

Capítulo 1- 30

Neuroadaptação de cepa selvagem do vírus CDV em camundongos (Mus musculus) 30

Capítulo 2 38

Análise filogenética do gene da Hemaglutinina do vírus da cinomose em amostras de campo detectadas no Brasil 38

DISCUSSÃO GERAL 60

CONCLUSÕES 62

LISTA DE FIGURAS

Figura 1- Árvore filogenética ilustrando as diferentes espécies do gênero *Morbillivirus* com a representação de alguns de seus respectivos hospedeiros. Fonte: Acervo pessoal. 15

Figura 2- Diagramas esquemáticos do vírion morbiliviral (superior) e seu genoma (inferior). Fonte: (Liu *et al*., 2016) 16

Figura 3- Organização do genoma viral, com foco da proteina hemgalutinina. Fonte: Acervo pessoal. 18

Figura 4- Relação filogenética entre cepas selecionadas de CDV baseadas no gene H. 48

Figura 5- Análise de polimorfismos nos isolados de interesse e na cepa vacinal Onderstepoort (acesso: EU143737). 49

Figura 6- Alinhamento das sequências de aminoácidos deduzidas da proteína H de estirpes de tipo selvagem e de vacina de CDV e predições de sítios de N-glicosilação 50

LISTA DE TABELAS

Tabela 1- *Primers* utilizados no estudo. 42

Tabela 2- *Primers* originais utilizados por Negrão *et al*., 2013. 43

Tabela 3- Descrição das cepas utilizadas para o estudo filogenético. 46

Tabela 4- Principais mutações de aminoácidos e seus fenótipos relacionados, descrito em literatura. 47

ABREVIATURAS E DEFINIÇÕES

CDV- Vírus da cinomose canina

CeMV- *Morbilivírus* cetáceo

ECP- Efeito citopático

ELISA- Ensaio de imunoabsorção enzimática

F- Proteína de fusão

FeMV- *Morbilivírus* felino

H-Hemaglutinina

L- Polimerase

LCR- Líquido cefalorraquidiano

Mev- Vírus do sarampo;

MLV- Vacinas vivas modificadas

N- Nucleoproteína

nm- Nanômetro

PDV- Vírus da cinomose focina

pH- Potencial hidrogeniônico

PPRV- Vírus da peste dos pequenos ruminantes

RNA- Ácido ribonucleico

RpRd- RNA-polimerase RNA-dependente

RPV- Vírus da peste bovina

RT-PCR- Reação em cadeia da polimerase seguida da transcriptase reversa

SLAM- Molécula sinalizadora de ativação de linfócitos

SPF- Livre de patógenos específicos

Vero DST- Vero Dog Slam Tag

NJ-Neighbor-Join

EU/SA1- Europa/América do Sul-1

ORF- Fase de leitura aberta

RESUMO

O vírus da cinomose canina (CDV) é um relevante patógeno de caninos domésticos e carnívoros selvagens. Pertencente á família *Paramyxoviridae* e ao gênero *Morbillivirus*, o CDV constitui o agente etiológico de uma infeção enzoótica mundialmente. Alguns relatos de cães supostamente vacinados que desenvolveram a doença trazem à tona questionamentos sobre a eficácia das formulações vacinais frente às cepas selvagens, levantando algumas hipóteses acerca da evolução do CDV. Com o objetivo de produzir uma linhagem do vírus de CDV capaz de reproduzir a enfermidade em camundongos e analisar o gene da Hemaglutinina do vírus CDV em amostras de campo de cães naturalmente infectados no Brasil, esta dissertação será apresentada na forma de dois artigos científicos. No primeiro, foi proposto o estabelecimento de uma linhagem de CDV neurotrópica para camundongos, capaz de induzir a doença a partir de uma cepa de CDV brasileira selvagem, através de inoculação intracerebral em camundongos Swiss neonatos, observando-se através de análises moleculares que não houve amplificação do material genético viral de interesse. No segundo artigo, amostras clínicas de cães naturalmente infectados no Brasil foram submetidas a um estudo filogenético utilizando o genoma *full-lenght* da glicoproteína H do CDV, onde foram obtidos cinco isolados distintos: H_CDV_A5_MG, H_CDV_A2_PE, H_CDV_A8_PE, H_CDV_A10_PE, H_CDV_A16_PE, todos agrupados no genogrupo Europa/América do Sul-1, grupo distinto do que abrange as cepas vacinais. Pesquisas de polimorfismos já descritos na literatura foram realizadas nos aminoácidos gerados, onde foi detectada a substituição R580Q nas amostras isoladas de Pernambuco, importante na eficiência da fusão e expressão da superfície proteica da hemaglutinina.

Palavras-chave: *Morbillivirus* canino; Hemaglutinina; Filogenia; Polimorfismo; Neuroadaptação; Camundongos Swiss; Pernambuco; Minas Gerais.

ABSTRACT

Canine distemper virus (CDV) is a relevant pathogen of domestic canines and wild carnivores. Belonging to the *Paramyxoviridae* family and the genus *Morbillivirus*, CDV is the etiologic agent of an enzootic infection worldwide. Some reports of supposedly vaccinated dogs that developed the disease raise questions about the efficacy of vaccine formulations against wild-type strains, raising some hypotheses about the development of CDV. With the objective of producing a CDV virus strain capable of reproducing the disease in mice and analyzing the Hemagglutinin CDV virus gene in field samples from naturally infected dogs in Brazil, this dissertation will be presented in the form of two scientific articles. In the first, it was proposed the establishment of a neurotropic CDV line for mice, capable of inducing the disease from a wild Brazilian CDV strain, through intracerebral inoculation in Swiss neonatal mice, observing through molecular analyzes that there was no amplification of viral genetic material of interest. In the second article, clinical samples of naturally infected dogs in Brazil were submitted to a phylogenetic study using the full-lenght genome of CDV H-glycoprotein, where five different isolates were obtained: H_CDV_A5_MG, H_CDV_A2_PE, H_CDV_A8_PE, H_CDV_A10_PE, H_CDV_A16_PE, all grouped in the genogroup Europe / South America-1, a group distinct from that covering the vaccine strains. Polymorphism studies already described in the literature were performed on the generated amino acids, where the R580Q substitution was detected in samples isolated from Pernambuco, important in the fusion efficiency and expression of the protein surface of hemagglutinin.

Keywords: Canine *Morbillivirus*; Hemagglutinin; Phylogeny; Polymorphism; Neuroadaptation; Swiss mice; Pernambuco; Minas Gerais.

QUALIFICAÇÃO DO PROBLEMA

A cinomose é uma doença viral, infecciosa, imunossupressora, altamente contagiosa, que acomete principalmente os cães e é causada pelo vírus da cinomose canina (CDV) (Silva *et al*., 2007). É considerada uma das principais infecções virais em cães e tem sido descrita como capaz de causar doença em carnívoros de outras famílias em todo o mundo (Cho e Park, 2005), além de ser a segunda doença infecciosa com maior relevância entre caninos domésticos, devido às suas altas taxas de morbidade e mortalidade (Negrão *et al*., 2006).

As semelhanças clínicas e moleculares entre os vírus da cinomose e do sarampo, caracterizam o furão (*Mustela putorius furo*) infectado com o vírus CDV como um modelo experimental e capaz de expressar sinais clínicos semelhantes à síndrome do vírus do sarampo em humanos (MeV), permitindo a identificação de determinantes de virulência e atenuação, bem como a avaliação de segurança e eficácia de novas terapias e vacinas (Da Fontoura Budaszewski e Von Messling, 2016). Entretanto, essa infecção resulta em altas taxas de mortalidade desses animais (Von Messling *et al*., 2003; Von Messling *et al*., 2004), e o uso de cepas de CDV neuroadaptadas em ratos recém-nascidos foi descrito como sendo capazes de induzir uma infecção neurológica crônica (Bernard *et al*., 1983), sendo dessa forma, um modelo animal ideal para estudos tanto de virulência como de infecções crônicas, substituindo mais facilmente os furões, uma vez que não costumam sobreviver á infecção experimental.

A medida mais eficaz conhecida contra o vírus CDV é a imunização. As vacinas anti-CDV foram produzidas a partir da década de 60, havendo grande impacto, reduzindo o índice de animais afetados (Harder e Osterhaus, 1997). Entretanto, ainda são utilizadas as mesmas cepas vacinais, havendo relatos que revelam aumento na incidência da infecção em animais vacinados (Blixenkrone-Moller *et al.*, 1993; Ek-Kommonen *et al.*, 1997; Haas *et al.*, 1997; Jozwik e Frymus, 2002; Norris *et al.*, 2006; Calderon *et al.*, 2007;Simon-Martinez *et al.*, 2008; Fischer, *et al*., 2016). Uma das razões por suspeitas de falhas vacinais deve-se a grande variabilidade genética entre as cepas do

CDV(Hashimoto *et al.*, 2001; Si *et al.*, 2010). A análise filogenética do gene da hemaglutinina, o mais variável entre os *Morbillivirus*, permite a classificação das cepas em genótipos, os quais se agrupam em relação à distribuição geográfica (Blixenkrone-Moller *et al.*, 1993).

A realização da presente pesquisa implica na obtenção de uma linhagem viral do CDV adaptada a camundongos, para que seja possível realizar estudos referentes ao diagnóstico, tratamento e desenvolvimento de vacinas, tanto para cinomose quanto para sarampo, ambos semelhantes molecular e clinicamente. Outra esfera abordada na presente pesquisa envolve a avaliação do panorama das cepas virais de CDV atuantes na região geográfica estudada, uma vez que há escassez destes dados e com isso, será possível comparar a cepa utilizada nas vacinas comerciais atuais com as cepas de circulantes, avaliando sua proximidade genética, estimando sua viabilidade na proteção dos animais pertencentes à região estudada.

REVISÃO DE LITERATURA

1- Morfologia e classificação taxonômica

O agente etiológico envolvido é um RNA-vírus, denominado cinomose (*Canine Distemper Vírus* - CDV), pertencente à ordem *Mononegavirales*, família *Paramyxoviridae* e gênero *Morbillivirus*, onde também estão identificados vírus do sarampo (MeV), vírus da cinomose focina (PDV), vírus da peste de pequenos ruminantes (PPRV), vírus da peste bovina (RPV), *Morbillivirus* cetáceo (CeMV) e mais recentemente, *Morbillivirus* felino (FeMV) (King *et al.*, 2011; Woo *et al.*, 2012) (**Figura 1**).

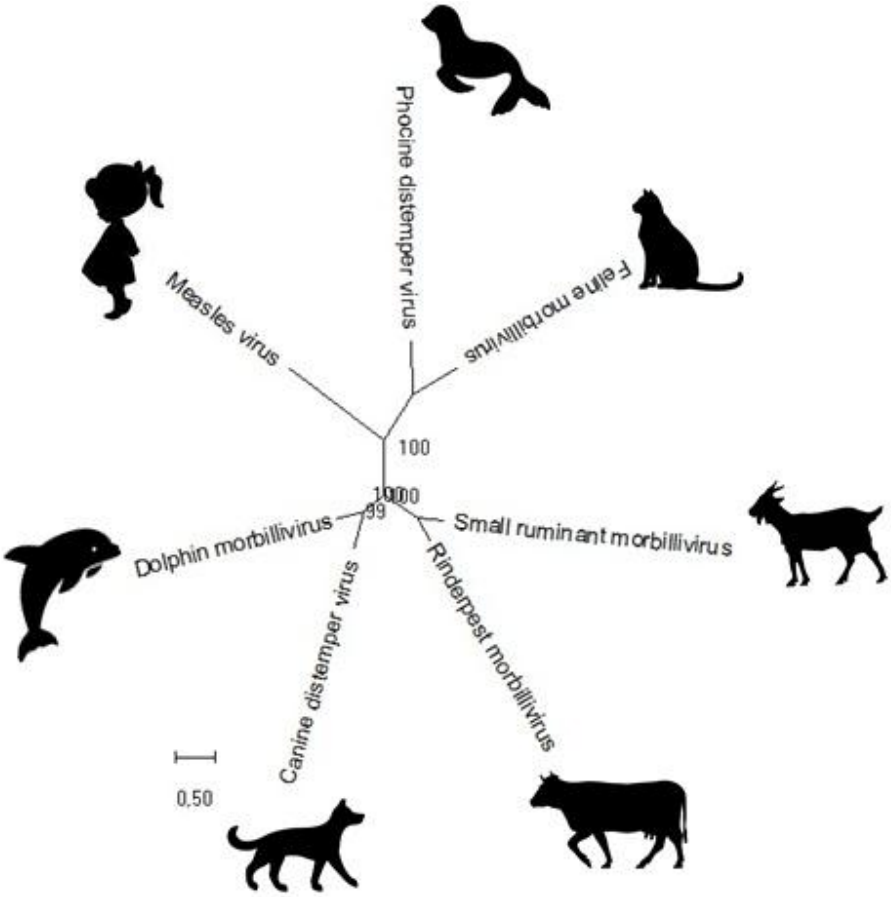


Figura 1- Árvore filogenética ilustrando as diferentes espécies do gênero *Morbillivirus* com a representação de alguns de seus respectivos hospedeiros. Fonte: Acervo pessoal.

CDV é um vírus envelopado e de caráter pleomórfico que contém o genoma em cadeia de RNA de sentido negativo. O nucleocapsídeo viral possui simetria helicoidal, e possui de 13 a 18 nm de diâmetro por 600 a 1.000 nm de extensão (Arns *et al.*, 2012). O RNA viral codifica ao menos oito proteínas: hemaglutinina (H), proteína de fusão (F), matriz associada ao envelope (M), fosfoproteína (P), polimerase viral (L) e Nucleoproteína (N), e duas proteínas secundárias não-estruturais (C e V), codificadas como unidades extra-transcricionais, incorporado ao gene P (Lamb e Parks, 2013) (**Figura 2**).

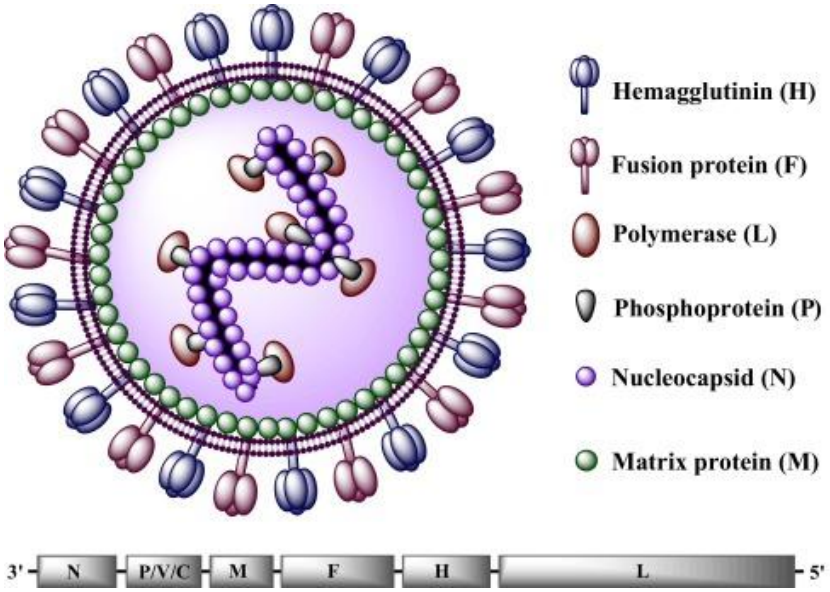


Figura 2- Diagramas esquemáticos do vírion morbiliviral (superior) e seu genoma (inferior). Fonte: (Liu *et al*., 2016)

2- Proteínas virais

2.1- Proteínas do complexo RNP (Ribonucleoproteínas)

2.1.1- Nucleocapsídeo (N)

No momento pós-transcrição, a proteína N possui alta produção e associação com o ácido nucleico, encarregando-se de proteger o genoma contra a digestão por nucleases, por servir encapsulando o genoma em um nucleocapsideo resistente a ação de RNase. Nos Paramixovírus, cerca de 80% da sequência da proteína do nucleocapsídeo é conservada (Arns *et al.*, 2012).

Segundo Liston e colaboradores (1997), durante a etapa transcricional e de replicação, a proteína N realiza a fusão à polimerase, associa-se à polimerase (P-L) compondo o complexo RNP (Ribonucleoproteina).

2.1.2- Fosfoproteína (P)

A proteína P tem importante função na RNA-polimerase RNA-dependente (RpRd), atuando como cofator da polimerase. Quando em conjunto com a proteína do nucleocapsídeo, é responsável ainda pela formação de agregados citoplasmáticos, conhecidos como corpúsculos de inclusão ou corpúsculos de Lentz, nas células infectadas (Arns *et al.*, 2012). Seu genoma codifica mais duas proteínas: C e V, onde desempenham papéis fator infectivo e inibição imunológica do hospedeiro, respectivamente (Von Messling *et al.*, 2006).

2.1.3- Polimerase (L)

Constitui a proteína em menor quantidade, e é responsável pelas funções catalíticas de RpRd. A sequência de nucleotídeos responsável por traduzir a proteína L é bastante preservada (Arns *et al.*, 2012).

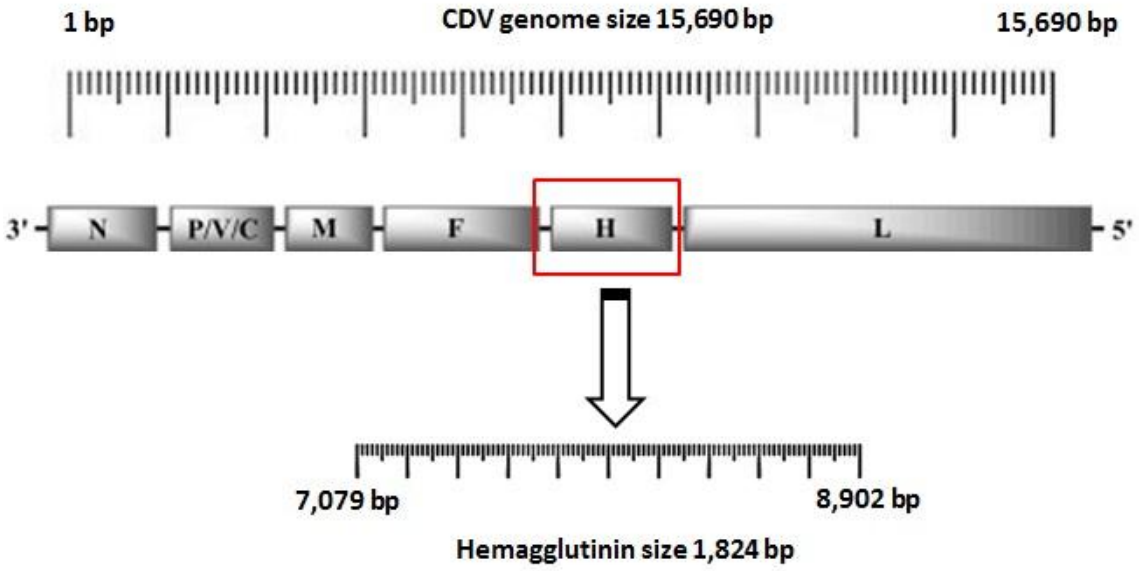
2.2- Proteínas do envelope

2.2.1- Hemaglutinina (H)

A proteína H tem como função primária a atividade de ligação aos receptores da célula hospedeira, além de interagir com a proteína de fusão para auxiliar na fixação e fusão do envelope viral com a membrana da célula hospedeira, mecanismo que permite o ingresso do vírus na célula (Moss e Griffin, 2006).

von Messling e colaboradores (2001) realizaram estudos utilizando vírus recombinantes onde concluíram que a proteína H é a principal atuante na eficiência da fusão, função anteriormente remetida á proteína F, além do que, a proteína H tem a capacidade de determinar a citopatogenicidade *in vitro*.

É no gene que codifica a hemaglutinina que se encontra a maior variação antigênica, conferindo a essa proteína viral o foco primário em estudos epidemiológicos e moleculares referentes ao vírus em questão (Iwatsuki *et al.*, 1997; Iwatsuki *et al.*, 2000; Von Messling *et al.*, 2001; Martella



et al., 2011). Em contrapartida, os genes N e L compartilham de alto grau de similaridade entre as cepas isoladas de CDV, tendo a proteína N dentro do grupo dos Paramixovírus, cerca de 80% de sua sequência proteica conservada (Castilho *et al.*, 2007; Sawatsky e Von Messling, 2011; Arns *et al.*, 2012) (**Figura 3**).

Figura 3- Organização do genoma viral, com foco da proteina hemgalutinina. Fonte: Acervo pessoal.

2.2.2-Proteína de fusão (F)

A proteína F participa dos processos de fusão e penetração dos vírus à célula do hospedeiro, sendo sintetizada como um precursor inativo, F0, onde após a clivagem, converte-se em sua forma biologicamente ativa através de F1 e F2, que se mantém aproximadas através de pontes dissulfeto. Uma particularidade na família *Paramyxoviridae*, é a necessidade de um pH neutro para a execução da atividade fusogênica dessa proteína (Scheid e Choppin, 1977; Arns *et al.*, 2012).

2.2.3-Proteína da matriz (M)

Compõe a camada interna entre o nucleocapsideo e envelope, formando a camada mais farta no vírion. Desempenha papel na relação entre o nucleocapsídeo viral e a membrana celular do hospedeiro, alicerçando a morfogênese viral, auxiliando na maturação e brotamento de novas partículas virais (Arns *et al.*, 2012).

3- Genotipagem

Recentemente pode-se observar o crescimento do número de estudos acerca da diversidade e relações filogenéticas, onde técnicas moleculares são ferramentas importantes para os estudos de epidemiologia e dinâmica das diferentes estirpes de CDV em circulação.

A base de classificação filogenética do CDV em diferentes genótipos é realizada através da análise da Hemaglutinina (H), uma vez que é tida como a proteína mais variável do genoma viral (Blixenkrone-Moller *et al.*, 1993).

As cepas de CDV já descritas são associadas principalmente a nove genótipos, embora ocorram divergências entre os autores. Os genótipos descritos são: *America-1*, onde se enquadram as cepas vacinais; *America-2*, onde são agrupados os isolados da América do Norte; *Europe*, no qual incluem isolados principalmente obtidos de cães da Europa, também observados em circulação na América do Sul (Panzera *et al.*, 2012), onde se admite também a classificação de *Europe/South America-1*; *Europe Wildlife*, incluindo principalmente cepas obtidas de animais selvagens na Europa; *Arctic,* onde são agregados as cepas obtidas do Ártico, porém também ocorre a inclusão de cepas europeias; *Asia-1* e *Asia-2*, onde são dispostos os isolados de diversos países Asiáticos, separados em dois grupos distintos; *South Africa*, cepas obtidas na África do Sul; e *South America-2*, onde estão dispostos os diferentes isolados obtidos nos países da América do Sul (Mochizuki *et al.*, 1999; Calderon *et al.*, 2007; Kapil *et al.*, 2008; Gamiz *et al.*, 2011; Negrao *et al.*, 2013; Budaszewski Rda *et al.*, 2014; Espinal *et al.*, 2014; Fischer *et al.*, 2016). Fora os grupos mais comumente associados às cepas documentadas, algumas sequências são descritas associadas à cepa vacinal *Rockborn*, formando um

cluster denominado *Rockborn-like* (Martella et al., 2011; Budaszewski Rda et al., 2014; Ke et al., 2015).

4- Variabilidade genética

As mutações manifestam-se naturalmente como reflexo de falhas próprias da polimerase, que atuam incorporando nucleotídeos incorretos durante a etapa de replicação do genoma, e com isso, tem-se a principal causa de variabilidade genética observada em *Morbillivírus*.e outros vírus de RNA não-segmentados. Os mutantes virais gerados durante o processo replicativo podem ou não expressar uma vantagem seletiva, sendo esse o fator que define se serão ou não mantidos no genoma (Moraes *et al.*, 2012).

Estudos demonstraram uma forte pressão seletiva nos aminoácidos 530 e 549 do gene da hemaglutinina, tais resíduos compõem a região responsável pela ligação com o receptor da célula do hospedeiro, estando associados a eventos de *spillover*- determinação remetida à capacidade viral de infectar novos hospedeiros. 22 substituições de aminoácidos identificadas nestas regiões estão relacionadas a vírus isolados de hospedeiros silvestres (Mccarthy *et al.*, 2007).

O termo recombinação é utilizado para designar um evento de permuta entre sequências genéticas de dois genomas. Dois processos recombinantes são descritos para vírus de RNA, um replicativo e um não-replicativo, sendo o modelo replicativo o que leva a transferência do complexo de replicação de uma fita de RNA para outra, enquanto o modelo não replicativo ocorre uma ruptura na fita de RNA que aprimore a formação de um genoma híbrido (Moraes *et al.*, 2012).

No que concerne o CDV, os principais indícios de recombinação compreende as glicoproteínas H e F, ambas responsáveis pelo tropismo celular, e com isso, equivalendo a um expressivo ganho evolutivo, uma vez que essas proteínas tem relação com a ação de anticorpos neutralizantes dos hospedeiros (Da Fontoura Budaszewski *et al.*, 2016).

5- Hospedeiros e fatores epidemiológicos

A infeção causada pelo vírus da cinomose é enzoótica mundialmente, apresentando frequência significativa em animais mais jovens e não vacinados (Arns *et al.*, 2012).

Um relevante aspecto da biologia do CDV é a quantidade de novos hospedeiros infectados. CDV já foi descrito em mamíferos das famílias *Canidae, Mustelidae, Hyaenidae, Procyonidae, Ailuridae, Viverridae, Felidae, Ursidae, Phocidae, Tayassuidae e Cercopithecidae* (Cho e Park, 2005; Cottrell *et al.*, 2013; Lempp *et al.*, 2014). Ao final da década de 80, algumas espécies de vida livre, incluindo espécies com risco de extinção, que até então não eram consideradas susceptíveis ao vírus apresentaram alguns surtos da doença (Mccarthy *et al.*, 2007). Acredita-se que devido a modificações do ecossistema, adaptação do vírus a fatores epizoóticos, e em conjunto com o surgimento de variantes, o vírus passou a apresentar novos hospedeiros incomuns, como os felídeos selvagens, incluindo hienas e leões (Appel *et al.*, 1994; Barrett, 1999), além do relato de alguns surtos em mamíferos de vida marinha (Barrett e Rima, 2002; Kuiken *et al.*, 2006; Butina *et al.*, 2010) e mais recentemente, casos de CDV em primatas não humanos (Qiu *et al.*, 2011; Sakai *et al.*, 2013), e pandas gigantes (Jin *et al.*, 2015; Feng *et al.*, 2016; Zhao *et al.*, 2017). Suínos e Felinos domésticos tem predisposição ao CDV, porém não há o desencadeamento da doença clínica nestas espécies (Gaskin, 1974), já tendo sido inclusive descrita a infecção experimental em gatos domésticos livres de patógenos específicos (SPF), onde foi observado a replicação viral e sinuosa linfopenia, porém com ausência de sinais clínicos (Harder *et al.*, 1996; Martella *et al.*, 2008).

Tal como outros vírus envelopados, CDV é rapidamente inativo no ambiente e a transmissão ocorre via animal-animal diretamente, estabelecendo-se através dos aerossóis e gotículas infectantes oriundas das excreções e secreções corpóreas dos animais infectados (Headley *et al.*, 2012), podendo ser detectado em altos títulos a partir destas secreções e excreções, inclusive urina (Elia *et al.*, 2006). Um estudo recente apresentou a transmissão horizontal através de pulgas (*Ceratophyllus sciurorum*) em furões de uma fazenda dinamarquesa, onde foram realizados estudos moleculares tanto nos furões quanto nas pulgas e foi observado 100% de equivalência entre

os genes da proteína H de CDV isolados dos furões e das pulgas (Trebbien *et al.*, 2014).

A susceptibilidade da infecção gira em torno de fatores climáticos, apresentando-se nas épocas mais frias do ano, fatores imunes, onde animais mais jovens (até os seis meses de vida) são mais passíveis, uma vez que a imunidade materna declina nesse período e se o animal não receber a vacinação adequada tem grandes chances de ser acometido (Martella *et al.*, 2008). Cadelas prenhes infectadas estão habilitadas a realizar a transmissão viral por via transplacentária, o que pode gerar abortos, fetos natimortos ou o nascimento de filhotes fracos e imunossuprimidos (Arns *et al.*, 2012).

Os *Morbillivírus* de forma geral induzem clínica semelhante entre si, tal como febre, secreção nasal serosa e tosse, além de sinais respiratórios e gastrointestinais, muitas vezes complicados por infecções bacterianas secundárias. Outro ponto de destaque entre os *Morbillivírus* é a capacidade de imunossupressão severa (Von Messling *et al.*, 2003; Griffin, 2007).

6- Patogenia

CDV inicia a infecção em novos hospedeiros primeiramente através do trato respiratório superior, quando inalados, os vírions estabelecem a infecção primária por fusão dependente do receptor na membrana plasmática (Smith *et al.*, 2009). Dois receptores celulares são atribuídos em infecções por *Morbillivírus*: molécula sinalizadora de ativação de linfócitos (SLAM / F1 ou CD150), expressa por subconjuntos de timócitos, células dendríticas, células estaminais hematopoiéticas, macrófagos e linfócitos T e B (Tatsuo *et al.*, 2000) e molécula de adesão celular de nectina 4 (nectina-4), expressa no complexo de junção aderente de células epiteliais (Muhlebach *et al.*, 2011; Noyce *et al.*, 2011). A patogênese viral tem ampla dependência dos receptores celulares, sendo a infecção mediada pelo receptor SLAM indispensável para a entrada e disseminação viral (De Swart *et al.*, 2007; Leonard *et al.*, 2008) e infecção mediada pela nectina-4 importante para a transmissão do vírus (Noyce e Richardson, 2012).

A propagação ocorre inicialmente em macrófagos e linfócitos B e T circulantes, disseminando-se pela via linfática local até as tonsilas e linfonodos

brônquicos e faríngeos (Nelson e Couto, 2006). Esta multiplicação viral inicial nos tecidos linfoides leva a uma depressão imune crítica e prolongada (Deem *et al.*, 2000; Vandevelde e Zurbriggen, 2005; Greene e Appel, 2006). Em um período de quatro a seis dias pós- infecção tem-se o inicio da replicação viral no sistema linfoide, medula óssea, timo, baço, linfonodos mesentéricos, placas de Peyer, células estomacais, células de Kupffer e células mononucleares ao redor dos vasos pulmonares e bronquiais, levando a uma consequente viremia e com isso, o primeiro pico febril, acompanhado por leucopenia devido a danos virais nas células linfoides (Greene e Appel, 2006; Maclachlan e Dubovi, 2011). Em média oito a dez dias pós-infecção, CDV movimenta-se por meio de vias hematogênicas ou via LCR para os tecidos epiteliais e o sistema nervoso central, levando a sinais clínicos típicos do sistema nervoso (Summers *et al.*, 1979; Higgins *et al.*, 1982; Maclachlan e Dubovi, 2011).

Após a dispersão sistêmica do vírus, os sinais clínicos podem desaparecer, devido ao aumento da titulação de anticorpos, ocorrendo então excreção do vírus através da maioria dos tecidos. Todavia, poderá ocorrer a persistência viral por longos períodos em tecidos uveais, neurônios e tegumentos e a recuperação da enfermidade está diretamente ligada à interrupção da replicação viral (Greene e Appel, 2006).

6.1- Disseminação viral no SNC

As células mononucleares são responsáveis por conduzir o CDV para o sistema nervoso central através de diferentes vias: líquido cefalorraquidiano, epêndima dos ventrículos e barreira hematoencefálica (Arns *et al.*, 2012). O vírus promove agregação das células contíguas, permitindo a passagem do genoma viral célula-célula, evitando a exposição a fatores imunológicos do hospedeiro, facilitando o processo de propagação viral (Murphy *et al.*, 1999). No SNC, os pontos de escolha para tropismo do CDV são a substância branca cerebelar, a região periventricular e ao redor do quarto ventrículo, a medula óssea e a via óptica. De modo geral, as lesões desmielinizantes são as mais usuais e ocorrem em função da replicação viral na região da substância branca. O processo desmielinizante ocorre por mecanismos principais: dano da própria mielina ou células mielinogênicas, chamado de desmielinização

primária ou lesão axonal que promove um efeito secundário na degeneração mielínica, chamado de desmielinização secundária (Arns *et al.*, 2012; Carvalho *et al.*, 2012).

Uma parte da população de animais que adquirem a doença não consegue montar uma resposta imune adequada e o vírus continua a sua multiplicação massivamente por todo o corpo. Boa parte dos animais acometidos morre 2 a 4 semanas após a infecção (Martella *et al.*, 2008).

6.2- Resposta imunológica

A resposta imune do sistema inato é a primeira forma interventiva em oposição à infecção ocasionada pelo CDV, sendo primordial para a produção de citocinas que promovem a resposta imune adaptativa permeada por células (Tizard, 2012). Entretanto, com o tropismo do CDV por células do sistema imune inato, a eficácia da resposta desse sistema fica comprometida, levando a uma leucopenia grave e perda de capacidade proliferativa de linfócitos, resultando em imunossupressão e aumento da predisposição do hospedeiro a infecções oportunistas, configurando uma das principais causas de óbitos associado aos *Morbillivírus (Laine et al., 2005; Beineke et al., 2009)*.

Para que ocorra a solução da infecção pelo CDV, é necessário que respostas imunes humorais e celulares aconteçam, estando a amplitude dessas respostas diretamente ligada à intensidade da doença. De modo geral, a reação do sistema imune humoral na cinomose ocorre produzindo anticorpos contra nucleoproteínas virais, em seguida sendo estabelecida a resposta imune humoral específica a proteínas de envelope viral (Miele e Krakowka, 1983; Rima *et al.*, 1991). Uma vez que não há esta resposta adequada, a doença encaminha-se para um estado clínico agudo que muitas vezes encaminha-se para o óbito rapidamente. Entre o 10º e 14º dia pós-infecção, é possível mensurar anticorpos específicos contra o vírus, onde direcionam para a persistência ou eliminação viral, sendo a eliminação diretamente dependente da especificidade da imunoglobulina envolvida fornecer ação contra o envelope proteico viral (Krakowka *et al.*, 1975).

7- Diagnóstico laboratorial

Uma grande variedade de indicadores clínicos e de técnicas laboratoriais vem sendo realizados a fim de levar a um diagnóstico *antemortem* decisivo da enfermidade. Todavia, alguns fatores interferem para que o correto diagnóstico seja realizado, tais como a duração da viremia, manifestações multissistêmicas e resposta imune humoral e celular ausentes ou tardias (Frisk *et al.*, 1999).

7.1 Imunofluorescência

A técnica de imunofluorescência (IF) pode ser realizada tendo como base uma diversidade de amostras clínicas, como *swabs* conjuntival, nasal e vaginal, utilizando anticorpos policlonais ou monoclonais. Entretanto, é uma técnica capaz de detectar antígenos apenas nas três primeiras semanas pós-infecção, quando o vírus ainda encontra-se presente em células epiteliais (Appel, 1987). Uma vez utilizada para detecção nas fases subagudas e crônicas da doença, esta técnica pode gerar resultados falso-negativos (Jozwik e Frymus, 2005).

7.2- Sorologia

Métodos sorológicos, como ELISA e soroneutralização (SN), apresentam valor limitado ao diagnóstico, uma vez que altos títulos de anticorpos anti-CDV não são diferenciados entre infecção natural, imunidade protetiva pelo uso de vacinas ou transferência passiva de anticorpos maternos (Shin *et al.*, 1995; Frisk *et al.*, 1999; Kim *et al.*, 2001). Anticorpos presentes no LCR são sugestivos de cinomose, em casos de encefalite (Tilley e Smith, 2008). Por outro lado, em casos severos da doença, o título de anticorpos pode estar baixo devido à imunossupressão causada pelo vírus (Amude *et al.*, 2007).

7.3-Isolamento viral

O diagnóstico viral baseado no cultivo celular é classificado como fastidioso e demorado, além de ter baixa aplicabilidade no diagnóstico para a rotina clínica, pois o vírus necessita de adaptação ao cultivo, através de sucessivas passagens às cegas, antes que o crescimento viral seja demonstrado pela formação de efeito citopático (ECP), entretanto, nem todas

as células desenvolvem ECP quando infectadas com CDV (Appel, 1987; Shin *et al.*, 1995; Frisk *et al.*, 1999; Kim *et al.*, 2001; Arns *et al.*, 2012).

Diferentes linhagens celulares como a B95a, Vero e Vero-DST vem sendo empregadas no isolamento de novas cepas de CDV (Seki *et al.*, 2003).

Uma célula do tipo Vero, que expressa receptor para morbilivírus (SLAM ou CD150) foi desenvolvida, e mostrou-se demasiadamente sensível para detecção de CDV por inoculação de amostras clínicas, apresentando ECP a partir de vinte e quatro horas pós-inoculação (Seki *et al.*, 2003). O receptor Slam é o mais importante receptor da célula hospedeira para a proteína H do CDV (Lan *et al.*, 2005).

7.4- RT-PCR

A reação em cadeia da polimerase seguida da transcriptase reversa (RT-PCR),vem sendo amplamente utilizada no diagnóstico do CDV, por tratar-se de um método rápido, sensível e específico (Frisk *et al.*, 1999; Rzezutka e Mizak, 2002; Shin *et al.*, 2004; Saito *et al.*, 2006), principalmente quando comparada aos métodos diagnósticos usuais, como microscopia eletrônica, isolamento viral, imunofluorescência e ELISA, levando-a ao patamar de teste de eleição para o diagnóstico conclusivo da cinomose (Elia *et al.*, 2006).

8- Controle e profilaxia

A única forma eficiente de controle da cinomose é através da vacinação sistemática. Durante a década de 1950, vacinas vivas modificadas (MLV) contra o vírus da cinomose foram disponibilizadas e amplamente utilizadas, refletindo na redução drástica da doença entre a população de cães (Harder e Osterhaus, 1997). A maioria das formulações vacinais comerciais tem como base as cepas tipo MLV, sendo a estirpe Onderstepoort, isolada na África do sul em 1956, a mais amplamente utilizada. Outras cepas também utilizadas são a Snyder Hill e Lederle (Martella *et al.*, 2008), que são filogeneticamente relacionadas (Harder e Osterhaus, 1997). A cepa Rockborn, isolada pela primeira vez na Suécia (Rockborn, 1959), ainda é encontrada em algumas formulações comerciais, embora se tenha alguns relatos de retenção da patogenicidade (Martella *et al.*, 2011).

No mercado de vacinas, também está disponível um tipo recombinante, baseado em vetor canaripox (rCDV) que expressa as proteínas H e F da estirpe Onderstepoort (Pardo *et al.*, 1997). No quesito de vacinas recombinantes, outros vírus têm sido utilizados, incluindo adenovírus (Fischer *et al.*, 2002), vírus da raiva (Wang *et al.*, 2012; Wang *et al.*, 2014) e vírus vaccínia (Wild *et al.*, 1993; Stephensen *et al.*, 1997; Welter *et al.*, 1999; 2000)

Uma grande diversidade de fatores pode levar a falhas vacinais, dentre eles: a interferência de anticorpos passivos oriundos da mãe; falhas individuais na resposta imune; qualidade, titulação, conservação, acometimento por outras enfermidades simultaneamente à vacinação (Negrão *et al.*, 2006), além disso, alguns trabalhos evidenciam ainda a divergência antigênica entre as cepas vacinais e as cepas de campo (Hashimoto *et al.*, 2001; Si *et al.*, 2010). Apesar de diversos relatos e estudos epidemiológicos publicados acerca do aumento da incidência da infecção por CDV em cães vacinados ou não (Blixenkrone-Moller *et al.*, 1993; Ek-Kommonen *et al.*, 1997; Haas *et al.*, 1997; Jozwik e Frymus, 2002; Norris *et al.*, 2006 Calderon *et al.*, 2007; Simon-Martinez *et al.*, 2008), ainda não há esclarecimento sobre a causa das falhas vacinais ocorridas (Da Fontoura Budaszewski *et al.*, 2016). Nos casos em que cães filhotes recém-vacinados desenvolvem a doença, na maioria das vezes, tem relação com a infecção por cepa de campo antes do desenvolvimento da imunidade ativa. A imunidade passiva passa a declinar 15 dias após o desmame, fato que os deixa propensos à infecção pelo CDV. Se o animal for primovacinado antes dos anticorpos da mãe sejam abrandados completamente, a resposta vacinal do animal pode ser comprometida, visto que o antígeno presente na vacina será inativado pelos anticorpos ainda existentes, não por uma resposta imune própria (Martella *et al.*, 2008; Arns *et al.*, 2012).

Tendo em vista que realizar a titulação de anticorpos maternais em cada filhote é inviável, a estratégia vacinal aconselhável para vacinas MLV é a imunização á cada 3- 4 semanas entre as primeiras 8 a 16 semanas de idade. Desta forma, garante que o filhote receba pelo menos uma dose vacinal em uma idade em que a imunidade passiva fornecida pela mãe seja insuficiente para obstruir a imunização ativa (Schultz e Conklin, 1998; American Animal Hospital Association Canine Vaccination Task *et al.*, 2011).

Precauções em função da biossegurança constituem importante medida no controle da enfermidade, e devem ser tomadas por parte das pessoas envolvidas nos cuidados dos animais acometidos. O uso de luvas descartáveis, o descarte ou esterilização de fômites, a antissepsia pessoal e ambiental e o isolamento de animais acometidos ou suspeitos são ações importantes para promover um controle adequado do CDV (Arns *et al.*, 2012). O vírus é lábil e sensível a desinfetantes comuns, entretanto, realizar a limpeza eficaz das instalações possui certa dificuldade (Maclachlan e Dubovi, 2011).

OBJETIVOS

Geral:

Produzir uma linhagem do vírus da cinomose canina (CDV) capaz de reproduzir a enfermidade em camundongos e analisar o gene da Hemaglutinina do vírus CDV em amostras de campo de cães naturalmente infectados no Brasil.

Específicos:

1. Replicar o vírus da cinomose em passagens sucessivas em camundongos;
2. Avaliar a morbidade e mortalidade ocasionada pelo vírus nos camundongos;
3. Caracterizar a cepa neuroadaptada por análise filogenética;
4. Realizar triagem por PCR convencional para o gene N das amostras clínicas recebidas;
5. Realizar PCR convencional para o gene H nas amostras positivas na triagem;
6. Processar a partir dos amplicons obtidos na PCR do gene H, o sequenciamento genético de cada amostra;
7. Avaliar a diversidade genética entre os isolados virais;
8. Comparar filogenéticamente as cepas encontradas a campo com as cepas comerciais utilizadas.

ARTIGOS CIENTÍFICOS

Os materiais e métodos e os respectivos resultados que compõem esta dissertação serão apresentados a seguir na forma de artigos científicos separados por capítulos.

Capítulo 1-

Neuroadaptação de cepa selvagem do vírus CDV em camundongos (Mus musculus)

Neuroadaptation of wild CDV strain in mice (*Mus musculus*)

PORTELA, VAB[1]; ROSA, RB[2]; CARVALHO, OV[3]; CURVÊLO, CS[2]; PENA, LJ[2]; MAIA, RCC[1]

[1] Departamento de Medicina Veterinária, Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife-PE, Brasil.
[2] Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães- FIOCRUZ-PE, Recife, Brasil
[3] Tecsa Laboratórios, Belo Horizonte- MG, Brasil
*Autor para correspondência/Corresponding author: E-mail: r.carvalhomaia@gmail.com

Resumo

O vírus da cinomose canina (CDV) é o agente etiológico de uma das mais importantes doenças infecciosas da clínica de caninos, e é capaz de acometer carnívoros de diversas ordens. O patógeno pertence ao mesmo gênero que o sarampo em humanos e já foi sugerido seu envolvimento no estudo na esclerose múltipla. Para que seja possível estudar diversos aspectos da doença é importante que se estabeleça um modelo experimental animal capaz de reproduzir a patologia em laboratório. O furão (*Mustela putorius furo*) vem sendo utilizado como modelo experimental para o sarampo e até para cinomose, mas a desvantagem desse modelo animal está nas altas taxas de mortalidade apresentadas, além das dificuldades de manejo desta espécie em laboratório. Por este motivo, a utilização de camundongos como modelo experimental tem sido utilizado para estudos de virulência e infecção crônica. Desta forma, o objetivo deste trabalho foi estabelecer uma linhagem de CDV neurotrópica para camundongos, a partir de uma cepa brasileira selvagem, isolado em laboratório a fim de que seja possível reproduzir a doença nesses animais. Foram realizadas inoculações intracerebrais em camundongos em passagens sucessivas e através de técnicas moleculares foi observado que a amostra que constituiu um pool de cérebros coletados dos camundongos inoculados não amplificou o material genético viral de interesse, mesmo após sucessivas passagens cerebrais e após a tentativa de aumento do título viral por passagem em cultivo celular.

Palavras-chave: Cinomose canina; camundongos Swiss; modelo animal; cepa neurotrópica

Abstract

Canine distemper virus (CDV) is the etiologic agent of one of the most important infectious diseases of the canine clinic, and is efficient of attacking carnivores of various orders. The pathogen belongs to the same genus as measles in humans and has already been implicated in multiple sclerosis. To be able to study several aspects of the disease, it is important to establish an experimental animal model capable of reproducing the pathology in the laboratory. Ferret (*Mustela putorius furo*) has been used as an experimental model for measles and canine distemper, but the disadvantage of this animal model is the high mortality rates presented, besides the difficulties of handling this species in the laboratory. For this reason, the use of mice as an experimental model has been used for studies of virulence and chronic infection. Thus, the objective of this work was to establish a neurotropic CDV line for mice from a wild Brazilian strain isolated in the laboratory in order to reproduce the disease in these animals. Intracerebral inoculations were carried out in mice in successive passages and through molecular techniques it was observed that the sample constituting a pool of brains collected from the inoculated mice did not amplify the viral genetic material of interest, even after successive cerebral passages and after the attempt to increase the viral titer by passage in cell culture.

Keywords: Canine distemper; Swiss mice; animal model; neurotropic strain

Introdução

A cinomose é uma doença viral, infecciosa, imunossupressora, altamente contagiosa, que acomete principalmente os cães e é causada pelo vírus da cinomose canina (CDV), (Silva *et al*., 2007). É considerada uma das principais infecções virais em cães e tem sido descrita como capaz de causar doença em carnívoros de outras famílias em todo o mundo (Cho e Park, 2005), além de ser a segunda doença infecciosa com maior relevância entre caninos domésticos, devido às suas altas taxas de morbidade e mortalidade (Negrão *et al*., 2006).

O vírus da cinomose canina pertence à ordem *Mononegavirales* e constitui o gênero *Morbillivirus*, juntamente com o vírus do sarampo (MeV), o vírus da cinomose focina (PDV), o vírus da peste de pequenos ruminantes (PPRV), o vírus da peste bovina (RPV), *Morbillivirus* cetáceo (CeMV) e mais recentemente, *Morbillivirus* felino (FeMV) (King *et al*., 2011; Woo *et al.*, 2012), O CDV integra a família *Paramyxoviridae*, sendo componente da subfamília *Paramyxovirinae*, e quase todos os membros apresentam equivalente tropismo e distribuição de tecido em seus respectivos hospedeiros (Von Messling *et al*.,

2003; Griffin, 2007). A participação dos *Morbillivírus* em doenças desmielinizantes como a esclerose múltipla em humanos tem sido discutida, podendo o CDV atuar como modelo de estudo para essa enfermidade (Baumgärtner e Alldinger, 2005; Sips *et al*., 2007).

As semelhanças clínicas e moleculares entre os vírus da cinomose e do sarampo, caracterizam o furão (Mustela putorius furo) infectado com o vírus CDV como um modelo experimental e capaz de expressar sinais clínicos semelhantes à síndrome do vírus do sarampo em humanos (MeV), permitindo a identificação de determinantes de virulência e atenuação, bem como a avaliação de segurança e eficácia de novas terapias e vacinas (Da Fontoura Budaszewski e Von Messling, 2016). Entretanto, essa infecção resulta em altas taxas de mortalidade desses animais (Von Messling *et al*., 2003; Von Messling *et al*., 2004).

O uso de cepas de CDV neuroadaptadas em ratos recém-nascidos foi descrito como sendo capazes de induzir uma infecção neurológica crônica em ratos, sendo dessa forma, um modelo animal ideal para estudos tanto de virulência como de infecções crônicas (Bernard *et al*., 1983), substituindo mais facilmente os furões, uma vez que não costumam sobreviver a infecção experimental. Os sinais clínicos da cepa neuroadaptada em camundongos incluem conjuntivite, depressão, sinais neurológicos (paralisia, mioclonia, convulsão) e obesidade (Bernard *et al*., 1983; Takenaka et al., 2016).

O presente estudo teve por objetivo produzir uma linhagem do CDV capaz de reproduzir a enfermidade em camundongos.

Material e métodos

1-Cultivo celular e vírus

Células de VerodogSLAMtag (VDST) foram cultivadas em meio Eagle modificado de Dulbecco (DMEM High Glucose, Sigma) contendo 10% de soro fetal bovino (FBS, Gibco), 1% de penicilina / estreptomicina e L-glutamin 1 mM (Gibco) a 37 °C em uma estufa umidificada a 5% de CO2. Zeocin (Invitrogen) será adicionado a 1 mg/ mL para manter a seleção da expressão de SLAM (Signaling lymphocytic activation formule) nas células VerodogSLAM.

Uma cepa do tipo selvagem do CDV (CDV / LDM-BTU-2, número de acesso do GenBank 147 KX434626) isolada de espécimes clínicos caninos foi usada neste estudo.

A estirpe CDV / LDM-BTU-2 foi propagada em céulas VerodogSLAM e os estoques virais foram preparados recolhendo as células infectadas mais o sobrenadante quando o efeito citopático era ~80% e foi armazenado em alíquotas a -80 ºC.

2- Experimentação animal

Foram selecionados 40 camundongos neonatos, albino suíço, sem separação de sexo, nos quais 30 animais foram direcionados para inoculação viral e 10 animais como controle negativo. Os procedimentos de neuroadaptação foram baseados Bernard et al (1983), com algumas modificações. Os camundongos foram inoculados pela via intracerebral, realizada no vértice de um triangulo regular que une o olho direito e a orelha ipsilateral, ao lado da sutura cranial com 0,2mL da cepa de CDV brasileira ou PBS, utilizando-se 3 animais por passagem, totalizando 10 passagens. A cada cinco dias os animais inoculados foram eutanasiados e os cérebros coletados e macerados. Um terço do material cerebral foi re-inoculado no grupo seguinte de 3 animais, outro terço foi inoculado em células Vero/SLAM para isolamento e caracterização viral e o restante do material foi congelado a -80°C. Os animais do controle negativo foram eutanasiados ao final do experimento e as amostras também foram divididas e inoculadas em células Vero/SLAM e a outra metade congelada.

3- Caracterização *in vivo*

Após a conclusão das passagens, o material obtido dos cérebros da passagem 1, da passagem 10 e do PBS foram inoculadas em TCID50 (50% dose infectante para cultivo celular) em três grupos de 10 camundongos com 21 dias de idade. Três dias pós-inoculação foram selecionados três animais de cada grupo para serem eutanasiados e necropsiados para coleta de órgãos para a virologia, que foram congelados, e para análise histopatológica, que foram fixados em formalina. Os demais animais foram acompanhados

diariamente por 21 dias para avaliação da morbidade e mortalidade através de parâmetros clínicos e fisiológicos. Após o experimento, os animais foram eutanasiados através do método da superdosagem de barbitúrico, pela aplicação de 100 mg/kg, de pentobarbital por via intraperitoneal e após a constatação do óbito.

4-Biologia molecular

Para confirmação da presença do vírus entre as passagens, o material teve seu RNA extraído, através do kit QIAamp Viral RNA Mini Kit (Qiagen, Alemanha) e posteriormente, submetido a reação em cadeia da polimerase seguida da transcriptase reversa, utilizando o kit ImProm-II™ Reverse Transcription System (Promega, EUA) e realização de PCR convencional, utilizando GoTaq® DNA Polymerase (Promega, EUA). Para a reação de PCR convencional, foram utilizados os *primers* P1 e P2 seguindo o protocolo proposto por Frisk,1999. O protocolo de ciclagem de temperatura consistiu em uma etapa de desnaturação inicial de 2 minutos a 95ºC; 40 ciclos, compreendendo o processo de desnaturação, 95ºC por 1 minuto, anelamento a 59ºC por 2 minutos, extensão a 72ºC por 1 minuto, seguido de um ciclo de extensão final de 72ºC por 5 minutos.

5- Aspectos éticos

A pesquisa foi submetida ao Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA) do Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães (IAM), e aprovado perante licença de número 111/2017.

6- Resultados

Após a primeira passagem intracerebral nos camundongos neonatos, ao final do quinto dia, foi observado que esses animais não apresentaram qualquer alteração comportamental ou fisiológica. Foi realizada a eutanásia e então a coleta de material cerebral, onde uma parte foi levada para análise por biologia molecular e outra parte preservada por congelamento rápido em -80ºC.

Após as análises moleculares por RT-PCR, concluiu-se que os cérebros do grupo de camundongos que constituiu a primeira passagem não amplificou

material genético do vírus de interesse. Foi repetido o protocolo de passagem cerebral, dessa vez, separando parte da alíquota viral para prosseguir com análise molecular, onde foi constatado que a alíquota viral do estoque não amplificou o material genético viral. A alíquota viral em estoque foi então re-inoculada em cultivo celular utilizando células VDST para a tentativa de aumento de título viral, e após sucessivas passagens, o material continuou com baixa titulação e não foi possível seguir com as inoculações intracerebrais nos camundongos e consequentemente com a caracterização viral *in vivo*.

7-Discussão

Os modelos animais fornecem a base de grande parte da compreensão atual do tropismo e da patogênese, e são fundamentais para o desenvolvimento e anuência de fármacos e vacinas (De Vries *et al.*, 2017).

Quando comparados os possíveis modelos animais para o CDV, muitos estudos trazem o uso de ferretes (Evermann *et al*., 2001; Von Messling *et al*., 2003; Da Fontoura Budaszewski e Von Messling, 2016; De Vries *et al*., 2017), porém, o uso dessa espécie tende a uma alta taxa de mortalidade (Von Messling *et al*., 2003; Von Messling *et al*., 2004; Da Fontoura Budaszewski e Von Messling, 2016), além de não ser de fácil execução no Brasil, uma vez que não é uma espécie típica de nossa fauna.

Estudos envolvendo a infecção por CDV em roedores de laboratório são executadas, como Bernard *et al*. (1983), onde foi realizado um estudo em que a cepa vacinal Onderstepoort do CDV foi passada 10 vezes em cérebro de camundongos recém-nascidos tipo Swiss e a cepa adaptada ao camundongo mostrou sintomas neuronais letais típicos, sinalizando que o camundongo é um modelo animal adequado para a neurovirulência do CDV. No presente estudo, não conseguimos replicar as inoculações intracerebrais nos camundongos, uma vez que o estoque viral não manteve o título adequado.

Idealmente, o patógeno em estudo não deveria precisar ser adaptado ao modelo animal e o processo da doença deveria recapitular todo o espectro clínico natural, entretanto muitas vezes o patógeno ou hospedeiro deve ser geneticamente alterado para produzir doenças (De Vries *et al*., 2017). Diversos estudos de infecção por CDV em modelos animais usam cepas recombinantes

ou clonadas para otimizar a infecção (Von Messling *et al*., 2003; Takenaka *et al.*, 2016; De Vries *et al*., 2017). Incluindo cepas com passagens seriadas em ovos embrionados (Morse *et al*., 1953).

No presente estudo foi utilizada uma cepa de campo propagada em cultivo celular, e não foram realizadas técnicas a fim de potencializar os efeitos infectivos e com isso, obter maior sucesso no processo neuroadaptativo do CDV em camundongos, que sugere o uso dessas técnicas para a realização de trabalhos futuros no referido escopo.

8- Referências

BAUMGÄRTNER, W.; ALLDINGER, S. The Pathogenesis of Canine Distemper Virus Induced Demyelination. In: LAVI, E. e CONSTANTINESCU, C. S. (Ed.). Experimental Models of Multiple Sclerosis. Boston, MA: Springer, 2005. ISBN 978-0-387-25518-7.

BERNARD, A.; WILD, T. F.; TRIPIER, M. F. Canine distemper infection in mice: characterization of a neuro-adapted virus strain and its long-term evolution in the mouse. J Gen Virol, v. 64 (Pt 7), p. 1571-9, Jul 1983. ISSN 0022-1317 (Print)
0022-1317 (Linking). Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6345720 >.

CHO, H. S.; PARK, N. Y. Detection of canine distemper virus in blood samples by reverse transcription loop-mediated isothermal amplification. J Vet Med B Infect Dis Vet Public Health, v. 52, n. 9, p. 410-3, Nov 2005. ISSN 0931-1793 (Print) 0931-1793 (Linking). Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16283921 >.

DA FONTOURA BUDASZEWSKI, R.; VON MESSLING, V. Morbillivirus Experimental Animal Models: Measles Virus Pathogenesis Insights from Canine Distemper Virus. Viruses, v. 8, n. 10, Oct 11 2016. ISSN 1999-4915 (Electronic)
1999-4915 (Linking). Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27727184 >.

DE VRIES, R. D. et al. Delineating morbillivirus entry, dissemination and airborne transmission by studying in vivo competition of multicolor canine distemper viruses in ferrets. PLoS Pathog, v. 13, n. 5, p. e1006371, May 2017. ISSN 1553-7374 (Electronic)
1553-7366 (Linking). Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28481926 >.

EVERMANN, J. F. et al. Pathogenesis of two strains of lion (Panthera leo) morbillivirus in ferrets (Mustela putorius furo). Vet Pathol, v. 38, n. 3, p. 311-6, May 2001. ISSN 0300-9858 (Print)
0300-9858 (Linking). Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11355661 >.

GRIFFIN, D. E. Measles virus. In: KNIPE, D. M.;HOWLEY, P. M., et al (Ed.). Fields Virology. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, v.5, 2007. p.1551–1585.

KING, A. M. Q. et al. Paramyxoviridae. In: (Ed.). Virus Taxonomy: Ninth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses. 9th: 680–681, 2011. p.680–681.

MORSE, H. G.; CHOW, T. L.; BRANDLY, C. A. Propagation of a Strain of Egg-Adapted Distemper Virus in Suckling Mice. Proc. Soc. exp. Bin, 1953.

NEGRÃO, F. J. et al. 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, v. 58, n. 6, p. 1099-1106, 2006. ISSN 0102-0935.

SILVA, M. C. et al. Aspectos clinicopatológicos de 620 casos neurológicos de Aspectos clinicopatológicos de 620 casos neurológicos de cinomose em cães cinomose em cães. Pesquisa Veterinária Brasileira v. 27, n. 5, p.:215-220, 2007. ISSN 0100-736X.

SIPS, G. J. et al. Involvement of morbilliviruses in the pathogenesis of demyelinating disease. Rev Med Virol, v. 17, n. 4, p. 223-44, Jul-Aug 2007. ISSN 1052-9276 (Print)
1052-9276 (Linking). Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17410634 >.

TAKENAKA, A. et al. Infectious Progression of Canine Distemper Virus from Circulating Cerebrospinal Fluid into the Central Nervous System. J Virol, v. 90, n. 20, p. 9285-92, Oct 15 2016. ISSN 1098-5514 (Electronic)
0022-538X (Linking). Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27489268 >.

VON MESSLING, V.; MILOSEVIC, D.; CATTANEO, R. Tropism illuminated: lymphocyte-based pathways blazed by lethal morbillivirus through the host immune system. Proc Natl Acad Sci U S A, v. 101, n. 39, p. 14216-21, Sep 28 2004. ISSN 0027-8424 (Print)
0027-8424 (Linking). Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15377791 >.

VON MESSLING, V. et al. A ferret model of canine distemper virus virulence and immunosuppression. J Virol, v. 77, n. 23, p. 12579-91, Dec 2003. ISSN 0022-538X (Print)
0022-538X (Linking). Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14610181 >.

WOO, P. C. et al. Feline morbillivirus, a previously undescribed paramyxovirus associated with tubulointerstitial nephritis in domestic cats. Proc Natl Acad Sci U S A, v. 109, n. 14, p. 5435-40, Apr 3 2012. ISSN 1091-6490 (Electronic)
0027-8424 (Linking). Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22431644 >.

Capítulo 2-

Análise filogenética do gene da Hemaglutinina do vírus da cinomose em amostras de campo detectadas no Brasil

Phylogenetic analysis of the Hemagglutinin gene from canine distemper virus in field samples detected in Brazil

Vanessa Alessandra de Barros Portela[1]; Klarissa Miranda Guarines[2]; Cláudia Kathariny da Silva Farias[1]; Otávio Valério de Carvalho[3]; Edmilson Ferreira de Oliveira-Filho[2]; Adalucia da Silva[2]; Lindomar José Pena[2]; Rita de Cássia Carvalho Maia[1].

[1] Departamento de Medicina Veterinária, Universidade Federal Rural de Pernambuco, Rua Dom Manoel de Medeiros, S/N, Recife-PE, Brasil, 52171-900.

[2] Instituto Aggeu Magalhães- IAM/FIOCRUZ-PE, Av. Prof. Moraes Rego, s/n - Cidade Universitária, Recife - PE, Brasil, 50670-420.

[3] Tecsa Laboratórios, Av. do Contorno, 6226 - Funcionários, Belo Horizonte - MG, Brasil, 30110-042.

*Autor para correspondência: E-mail: alessandra.barros.portela@hotmail.com

Resumo

O vírus da cinomose canina (CDV) é o agente etiológico de uma das principais enfermidades infecciosas que acomete tanto os cães domésticos quanto os animais selvagens, resultando em altas taxas de morbidade e mortalidade. O genoma viral codifica seis proteínas distintas, sendo a Hemaglutinina (H) a que apresenta a maior variabilidade genética, atuando como base para análises de filogenia molecular. A diversidade do gene H pode estar associada ao impedimento do reconhecimento por anticorpos neutralizantes, induzidos pela vacina, resultando em falha vacinal levando a estudos recentes que visam comparar as cepas de campo com cepas vacinais de referência que estão vinculadas ao genogrupo América-1. O estudo em questão objetivou analisar o gene da Hemaglutinina do vírus CDV em amostras de campo de cães naturalmente infectados no Brasil. O sequenciamento realizado a partir dos fragmentos que representam toda a sequência do gene H demonstrou cinco isolados distintos. A análise filogenética alcançada enquadrou os isolados descritos no *cluster* Europa/América do Sul-1, onde estão classificadas as demais cepas do Brasil, e que diferem substancialmente das cepas vacinais utilizadas no país. Foi realizada uma análise com base nos aminoácidos gerados, demonstrando que as substituições específicas no sítio de ligação ao receptor SLAM do gene da hemaglutinina, previamente ligados à emergência de doenças em novos hospedeiros não foram detectados nestas sequencias, entretanto, a substituição R580Q foi detectada nos isolados provenientes de Pernambuco, tida como iminentemente deletéria para a eficiência da fusão e expressão da superfície da proteína de ligação. Tais achados demonstram que a variabilidade genética das cepas de campo do vírus da cinomose de áreas endêmicas no Brasil necessita de melhores estudos para determinar a real proteção vacinal alcançada para este vírus.

Palavras-chave: *Morbillivirus* canino; Hemaglutinina; Filogenia; Polimorfismo; Pernambuco; Minas Gerais.

Abstract

Canine distemper virus (CDV) is the etiological agent of one of the major infectious diseases affecting both domestic dogs and wild animals, resulting in high rates of morbidity and mortality. The viral genome encodes six distinct proteins, with Hemagglutinin (H) being the most genetically variable, acting as the basis for molecular phylogenetic analysis. The diversity of the H gene may be associated with the impairment of vaccine-induced neutralizing antibody recognition, resulting in vaccine failure leading to recent studies comparing field strains with reference vaccine strains that are linked to genome-wide America-1. The present study aimed to analyze the Hemagglutinin gene of the CDV virus in field samples from naturally infected dogs in Brazil. Sequencing from the fragments representing the entire H gene sequence demonstrated five distinct isolates. The phylogenetic analysis of the isolates described in the cluster Europe / South America-1, where the other strains of Brazil are classified, differ substantially from the vaccine strains used in the country. An analysis was performed based on the generated amino acids, demonstrating that the specific substitutions at the SLAM receptor site of the hemagglutinin gene, previously linked to the emergence of diseases in new hosts were not detected in these sequences, however, the R580Q substitution was detected in the isolated from Pernambuco, considered to be imminently deleterious to the efficiency of fusion and expression of the surface of the binding protein. These findings demonstrate that the genetic variability of the field strains of the distemper virus in endemic areas in Brazil requires better studies to determine the actual vaccine protection achieved for this virus.

Keywords: Canine *Morbillivirus*; Hemagglutinin; Phylogeny; Polymorphism; Pernambuco; Minas Gerais.

1-Introdução

O vírus da cinomose (CDV), pertencente à ordem *Mononegavirales*, família *Paramyxoviridae* e gênero *Morbillivirus*, no qual também estão identificados vírus do sarampo (MeV), vírus da cinomose focina (PDV), vírus da peste de pequenos ruminantes (PPRV), vírus da peste bovina (RPV), *Morbillivirus* cetáceo (CeMV) e mais recentemente, *Morbillivirus* felino (FeMV) (Kim *et al*., 2001; Woo *et al*., 2012), é o agente etiológico da cinomose, uma enfermidade sistêmica grave, de caráter imunossupressor e altamente contagiosa, que afeta uma ampla gama de carnívoros terrestres e marinhos, e primatas não humanos (Kuiken *et al*., 2006; Butina *et al*., 2010; Qiu *et al*., 2011; Cottrell *et al*., 2013; Sakai *et al*., 2013; Feng *et al*., 2016).

O CDV possui genoma de RNA negativo de fita simples, não segmentado, com 15,690 kb de comprimento e codifica seis proteínas no qual,

a hemaglutinina (H) possui importante papel no que se refere à imunidade específica do hospedeiro e por questões de adaptação, exibe expressiva variabilidade genética no genoma, sendo o foco dos estudos epidemiológicos e de análises filogenéticas que envolvem o CDV (Haas *et al*., 1997; Hashimoto *et al*., 2001; Von Messling *et al*., 2001; Martella *et al*., 2006).

As cepas de CDV descritas na literatura são distribuídas em nove genótipos diferentes, embora alguns autores apresentem opiniões divergentes. Os genótipos descritos são: America-1, onde se enquadram as cepas vacinais; America-2, onde são agrupados os isolados da América do Norte; Europe, no qual incluem isolados principalmente obtidos de cães da Europa, também observados em circulação na América do Sul (Panzera *et al*., 2012), onde se admite também a classificação de Europe/South America-1; Europe Wildlife, incluindo principalmente cepas obtidas de animais selvagens na Europa; Arctic, onde são agregadas as cepas obtidas do Ártico, porém também ocorre a inclusão de cepas europeias; Asia-1 e Asia-2, onde são dispostos os isolados de diversos países Asiáticos, separados em dois grupos distintos; South Africa, cepas obtidas na África do Sul; e South America-2, onde estão dispostos os diferentes isolados obtidos nos países da América do Sul (Calderon *et al*., 2007; Gamiz *et al*., 2011; Negrao *et al*., 2013; Budaszewski Rda *et al*., 2014; Espinal *et al.*, 2014; Fischer *et al.,* 2016). Além dos grupos mais comumente associados às cepas documentadas, algumas sequências são descritas associadas à cepa vacinal Rockborn, formando um *cluster* denominado Rockborn-like (Martella *et al*., 2011; Budaszewski Rda *et al.*, 2014; Ke *et al*., 2015).

Embora a incidência da enfermidade pode ser reduzida drasticamente através da utilização de vacinas, alguns casos de filhotes de cães vacinados que contraíram a enfermidade foram relatados (Norris *et al*., 2006; Lee *et al*., 2010), e apesar das várias explicações mencionadas, a causa exata da falha vacinal permanece inédita. Como as cepas CDV vacinais se tornaram amplamente utilizadas, sua interação com cepas de tipo selvagem é uma questão importante que exige uma maior investigação (Ke *et al*., 2015).

Estudos recentes trazem novas informações sobre a epidemiologia molecular desta enfermidade no Brasil (Budaszewski Rda *et al., 2014*; Fischer

et al., 2016; Cortez *et al*., 2017), no entanto, ainda existe escassez de dados no que concerne a algumas regiões brasileiras. Com isso, buscamos analisar o gene da Hemaglutinina do vírus CDV em amostras de campo de cães naturalmente infectados em diferentes regiões do Brasil.

2-Material e Métodos

2.1-Extração e transcrição reversa O RNA total obtido a partir de amostras clínicas de urina e swabs oculares e nasais de animais acometidos foi submetido ao processo de extração utilizando o kit QIAamp Viral RNA Mini Kit (Qiagen®, Alemanha), de acordo com as instruções do fabricante. O RNA foi transcrito reversamente com auxílio do *primer* P2 (**Tabela 1**) (Frisk *et al*., 1999), utilizando o kit ImProm-II™ Reverse Transcription System (Promega®, EUA), de acordo com as instruções do fabricante.

2.2-Amplificação por PCR

Foram realizadas duas etapas de amplificação por PCR, a primeira foi considerada uma etapa de triagem para classificar as amostras positivas, onde foi adotado o protocolo proposto por Frisk *et al.* (1999) com modificações. Nesta etapa inicial foram utilizados os *primers* P1 e P2 (Frisk *et al*., 1999), o protocolo de ciclagem de temperatura consistindo em uma etapa de desnaturação inicial de 2 minutos a 95ºC; 40 ciclos, compreendendo o processo de desnaturação, 95ºC por 1 minuto, anelamento a 59ºC por 2 minutos, extensão a 72ºC por 1 minuto, seguido de um ciclo de extensão final de 72ºC por 5 minutos.

A segunda etapa de amplificação por PCR foi utilizada nas amostras positivas na etapa de triagem, onde o RNA das amostras selecionadas foi transcrito reversamente com o *primer* H5R (**Tabela 1**), utilizando o protocolo já descrito.

Tabela 1- *Primers* utilizados no estudo.

Primer	Gene	Sequence (5´- 3´)	Direction	Nucleotide position
P1[a]	N	ACAGGATTGCTGAGGACCTAT	+	769–789
P2[a]		CAAGATAACCATGTACGGTGC	-	1055–1035
H1F[b]	H	CCGACAGACATTCAAGCA	+	6833-6850
H1R[b]		AACCGTAACCCAACCTCAT	-	7380-7398
H2F[b]	H	AGATTGCTGAAAGAGGATA	+	7292-7310
H2R[b]		ACATACCTTGGCTTTGGAA	-	7909-7927
H3F[b]	H	GTGGAGCTACTACTTCAG	+	7644-7661
H3R[b]		TGTCAACCGCCCATAAGAT	-	8290-8308
H4F[b]	H	CTGAGAAACAAGAGGAACAA	+	8181-8200
H4R[b]		TCATCCCACACAAAACATT	-	8772-8790
H5F[b]	H	GTTTATTATGTTTATGACCC	+	8681-8700
H5R[b]		ATTCTCTCTTTGATATTACG	-	9168-9187

[a]:Primers RT-PCR (Frisk et al., 1999);
[b]: Primers RT-PCR (Negrão et al., 2013) with modifications;

A amplificação foi conduzida utilizando os *primers* baseados no protocolo de (Negrão *et al*., 2013), (**Tabela 1)** com modificações em alguns nucleotídeos sinalizadas em vermelho (**Tabela 2**). A ciclagem das temperaturas adotadas consistiu em uma desnaturação inicial de 95ºC por 2 minutos, 40 ciclos da seguinte repetição: desnaturação por 1 minuto a 95ºC, anelamento por 1minuto a 45ºC, extensão por 1 minuto a 72ºC e um ciclo de extensão final de 5 minutos a 72ºC.

Tabela 2- *Primers* originais utilizados por Negrão *et al*., 2013.

Primer	Gene	Sequence (5´- 3´)	Direction	Nucleotide position
NAH1[a]		CCAACAGACACTCAAGCA	+	6833-6850
NAH2[a]	H	AACCGTAACCCAATCTCAT	-	7380-7398
NAH3[b]		AGATTGCTGAAAGAGGATA	+	7292-7310
NAH4[b]	H	ACATACCTTGGCTTTGGAA	-	7909-7927
NAH5[c]		GTGGAGCTACTACTTCAG	+	7644-7661
NAH6[c]	H	TGTCAACCGCCCATAAGAT	-	8290-8308
NAH7[d]		CTGAGAAACAAGAAGAACAA	+	8181-8200
NAH8[d]	H	TCATCCCACACAAAACATT	-	8772-8790
NAH9[e]		GTTTATTATGTTTATGACCC	+	8681-8700
NAH10[e]	H	ATTCTCTCTTTGATATTACG	-	9168-9187

[a]: Primers H1
[b]: Primers H2
[c]: Primers H3
[d]: Primers H4
[e]: Primers H5

2.3-Sequenciamento de DNA

Os produtos de PCR do gene H foram purificados com PureLink™ PCR Purification Kit (Invitrogen®, EUA), seguindo as instruções do fabricante. Os produtos purificados foram quantificados por espectrofotometria, através do NanoDrop™ 2000 (Thermo Fisher Scientific®, EUA). Os pares de *primer* utilizados no sequenciamento genético foram os mesmos utilizados na amplificação por PCR do gene H (**Tabela 1**).

As amostras previamente amplificadas e purificadas foram submetidas ao sequenciamento de DNA utilizando o kit BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing (Applied Biosystems®, EUA), e os produtos purificados com Etanol/EDTA(AppliedBiosystems® EUA), ambos os métodos seguindo as instruções do fabricante. Todos os fragmentos foram analisados através do sequenciador automático de DNA ABI Prism 3100 (Applied Biosystems®, EUA) disponível para utilização no Núcleo de Plataformas Tecnológicas do CPqAM/

FIOCRUZ. As sequências obtidas foram alinhadas usando o software DNASTAR®- Lasergene® SeqMan Pro™ (© 1988-2017).

2.4-Análise filogenética

Os dados das sequências obtidas foram montados e editados em um comprimento total de 1824 bp usando o programa SeqMan (pacote de software DNAStar Lasergene, Madison, WI, EUA).

Para verificar a integridade e similaridade das sequências, as amostras foram submetidas a uma busca em banco de dados públicos- NCBI, através da ferramenta BLAST (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/).

As sequências obtidas foram inicialmente alinhadas utilizando o programa MAFFT (Katoh *et al*., 2017). Os algoritmos de Neighbor-Join e BioNJ foram utilizados em uma matriz de distâncias entre os pares estimadas usando a abordagem MVI (Maximum Composite Likelihood), com base na sequência do gene H de comprimento total. As árvores NJ foram construídas usando o programa MEGA X (Kumar *et al.*, 2018). O modelo de melhor ajuste para o conjunto de dados de sequências foi o modelo Kimura de 2 parâmetros (Kimura, 1980). A confiabilidade das árvores foi estimada pela análise bootstrap (BS) de 1000 conjuntos de dados pseudoreplicados (Felsenstein, 1985).

2.5-Análise de aminoácidos da proteína H

Sequências de 607 aminoácidos foram geradas a partir das ORFs da proteína H de cada uma das novas cepas descritas. As sequências foram alinhadas com a sequência de proteína da cepa vacinal Onderstepoort do CDV, utilizando o Mega X (Kumar *et al.*, 2018), para explorar seus perfis de similaridade. A predição de locais de N-glicosilação foi realizada com auxílio do servidor NetNGlyc 1.0 (Gupta *et al*., 2004).

3-Resultados

Incialmente, 24 amostras de urina e secreção conjuntival de cães naturalmente infectados com o vírus da cinomose canina testadas em PCR-Real Time foram cedidas gentilmente pelo TECSA laboratórios. Ao chegarem a

nosso laboratório, as amostras foram testadas para o CDV através de PCR convencional e destas, apenas cinco amostras foram classificadas para a etapa seguinte de RT-PCR do gene H. Tanto o controle positivo quanto negativo incluídos nas amplificações de RT-PCR responderam como esperado.

Após a realização do sequenciamento, foi confirmado que os fragmentos amplificados correspondiam ao gene de interesse, sendo as sequências denominadas H_CDV_A2_MG, proveniente de um cão doméstico da cidade Belo Horizonte, estado de Minas Gerais e H_CDV_A5_PE, H_CDV_A8_PE, H_CDV_A10_PE e H_CDV_A16_PE provenientes de cães domésticos da cidade de Recife, estado de Pernambuco. As sequências dos isolados analisados no presente estudo foram depositadas no GenBank com os seguinte códigos de acesso: H_CDV_A5_PE (**MK423863**); H_CDV_A8_PE (**MK423859**); H_CDV_A10_PE (**MK423862**); H_CDV_A16_PE (**MK423861**); H_CDV_A2_MG (**MK423860**).

Foi utilizada a ferramenta Blast para avaliar a similaridade das sequências obtidas com as cepas já depositadas no GenBank, onde observou-se que todos os isolados analisados no estudo apresentaram 99% de similaridade quando comparados com cepas de outras regiões brasileiras, e 98% de similaridade com cepas da Argentina e Uruguai. Não foram encontradas outras cepas de CDV no GenBank referentes ao gene H, nas regiões geográficas de Pernambuco e Minas Gerais, contempladas neste estudo.

A fim de aprofundar o estudo, 56 sequências do CDV de diferentes clados foram selecionadas e alinhadas com os isolados descritos (**Tabela 3**).

As análises filogenéticas realizadas com o método Neighbor-Joining com base nas sequências nucleotídicas do gene H, formaram uma árvore filogenética (**Figura 4**), no qual foi possível avaliar que isolados de Pernambuco e Minas Gerais foram relacionados com cepas do genogrupo Europa/América do Sul-1 (EU/SA-1), em que também estão agrupados os demais isolados brasileiros já descritos, bem como isolados da Argentina e Uruguai.

Tabela 3- Descrição das cepas utilizadas para o estudo filogenético.

Access code (GenBank)	Host	Place	Year	Genotype
EU143737	Vaccine strain- Onderstepoort	USA	2007	America-1
FJ461701	Vaccine strain- Nobivac DHPPI	South Africa	2008	America-1
FJ461710	Vaccine strain- Canigen DHPPI	South Africa	2006	America-1
AF378705	Vaccine strain- Onderstepoort	USA	2008	America-1
Z35493	Vaccine strain- Convac	Denmark	1994	America-1
JN896987	Vaccine strain- Snyder Hill	USA,Boston	2011	America-1
AF259552	Vaccine strain- Snyder Hill	Russia, Irkutsk	2000	America-1
AY649446	Raccoon	USA	2004	America-2
AY498692	Raccoon	USA	2003	America-2
X84998	*Phoca sibirica*	United Kingdom	1995	Artic
Z47760	Dog	Denmark	1995	Artic
AF172411	Dog	China	1999	Artic
DQ191767	Dog	Taiwan	2005	Asia 1
AB212964	Dog	Japan	2005	Asia 1
AB212963	Dog	Japan	2005	Asia 1
AB212730	Dog	Japan	2005	Asia 2
AY297454	Dog	Japan	2003	Asia 2
AY297453	Dog	Japan	2003	Asia 2
FJ392651	Dog	Argentina	2008	South America 2
KC257463	Dog	Argentina, Buenos Aires	2012	South America 2
KC257464	Dog	Argentina, Buenos Aires	2012	South America 2
KF835423	Dog	Colômbia, Medellin	2013	South America-3
KF835424	Dog	Colômbia, Medellin	2013	South America-3
KF835425	Dog	Colômbia, Medellin	2013	South America-3
X84999	Raccoon	United Kingdom	1995	Europe-2
Z47759	Mink	Denmark	1995	Europe-2
GQ214369	Stone marten	Austria, Vienna	2009	Europe-2
JX912968	Dog	Brazil, Porto Alegre	2013	Rockborn-like
AY964114	Dog	USA	2005	Rockborn-like
AF178039	Panda	China	1999	Rockborn-like
GU810819	Dog	Italy	2010	Rockborn-like
FJ461702	Dog	South Africa	2008	Rockborn-like
Z77672	Dog	Germany	1996	Europe 1
Z77673	Dog	Germany	1996	Europe 1
DQ494317	Dog	Italy	2006	Europe 1
DQ494318	Dog	Italy	2006	Europe 1
EU098104	Dog	Brazil, Londrina	2007	South America 1
EU098105	Dog	Brazil,Londrina	2007	South America 1
JX912958	Dog	Brazil, Porto Alegre	2013	South America 1
JX912963	Dog	Brazil, Porto Alegre	2013	South America 1
KX434626	Dog	Brazil, Botucatu	2016	South America 1
EU098102	Dog	Brazil, Londrina	2007	South America 1
JX912959	Dog	Brazil, Porto Alegre	2013	South America 1
JN215475	Dog	Uruguay, Montevideo	2011	South America 1
JN215476	Dog	Uruguay, Montevideo	2011	South America 1
JN215473	Dog	Uruguay, Montevideo	2011	South America 1
JN215477	Dog	Uruguay, Montevideo	2011	South America 1
JN215474	Dog	Uruguay, Montevideo	2011	South America 1
JX912971	Dog	Brazil, Porto Alegre	2013	South America 1
JX912975	Dog	Brazil, Porto Alegre	2013	South America 1
JX912976	Dog	Brazil, Porto Alegre	2013	South America 1
FJ392652	Dog	Argentina	2008	South America 1
JX912978	Dog	Brazil, Porto Alegre	2013	South America 1
KT429766	Dog	Brazil, Londrina	2012	South America 1
KX434626	Dog	Brazil, Botucatu	2016	South America 1
MG827088	*Tamandua tetradactyla*	Brazil, Cuiabá	2018	South America 1

Baseado na análise dos resíduos de aminoácidos apresentados pelas ORFs dos isolados descritos e nas principais substituições descritas na literatura (**Tabela 4**) foi possível verificar a presença de substituição na posição 580 (R580Q) dos isolados provenientes do estado de Pernambuco (**Figura 5**). Ainda com base na análise de aminoácidos, foi realizada a predição de sítios de N-glicosilação, onde foi constatada a presença de cinco regiões predispostas (19-21/ 149-151/ 309-311/ 391-393/ 422-424), (**Figura 6**), todas elas já previamente descritas em estudos pregressos.

Tabela 4- Principais mutações de aminoácidos e seus fenótipos relacionados, descrito em literatura.

Mutação	Fenótipo envolvido	Referência
Y549H	Adaptação do vírus a hospedeiros não canídeos	(Mccarthy *et al.*, 2007)
G/E530R/D/N	Adaptação do vírus a hospedeiros não canídeos	(Mccarthy *et al.*, 2007)
E29D	Associado a troca de hospedeiro, através da força de evidência de seu envolvimento, mais fraco do que nos resíduos 530 e 549.	(Mccarthy *et al.*, 2007)
G178S	Associado a troca de hospedeiro, através da força de evidência de seu envolvimento, mais fraco do que nos resíduos 530 e 549.	(Mccarthy *et al.*, 2007)
D603H/S	Associado a troca de hospedeiro, através da força de evidência de seu envolvimento, mais fraco do que nos resíduos 530 e 549.	(Mccarthy *et al.*, 2007)
R508Q	Pontencialmente prejudicial para a eficiência de fusão e expressão de superfície da proteína de ligação *in vitro*.	(Sattler *et al.*, 2014)
I542N	Sítio de n-glicosilação, associado ao aumento da virulência em cepas de CDV.	(Zhao *et al.*, 2014)

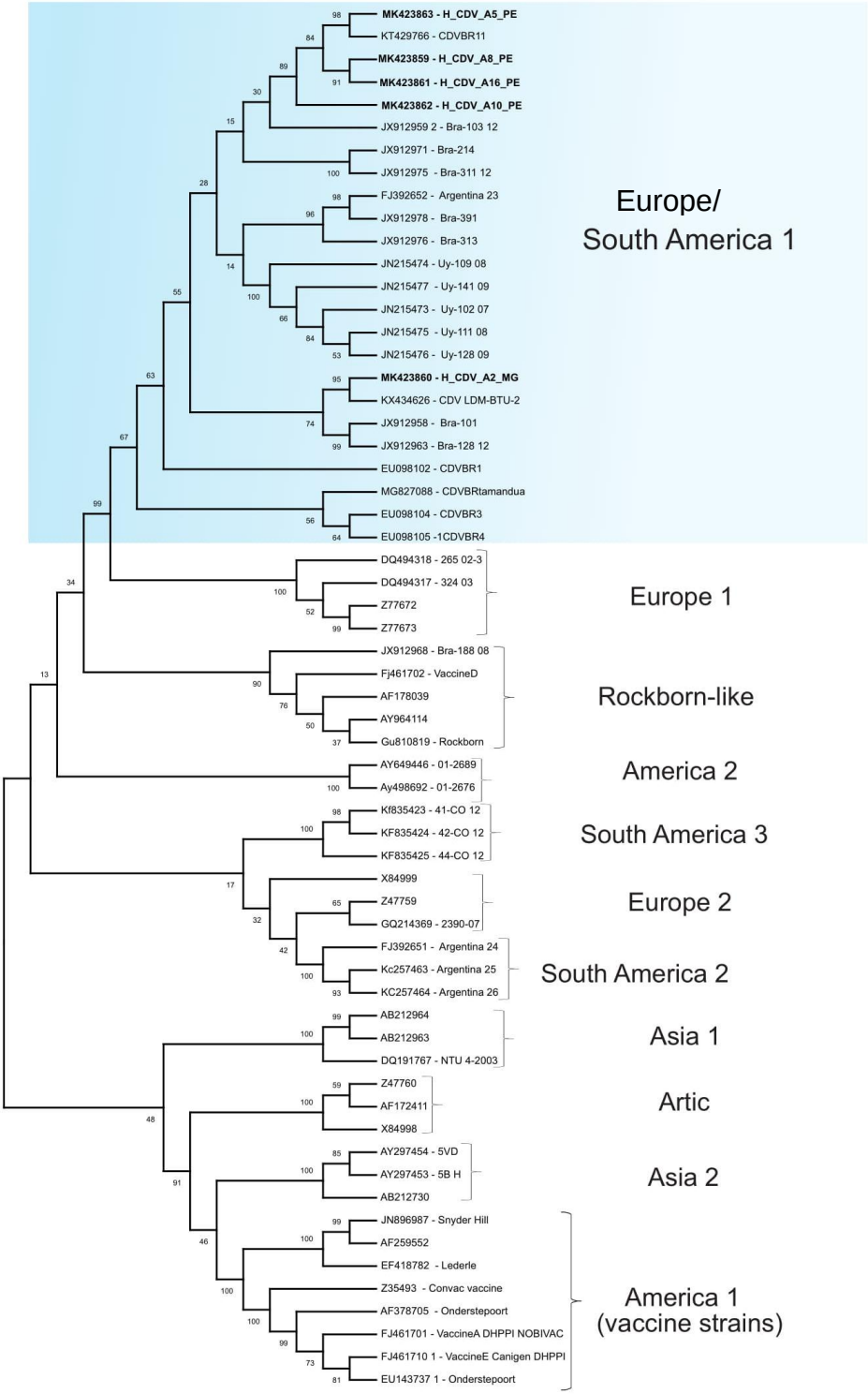


Figura 4- Relação filogenética entre cepas selecionadas de CDV baseadas no gene H.

A história evolutiva foi inferida usando o método da Máxima Verossimilhança e o modelo Kimura de 2 parâmetros. A árvore com a maior probabilidade de log é mostrada. As árvores iniciais para a pesquisa heurística foram obtidas automaticamente aplicando algoritmos de Neighbor-Join e BioNJ a uma matriz de distâncias entre pares estimadas usando a abordagem MVI (*Maximum Composite Likelihood*). Esta análise envolveu 58 sequências nucleotídicas. Análises evolutivas foram realizadas no MEGA X (Kumar *et al.*, 2018). As principais linhagens são evidenciadas e nomeadas. As cepas encontradas neste estudo estão agrupadas no clado ***Europe/South America* 1** (destaque em azul) e estão destacadas em negrito. A cepas vacinais estão agrupadas no clado ***America 1***, distante filogeneticamente das cepas descritas no presente estudo.

```
----|----| ----|----| ----|----| ----|----| ----|----|
        10         20         30         40         50
MLPYQDKVGA FYKDNARANS TKLSLVTEGH GGRRPPYLLF VLLILLVGIL   cepa Onderstepoort
----|----| ----|----| ----|----| ----|----| ----|----|
        10         20         30         40         50
MLSYQDKVGA FYKDNARANS SKLSLVTEEQ GGRRPPYLLF VLLILLVGIM   A2/BH
----|----| ----|----| ----|----| ----|----| ----|----|
        10         20         30         40         50
MLSYQDKVGA FYKDNARANS SKLSLVTEEQ GGRRPPYLLF VLLILLVGIM   A5/REC
----|----| ----|----| ----|----| ----|----| ----|----|
        10         20         30         40         50
MLSYQDKVGA FYKDNARANS SKLSLVTEEQ GGRRPPYLLF VLLILLVGIM   A8/REC
----|----| ----|----| ----|----| ----|----| ----|----|
        10         20         30         40         50
MLSYQDKVGA FYKDNARANS SKLSLVTEEQ GGRRPPYLLF VLLILLVGIM   A10/REC
----|----| ----|----| ----|----| ----|----| ----|----|
        10         20         30         40         50
MLSYQDKVGA FYKDNARANS SKLSLVTEEQ GGRRPPYLLF VLLILLVGIM   A16/REC

----|----| ----|----| ----|----| ----|----| ----|----|
        160        170        180        190        200
TNYCESIGIR KAIASAANPI LLSALSGGRG DIFPPHRCSG ATTSVGKVFP   cepa Onderstepoort
----|----| ----|----| ----|----| ----|----| ----|----|
        160        170        180        190        200
TNYCDTIGIR KSIASAANPI LLSALSGGRG DIFPPYRCSG ATTSVGRVFP   A2/BH
----|----| ----|----| ----|----| ----|----| ----|----|
   160        170        180        190        200
TNYCDTIGIR KSIASAANPI LLSALSGGRG DIFPPYKCNG ATTSVGRVYP   A5/REC
----|----| ----|----| ----|----| ----|----| ----|----|
        160        170        180        190        200
TNYCDTIGIR KSIASAANPI LLSALSGGRG DIFPPYKCSG ATTSVGRVYP   A8/REC
----|----| ----|----| ----|----| ----|----| ----|----|
        160        170        180        190        200
TNYCDTIGIR KSIASAANPI LLSALSGGRG DIFPPYKCSG ATTSVGRVYP   A10/REC
----|----| ----|----| ----|----| ----|----| ----|----|
        160        170        180        190        200
TNYCDTIGIR KSIASAANPI LLSALSGGRG DIFPPYKCSG ATTSVGRVYP   A16/REC

----|----| ----|----| ----|----| ----|----| ----|----|
        510        520        530        540        550
DRDVLIESNI VVLPTQSIRY VIATYDISRS DHAIVYYVYD PIRTISYTHP   cepa Onderstepoort
----|----| ----|----| ----|----| ----|----| ----|----|
        510        520        530        540        550
DKDVLTESNL VVLPTQNFRY VIATYDISRG DHAIVYYVYD PIRTISYTYP   A2/BH
----|----| ----|----| ----|----| ----|----| ----|----|
        510        520        530        540        550
DKDVLTESNL VVLPTQNFRY VIATYDISRG DHAIVYYVYD PIRTISYTYP   A5/REC
----|----| ----|----| ----|----| ----|----| ----|----|
        510        520        530        540        550
DKDVLTESNL VVLPTQNFRY VIATYDISRG DHAIVYYVYD PIRTISYTYP   A8/REC
----|----| ----|----| ----|----| ----|----| ----|----|
        510        520        530        540        550
DKDVLTESNL VVLPTQNFRY VIATYDISRG DHAIVYYVYD PIRTISYTYP   A10/REC
----|----| ----|----| ----|----| ----|----| ----|----|
        510        520        530        540        550
DKDVLTESNL VVLPTQNFRY VIATYDISRG DHAIVYYVYD PIRTISYTYP   A16/REC

----|----| ----|----| ----|----| ----|----| ----|----| ----|
        560        570        580        590        600
FRLTTKGRPD FLRIECFVWD DNLWCHQFYR FEADIANSTT SVENLVRIRF SCNR   cepa Onderstepoort
----|----| ----|----| ----|----| ----|----| ----|----| ----|
        560        570        580        590        600
FRLTTKGRPD FLRIECFVWD DDLWCHQFYR FEADITNSTT SVENLVRIRF SCNR   A2/BH
----|----| ----|----| ----|----| ----|----| ----|----| ----|
        560        570        580        590        600
FRLTTKGRPG FLRIECFVWD DDLWCHQFYQ FEADITNSTT SVENLVRIRF SCNR   A5/REC
----|----| ----|----| ----|----| ----|----| ----|----| ----|
        560        570        580        590        600
FRLTTKGRPD FLRIECFVWD DDLWCHQFYQ FEADITNSTT SVENLVRIRF SCNR   A8/REC
----|----| ----|----| ----|----| ----|----| ----|----| ----|
        560        570        580        590        600
FRLTTKGRPD FLRIECFVWD DDLWCHQFYQ FEADITNSTT SVENLVRIRF SCNR   A10/REC
----|----| ----|----| ----|----| ----|----| ----|----| ----|
        560        570        580        590        600
FRLTTKGRPD FLRIECFVWD DDLWCHQFYQ FEADITNSTT SVENLVRIRF SCNR   A16/REC
```

Figura 5- Análise de polimorfismos nos isolados de interesse e na cepa vacinal Onderstepoort (acesso: EU143737).

As sequências de aminoácidos obtidas a partir dos isolados encontrados foram alinhadas juntamente com a cepa vacinal Onderstepoort a fim de analisar os principais polimorfismos descritos em literatura. As posições 29, 178, 530, 549, 580, 603 foram analisadas e destacadas em vermelho.

```
MLPYQDKVGAFYKDNARANSTKLSLVTEGHGGRRPPYLLFVLLILLVGILALLAITGVRFHQVSTSNMEFSRLLKEDMEK 80 cepa Onderstepoort
..................N..................................................................80
MLSYQDKVGAFYKDNARANSSKLSLVTEEQGGRRPPYLLFVLLILLVGIMTLLAITGVRFHQVSTSNTEFSRLLKEDMEK 80 A2/BH
..................N..................................................................80
MLSYQDKVGAFYKDNARANSSKLSLVTEEQGGRRPPYLLFVLLILLVGIMTLLAITGVRFHQVSTSNMEFSRLLKEDMEK 80 A5/REC
..................N..................................................................80
MLSYQDKVGAFYKDNARANSSKLSLVTEEQGGRRPPYLLFVLLILLVGIMTLLAITGVRFHQVSTSNMEFNRLLKEDMEK 80 A8/REC
..................N..................................................................80
MLSYQDKVGAFYKDNARANSSKLSLVTEEQGGRRPPYLLFVLLILLVGIMTLLAITGVRFHQVSTSNMEFSRLLKEDMEK 80 A10/REC
..................N..................................................................80
MLSYQDKVGAFYKDNARANSSKLSLVTEEQGGRRPPYLLFVLLILLVGIMTLLAITGVRFHQVSTSNMEFNRLLKEDMEK 80 A16/REC
..................N..................................................................80

SEAVHHQVIDVLTPLFKIIGDEIGLRLPQKLNEIKQFILQKTNFFNPNREFDFRDLHWCINPPSTVKVNITNYCESIGIR 160 cepa Onderstepoort
.......................................................................N...........160
SEAVHHQVIDVLTPLFKIIGDEVGLRLPQKLNEIKQFILQKTNFFNPNREFDFRDLHWCINPPSKIKVNITNYCDTIGIR 160 A2/BH
.......................................................................N...........160
SEAVHHQVIDVLTPLFKIIGDEVGLRLPQKLNEIKQFILQKTNFFNPNREFDFRDLHWCINPPSKIKVNITNYCDTIGIR 160 A5/REC
.......................................................................N...........160
SEAVHHQVIDVLTPLFKIIGDEVGLRLPQKLNEIKQFILQKTNFFNPNREFDFRDLHWCINPPSKIKVNITNYCDTIGIR 160 A8/REC
.......................................................................N...........160
SEAVHHQVIDVLTPLFKIIGDEVGLRLPQKLNEIKQFILQKTNFFNPNREFDFRDLHWCINPPSKIKVNITNYCDTIGIR 160 A10/REC
.......................................................................N...........160
SEAVHHQVIDVLTPLFKIIGDEVGLRLPQKLNEIKQFILQKTNFFNPNREFDFRDLHWCINPPSKIKVNITNYCDTIGIR 160 A16/REC
.......................................................................N...........160

GEFDTQKIRVFEIGFIKRWLNNMPLLQTTNYMVLPENSKAKVCTIAVGELMLASLCVDESTVSLYHDSNGSQDGILVVTL 320 cepa Onderstepoort
.......................................................................N...........320
EEYDTQKIRVFEIGFIKRWLNNMPLLQTTNYMVLPENSKAKVCTIAVGELTLASLCVDESTVSLYHDSNGSQDGILVVTL 320 A2/BH
.......................................................................N...........320
EEYDTQKIRVFEIGFTKRWLNNMPLLQTTNYMVLPENSKAKVCTIAVGELMLASLCVAESTVSLYHDSNGSQDGILVVTL 320 A5/REC
.......................................................................N...........320
EEYDTQKIRVFEIGFIKRWLNNMPLLQTTNYMVLPENSKAKVCTIAVGELTLASLCVDESTVSLYHDSNGSQDGILVVTL 320 A8/REC
.......................................................................N...........320
EEYDTQKIRVFEIGFIKRWLNNMPLLQTTNYMVLPENSKAKVCTIAVGELMLASLCVADSTVSLYHDSNGSQDGILVVTL 320 A10/REC
.......................................................................N...........320
EEYDTQKIRVFEIGFIKRWLNNMPLLQTTNYMVLPENSKAKVCTIAVGELTLASLCVAESTVSLYHDSNGSQDGILVVTL 320 A16/REC
.......................................................................N...........320

GIFGATPMDQVEKVIPVAHPSVEKIHITNHRGFIKDSIATWMVPALVFEKQEEQKNCLESACQRKTYPMCNQTSWEPFGG 400 A2/BH
.......................................................................N.........400
GIFGATSMDQVEEVIPVSHPLVEKIHITNHRGFIKDSIATWMVPALISEKQEEQKNCLESACQRKTYPMCNQTSWEPFGG 400 A5/REC
.......................................................................N.........400
GIFGATPMNQVEEVIPVAHSSVEKIHITNHRGFIKDSIATWMVPALISEKQEEQKNCLESACQRKTYPMCNQTSWEPFGG 400 A8/REC
.......................................................................N.........400
GIFGATPMNQVEEVIPVAHPSVEKIHITNHRGFIKDSIATWMVPALVFEKQEEQKNCLESACQRKTYPMCNQTSWEPFGG 400 A10/REC
.......................................................................N.........400
GIFGATPMNQVEEVIPVAHSSVEKIHITSHRGFIKDSIATWMVPALISEKQEEQKNCLESACQRKTYPMCNQTSWEPFGG 400 A16/REC
.......................................................................N.........400
```

Figura 6- Alinhamento das sequências de aminoácidos deduzidas da proteína H de estirpes de tipo selvagem e de vacina de CDV e predições de sítios de N-glicosilação.

Abreviatura para as sequências: cepa vacinal Onderstepoort (acesso: EU143737); **A5/MG**: isolado proveniente de um cão doméstico da cidade de Belo Horizonte, estado de Minas Gerais; **A5/PE**, **A8/PE**, **A10/PE**, **A16/PE**: isolados proveniente de cães domésticos da cidade do Recife, estado de Pernambuco. As sequências Asn-X-Ser/Thr estão destacadas em azul. As Asparaginas (N) com previsão de serem glicosiladas estão destacadas em vermelho e selecionadas na imagem.

4- Discussão

A cinomose canina enquadra-se como uma das enfermidades virais de maior relevância em cães brasileiros (Headley *et al*., 2012; Rosa *et al*., 2012). Estudos recentes sugerem o aumento da atuação do CDV mundialmente, com foco especial para os casos relatados na América do Sul (Calderon *et al*., 2007; Panzera *et al*., 2012; Espinal *et al*., 2014; Sarute *et al*., 2014; Fischer *et al*., 2016). Estudos anteriores apresentam alta frequência de detecção da enfermidade em cães sintomáticos no Brasil (Headley *et al.*, 2012; Fischer *et al*., 2016). Dentre o grupo de animais positivos para CDV estudados por Fischer *et al*., 2016, 19% tinham sido submetidos a um esquema vacinal, endossando outros estudos de surtos de CDV em animais vacinados (Norris *et al.*, 2006; Simon-Martinez *et al.*, 2008) e por conseguinte, colocando em pauta as possíveis causas que levam às falhas vacinais na atualidade, no qual uma questões discutidas deve-se a grande variabilidade genética entre as cepas do CDV.

Ao analisar as relações filogenéticas baseadas no alinhamento de nucleotídeos entre as cepas descritas no presente estudo, baseada em um segmento de 1824pb do gene H, e as sequências do CDV armazenadas no Genbank, observou-se que as novas cepas descritas agruparam-se ao clado denominado Europa/América do Sul-1 (EU1 / SA1).

Foi sugerido que existem três linhagens do vírus circulantes entre os países da América no Sul, onde anteriormente eram descritas apenas duas linhagens (Espinal *et al*., 2014; Sarute *et al*., 2014). As linhagens descritas envolvem o clado denominado Europa/América do Sul-1, onde pôde ser estimado que as cepas de CDV foram introduzidas na Europa através da Itália dando sequência a sua expansão e espalhando-se pelo continente e pela América do Sul, e supõem-se que a entrada do ancestral italiano na América do Sul tenha se dado pelo Brasil, e em seguida disseminou-se pelo Uruguai e Argentina (Panzera *et al*., 2012; Budaszewski Rda *et al*., 2014). Um segundo clado identificado em carnívoros selvagens e domésticos da Argentina, é chamado de América do Sul-2 (Panzera *et al*., 2012) e o último clado que

envolve cepas identificadas na Colômbia, chamado de América do Sul- 3, descrito por Sarute *et al*. (2014) e Espinal *et al*. (2014).

Estudos de filogenia envolvendo cepas isoladas no Brasil relatam que as cepas descritas pertencem ao clado Europa/América do Sul-1 (EU1 / SA1) (Rosa *et al*., 2012; Budaszewski Rda *et al*., 2014; Cortez *et al*., 2017), corroborando com os dados obtidos no presente estudo. As cepas de CDV brasileiras analisadas são geneticamente relacionadas ás cepas que circulam no Uruguai, na Argentina e na Europa, e não foram encontradas relações com as linhagem sul-americanas 2 e 3, também observado por Cortez *et al*. (2017).

No Brasil, alguns estudos filogenéticos pregressos são baseados em análises de sequências parciais do gene N, uma vez que ocorre uma menor variabilidade genética entre os isolados quando comparado com o gene H, o que é justificado pelo fato de o gene N fazer parte da região mais conservada do genoma do CDV (Headley *et al.*, 2012). Entretanto, estudos envolvendo a inferência do gene H levam a análises mais robustas, uma vez que essa glicoproteína está sob constante pressão evolutiva, ocasionando frequentes mutações que ocorrem de forma natural (Pardo *et al*., 2005; Martella *et al*., 2006). Em nosso estudo, utilizamos as análises do gene N e do gene H, funcionando a primeira como uma forma de selecionar amostras positivas para o CDV, uma vez que esse gene tem maior conservação e é mais viável de torna-lo alvo na RT-PCR. Já a análise baseada na inferência do gene H foi utilizada para uma avaliação da variabilidade desse gene na população de cães naturalmente infectados no Brasil, além de permitir que se realize um paralelo envolvendo as novas cepas descritas com as cepas vacinais.

Embora não tenha sido possível uma avaliação do perfil clínico dos animais nos quais as amostras clínicas analisadas foram originadas, uma vez que o presente estudo contou com a doação das amostras a partir de um banco de amostras, pertencentes ao Tecsa Laboratórios, outros estudos apresentam considerável divergência antigênica entre as cepas de campo e as cepas de vacinas (Hashimoto *et al*., 2001), levantando questões no que concerne a cobertura vacinal e a indução de anticorpos neutralizantes oferecidos pelas formulações vacinais comerciais, sugerindo a necessidade da elaboração de uma formulação vacinal do CDV atualizada. (Anis *et al*., 2018).

As cepas do CDV apresentadas neste estudo apresentaram-se em um grupo distinto do clado composto pelas cepas vacinais (América-1), corroborando com estudos anteriores (Martella *et al*., 2006; Panzera *et al*., 2012; Rosa *et al*., 2012; Negrao *et al*., 2013; Cortez *et al*., 2017; Anis et al., 2018), sugerindo uma evolução de forma distinta entre as cepas de campo e as cepas vacinais, por conta de divergências nas pressões de seleção das diferentes populações virais (Cortez *et al*., 2017).

Após a análise dos aminoácidos gerados a partir do gene H das cepas descritas, foi possível analisar a presença de polimorfismos já descritos na literatura e realizar a predição de sítios de N-glicosilação nas sequências. Mccarthy *et al.* (2007) descreveram uma mutação na posição Y549H, relacionado à adaptação do vírus a hospedeiros. Cães domésticos e canídeos selvagens são mais comumente acometidos com cepas 549Y, enquanto que as cepas 549H são mais comumente descritas em hospedeiros não canídeos (Mccarthy *et al.*, 2007; Nikolin *et al*., 2012), embora Lunardi *et al.* (2018) tenham descrito uma infecção ativa do CDV em *Tamandua tetradactyla* onde não foi observado tal polimorfismo. Em nosso estudo, observamos que a posição 549 das novas sequências descritas continha uma Tirosina (Y), e ao realizarmos o paralelo com a cepa vacinal Onderstepoort (GenBank: EU143737), observamos que havia uma Histidina (H), típica de hospedeiros não canídeos. Fischer *et al*. (2016), relataram alta taxa da frequência de 549Y em cães infectados no Brasil.

A troca de aminoácidos R580Q do gene H é considerada incomum *in vivo* e estudos associam essa permuta como sendo eventualmente prejudicial na capacidade da fusão e expressão de superfície da proteína de ligação *in vitro* (Sattler *et al*., 2014). Um recente estudo demonstrou que esta substituição tem elevada prevalência entre os isolados de CDV de cães infectados na região Sul do Brasil e em outras cepas inclusas na linhagem EU / SA1 (Fischer *et al*., 2016). O gene H de quatro dos cinco isolados descritos no presente estudo (amostras provenientes de Pernambuco) apresentou a Glutamina (Q) na região 580, comprovando os dados apresentados por Fischer *et al*., 2016. No entanto, o isolado H_CDV_A2_MG apresenta a Arginina (R) típica da

região, bem como a cepa vacinal Onderstepoort (GenBank: EU143737), aqui utilizada para fins comparativos.

Outra mutação importante descrita na literatura é na posição 530, onde pode haver substituições G/E530/R/D/N. A substituição nesta posição está relacionada ao receptor SLAM, que envolve a ligação entre novos hospedeiros não canídeos. Um estudo realizado por Mccarthy *et al.* (2007) concluiu que as cepas isoladas de cães domésticos em todo o mundo têm majoritariamente uma Glicina (G) ou Glutamato (E) nessa região. Nos isolados descritos, foram observados nesta posição a Glicina (G), em acordo com o estudo realizado onde cepas analisadas de cães infectados de diversas áreas do Brasil apresentaram um G na região 530, atestando este achado com CDV circulando em populações de cães no Brasil (Fischer *et al*., 2016). A ocorrência de polimorfismos genéticos específicos neste resíduo do gene H foi ligada à emergência da doença em uma série de novos hospedeiros. A presença do resíduo S (Serina) na região 530 é descrito como incomum em populações de cães domésticos, canídeos selvagens e hospedeiros não canídeos, mundialmente. Entretanto, esta substituição é descrita em algumas sequências vacinais, como pode ser observado no presente estudo através da cepa vacinal Onderstepoort (GenBank: EU143737) (Nikolin *et al.,* 2012).

Outras substituições de aminoácidos descritas nas posições 29 (E29D), 178 (G178S) e 603 (D603H/S) do gene H do CDV, remetidas à ligação aos hospedeiros (Mccarthy *et al.,* 2007), não foram detectadas nos isolados descritos. A substituição descrita por Zhao *et al.* (2014) na posição 542 (I542N), relacionada com o aumento da virulência das cepas, não foi observada.

As mudanças que ocorrem na etapa pós-traducional são fundamentais no papel de muitas proteínas. Os sítios de N-glicosilação, onde são adicionados aos resíduos de Asparagina (N) no retículo endoplasmático na sequência de consenso NXS / T, podendo "X" ser qualquer aminoácido exceto Prolina (P), são importantes para o correto dobramento, transporte e função de glicoproteínas de fusão e fixação (Sawatsky e Von Messling, 2010). No presente estudo, os isolados apresentaram na análise preditiva, cinco prováveis sítios de N-glicosilação, (19-21/ 149-151/ 309-311/ 391-393/ 422-424), também observados por Haas *et al.* (1997), Pardo *et al*. (2005) e Espinal

et al. (2014). Sawatsky e Von Messling (2010) desenvolveram um estudo para esclarecer o papel dos N-glicanos no ciclo de vida do vírus morbillivírus, através de análise mutacional da glicosilação da proteína H do CDV, onde notaram a tolerância à deleção completa dos sítios de N-glicosilação da proteína, sem se tornar afuncional, porém completamente atenuadas *in vivo*. O estudo sugere ainda que a estirpe da vacina Onderstepoort pode ter perdido vários locais de N-glicosilação durante o processo de atenuação, onde pode ser confirmada tal informação baseado na análise preditiva de sítios de N-glicosilação da cepa vacinal Onderstepoort (GenBank: EU143737) utilizada em nosso estudo.

Conclusão

Os dados apresentados no presente estudo expandem os estudos filogenéticos na América do Sul, com foco especial para as regiões contempladas nesta pesquisa, onde ainda não haviam sido descritos registros da análise do gene H do CDV. O presente estudo fortalece os achados prévios de que as cepas brasileiras são inseridas no clado Europa/ América do sul-1, além de se apresentarem em um clado distante das cepas vacinais, impulsionando estudos para a elaboração de uma formulação vacinal do CDV atualizada e com proteção de maior abrangência, possivelmente reduzindo a incidência e consequentemente o caráter endêmico da doença.

Agradecimentos

Este estudo foi apoiado pela Universidade Federal Rural de Pernambuco, Instituto Aggeu Magalhães (IAM/PE), Tecsa Laboratórios e suporte financeiro da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES).

Referências

Anis,E., Holford, A.L., Galyon, G.D., Wilkes,R.P . Jun 2018. Antigenic analysis of genetic variants of Canine distemper virus. Vet Microbiol, v. 219, p. 154-160, ISSN 1873-2542 (Electronic) 0378-1135 (Linking). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29778189 >.

Budaszewski Rda.F. Pinto, L.D., Weber, N.M., Caldart, E.T., C.D. Alves, Martella, V., Ikuta, N., Lunge, V.R., Canal, C.W. 2014. Genotyping of canine distemper virus strains circulating in Brazil from 2008 to 2012. Virus Res, v. 180, p. 76-83. ISSN 1872-7492 (Electronic)

0168-1702 (Linking). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24370870 >.

Butina, T.V., Denikina, N.N., Belikov, S. I. 2010. Canine distemper virus diversity in Lake Baikal seal (Phoca sibirica) population. Vet Microbiol, v. 144, n. 1-2, p. 192-7. ISSN 1873-2542 (Electronic)

0378-1135 (Linking). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20083361 >.

Calderon, M. G., Remorini, P., Periolo, ó., Iglesias, H., Mattion, N., La Torre, J. 2007. Detection by RT-PCR and genetic characterization of canine distemper virus from vaccinated and non-vaccinated dogs in Argentina. Vet Microbiol, v. 125, n. 3-4, p. 341-9. ISSN 0378-1135 (Print)

0378-1135 (Linking). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17628358 >.

Cortez, A., Heinemann, M.B., Fonseca Junior, A.A., Costa, L.F., Souza, V.A.F., Jane Megid, J. 2017. Genetic characterization of the haemagglutinin gene in canine distemper virus strains from naturally infected dogs in Brazil. Braz. J. Vet. Res. Anim. Sci, v. 54, n. 4, p. 445-449. ISSN 1678-4456.

Cottrell, W. O., Keel, M.K. , Brooks, J.W. , DG , Mead , Phillips, J.E. 2013. First report of clinical disease associated with canine distemper virus infection in a wild black bear (*Ursus americana*). J Wildl Dis, v. 49, n. 4, p. 1024-7. ISSN 1943-3700 (Electronic)

0090-3558 (Linking). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24502734 >.

Espinal, M. A.; Diaz, F. J.; Ruiz-Saenz, J. 2014. Phylogenetic evidence of a new canine distemper virus lineage among domestic dogs in Colombia, South America. Vet Microbiol, v. 172, n. 1-2, p. 168-76. ISSN 1873-2542 (Electronic)

0378-1135 (Linking). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24950886 >.

Felsenstein, J. Confidence Limits on Phylogenies: An Approach Using the Bootstrap. Evolution, v. 39, n. 4, p. 783-791, Jul 1985. ISSN 1558-5646 (Electronic)

0014-3820 (Linking). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28561359 >.

Feng, N., Yu, Y. , Wang, T. , Wilker, P., Wang, J., Li, Y. , Dom, Z., Gao, Y., Xia, X . 2016. Fatal canine distemper virus infection of giant pandas in China. Sci Rep, v. 6, p. 27518ISSN 2045-2322 (Electronic)

2045-2322 (Linking). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27310722 >.

Fischer, C. D. B., Gräf, T. , Ikuta, N., Lehmann, F.K.M., Passos, D.T., Makiejczuk, U.m., Silveira, M.A.T Jr , Fonseca, A.S.K. , Canal, C.W. 2016. Lunge VR Phylogenetic analysis of canine distemper virus in South America clade 1 reveals unique molecular signatures of the local epidemic. Infect Genet Evol, v. 41, p. 135-14. ISSN 1567-7257 (Electronic)

1567-1348 (Linking). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27060756 >.

Frisk, A. L. König, H. , Moritz, U.m. , Baumgärtner, W. 1999. Detection of canine distemper virus nucleoprotein RNA by reverse transcription-PCR using serum, whole blood, and cerebrospinal fluid from dogs with distemper. J Clin Microbiol, v. 37, n. 11, p. 3634-43. ISSN 0095-1137 (Print)

0095-1137 (Linking). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10523566 >.

Gamiz, C., Martella, V., Ulloa, R., Fajardo, R. , Quijano Hernandez, I., Martinez, S. 2011. Identification of a new genotype of canine distemper virus circulating in America. Vet Res Commun, v. 35, n. 6, p. 381-90. ISSN 1573-7446 (Electronic)

0165-7380 (Linking). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21713437 >.

Gupta, R., Jung, E., Brunak, S. Prediction of N-glycosylation sites in human protein. In preparation, 2004. Disponivel em: < http://www.cbs.dtu.dk/services/NetNGlyc/>

Haas, L., Martens, W. , Greiser-Wilke, I. , Mamaev, G. T., Maack, D. , Barrett, T. 1997. Analysis of the haemagglutinin gene of current wild-type canine distemper virus isolates from Germany. Virus Res, v. 48, n. 2, p. 165-71, May 1997. ISSN 0168-1702 (Print)

0168-1702 (Linking). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9175255 >.

Hashimoto, M.; Une, Y.; Mochizuki, M. 2001.Hemagglutinin genotype profiles of canine distemper virus from domestic dogs in Japan. Arch Virol, v. 146, n. 1, p. 149-55. ISSN 0304-8608 (Print)

0304-8608 (Linking). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11266208 >.

Headley, S. A.,Amude, A.M., Alfieri, A.F., Bracarense, A.P.F.R.L, Alfieri, A.A. 2012. Aspectos epidemiológicos e as manifestações neuropatológicas associadas à infecção pelo vírus da cinomose canina no Brasil: uma revisão. Semina: Ciências Agrárias. Londrina - PR: . 33: 1978 p.

Katoh, K.; Rozewicki, J.; Yamada, K. D. MAFFT online service: multiple sequence alignment, interactive sequence choice and visualization. Brief Bioinform, Sep 6 2017. ISSN 1477-4054 (Electronic)

1467-5463 (Linking). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28968734 >.

Kim, Y. H., K.W, Cho , Youn, H.Y., Yoo, H.S., Han, H.R. 2001. Detection of canine distemper virus (CDV) through one step RT-PCR combined with nested PCR. J Vet Sci, v. 2, n. 1, p. 59-63. ISSN 1229-845X (Print)

1229-845X (Linking). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14614296 >.

Kimura, M. A simple method for estimating evolutionary rates of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. J Mol Evol, v. 16, n. 2, p. 111-20, Dec 1980. ISSN 0022-2844 (Print)

0022-2844 (Linking). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7463489 >.

Kuiken, Kennedy S., Barrett, T., Van de Bildt, M.W., Borgsteede, F.H., Brew, S.D., Codd, G.A., Pato,C., Deaville, R., Eybatov, T., Forsyth, M.A., Foster, G., D.P. de Jepson , Kydyrmanov, A. , Mitrofanov, I., Ward, C.J., Wilson, S., Osterhaus, A.D. 2006. The 2000 canine distemper epidemic in Caspian seals (Phoca caspica): pathology and analysis of contributory factors. Vet Pathol, v. 43, n. 3, p. 321-38. ISSN 0300-9858 (Print)

0300-9858 (Linking). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16672579 >.

Kumar, S., Stecher, G. , Li, M. , Knyaz, C., Tamura, K. 2018. MEGA X: Molecular Evolutionary Genetics Analysis across Computing Platforms. **Mol Biol Evol,** v. 35, n. 6, p. 1547-1549, Jun 1 2018. ISSN 1537-1719 (Electronic)

0737-4038 (Linking). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29722887 >.

Norris, J. M. , Krockenberger, M.B., Baird, A.A., Knudsen, G. Canine distemper: re-emergence of an old enemy. **Aust Vet J,** v. 84, n. 10, p. 362-3, Oct 2006. ISSN 0005-0423 (Print)

0005-0423 (Linking). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17359474 >.

Lee, M. S. Tsai, K.J. , Chen, L.H., Chen, C.Y., Liu, Y.P., Chang, C.C., Lee, S.H., Hsu, W.L. 2010. The identification of frequent variations in the fusion protein of canine distemper virus. Vet J, v. 183, n. 2, p. 184-90. ISSN 1532-2971 (Electronic)

1090-0233 (Linking). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19010700 >.

Lunardi, M. Darold, G.M., Amude, A.M., Headley, S.A. , Sonne, L., Yamauchi, K.C.I., Boabaid, F.M., Alfieri, A.F., Alfieri, A.A. 2018. Canine distemper virus active infection in order Pilosa, family Myrmecophagidae, species Tamandua tetradactyla. Vet Microbiol, v. 220, p. 7-11. ISSN 1873-2542 (Electronic)

0378-1135 (Linking). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29885804 >.

Martella, V., Blixenkrone-Moller, H., Elia, G. , Lucente, M.S., Cirone, F., Decaro, N., Nielsen, G., Bányai, K. , Carmichael, L.E., Buonavoglia, C. 2011. Lights and shades on an historical vaccine canine distemper virus, the Rockborn strain. Vaccine, v. 29, n. 6, p. 1222-7. ISSN 1873-2518 (Electronic)

0264-410X (Linking). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21167117 >.

Martella, V. Cirone, F., Elia, G., Lorusso, E., Decaro, N., Campolo, H. , DeSario, C., Lucente, M.S., Bellacicco, A.L., Blixenkrone-Moller, H., Carmichael, L.E., Buonavoglia, C. 2006. Heterogeneity within the hemagglutinin genes of canine distemper virus (CDV) strains detected in Italy. Vet Microbiol, v. 116, n. 4, p. 301-9, Sep 10 2006. ISSN 0378-1135 (Print)

0378-1135 (Linking). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16730927 >.

Mccarthy, A. J.; Shaw, M. A.; Goodman, S. J. 2007. Pathogen evolution and disease emergence in carnivores. Proc Biol Sci, v. 274, n. 1629, p. 3165-74. ISSN 0962-8452 (Print)

0962-8452 (Linking). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17956850 >.

Negrao, F. J. , Gardinali, N.R., Headley, S.A., Alfieri, A.A., Fernandez, M.A., Alfieri, A. 2013. Phylogenetic analyses of the hemagglutinin gene of wild-type strains of canine distemper virus in southern Brazil. Genet Mol Res, v. 12, n. 3, p. 2549-55, Jul 24 2013. ISSN 1676-5680 (Electronic)

1676-5680 (Linking). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23546971 >.

Nikolin, V.M., Wibbelt, G., Michler, F.U., Wolf, P., M.L. Leste. 2012. Susceptibility of carnivore hosts to strains of canine distemper virus from distinct genetic lineages. Vet Microbiol, v. 156, n. 1-2, p. 45-53. ISSN 1873-2542 (Electronic)

0378-1135 (Linking). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22024346 >.

Panzera, Y. Calderón, M.G., Sartre, N., Guasco, S., Cardeillac, A., B, Bonilla, M, Hernández , Francia, L. , Bedó, G. , La Torre, J., R., Pérez. 2012. Evidence of two co-circulating genetic lineages of canine distemper virus in South America. Virus Res, v. 163, n. 1, p. 401-4. ISSN 1872-7492 (Electronic)

0168-1702 (Linking). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22036731 >.

Pardo, I. D.; Johnson, G. C.; Kleiboeker, S. B. 2005. Phylogenetic characterization of canine distemper viruses detected in naturally infected dogs in North America. J Clin Microbiol, v. 43, n. 10, p. 5009-17. ISSN 0095-1137 (Print)

0095-1137 (Linking). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16207955 >.

Qiu, W. Zheng, Y., Zhang, S., Fan, Q., Liu, H., Zhang, F., Wang, W., Liao, G. , Hu, R. 2011. Canine distemper outbreak in rhesus monkeys, China. Emerg Infect Dis, v. 17, n. 8, p. 1541-3. ISSN 1080-6059 (Electronic)

1080-6040 (Linking). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21801646 >.

Rosa, G. N. Domingues, H.N., dos Santos, M.M.V.Ap.B., Felippe, P.A.N., Spilki, F.R., Arns, C.W. 2012. Detecção molecular e análise filogenética do gene H de amostras do vírus da cinomose canina em circulação no município de Campinas, São Paulo. Pesquisa Veterinária Brasileira, v. 32. ISSN 0100-736X.

Sakai, K. Nagata N., Ami, Y. , Seki, M., Suzaki, Y., Iwata-Yoshikawa, N., Suzuki, T., Fukushi, S., Mizutani, T., Yoshikawa, T., Otsuki, N., Kurane, I., Komase, K., Yamaguchi, R., Hasegawa H., Saijo, M., Takeda, M., Morikawa, S. 2013. Lethal canine distemper virus outbreak in cynomolgus monkeys in Japan in 2008. J Virol, v. 87, n. 2, p. 1105-14. ISSN 1098-5514 (Electronic)

0022-538X (Linking). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23135729 >.

Sarute, N., Pérez, R. , Aldaz, J. , Alfieri, A.A., Alfieri, A.F., Nome, D., Llanes, J., Hernández, H., Francia, G., Panzera, Y. 2014.Molecular typing of canine distemper virus strains reveals the presence of a new genetic variant in South America. Virus Genes, v. 48, n. 3, p. 474-8. ISSN 1572-994X (Electronic)

0920-8569 (Linking). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24647552 >.

Sattler, U., Khosravi M., Avila, M., Pilo P., Langedijk, J.P., Ader-Ebert, N., Alves, L.A., Plattet, P., Origgi, F.C. 2014. Identification of amino acid substitutions with compensational effects in the attachment protein of canine distemper virus. J Virol, v. 88, n. 14, p. 8057-64. ISSN 1098-5514 (Electronic)

0022-538X (Linking). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24807725 >.

Sawatsky, B.; von Messling, V. 2010. Canine distemper viruses expressing a hemagglutinin without N-glycans lose virulence but retain immunosuppression. J Virol, v. 84, n. 6, p. 2753-61. ISSN 1098-5514 (Electronic)

0022-538X (Linking). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20042514 >.

Simon-Martinez, J., Ulloa-Arvizu, R., Soriano, V.E., Fajardo, R. 2008. Identification of a genetic variant of canine distemper virus from clinical cases in two vaccinated dogs in Mexico. **Vet J,** v. 175, n. 3, p. 423-6, Mar 2008. ISSN 1090-0233 (Print)

1090-0233 (Linking). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17382567 >.

von Messling, V. Zimmer, G., Herrler, G., Haas, L., Cattaneo, R. 2001. The hemagglutinin of canine distemper virus determines tropism and cytopathogenicity. J Virol, v. 75, n. 14, p. 6418-27. ISSN 0022-538X (Print)

0022-538X (Linking). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11413309 >.

Woo, P. C., Lau, S.K., Wong, B.H., Fan, R.Y., A.Y., Wong , Zhang, A.J., Y, Wu, Choi, G.K., K.S.,Li , Hui, J., M., Wang, Zheng, B.J., K.H., Chan , Yuen, K.Y. 2012. Feline morbillivirus, a previously undescribed paramyxovirus associated with tubulointerstitial nephritis in domestic cats. Proc Natl Acad Sci U S A, v. 109, n. 14, p. 5435-40, Apr 3 2012. ISSN 1091-6490 (Electronic)

0027-8424 (Linking). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22431644 >.

Zhao, J., Zhang, H. , Bai, X., Martella, V., Hu, B., Sun, Y., Zhu, C., Zhang, L. , Liu, H., Xu, S., Shao, X., Wu, W., Yan, X. 2014. Emergence of canine distemper virus strains with two amino acid substitutions in the haemagglutinin protein, detected from vaccinated carnivores in North-Eastern China in 2012-2013. Vet J, v. 200, n. 1, p. 191-4. ISSN 1532-2971 (Electronic)

1090-0233 (Linking). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24618397 >.

DISCUSSÃO GERAL

O uso de modelos animais auxilia nos estudos fisiopatológicos de diversos agravos, tornando-se fundamentais para o desenvolvimento e certificação de terapias imunogênicas e de fármacos (De Vries *et al.*, 2017).

Por seus aspectos neuropatológicos e sua semelhança com doenças desmielinizantes como a esclerose múltipla em humanos, o CDV é classificado como um importante modelo de estudo para essa enfermidade (Baumgärtner e Alldinger, 2005; Sips *et al.*, 2007). Além das doenças desmielinizantes, o CDV tem correspondência com o vírus do sarampo, o que caracteriza o furão (*Mustela putorius furo*) infectado com o vírus CDV como um modelo experimental e capaz de expressar sinais clínicos semelhantes à síndrome do vírus do sarampo em humanos (MeV), permitindo a identificação de determinantes de virulência e atenuação (Da Fontoura Budaszewski e Von Messling, 2016) Entretanto, essa infecção resulta em altas taxas de mortalidade desses animais (Von Messling *et al.*, 2003; Von Messling *et al.*, 2004), além de não ser modelo aplicável à pesquisas brasileiras, tendo em vista que não é uma espécie típica de nossa fauna. Um interessante modelo animal para estudos tanto de virulência como de infecções crônicas são os camundongos (Bernard *et al.*, 1983), que podem ser substitutos palpáveis aos furões, uma vez que não costumam sobreviver a infecção experimental. Entretanto, em nosso estudo, não foi possível a realização da adaptação da cepa selvagem, uma vez que os estoques virais não estavam com títulos adequados após algumas passagens em cérebros de camundongos recém-nascidos.

Os estudos mais frequentes de infecção por CDV em modelos animais laçam mão de cepas recombinantes ou clonadas para otimizar a infecção (Von Messling *et al.*, 2003; Takenaka *et al.*, 2016; De Vries *et al.*, 2017). Incluindo cepas com passagens seriadas em ovos embrionados (Morse *et al.*, 1953). Esta talvez seja uma alternativa viável a fim de aumentar as partículas

infectivas virais e porventura, obter êxito no processo neuroadaptativo do CDV em camundongos.

Estudos que se baseiam na inferência do gene H do CDV levam a análises mais robustas (Tan *et al.*, 2011), uma vez que essa glicoproteína está em constante evolução, ocasionando frequentes mutações que ocorrem de forma natural (Bolt *et al.*, 1997; Mochizuki *et al.*, 1999; Pardo *et al.*, 2005; Martella *et al.*, 2006).

Ao analisar filogeneticamente as cepas descritas, com base no alinhamento dos nucleotídeos apresentados, e utilizando outras sequências do CDV armazenadas no Genbank, observou-se que os isolados descritos pertencem ao genogrupo denominado Europa/América do Sul-1 (EU1 / SA1), onde outros estudos envolvendo isolados de diferentes regiões brasileiras apresentam seus isolados como pertencentes ao mesmo clado (Rosa *et al.*, 2012; Budaszewski Rda *et al.*, 2014; Cortez *et al.*, 2017), corroborando com os dados obtidos no presente estudo. As cepas de CDV brasileiras analisadas são ainda geneticamente relacionadas às cepas que circulam no Uruguai, na Argentina e na Europa.

Os isolados do CDV aqui apresentados, se agruparame a um genotipo contrastante ao que as cepas vacinais de referência compõem (América-1), estando em acordo com estudos anteriores (Martella *et al.*, 2006; Panzera *et al.*, 2012; Rosa *et al.*, 2012; Negrao *et al.*, 2013; Cortez *et al.*, 2017; Anis *et al.*, 2018)**,** propondo um processo evolutivo peculiar entre as cepas de campo e as cepas vacinais**,** por conta de divergências nas pressões de seleção em diferentes populações virais (Cortez *et al.*, 2017).

A partir das ORFs da proteína H das novas cepas descritas, foram codificados 607 aminoácidos para cada cepa. Uma vez que as sequências de aminoácidos foram definidas, foi possível analisar a presença de polimorfismos já descritos na literatura e realizar um painel comparativo. Mccarthy *et al.* (2007) descreveram uma substituição de aminoácidos na posição Y549H, relacionado ao receptor SLAM e a adaptação do vírus a hospedeiros não canídeos. Tal mutação não foi observada entre os isolados do presente estudo. Sattler *et al.* (2014) comentam sobre uma importante substituição de aminoácidos que tem efeitos negativos na capacidade da fusão e expressão da

superfície da proteína de ligação em estudos *in vitro*, trata-se de uma troca de Arginina (R) por Glutamina (Q) na região 580 (R580Q), sendo observado e uma de nossas sequências de interesse, a A5/PE e descrito por Fischer *et al.* (2016) como a assinatura das cepas do clado EU/SA-1. Com a obtenção das sequências de aminoácidos, foi possível ainda realizar a predição de terminais de N-glicosilação, onde foi observado que as sequências apresentaram cinco possíveis sítios (19-21/ 149-151/ 309-311/ 391-393/ 422-424), também observados por Haas *et al.* (1997), Pardo *et al.* (2005) e Espinal *et al.* (2014).

CONCLUSÕES

Conclui-se com a compilação de dados aqui apresentados que uma cepa neurotrópica de CDV para camundongos é uma alternativa no auxílio aos estudos de fisiopatológicos não só da cinomose, mas também de enfermidades com aspectos semelhantes ao CDV, fazendo uso de cepas geneticamente modificadas a fim de facilitar o processo adaptativo em uma nova espécie.

Levando em conta a escassez de dados, tem-se a necessidade de mais estudos filogenéticos na América do Sul, uma vez que a descrição genética das cepas de campo do CDV tem sido limitada. O presente estudo contribui para acervos de dados filogenéticos da América Latina, além do ineditismo do estudo, focando em regiões geográficas onde ainda não haviam sido descritos registros da análise filogenética do gene H do CDV. A análise corrobora ainda com os achados prévios de que as cepas brasileiras são inseridas no clado Europa/ América do sul-1, além de estarem filogeneticamente distantes do grupo das cepas vacinais, incentivando a elaboração de um imunógeno do CDV capaz de oferecer maior cobertura vacinal, quando em comparação com as formulações utilizadas atualmente.

REFERÊNCIAS

AMERICAN ANIMAL HOSPITAL ASSOCIATION CANINE VACCINATION TASK, F. et al. 2011 AAHA canine vaccination guidelines. **J Am Anim Hosp Assoc,** v. 47, n. 5, p. 1-42, Sep-Oct 2011. ISSN 1547-3317 (Electronic) 0587-2871 (Linking). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21998907 >.

AMUDE, A. M.; ALFIERI, A. A.; ALFIERI, A. F. Clinicopathological findings in dogs with distemper encephalomyelitis presented without characteristic signs of the disease. **Res Vet Sci,** v. 82, n. 3, p. 416-22, Jun 2007. ISSN 0034-5288 (Print) 0034-5288 (Linking). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17084426 >.

ANIS, E. et al. Antigenic analysis of genetic variants of Canine distemper virus. **Vet Microbiol,** v. 219, p. 154-160, Jun 2018. ISSN 1873-2542 (Electronic) 0378-1135 (Linking). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29778189 >.

APPEL, M. J. et al. Canine distemper epizootic in lions, tigers, and leopards in North America. **J Vet Diagn Invest,** v. 6, n. 3, p. 277-88, Jul 1994. ISSN 1040-6387 (Print) 1040-6387 (Linking). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7948195 >.

APPEL, M. J. G. Canine distemper virus. In: HORZINEK, M. C. (Ed.). **Virus infections of carnivores**. Amsterdam: Elsevier, 1987. p.133-159.

ARNS, C. W. et al. *Paramyxoviridae*. In: FLORES, E. F. (Ed.). **Virologia veterinária: virologia geral e doenças víricas**. 2ª. Santa Maria: Ed. da UFSM: Editora UFSM, 2012. cap. 27, p.1008. ISBN 978-85-7391-179-4.

BARRETT, T. Morbillivirus infections, with special emphasis on morbilliviruses of carnivores. **Vet Microbiol,** v. 69, n. 1-2, p. 3-13, Sep 1 1999. ISSN 0378-1135 (Print) 0378-1135 (Linking). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10515262 >.

BARRETT, T.; RIMA, B. K. Molecular biology of morbillivirus diseases of marine mammals. In: J., P. C. (Ed.). **Molecular and cell biology of marine mammals**. Malabar, FL: Krieger Publishing Company, 2002. p.161–172.

BAUMGÄRTNER, W.; ALLDINGER, S. he Pathogenesis of Canine Distemper Virus Induced Demyelination. In: LAVI, E. E. C., C. S. (Ed.). **Experimental Models of Multiple Sclerosis**. Boston, MA: Springer, 2005. ISBN ISBN 978-0-387-25518-7.

BEINEKE, A. et al. Pathogenesis and immunopathology of systemic and nervous canine distemper. **Vet Immunol Immunopathol,** v. 127, n. 1-2, p. 1-18, Jan 15 2009. ISSN 0165-2427 (Print) 0165-2427 (Linking). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19019458 >.

BERNARD, A.; WILD, T. F.; TRIPIER, M. F. Canine distemper infection in mice: characterization of a neuro-adapted virus strain and its long-term evolution in the mouse. **J Gen Virol,** v. 64 (Pt 7), p. 1571-9, Jul 1983. ISSN 0022-1317 (Print) 0022-1317 (Linking). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6345720 >.

BLIXENKRONE-MOLLER, M. et al. Studies on manifestations of canine distemper virus infection in an urban dog population. **Vet Microbiol,** v. 37, n. 1-2, p. 163-73, Oct 1993. ISSN 0378-1135 (Print) 0378-1135 (Linking). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8296445 >.

BOLT, G. et al. Genetic diversity of the attachment (H) protein gene of current field isolates of canine distemper virus. **J Gen Virol,** v. 78 (Pt 2), p. 367-72, Feb 1997. ISSN 0022-1317 (Print) 0022-1317 (Linking). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9018059 >.

BUDASZEWSKI RDA, F. et al. Genotyping of canine distemper virus strains circulating in Brazil from 2008 to 2012. **Virus Res,** v. 180, p. 76-83, Feb 13 2014. ISSN 1872-7492 (Electronic) 0168-1702 (Linking). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24370870 >.

BUTINA, T. V.; DENIKINA, N. N.; BELIKOV, S. I. Canine distemper virus diversity in Lake Baikal seal (Phoca sibirica) population. **Vet Microbiol,** v. 144, n. 1-2, p. 192-7, Jul 29 2010. ISSN 1873-2542 (Electronic) 0378-1135 (Linking). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20083361 >.

CALDERON, M. G. et al. Detection by RT-PCR and genetic characterization of canine distemper virus from vaccinated and non-vaccinated dogs in Argentina. **Vet Microbiol,** v. 125, n. 3-4, p. 341-9, Dec 15 2007. ISSN 0378-1135 (Print) 0378-1135 (Linking). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17628358 >.

CARVALHO, O. V. et al. Immunopathogenic and neurological mechanisms of canine distemper virus. **Adv Virol,** v. 2012, p. 163860, 2012. ISSN 1687-8647 (Electronic) 1687-8639 (Linking). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23193403 >.

CASTILHO, J. G. et al. Molecular analysis of the N gene of canine distemper virus in dogs in Brazil. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia,** v. 59, p. 654-659, 2007. ISSN 1678-4162.

CHO, H. S.; PARK, N. Y. Detection of canine distemper virus in blood samples by reverse transcription loop-mediated isothermal amplification. **J Vet Med B Infect Dis Vet Public Health,** v. 52, n. 9, p. 410-3, Nov 2005. ISSN 0931-1793 (Print) 0931-1793 (Linking). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16283921 >.

CORTEZ, A. et al. Genetic characterization of the haemagglutinin gene in canine distemper virus strains from naturally infected dogs in Brazil. **Braz. J. Vet. Res. Anim. Sci,** v. 54, n. 4, p. 445-449, 2017. ISSN 1678-4456.

COTTRELL, W. O. et al. First report of clinical disease associated with canine distemper virus infection in a wild black bear (Ursus americana). **J Wildl Dis,** v. 49, n. 4, p. 1024-7, Oct 2013. ISSN 1943-3700 (Electronic) 0090-3558 (Linking). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24502734 >.

DA FONTOURA BUDASZEWSKI, R. et al. Influence of vaccine strains on the evolution of canine distemper virus. **Infect Genet Evol,** v. 41, p. 262-269, Jul 2016. ISSN 1567-7257 (Electronic) 1567-1348 (Linking). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27101783 >.

DA FONTOURA BUDASZEWSKI, R.; VON MESSLING, V. Morbillivirus Experimental Animal Models: Measles Virus Pathogenesis Insights from Canine Distemper Virus. **Viruses,** v. 8, n. 10, Oct 11 2016. ISSN 1999-4915 (Electronic) 1999-4915 (Linking). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27727184 >.

DE SWART, R. L. et al. Predominant infection of CD150+ lymphocytes and dendritic cells during measles virus infection of macaques. **PLoS Pathog,** v. 3, n. 11, p. e178, Nov 2007. ISSN 1553-7374 (Electronic) 1553-7366 (Linking). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18020706 >.

DE VRIES, R. D. et al. Delineating morbillivirus entry, dissemination and airborne transmission by studying in vivo competition of multicolor canine distemper viruses in ferrets. **PLoS Pathog,** v. 13, n. 5, p. e1006371, May 2017. ISSN 1553-7374 (Electronic) 1553-7366 (Linking). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28481926 >.

DEEM, S. L. et al. Canine distemper in terrestrial carnivores: a review. **J Zoo Wildl Med,** v. 31, n. 4, p. 441-51, Dec 2000. ISSN 1042-7260 (Print) 1042-7260 (Linking). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11428391 >.

EK-KOMMONEN, C. et al. Outbreak off canine distemper in vaccinated dogs in Finland. **Vet Rec,** v. 141, n. 15, p. 380-3, Oct 11 1997. ISSN 0042-4900 (Print) 0042-4900 (Linking). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9364705 >.

ELIA, G. et al. Detection of canine distemper virus in dogs by real-time RT-PCR. **J Virol Methods,** v. 136, n. 1-2, p. 171-6, Sep 2006. ISSN 0166-0934 (Print) 0166-0934 (Linking). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16750863 >.

ESPINAL, M. A.; DIAZ, F. J.; RUIZ-SAENZ, J. Phylogenetic evidence of a new canine distemper virus lineage among domestic dogs in Colombia, South America. **Vet Microbiol,** v. 172, n. 1-2, p. 168-76, Aug 6 2014. ISSN 1873-2542 (Electronic) 0378-1135 (Linking). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24950886 >.

FENG, N. et al. Fatal canine distemper virus infection of giant pandas in China. **Sci Rep,** v. 6, p. 27518, Jun 16 2016. ISSN 2045-2322 (Electronic) 2045-2322 (Linking). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27310722 >.

FISCHER, C. D. B. et al. Phylogenetic analysis of canine distemper virus in South America clade 1 reveals unique molecular signatures of the local epidemic. **Infect Genet Evol,** v. 41, p. 135-141, Jul 2016. ISSN 1567-7257 (Electronic) 1567-1348 (Linking). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27060756 >.

FISCHER, L. et al. Vaccination of puppies born to immune dams with a canine adenovirus-based vaccine protects against a canine distemper virus challenge. **Vaccine,** v. 20, n. 29-30, p. 3485-97, Oct 4 2002. ISSN 0264-410X (Print) 0264-410X (Linking). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12297394 >.

FRISK, A. L. et al. Detection of canine distemper virus nucleoprotein RNA by reverse transcription-PCR using serum, whole blood, and cerebrospinal fluid from dogs with distemper.

J Clin Microbiol, v. 37, n. 11, p. 3634-43, Nov 1999. ISSN 0095-1137 (Print) 0095-1137 (Linking). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10523566 >.

GAMIZ, C. et al. Identification of a new genotype of canine distemper virus circulating in America. **Vet Res Commun,** v. 35, n. 6, p. 381-90, Aug 2011. ISSN 1573-7446 (Electronic) 0165-7380 (Linking). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21713437 >.

GASKIN, J. M. Canine distemper virus in domesticated cats and pigs. **Adv Enzymol Relat Areas Mol Biol,** v. 40, n. 0, p. 803-6, 1974. ISSN 0065-258X (Print) 0065-258X (Linking). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/4600776 >.

GREENE, C. E.; APPEL, M. J. G. **Infectious Diseases of Dog and Cat**. 3th. Philadelphia: W. B. Saunders, 2006. 26-41.

GRIFFIN, D. E. Measles virus. In: KNIPE, D. M.;HOWLEY, P. M., *et al* (Ed.). **Fields Virology**. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, v.5, 2007. p.1551–1585.

HAAS, L. et al. Analysis of the haemagglutinin gene of current wild-type canine distemper virus isolates from Germany. **Virus Res,** v. 48, n. 2, p. 165-71, May 1997. ISSN 0168-1702 (Print) 0168-1702 (Linking). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9175255 >.

HARDER, T. C. et al. Canine distemper virus from diseased large felids: biological properties and phylogenetic relationships. **J Gen Virol,** v. 77 (Pt 3), p. 397-405, Mar 1996. ISSN 0022-1317 (Print) 0022-1317 (Linking). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8601773 >.

HARDER, T. C.; OSTERHAUS, A. D. Canine distemper virus--a morbillivirus in search of new hosts? **Trends Microbiol,** v. 5, n. 3, p. 120-4, Mar 1997. ISSN 0966-842X (Print) 0966-842X (Linking). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9080611 >.

HASHIMOTO, M.; UNE, Y.; MOCHIZUKI, M. Hemagglutinin genotype profiles of canine distemper virus from domestic dogs in Japan. **Arch Virol,** v. 146, n. 1, p. 149-55, 2001. ISSN 0304-8608 (Print) 0304-8608 (Linking). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11266208 >.

HEADLEY, S. A. et al. **Aspectos epidemiológicos e as manifestações neuropatológicas associadas à infecção pelo vírus da cinomose canina no Brasil: uma revisão**. Semina: Ciências Agrárias. Londrina - PR. 33**:** 1978 p. 2012.

HIGGINS, R. J. et al. Primary demyelination in experimental canine distemper virus induced encephalomyelitis in gnotobiotic dogs. Sequential immunologic and morphologic findings. **Acta Neuropathol,** v. 58, n. 1, p. 1-8, 1982. ISSN 0001-6322 (Print) 0001-6322 (Linking). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7136512 >.

IWATSUKI, K. et al. Molecular and phylogenetic analyses of the haemagglutinin (H) proteins of field isolates of canine distemper virus from naturally infected dogs. **J Gen Virol,** v. 78 (Pt 2), p. 373-80, Feb 1997. ISSN 0022-1317 (Print) 0022-1317 (Linking). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9018060 >.

IWATSUKI, K. et al. Antigenic differences in the H proteins of canine distemper viruses. **Vet Microbiol,** v. 71, n. 3-4, p. 281-6, Feb 2000. ISSN 0378-1135 (Print) 0378-1135 (Linking). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10703710 >.

JIN, Y. et al. Genomic Characterization of the Newly Emerged Canine Distemper Virus in Giant Panda. **Scientia Agricultura Sinica,** v. 48, n. 7, p. 1445-1452, 2015.

JOZWIK, A.; FRYMUS, T. Natural distemper in vaccinated and unvaccinated dogs in Warsaw. **J Vet Med B Infect Dis Vet Public Health,** v. 49, n. 9, p. 413-4, Nov 2002. ISSN 0931-1793 (Print) 0931-1793 (Linking). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12489707 >.

JOZWIK, A.; FRYMUS, T. Comparison of the immunofluorescence assay with RT-PCR and nested PCR in the diagnosis of canine distemper. **Vet Res Commun,** v. 29, n. 4, p. 347-59, May 2005. ISSN 0165-7380 (Print) 165-7380 (Linking). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15751584 >.

KAPIL, S. et al. Canine distemper virus strains circulating among North American dogs. **Clin Vaccine Immunol,** v. 15, n. 4, p. 707-12, Apr 2008. ISSN 1556-679X (Electronic) 1556-679X (Linking). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18256210 >.

KE, G. M. et al. Phylodynamic analysis of the canine distemper virus hemagglutinin gene. **BMC Vet Res,** v. 11, p. 164, Jul 25 2015. ISSN 1746-6148 (Electronic) 1746-6148 (Linking). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26205391 >.

KIM, Y. H. et al. Detection of canine distemper virus (CDV) through one step RT-PCR combined with nested PCR. **J Vet Sci,** v. 2, n. 1, p. 59-63, Apr 2001. ISSN 1229-845X (Print) 1229-845X (Linking). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14614296 >.

KING, A. M. Q. et al. *Paramyxoviridae*. In: (Ed.). **Virus Taxonomy: Ninth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses**. 9th: 680–681, 2011. p.680–681.

KRAKOWKA, S. et al. Serologic response to canine distemper viral antigens in gnotobiotic dogs infected with canine distemper virus. **J Infect Dis,** v. 132, n. 4, p. 384-92, Oct 1975. ISSN 0022-1899 (Print) 0022-1899 (Linking). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1185008 >.

KUIKEN, T. et al. The 2000 canine distemper epidemic in Caspian seals (Phoca caspica): pathology and analysis of contributory factors. **Vet Pathol,** v. 43, n. 3, p. 321-38, May 2006. ISSN 0300-9858 (Print) 0300-9858 (Linking). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16672579 >.

LAINE, D. et al. Measles virus nucleoprotein induces cell-proliferation arrest and apoptosis through NTAIL-NR and NCORE-FcgammaRIIB1 interactions, respectively. **J Gen Virol,** v. 86, n. Pt 6, p. 1771-84, Jun 2005. ISSN 0022-1317 (Print) 0022-1317 (Linking). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15914856 >.

LAMB, R. A.; PARKS, G. D. Paramyxoviridae: the viruses and their replication. In: FIELDS, B. N.;KNIPE, D. M., *et al* (Ed.). **Fields Virology**. Philadelphia: Lippincott-Raven, 2013. p.1450–1496.

LAN, N. T. et al. The growth profiles of three types of canine distemper virus on Vero cells expressing canine signaling lymphocyte activation molecule. **J Vet Med Sci,** v. 67, n. 5, p. 491-5, May 2005. ISSN 0916-7250 (Print) 0916-7250 (Linking). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15942133 >.

LEMPP, C. et al. New aspects of the pathogenesis of canine distemper leukoencephalitis. **Viruses,** v. 6, n. 7, p. 2571-601, Jul 2 2014. ISSN 1999-4915 (Electronic) 1999-4915 (Linking). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24992230 >.

LEONARD, V. H. et al. Measles virus blind to its epithelial cell receptor remains virulent in rhesus monkeys but cannot cross the airway epithelium and is not shed. **J Clin Invest,** v. 118, n. 7, p. 2448-58, Jul 2008. ISSN 0021-9738 (Print) 0021-9738 (Linking). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18568079 >.

LISTON, P. et al. Protein interaction domains of the measles virus nucleocapsid protein (NP). **Arch Virol,** v. 142, n. 2, p. 305-21, 1997. ISSN 0304-8608 (Print) 0304-8608 (Linking). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9125045 >.

MACLACHLAN, N. J.; DUBOVI, E. J. **Fenner's Veterinary Virology**. 4th. Academic Press, 2011. 534 ISBN 9780123751584.

MARTELLA, V. et al. Lights and shades on an historical vaccine canine distemper virus, the Rockborn strain. **Vaccine,** v. 29, n. 6, p. 1222-7, Feb 1 2011. ISSN 1873-2518 (Electronic) 0264-410X (Linking). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21167117 >.

MARTELLA, V. et al. Heterogeneity within the hemagglutinin genes of canine distemper virus (CDV) strains detected in Italy. **Vet Microbiol,** v. 116, n. 4, p. 301-9, Sep 10 2006. ISSN 0378-1135 (Print) 0378-1135 (Linking). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16730927 >.

MARTELLA, V.; ELIA, G.; BUONAVOGLIA, C. Canine distemper virus. **Vet Clin North Am Small Anim Pract,** v. 38, n. 4, p. 787-97, vii-viii, Jul 2008. ISSN 0195-5616 (Print) 0195-5616 (Linking). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18501278 >.

MCCARTHY, A. J.; SHAW, M. A.; GOODMAN, S. J. Pathogen evolution and disease emergence in carnivores. **Proc Biol Sci,** v. 274, n. 1629, p. 3165-74, Dec 22 2007. ISSN 0962-8452 (Print) 0962-8452 (Linking). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17956850 >.

MIELE, J. A.; KRAKOWKA, S. Antibody responses to virion polypeptides in gnotobiotic dogs infected with canine distemper virus. **Infect Immun,** v. 41, n. 2, p. 869-71, Aug 1983. ISSN 0019-9567 (Print) 0019-9567 (Linking). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6874079 >.

MOCHIZUKI, M. et al. Genotypes of canine distemper virus determined by analysis of the hemagglutinin genes of recent isolates from dogs in Japan. **J Clin Microbiol,** v. 37, n. 9, p. 2936-42, Sep 1999. ISSN 0095-1137 (Print) 0095-1137 (Linking). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10449479 >.

MORAES, P. M.; JARAMILLO, H. D.; SPILKI, F. R. Genética, evolução e filogenia dos vírus. In: FLORES, E. F. (Ed.). **Virologia veterinária: virologia geral e doenças víricas**. 2. Santa Maria: Editora UFSM, 2012. cap. 4, p.1008. ISBN 978-85-7391-179-4.

MORSE, H. G.; CHOW, T. L.; BRANDLY, C. A. Propagation of a Strain of Egg-Adapted Distemper Virus in Suckling Mice. **Proc. Soc. exp. Bin**, 1953.

MUHLEBACH, M. D. et al. Adherens junction protein nectin-4 is the epithelial receptor for measles virus. **Nature,** v. 480, n. 7378, p. 530-3, Nov 2 2011. ISSN 1476-4687 (Electronic) 0028-0836 (Linking). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22048310 >.

MURPHY, F. A. et al. **Veterinary Virology**. Academic Press, 1999. ISBN 9780080552033.

NEGRAO, F. J. et al. Phylogenetic analyses of the hemagglutinin gene of wild-type strains of canine distemper virus in southern Brazil. **Genet Mol Res,** v. 12, n. 3, p. 2549-55, Jul 24 2013. ISSN 1676-5680 (Electronic) 1676-5680 (Linking). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23546971 >.

NEGRÃO, F. J. et al. 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,** v. 58, n. 6, p. 1099-1106, 2006. ISSN 0102-0935.

NELSON, R. W.; COUTO, C. G. **Medicina Interna de Pequenos Animais**. 3ª. Rio de Janeiro: Elsevier, 2006.

NORRIS, J. M. et al. Canine distemper: re-emergence of an old enemy. Aust Vet J**,** v. 84, n. 10, p. 362-3, Oct 2006. ISSN 0005-0423 (Print) 0005-0423 (Linking). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17359474 >.

NOYCE, R. S. et al. Tumor cell marker PVRL4 (nectin 4) is an epithelial cell receptor for measles virus. **PLoS Pathog,** v. 7, n. 8, p. e1002240, Aug 2011. ISSN 1553-7374 (Electronic)1553-7366 (Linking). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21901103 >.

NOYCE, R. S.; RICHARDSON, C. D. Nectin 4 is the epithelial cell receptor for measles virus. **Trends Microbiol,** v. 20, n. 9, p. 429-39, Sep 2012. ISSN 1878-4380 (Electronic) 0966-842X (Linking). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22721863 >.

PANZERA, Y. et al. Evidence of two co-circulating genetic lineages of canine distemper virus in South America. **Virus Res,** v. 163, n. 1, p. 401-4, Jan 2012. ISSN 1872-7492 (Electronic) 0168-1702 (Linking). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22036731 >.

PARDO, I. D.; JOHNSON, G. C.; KLEIBOEKER, S. B. Phylogenetic characterization of canine distemper viruses detected in naturally infected dogs in North America. **J Clin Microbiol,** v. 43, n. 10, p. 5009-17, Oct 2005. ISSN 0095-1137 (Print) 0095-1137 (Linking). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16207955 >.

PARDO, M. C.; BAUMAN, J. E.; MACKOWIAK, M. Protection of dogs against canine distemper by vaccination with a canarypox virus recombinant expressing canine distemper virus fusion and hemagglutinin glycoproteins. **Am J Vet Res,** v. 58, n. 8, p. 833-6, Aug 1997. ISSN 0002-9645 (Print) 0002-9645 (Linking). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9256965 >.

QIU, W. et al. Canine distemper outbreak in rhesus monkeys, China. **Emerg Infect Dis,** v. 17, n. 8, p. 1541-3, Aug 2011. ISSN 1080-6059 (Electronic) 1080-6040 (Linking). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21801646 >.

RIMA, B. K. et al. Correlation between humoral immune responses and presence of virus in the CNS in dogs experimentally infected with canine distemper virus. **Arch Virol,** v. 121, n. 1-4, p. 1-8, 1991. ISSN 0304-8608 (Print) 0304-8608 (Linking). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1759903 >.

ROCKBORN, G. An attenuated strain of canine distemper virus in tissue culture. **Nature,** v. 184(Suppl 11), p. 822, Sep 12 1959. ISSN 0028-0836 (Print) 0028-0836 (Linking). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14438106 >.

ROSA, G. N. et al. Detecção molecular e análise filogenética do gene H de amostras do vírus da cinomose canina em circulação no município de Campinas, São Paulo. **Pesquisa Veterinária Brasileira,** v. 32, 2012. ISSN 0100-736X.

RZEZUTKA, A.; MIZAK, B. Application of N-PCR for diagnosis of distemper in dogs and fur animals. **Vet Microbiol,** v. 88, n. 1, p. 95-103, Aug 2 2002. ISSN 0378-1135 (Print) 0378-1135 (Linking). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12119141 >.

SAITO, T. B. et al. Detection of canine distemper virus by reverse transcriptase-polymerase chain reaction in the urine of dogs with clinical signs of distemper encephalitis. **Res Vet Sci,** v. 80, n. 1, p. 116-9, Feb 2006. ISSN 0034-5288 (Print) 0034-5288 (Linking). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15878186 >.

SAKAI, K. et al. Lethal canine distemper virus outbreak in cynomolgus monkeys in Japan in 2008. **J Virol,** v. 87, n. 2, p. 1105-14, Jan 2013. ISSN 1098-5514 (Electronic) 0022-538X (Linking). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23135729 >.

SATTLER, U. et al. Identification of amino acid substitutions with compensational effects in the attachment protein of canine distemper virus. **J Virol,** v. 88, n. 14, p. 8057-64, Jul 2014. ISSN 1098-5514 (Electronic) 0022-538X (Linking). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24807725 >.

SAWATSKY, B.; VON MESSLING, V. Canine distemper virus. In: KAMAL, S. K. (Ed.). **The Biology of Paramyxoviruses**. Norfolk: Caister Academic Press, 2011. p.275– 291.

SCHEID, A.; CHOPPIN, P. W. Two disulfide-linked polypeptide chains constitute the active F protein of paramyxoviruses. **Virology,** v. 80, n. 1, p. 54-66, Jul 1 1977. ISSN 0042-6822 (Print) 0042-6822 (Linking). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/195398 >.

SCHULTZ, R. D.; CONKLIN, S. The immune system and vaccines. In: (Ed.). **Compendium on Continuing Education for the Practicing Veterinarian**, v.20, 1998. p.5-18.

SEKI, F. et al. Efficient isolation of wild strains of canine distemper virus in Vero cells expressing canine SLAM (CD150) and their adaptability to marmoset B95a cells. **J Virol,** v. 77, n. 18, p. 9943-50, Sep 2003. ISSN 0022-538X (Print) 0022-538X (Linking). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12941904 >.

SHIN, Y. et al. Detection of canine distemper virus nucleocapsid protein gene in canine peripheral blood mononuclear cells by RT-PCR. **J Vet Med Sci,** v. 57, n. 3, p. 439-45, Jun 1995. ISSN 0916-7250 (Print) 0916-7250 (Linking). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7548395 >.

SHIN, Y. J. et al. Comparison of one-step RT-PCR and a nested PCR for the detection of canine distemper virus in clinical samples. **Aust Vet J,** v. 82, n. 1-2, p. 83-6, Jan-Feb 2004. ISSN 0005-0423 (Print) 0005-0423 (Linking). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15088966 >.

SI, W. et al. A multiplex reverse transcription-nested polymerase chain reaction for detection and differentiation of wild-type and vaccine strains of canine distemper virus. **Virol J,** v. 7, p. 86, May 1 2010. ISSN 1743-422X (Electronic) 1743-422X (Linking). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20433759 >.

SILVA, M. C. et al. Aspectos clinicopatológicos de 620 casos neurológicos de Aspectos clinicopatológicos de 620 casos neurológicos de cinomose em cães cinomose em cães. Pesquisa Veterinária Brasileira v. 27, n. 5, p.:215-220, 2007. ISSN 0100-736X.

SIMON-MARTINEZ, J. et al. Identification of a genetic variant of canine distemper virus from clinical cases in two vaccinated dogs in Mexico. **Vet J,** v. 175, n. 3, p. 423-6, Mar 2008. ISSN 1090-0233 (Print) 1090-0233 (Linking). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17382567 >.

SIPS, G. J. et al. Involvement of morbilliviruses in the pathogenesis of demyelinating disease. **Rev Med Virol,** v. 17, n. 4, p. 223-44, Jul-Aug 2007. ISSN 1052-9276 (Print) 1052-9276 (Linking). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17410634 >.

SMITH, E. C. et al. Viral entry mechanisms: the increasing diversity of paramyxovirus entry. **FEBS J,** v. 276, n. 24, p. 7217-27, Dec 2009. ISSN 1742-4658 (Electronic) 1742-464X (Linking). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19878307 >.

STEPHENSEN, C. B. et al. Canine distemper virus (CDV) infection of ferrets as a model for testing Morbillivirus vaccine strategies: NYVAC- and ALVAC-based CDV recombinants protect against symptomatic infection. **J Virol,** v. 71, n. 2, p. 1506-13, Feb 1997. ISSN 0022-538X (Print) 0022-538X (Linking). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8995676 >.

SUMMERS, B. A.; GREISEN, H. A.; APPEL, M. J. Early events in canine distemper demyelinating encephalomyelitis. **Acta Neuropathol,** v. 46, n. 1-2, p. 1-10, Apr 12 1979. ISSN 0001-6322 (Print) 0001-6322 (Linking). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/452851 >.

TAKENAKA, A. et al. Infectious Progression of Canine Distemper Virus from Circulating Cerebrospinal Fluid into the Central Nervous System. **J Virol,** v. 90, n. 20, p. 9285-92, Oct 15 2016. ISSN 1098-5514 (Electronic) 0022-538X (Linking). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27489268 >.

TAN, B. et al. Pathogenesis and phylogenetic analyses of canine distemper virus strain ZJ7 isolate from domestic dogs in China. **Virol J,** v. 8, p. 520, Nov 16 2011. ISSN 1743-422X (Electronic) 1743-422X (Linking). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22087872 >.

TATSUO, H. et al. SLAM (CDw150) is a cellular receptor for measles virus. **Nature,** v. 406, n. 6798, p. 893-7, Aug 24 2000. ISSN 0028-0836 (Print) 0028-0836 (Linking). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10972291 >.

TILLEY, L. P.; SMITH, F. W. K. **Consulta Veterinária em 5 Minutos: Espécies Canina e Felina**. 3. Barueri: Manole, 2008.

TIZARD, I. **Veterinary Immunology**. 9th. Sauders, 2012. ISBN 9781455754991.

TREBBIEN, R. et al. Wildlife reservoirs of canine distemper virus resulted in a major outbreak in Danish farmed mink (Neovison vison). **PLoS One,** v. 9, n. 1, p. e85598, 2014. ISSN 1932-6203 (Electronic) 1932-6203 (Linking). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24454897 >.

VANDEVELDE, M.; ZURBRIGGEN, A. Demyelination in canine distemper virus infection: a review. **Acta Neuropathol,** v. 109, n. 1, p. 56-68, Jan 2005. ISSN 0001-6322 (Print) 0001-6322 (Linking). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15645260 >.

VON MESSLING, V.; MILOSEVIC, D.; CATTANEO, R. Tropism illuminated: lymphocyte-based pathways blazed by lethal morbillivirus through the host immune system. **Proc Natl Acad Sci U S A,** v. 101, n. 39, p. 14216-21, Sep 28 2004. ISSN 0027-8424 (Print) 0027-8424 (Linking). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15377791 >.

VON MESSLING, V. et al. A ferret model of canine distemper virus virulence and immunosuppression. **J Virol,** v. 77, n. 23, p. 12579-91, Dec 2003. ISSN 0022-538X (Print) 0022-538X (Linking). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14610181 >.

VON MESSLING, V.; SVITEK, N.; CATTANEO, R. Receptor (SLAM [CD150]) recognition and the V protein sustain swift lymphocyte-based invasion of mucosal tissue and lymphatic organs by a morbillivirus. **J Virol,** v. 80, n. 12, p. 6084-92, Jun 2006. ISSN 0022-538X (Print) 0022-538X (Linking). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16731947 >.

VON MESSLING, V. et al. The hemagglutinin of canine distemper virus determines tropism and cytopathogenicity. **J Virol,** v. 75, n. 14, p. 6418-27, Jul 2001. ISSN 0022-538X (Print) 0022-538X (Linking). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11413309 >.

WANG, F. X. et al. Recombinant rabies virus expressing the H protein of canine distemper virus protects dogs from the lethal distemper challenge. **Vet Microbiol,** v. 174, n. 3-4, p. 362-

371, Dec 5 2014. ISSN 1873-2542 (Electronic) 0378-1135 (Linking). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25465178 >.

WANG, X. et al. Recombinant canine distemper virus serves as bivalent live vaccine against rabies and canine distemper. **Vaccine,** v. 30, n. 34, p. 5067-72, Jul 20 2012. ISSN 1873-2518 (Electronic) 0264-410X (Linking). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22698451 >.

WELTER, J. et al. Mucosal vaccination with recombinant poxvirus vaccines protects ferrets against symptomatic CDV infection. **Vaccine,** v. 17, n. 4, p. 308-18, Jan 28 1999. ISSN 0264-410X (Print) 0264-410X (Linking). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9987168 >.

NIEWIESK,S. Vaccination against canine distemper virus infection in infant ferrets with and without maternal antibody protection, using recombinant attenuated poxvirus vaccines. **J Virol,** v. 74, n. 14, p. 6358-67, Jul 2000. ISSN 0022-538X (Print) 0022-538X (Linking). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10864646 >.

WILD, T. F. et al. Vaccination of mice against canine distemper virus-induced encephalitis with vaccinia virus recombinants encoding measles or canine distemper virus antigens. **Vaccine,** v. 11, n. 4, p. 438-44, 1993. ISSN 0264-410X (Print) 0264-410X (Linking). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8470428 >.

WOO, P. C. et al. Feline morbillivirus, a previously undescribed paramyxovirus associated with tubulointerstitial nephritis in domestic cats. **Proc Natl Acad Sci U S A,** v. 109, n. 14, p. 5435-40, Apr 3 2012. ISSN 1091-6490 (Electronic) 0027-8424 (Linking). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22431644 >.

ZHAO, N. et al. Impacts of canine distemper virus infection on the giant panda population from the perspective of gut microbiota. **Sci Rep,** v. 7, p. 39954, Jan 4 2017. ISSN 2045-2322 (Electronic) 2045-2322 (Linking). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28051146 >.