

ALLAN ANDRADE REZENDE

**AVALIAÇÃO EM MODELO MURINO DA RESPOSTA IMUNE DE VACINAS
COMERCIAIS CONTRA O VÍRUS DA CINOMOSE CANINA (CDV)**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária, para obtenção do título de *Magister Scientiae*.

VIÇOSA
MINAS GERAIS – BRASIL
2014

Ficha catalográfica preparada pela Biblioteca Central da Universidade Federal de Viçosa - Campus Viçosa

T

R467a
2014 Rezende, Allan Andrade, 1988-
Avaliação em modelo murino da resposta imune de vacinas comerciais contra o Vírus da Cinomose Canina (CDV) / Allan Andrade Rezende. - Viçosa, MG, 2014.
ix, 58f. : il. ; 29 cm.

Inclui anexo.

Inclui apêndice.

Orientador: Abelardo Silva Júnior.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Viçosa.

Referências bibliográficas: f.44-57.

1. Cão - Doenças. 2. Imunologia. 3. Resposta imune. 4. Bem-estar animal. I. Universidade Federal de Viçosa. Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular. Programa de Pós-graduação em Medicina Veterinária. II. Título.

CDD 22. ed. 614.47

ALLAN ANDRADE REZENDE

**AVALIAÇÃO EM MODELO MURINO DA RESPOSTA IMUNE DE VACINAS
COMERCIAIS CONTRA O VÍRUS DA CINOMOSE CANINA (CDV)**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária, para obtenção do título de *Magister Scientiae*.

APROVADA: 11 de dezembro de 2014

Dr. Abelardo Silva Júnior
(Orientador/presidente)

Dra. Marcia Rogéria de Almeida
(Coorientador)

Dr. Gustavo Costa Bressan
(Coorientador)

AGRADECIMENTOS

Acima de tudo e todos, meus pais e irmã pela confiança, apoio, amor e incentivo.

Ao Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária da Universidade Federal de Viçosa (UFV) pela oportunidade de realização do curso.

Ao Laboratório de Virologia Animal (LVA) do Departamento de Veterinária representado pelo professor Dr. Abelardo Silva Júnior.

Ao Núcleo de Microscopia e Microanálises (NMM) do Centro de Ciências Biológicas e da Saúde (CCB) da Universidade Federal de Viçosa (UFV) representado pelo professor Dr. Leandro Licursi de Oliveira.

Aos CNPQ e FAPEMIG por todo o apoio financeiro.

Ao professor Abelardo Silva Júnior, pela orientação na realização deste trabalho, confiança, pelo apoio nas maiores dificuldades e em minha formação profissional e aos seus fiéis escudeiros Otávio Valério e Marcus Rebouças, pela parceria, companheirismo, dedicação, apoio, conselhos e insistências.

Aos meus queridos irmãos de coração...Silvia Letícia, Lino Neto, Igor Menezes, Dênisson Santa'na, Thiago Marnet, Lyvian Cardoso e Fátima Vieira.

A todos os meus ex-professores e orientadores da graduação, os quais me agregaram conhecimento e experiência de vida e colegas de trabalho de todos os lugares nos quais trabalhei e adquiri experiência profissional e qualificada.

A todos os meus incontáveis queridos amigos de toda a vida de Aracaju, Salvador, Rio, Porto Alegre e lugares por onde andei.

A todos os meus queridos amigos mineiros e agregados...Débora Carvalho, Beatriz Caçador, Rodrigo Batista, Matheus Viana, Gabrielle Souza, Renato Ferraz, Nicole Losano, Mayra Catharino, entre outros...os quais passei bons momentos e aventuras, tive ótimas conversas e que, de alguma forma, me ajudaram a me manter nesta cidade.

.....muito obrigado a todos.

BIOGRAFIA

Allan Andrade Rezende, filho de José Rezende de Matos e Josenice Andrade de Almeida Rezende, nasceu em Aracaju, Sergipe, em 06 de julho de 1988.

Em agosto de 2008, iniciou o Curso de Medicina Veterinária na Faculdade Pio Décimo, em Aracaju-SE, concluindo-o em julho de 2013.

Em agosto de 2013, ingressou no programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária da Universidade Federal de Viçosa, em nível de mestrado, na área de Biotecnologia, Diagnóstico e Controle de Doenças dos Animais.

SUMÁRIO

RESUMO.....	viii
ABSTRACT.....	ix
1. JUSTIFICATIVA E RELEVÂNCIA	1
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	3
2.1. Cinomose canina	3
2.1.1. Etiologia e Aspectos Moleculares do Vírus da Cinomose Canina.....	3
2.1.2. Histórico e Epidemiologia do Vírus da Cinomose Canina.....	5
2.1.3. Patogênese da Enfermidade	7
2.1.4. Manifestações Clínicas.....	8
2.1.5. Imunossupressão e Imunopatologia	10
2.1.6. Diagnóstico	12
2.1.7. Tratamento e Profilaxia	13
2.2. Vacinas Contra <i>Morbillivirus</i>	17
2.3. Resposta Imune a <i>Morbillivirus</i>	21
3. OBJETIVOS	23
3.1. GERAL	23
3.2. ESPECÍFICOS	23
4. MATERIAL E MÉTODOS.....	23
4.1. Animais	23
4.2. Imunizações	24
4.3. Delineamento Experimental	25
4.4. Ensaio de Soroneutralização	25
4.5. Ensaio Linfoproliferação Celular e Citometria de Fluxo	26
4.6. Análise Estatística	28
5. RESULTADOS	28
5.1. Avaliação dos Títulos de Anticorpos Segundo os Grupos Avaliados	28
5.2. Análises da Ativação de Linfócitos por Marcação de CFSE	32
6. DISCUSSÃO	37
7. CONCLUSÕES	43
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	44
ANEXOS.....	58

LISTA DE ABREVIATURAS

CDV: Canine Distemper Virus;

CEUA: Comitê de Ética no Uso de Animais;

CFSE: Carboxyfluorescein Diacetate Succinimidly Ester;

DNA: Deoxyribonucleic Acid;

ELISA: Enzyme Linked Immunosorbent Assay

Ig: Imunoglobulina;

IL: Interleucina;

Kb: Kilobase;

LCR: Líquido Céfalorraquidiano;

MV: Measles Virus;

NK: Natural Killer;

PBS: Phosphate Buffered Saline;

PDV: Phocine Distemper Virus;

PPRV: Vírus da Peste de Pequenos Ruminantes;

RIG-1: Gene Induzido por Ácido Retinóico;

RNA: Ribonucleic Acid;

RPM: Rotação por Minuto;

RPMI: Meio Roswell Park Memorial Institute;

RPV: Vírus Rindempest Bovino;

RT-PCR: Reverse Transcriptase Chain Reaction

SLAM: Signaling Lymphocyte Activation Molecule;

SNC: Sistema Nervoso Central;

TCID: Tissue Culture Infective Dose;

TNF: Fator de Necrose Tumoral;

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Delineamento experimental da imunização de vacinas contra o vírus da cinomose canina nos grupos experimentais a serem avaliados.

Figura 2: Titulação de anticorpos neutralizantes avaliados pela técnica de soroneutralização após a primeira imunização (dia 14).

Figura 3: Titulação de anticorpos neutralizantes avaliados pela técnica de soroneutralização após a segunda imunização (dia 28).

Figura 4: Titulação de anticorpos neutralizantes avaliados pela técnica de soroneutralização após a terceira imunização (dia 42).

Figura 5: Avaliação da titulação de anticorpos neutralizantes pela técnica de soroneutralização após as imunizações vacinais entre os grupos G0 a G6.

Figura 6: Avaliação celular na relação tamanho e intensidade de fluorescência FCS/CFSE a partir da comparação entre o controle negativo e estimulação de imunógenos dos grupos G0 a G2.

Figura 7: Avaliação celular na relação tamanho e intensidade de fluorescência FCS/CFSE a partir da comparação entre o controle negativo e estimulação de imunógenos dos grupos G3 a G5.

Figura 8: Avaliação celular na relação tamanho e intensidade de fluorescência FCS/CFSE a partir da comparação entre o controle negativo e estimulação de imunógenos do grupo G6.

Figura 9: Correlação entre os grupos experimentais G0 a G6 em relação à percentagem de proliferação entre os grupos experimentais.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Descrição de 06 vacinas comerciais de acordo com origem, cepas vacinais e antígenos respectivos a cada grupo.

RESUMO

REZENDE, AllanAndrade, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, Dezembro de 2014. **Avaliação em modelo murino da resposta imune de vacinas comerciais contra o Vírus da Cinomose Canina (CDV).**Orientador: Dr. Abelardo Silva Júnior. Co-orientadores:Dra. Marcia Rogéria de Almeida; Dr. Gustavo Costa Bressan e Dr. Leandro Licurside Oliveria

A cinomose é uma doença viral altamente contagiosa e em todo o mundo caracteriza-se principalmente por elevadas taxas de mortalidade e diversidade de sinais clínicos, especialmente em animais jovens, e não há nenhuma terapia antiviral. Vírus RNA fita simples (*Canine distemper virus*- CDV(Vírus da cinomose canina)) pertencente ao gênero *Morbillivirus* e família *Paramyxoviridae*. A importância da imunização vacinal, quer profilática ou curativa, é uma grande estratégia para controle da morbidade e mortalidade e melhoria do bem-estar dos animais susceptíveis. Escassez de informações e duvidosas qualidades vacinais para prevenir ou combater tal infecção são, hoje, altamente relevantes devido a inúmeras vacinas, originadas tanto de laboratórios estrangeiros quanto nacionais, disponíveis no mercado comercial com eficácia imunológica insegura. Além disso, algumas vacinas apresentam grande quantidade de restrições de uso, baixo espectro de ação, utilidade terapêutica limitada, a ocorrência de cepas resistentes emergentes e alto nível de toxicidade. Neste contexto, algumas vacinas comerciais CDV, três de laboratórios importados e três nacionais de diferentes fabricantes, foram avaliadas em modelo de murino para a avaliação da eficácia imunogênica das vacinas em desencadear respostas imunes (humoral e celular). Melhores neutralizantes de títulos de anticorpos foram identificados pelo teste de soroneutralização do CDV em vacinas nacionais, que também apresentaram uma percentagem elevada da intensidade de fluorescência de rotulagem CFSE. Em conclusão, as vacinas nacionais CDV têm mostrado melhores resultados para os anticorpos neutralizantes e estimulação de resposta geral de linfócitos em comparação as vacinas CDV importadas.

Palavras-chave: imunogenicidade; eficácia; resposta vacinal.

ABSTRACT

REZENDE, Allan Andrade, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, December de 2014. **Evaluation in murine model of immune response of commercial vaccines against the *Virus Canine Distemper (CDV)***. Adviser: Dr. Abelardo Silva Júnior. Co-adviser: Dra. Marcia Rogéria de Almeida; Dr. Gustavo Costa Bressan and Dr. Leandro Licursi de Oliveria

Canine distemper is a highly contagious and worldwide viral disease mainly characterized by high rates of mortality and diversity of clinical signs, especially in young animals and there is no specific antiviral therapy. The RNA single strand virus (*Canine distemper virus* - CDV) belongs to the *Morbillivirus* genus and *Paramyxoviridae* family. The importance of vaccine immunization, either prophylactic or curative, it is a great strategy for CDV morbidity and mortality control and wellness improvement of susceptible animals. The lack of information and the doubtful quality and effectiveness of vaccines for preventing or combating canine distemper infection are nowadays highly relevant due to numerous products, both domestic and international, available in the commercial market with immune effectiveness. Moreover, some vaccines present large amount of use restrictions, low action spectrum, limited therapeutic utility, occurrence of resistant emerging strains and high level of toxicity. In this context, some CDV commercial vaccines, three imported and three national vaccines of different manufacturers were evaluated in a murine model for vaccine efficacy at triggering immune responses (humoral and cellular response). Best neutralizing antibody titres was identified by virus neutralization test in national vaccines, which also presented a high fluorescence intensity percentage of CFSE labeling. In conclusion, national CDV vaccines have shown better results for neutralizing antibodies and general lymphocyte response stimulation compared with imported CDV vaccines.

Keywords: Effectiveness; immunogenicity; vaccine response.

1. JUSTIFICATIVA E RELEVÂNCIA

A Cinomose Canina é uma doença infecciosa multisistêmica de distribuição mundial cujo agente infeccioso é um vírus RNA, fita simples do gênero *Morbillivirus*, família *Paramyxoviridae* e ordem *Mononegavirales*. Trata-se de uma enfermidade facilmente transmissível que afeta caninos domésticos e selvagens, assim como outros carnívoros terrestres e mamíferos aquáticos (FLORES, 2007). Porém, a sua maior importância na rotina médica veterinária está relacionada com as diversas manifestações clínicas em cães domésticos (MURPHY et al., 1999).

A enfermidade é caracterizada por elevados índices de morbidade e mortalidade em populações vacinadas e não vacinadas em todo o mundo sendo considerada uma doença canina altamente contagiosa com apresentação clínica aguda, subaguda e crônica. A cinomose possui a segunda maior taxa de letalidade entre os cães, inferior apenas à raiva (SUMMERS, 1995; APPEL et al., 1999; MURPHY et al., 1999).

Dentro do gênero *Morbillivirus*, o CDV apresenta uma das maiores incidências de envolvimento do sistema nervoso central (SNC). É um vírus relativamente grande, o qual varia de 150 a 250 nm, pleomórfico e envelopado, contendo RNA senso negativo não segmentado como genoma, com comprimento de aproximadamente 16 kilobases (Kb) e antigenicamente relacionado ao vírus do sarampo ("Measles Virus"-MV) e ao da peste bovina (PRINGLE, 1999; GRIFFIN, 2006; MOSS, 2006; FLORES, 2007).

Ao considerar sua grande importância na saúde animal, elevado impacto econômico e a ausência de terapia específica, o vírus da cinomose canina representa um alvo em potencial de interesses comerciais e epidemiológico. Entretanto, mesmo com vacinas existentes no mercado, tal enfermidade persiste como a doença canina de maior incidência e mortalidade entre as demais infecções de etiologia viral (RODEHEFFER et al., 2007; MARTELLA et al., 2008).

A diversa disponibilidade de produtos vacinais no mercado comercial contra a cinomose canina, tanto nacionais quanto importadas, e escassas informações despertam algumas incertezas quanto as suas reais eficácias, qualidade e competência destes agentes para prevenir ou combater tal infecção

ou não disporem de qualquer associação ou analogia entre eles se referido à capacidade de desenvolver uma eficácia imunológica adequada. Além disso, sua grande parte possuem ilimitadas restrições de uso, limitada utilidade terapêutica, reduzido aspecto de ação, elevado nível de toxicidade ao paciente e o surgimento contínuo de cepas resistentes (GRIFFIN, 2006; MOSS, 2006).

Nesse contexto, vacinas comerciais contra a cinomose canina, três nacionais e três importadas de diferentes fabricantes, foram avaliadas, em modelo murino, quanto à imunogenicidade em desencadear uma superior resposta imunológica (humoral e celular).

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. Cinomose Canina

2.1.1. Etiologia e Aspectos Moleculares do Vírus da Cinomose Canina

O *Canine distemper virus*– CDV (Vírus da cinomose canina) possui RNA fita simples, senso negativo e não segmentado como genoma, comprimento de aproximadamente 16 kilobases (Kb) e antigenicamente relacionado ao vírus do sarampo (“Measles Virus”-MV) e ao da peste bovina (PRINGLE, 1999; GRIFFIN, 2006; MOSS, 2006; FLORES, 2007;).

Pertence ao gênero *Morbillivirus*, família *Paramyxoviridae* e ordem *Mononegavirales*, é facilmente transmissível e multissistêmico, que afeta caninos domésticos e selvagens, assim como outros carnívoros terrestres e mamíferos aquáticos (FLORES, 2007). Produzem elevados índices de morbidade e mortalidade em populações não vacinadas, porém, a sua maior importância na rotina médica veterinária está relacionada às diversas manifestações clínicas em cães domésticos (MURPHY et al., 1999).

Existem seis grandes grupos de linhagens genéticas dos CDVs em todo o mundo: *America*, *European*, *Asia-1*, *Asia-2*, *Arctic* e *Vaccine* (HASHIMOTO et al., 2001; BOLT et al., 2007; DEMETER et al., 2007; MARTELLA et al., 2007). As cepas virais são relativamente lábeis, sendo desintegradas pelo calor (acima de 60°C), desinfetantes, períodos longos em condições ambientais, detergentes, solventes lipídicos, como clorofórmio, éter, formol, fenol, entre outros e radiação solar (ETTINGER, 2004; FLORES, 2007).

O CDV possui seis genes que codificam uma proteína associada ao envelope (M), duas proteínas associadas à transcriptase (fosfoproteína P e proteína L), duas glicoproteínas (hemaglutinina H e A proteína de fusão F) e a proteína do nucleocapsídeo (N), responsável por encapsular o RNA viral (MOSS et al., 2006; GRIFFIN et al., 2006).

A fixação dos receptores celulares durante o início da infecção é realizada pela hemaglutinina, que pode ser neutralizada por uma resposta imune adequada do hospedeiro, prevenindo assim a infecção pelo CDV (VON MESSLING et al.,

2001). O gene dessa glicoproteína possui 10% de variabilidade entre as cepas virais, sendo o menos conservado. A proteína H determina o tropismo viral, identificando as células alvos e tecidos em potencial dentro do organismo infectado (DUPREX et al., 1999; JOHNSTON et al., 1999).

A fusão do envelope viral com as membranas das células hospedeiras e/ou entre as mesmas com a formação de sincícios é realizada após a fixação dos receptores celulares pela proteína F (LAMB et al., 2006). A ligação entre as ribonucleoproteínas e proteínas de envelope durante a montagem do vírion é realizada pela proteína M. A proteína P é responsável por regular a transcrição, replicação e a eficiência com que as nucleoproteínas são montadas no nucleocapsídeo (MOSS, 2006; GRIFFIN, 2006) e a junção das proteínas P e L formam a RNA polimerase (LAMB, 2001).

O gene H do CDV é uma região na qual ocorrem inúmeras variações genéticas e antigênicas, diferentemente do gene do nucleocapsídeo, considerado como uma região conservada quando comparado aos outros genes do mesmo vírion. A posição genômica e arranjo linear dos seis genes do CDV são respectivamente: N, P, M, F, H e L (MARTELLA et al., 2007).

2.1.2. Histórico e Epidemiologia do Vírus da Cinomose Canina

A existência da cinomose em cães data do século XVI, mas a identificação desta doença com etiologia viral foi somente realizada por Henri Carré em 1905.

Em 1809, Edward Jenner iniciou a descrição do curso e características da doença e em 1815, observou que o contágio dela entre cães assemelhava-se à varíola e ao sarampo entre seres humanos (FENNER, 1993). Em 1844, Karle obteve sucesso numa primeira transmissão experimental da doença, ao inocular secreção nasal de animais doentes em sadios. J. C. Van der Slooten (1894) escreveu um artigo sobre a cinomose canina chamado "*canine epizootic catarrhal fever*", ressaltando tratar-se de uma enfermidade severa de cães e outros carnívoros (EGBERINK, 2008).

O primeiro relato da enfermidade na América do Sul foi descrito por Ulloa (1746) no Peru, em seu trabalho “Relação Histórica da Viagem à América Meridional”. De acordo com Charles F. Heusinger, a cinomose alastrou-se na Espanha, durante o século XVIII, na Inglaterra, Itália (1764) e Rússia (1770) e em 1763, em um dia, resultou na morte de 900 cães em Madri (EGBERINK, 2008).

De ocorrência mundial e padrão endêmico, a enfermidade é uma das mais importantes doenças virais caninas (KRAKOWKA et al., 1980), com altas taxas de morbidade e mortalidade em cães não vacinados e em animais previamente vacinados (TIPOLD et al., 1992; SUMMERS et al., 1995). Falhas vacinais associadas aos esquemas de vacinação inadequados ou mesmo com vacinas comerciais de baixa qualidade podem também resultar na incidência da doença em animais vacinados (FLORES, 2007).

O espectro de infectividade do vírus abrange as famílias *Canidae* (cães domésticos, dingos, chacais, raposas e coiotes), *Mustelidae* (furões, visões, doninhas, martas, canagambás, texugos e lontras), *Procyonidae* (guaxinins, juruparás e quatis), *Felidae* (guepardos, leões, onças-pintadas, tigres e jaguatiricas; exceto gatos domésticos), *Hyaenidae* (hienas) e *Ursidae* (ursos e pandas) (APPEL, 1987; BICHARD, 2003; SHEDING, 2003). A infecção pelo CDV em felídeos selvagens é relatada nos arredores de habitações e em estreita associação com cães domésticos que vivem em áreas próximas (NAVA et al., 2008).

A principal forma de transmissão do vírus dá-se pelo contato direto com secreções orais e nasais, por aerossóis e gotículas contaminadas de secreções respiratórias, embora possa ocorrer através de fezes e urina de animais infectados (CORRÊA, 1992). A propagação viral também ocorre das formas transplacentária e neonatal, de ocorrências raras e a depender do estágio gestacional, podem desencadear abortos, natimortos ou neonatos vivos debilitados (KRAKOWKA et al., 1975; BICHARD, 2003; SHIERDING, 2003; FLORES, 2007).

Grande parcela dos cães infectados, aproximadamente 75%, não desenvolve a forma clínica da enfermidade, mas dissemina o vírus, tornando a taxa de infectividade do CDV maior do que a quantidade de animais que

manifesta os sinais clínicos (CORRÊA, 1992; GEBARA et al., 2004). Entretanto, existem cepas virais com inúmeros níveis de patogenicidade. Esse fato é associado aos fatores intrínsecos do hospedeiro, como *status* imunológico, idade e infecções secundárias, que podem influenciar significativamente nas manifestações das diferentes formas clínicas da doença (BICHARD, 2003; SHIERDING, 2003).

2.1.3. Patogênese da Enfermidade

Em condições naturais de exposição, o CDV é geralmente transmitido através de aerossóis de animais infectados com deslocamento de partículas virais para o trato respiratório superior de animais susceptíveis (APPEL e SUMMERS, 1999). A replicação viral nas primeiras 24 horas pós-infecção ocorre em macrófagos teciduais e monócitos localizados nas vias aéreas superiores e a propagação viral utilizam as vias linfáticas, tonsilas e linfonodos bronquiais (APPEL, 1969; VANDEVELDE, 1995; ZURBRIGGEN, 1995; APPEL, 2006; GREENE, 2006).

De acordo com Scherding (2003) e Greenne e Appel (2006), o período de incubação do vírus da cinomose canina é de 14 dias e variação de 14 a 18 dias de acordo com Genelhu (2006). A taxa de morbidade varia de 25 a 75% e a taxa de letalidade é frequente de até 68%, principalmente em animais jovens e em algumas variações na intensidade da infectividade da cepa viral (GENELHU, 2006).

A eliminação viral da CDV ocorre de 60 a 90 dias após infecção, sendo a fase aguda, restringindo-se às duas primeiras semanas (CORRÊA, 1992). A contaminação de animais susceptíveis é maior entre jovens, na faixa etária entre 60 a 90 dias, período em que ocorre declínio da imunidade passiva disponibilizada pela mãe e a frequência persiste, de forma elevada, em cães até os dois anos de idade, geralmente em função da não vacinação, ausência de contato prévio com o vírus ou falha imunológica (BICHARD, 2003; SHERDING, 2003).

Após dispersão por todo trato respiratório, a replicação viral em células do tecido linfóide associada desencadeia a viremia na forma sistêmica, a depender da duração da exposição, severidade e cepa, idade e status imunológico do hospedeiro. Em geral, o período de incubação varia de 1 a 4 semanas (APPEL, 1987; MORITZ et al., 2000). Existem outras formas de propagação e disseminação viral, como a inoculação de secreções contaminadas com o vírus nas demais mucosas de animais susceptíveis, por escoriações ou lesões e raramente, mas não menos importante, por via placentária (KRAKOWKA, 1982; APPEL et al., 1998; MURPHY et al., 1999).

A partir dos primeiros dias pós-infecção, observa-se no enfermo a primeira elevação da temperatura corporal, devido à intensa proliferação virêmica do CDV, difundida pelo sistema linfático até os demais tecidos e evoluindo para a forma mais agravante e letal da doença no sistema nervoso central (SNC) (APPEL, 1987; APPEL et al., 1998; MURPHY et al., 1999).

A imunossupressão severa e duradoura é resultante da intensa replicação viral primária nos tecidos linfóides, sendo as células T mais afetadas em relação às células B (KRAKOWKA, 1982; IWATSUKI et al., 1995). Segundo Moro et al. (2003), os linfócitos CD4⁺ são rapidamente esgotados por várias semanas, provavelmente devido à apoptose induzida pelo vírus, enquanto os linfócitos CD8⁺ são relativamente menos afetados e se recuperam rapidamente (KRAKOWKA, 1982).

2.1.4. Manifestações Clínicas

Os sinais clínicos mais comuns da enfermidade são pirexia, letargia, desidratação, anorexia, perda de peso, descarga nasal, conjuntivite, diarreia, pústulas cutâneas e hiperqueratose (WRIGHT et al., 1974; APPEL, 1987). Os neurológicos, principais responsáveis pela elevada taxa de mortalidade de animais infectados, aparecem durante, depois ou na ausência da fase sistêmica da doença (ZUBRIGGEN, 1995; VANDERVELDE, 1995).

Manifestações sistêmicas agudas e nervosas crônicas são caracterizadas e diferenciadas de acordo com o quadro clínico catarral e/ou nervoso do hospedeiro

infectado. Na fase aguda, o vírus é encontrado em cada secreção e excreção do corpo, acompanhada por inúmeros sinais clínicos incluindo erupções cutâneas, descargas nasais e oculares, conjuntivite e anorexia, seguidas por distúrbios respiratórios e gastrointestinais, que são, muitas vezes, acompanhadas por infecções bacterianas secundárias e moderadas perturbações neurológicas (KRAKOWKA et al., 1985).

Logo após, na forma secundária, diversos e progressivos sinais nervosos, como mioclonia, nistagmo, ataxia, déficits de reação postural e tetraparesia são observados no enfermo (KRAKOWKA et al., 1985; GREENE e APPEL, 1992; MORITZ et al., 2003; AMUDE et al., 2007).

O vírus da cinomose canina propaga-se por gotículas de aerossóis e, em um período de 24 horas, ao entrar em contato com o epitélio do trato respiratório superior, replica em células do sistema imune e se dissemina pela via linfática local, para as tonsilas e linfonodos brônquicos, caracterizada como a primeira viremia, a qual resulta em uma infecção ascendente generalizada que atinge todos os tecidos linfoides, incluindo baço, gânglios linfáticos, medula óssea e os macrófagos na lâmina própria do trato gastrointestinal (WRIGHT et al., 1974; KRAKOWKA et al., 1980; VANDEVELDE e ZURBRIGGEN, 2005; GREENE, 2006).

A segunda viremia segue por vários dias, caracterizada após a primeira propagação de leucócitos e trombócitos associado à patógenos infecciosos, a qual resulta em infecção do parênquima e células de todo o corpo associada à febre alta (BLINXENKRONE-MOLLER et al., 1989).

Dermatites pustulares abdominal, nasal e periauricular são, também, outras manifestações clínicas encontradas em cães naturalmente infectados por cinomose canina e incomum na doença do coxim duro (*hard pad disease*), quando diagnosticado histologicamente com formação de vesículas e pústulas a partir de uma hiperqueratose e a presença de células gigantes sinciciais multinucleadas (BAUMGARTNER, 1993, MAEDA et al., 1994; MORITZ et al., 2000).

A regressão de sinais clínicos pode ocorrer com o aumento da titulação de anticorpos, quando o animal possui um nível intermediário de resposta imune

humoral e celular, exceto em alguns casos onde o vírus pode persistir por longos períodos em tecidos uveais, neurônios e tegumento. Também, quando em casos de cepas altamente virulenta, dose infectante alta ou imunossupressão (CORRÊA, 1992; APPEL, 2006; GREENE, 2006).

Variações na virulência na cepa viral, condições ambientais, idade e resistência individual do hospedeiro, além de infecções virais e bacterianas secundárias alteram a duração e gravidade dos sinais clínicos da enfermidade e foram comprovadas em animais naturalmente e experimentalmente infectados (APPEL, 1987). Cães com idade entre 3 e 4 meses, não vacinados e/ou que perderam a imunidade passiva (materna) estão mais susceptíveis à infecção por CDV (APPEL, 1987).

2.1.5. Imunossupressão e Imunopatologia

O vírus da cinomose canina é altamente imunossupressor e linfotrópico. Semelhante a outros *morbillivírus*, caracteriza-se por desencadear intensa leucopenia e perda da habilidade proliferativa de linfócitos. Uma vez que se manifesta, a infecção provoca uma duradoura e profunda deficiência celular e de funções imunitárias humorais, a qual torna o hospedeiro altamente susceptível a infecções oportunistas (KRAKOWKA et al., 1975; BECKFORD et al., 1985; BEINEKE et al., 2009; LAINE et al., 2009).

Os furões (*Mustela putorius*) representam o modelo animal mais confiável para investigação da inoculação e imunossupressão induzida pelo vírus do CDV e no desenvolvimento de novas estratégias vacinais para a cinomose canina e sarampo, devido a sua elevada susceptibilidade ao CDV. A infecção provoca uma doença altamente imunossupressora e, muitas vezes, fatal, observada experimentalmente por severa leucopenia, supressão da resposta imune celular e humoral e proliferação linfocitária (KAUFFMAN et al., 1982; STEPHENSEN et al., 1997; WELTER et al., 2000; VON MESSLING et al., 2004).

Vários estudos explicam o tropismo do CDV para linfócitos, presumivelmente com base na ligação de uma molécula de sinalização e ativação linfocitária, a CD150 (*signaling lymphocyte activation molecule*, SLAM), receptor

único do morbillivírus presente nos subconjuntos linfocitários, pela proteína H viral, seguida da entrada na célula hospedeira. A SLAM é constitutivamente presente em uma série de órgãos de cães saudáveis. Entretanto, após a infecção pelo CDV, torna-se expressa e amplificada pelo vírus (APPEL 1969; CERRUTI-SOLA et al., 1983; VON MESSINLING et al., 2004; WENZLOW et al., 2007).

A expressão da SLAM na superfície celular é essencial para a CDV, após infecção induzida em linfócitos T e B, para que haja disseminação viral e indução imunossupressora nos hospedeiros (TATSUO et al., 2001; LAN et al., 2005; YAMAUCHI et al., 2005; PUFF et al., 2008). Segundo Suter et al. (2005), experiências *in vitro* mostraram, após reação de membrana a CD150, uma infecção por CDV e subsequente indução da apoptose de algumas células linfóides caninas.

Alterações morfológicas em órgãos linfóides, após a infecção sistêmica pelo vírus da cinomose canina, são observadas por visualizáveis mudanças em diversos tecidos dos hospedeiros, como edemaciação linfocitária, hipertrofia do timo, entre outras. Além disso, a formação de sincícios e da morte celular das células do sistema imunológico é observada em folículos linfóides que conduzem a perda completa de folículos secundários de cães na fase aguda do CDV (KRAKOWKA e KOESTNER 1977; IWATSUKI et al., 1995).

Ainda na fase aguda do CDV, a linfopenia sistêmica caracteriza-se por déficit transitório de células T CD4⁺ auxiliares (*helper*), células T CD8⁺ citotóxicas e células B CD21⁺ e pode significar o resultado das deficientes produções linfáticas primárias e secundárias associadas à apoptose leucocitária, independentes dos mecanismos de ação viral (KUNMAGAI et al., 2004; MORO et al., 2004; SCHOBESBERGER et al., 2005; KAJITA et al., 2006).

Em geral, o grau de depleção linfóide é diretamente relacionada com a quantidade de antígeno do CDV no órgão afetado. Assim, alterações morfológicas podem ser parcialmente revertidas pelo repovoamento e formação de tecidos linfocitários persistentemente infectados nos centros replicativos de cães convalescentes (MC CULLOUGH et al., 1974; WUNSCHMANN et al., 1999; KUMAGAI et al., 2004).

A perda de células CD4+ e a depleção da produção de células CD8+ em órgãos linfoides são constatadas pela diminuição da função imunológica da primeira fase da doença associada à viremia e parcialmente por lise de linfócitos e macrófagos. Na fase crônica, a reconstrução tecidual e repovoamento linfocitário caracterizar-se por completa reconstituição de células CD4+ e CD8+, expressos por subconjuntos de linfócitos nas áreas de células T em cães infectados (MCCULLOUGH et al., 1974; KRAKOWKA et al., 1975; KRAKOWKA e KOESTNER, 1977; CERRUTI – SOLA et al., 1983).

A resposta imune celular, após a infecção pelo CDV, é detectada por um curto período de tempo em cães convalescentes e evidenciada por meio da imunidade celular protetora na ausência de resposta imune mediada por quantidades de anticorpos mensuráveis (GERBER, 1976; MARRON, 1976; APPEL et al., 1982).

Geralmente, quando se há uma melhor resposta imune do hospedeiro, especialmente em uma crescente produção de neutralizadores virais específicos, os anticorpos podem promover a recuperação do animal. No entanto, o CDV pode persistir em certos tecidos, como úvea, SNC e órgãos linfoides e responder com sintomatologia clínica moderada e retardo na progressão da doença imune. Conseqüentemente, com a persistência viral no SNC, perturbações neurológicas são observadas sob a forma resultante nervosa da enfermidade, causadora de maior parte da mortalidade destes enfermos (APPEL, 1987; ZURBRIGGEN et al., 1995).

2.1.6. Diagnóstico

O diagnóstico da cinomose canina consiste de sinais clínicos típicos em cães jovens, entre três e sete meses, com histórico de vacinações inadequadas ou não vacinação, possibilidades de exposição ao vírus e exames complementares laboratoriais conclusivos à infecção pelo CDV (FRASER et al., 1997; SUMMERS, 1999; GEBARA et al., 2004; SILVA, 2007; MANUAL et al., 2008).

Entre os achados laboratoriais, encontra-se neutropenia, caracterizada pela redução do número de neutrófilos segmentados e trombocitopenia. Além do aumento de proteínas e leucócitos, relacionados à vigência de um processo inflamatório no líquido cefalorraquidiano (LCR) (SWANGO, 1997; GREENE e APPEL, 1998; SHERDING, 2003; GUEDES et al., 2004; SILVA e ZANINI, 2005).

A identificação de corpúsculos de inclusão em células associadas à exudato e linfócitos também são características típicas sugestivas à infecção pelo CDV. Além dos testes ELISA (enzyme linked immunosorbent assay), soroneutralização, RT-PCR e imunofluorescência (FELDMAN, 2000; JONES, 2000; ZINKL, 2000; GUEDES, 2004).

2.1.7. Tratamento e Profilaxia

A terapêutica para a cinomose canina se restringe a orientações padronizadas de suporte e medidas de correções sintomáticas e paliativas, devido à ausência de um tratamento antiviral específico. Visam reestruturar e fortalecer o sistema imune do hospedeiro para combate ao vírus e evitar infecções secundárias por outros microorganismos (AMARAL, 2005; SHERDING, 2003).

O restabelecimento imunológico consiste em reposições líquidas, eletrolíticas e vitaminas do complexo B, associada à suplementação nutricional, higienização de secreções do animal e do ambiente. Além disso, antibióticos de amplo espectro são de suma importância para o controle de infecções bacterianas de origem secundária (SWANGO, 1997; BIRCHARD, 2003; SHERDING, 2003; SILVA e ZANINI, 2005).

Não existe qualquer agente antiviral específico para o tratamento do CDV, mas alguns estudos demonstram a ribavirina altamente efetiva na replicação viral da cinomose “*in vitro*” (ELIA et al., 2007) e na fase neurológica, com sensível melhora do quadro clínico do animal (MANGIA, 2008).

Estudos relatam que técnicas de acupuntura apresentam efeitos imunoestimulante, analgésico e anti-inflamatório ao agir sobre o sistema nervoso autônomo e endócrino. Além disso, este tratamento visa estimular pontos reflexos

com propriedades de equilíbrio corporal em animais com sintomatologia neurológica (SHOEN, 2006).

Em convulsões parciais graves ou tônico-clônicas generalizadas utiliza-se o fenobarbital na dose de 2 mg/Kg, BID, por vias endovenosa, intramuscular e oral. O uso de corticoesteróides, em protocolos de regressão gradual, como a dexametasona, ocorre nas implicações imunológicas das lesões do SNC e edema cerebral. A dosagem anti-inflamatória de corticosteroides é utilizada no controle de sinais clínicos associados à encefalite crônica (VANDEVELDE, 2004).

Métodos profiláticos possuem importâncias primordiais, acessíveis e viáveis, como a vacinação inicial e de suporte anual dos animais susceptíveis, para o combate ao vírus da cinomose canina. No entanto, mesmo com a ampla administração da mesma, durante décadas, ainda se constata elevadas taxas de morbidade e mortalidade em hospedeiros em inúmeras partes do mundo (ELIAE et al., 2008).

Vacina de vírus vivo modificado induz imunidade efetiva contra a cinomose, no entanto, a imunidade derivada da mãe e a idade na qual os filhotes se tornam susceptíveis são fatores de interferência a serem considerados. O protocolo vacinal utilizado atualmente consiste na vacinação de cães filhotes a cada três semanas de vida até completarem 14 semanas (CORREA e CORREA, 1992). Alguns estudos afirmam que a administração da vacina de vírus modificado para a cinomose, por via intravenosa, tem valor terapêutico, mas não existem dados provenientes de estudos controlados que apoiem esta afirmativa (SILVA e ZANINI, 2005).

2.2. Vacinas contra *Morbillivirus*

A nomenclatura vacina (do Latim, *vaccinia*) refere-se à prática da administração de patógenos a indivíduos sadios com o objetivo de induzir uma resposta imunológica. Consistem na administração, em organismos sadios, de micro-organismos (viáveis ou inativados) ou frações destes induzirem uma resposta do sistema imune, a partir de células efetoras e células de memória, capazes de proteger ao contato posterior com o agente original. A vacinação é

considerada o meio profilático mais efetivo de prevenção e controle de várias enfermidades causadas por vírus e bactérias (BABIUK, 2000; DE CLERCQ, 2003; PINK e KIENY, 2004).

A aquisição da proteção imunológica contra alguma doença infecciosa, com o objetivo de aumentar a resistência de organismos susceptíveis à mesma, é chamada de imunização. Distinta e classificada por dois principais tipos: passiva e ativa. A primeira resulta na transmissão de anticorpos pré-formados através da placenta e/ou colostro materno ao filhote mamífero, indução de soro hiperimune ou da gema do ovo em aves e nenhuma resposta específica pelo sistema imunológico do hospedeiro (KUCERS, 1992). Logo após a exposição ao patógeno por infecção natural ou induzida ou administração de alguma vacina específica, no próprio sistema imune do hospedeiro, ocorre uma estimulação desencadeada pela produção de anticorpos e células imunes (linfócitos T) (DE CLERCQ, 2003; HENDERSON, 2005).

A imunidade passiva em cães é ressaltada pela transferência de imunoglobulinas, já anteriormente produzidos pela prévia exposição ao CDV à mãe, pelo aleitamento materno e placenta ao neonato susceptível, que desaparecem gradualmente ao avançar da idade e os protegem, em grande parte, até depois do desmame. A imunidade ativa é adquirida pelos canídeos pelo contato direto do vírus da cinomose ou vacina específica ao hospedeiro susceptível após o término da primeira imunidade. É de longa duração, e no período de transição, grande parte destes animais expostos adoece e recupera-se, tornando-se imune (DE CLERCQ, 2003; AVMA, 2004).

Vacinas eficientes com plena capacidade em induzir um estado de imunidade em hospedeiros susceptíveis são formuladas com amostras isoladas do vírus da cinomose de cães naturalmente infectados e apropriadamente atenuadas em cultura de células (GREENE, 1990).

Por apresentar elevadas patogenicidade e virulência, o vírus da cinomose canina necessita submeter-se a inúmeras condutas específicas para atenuar este potencial e viabilizar a utilização como vacina de vírus modificado. Quando não, o mesmo é capaz de desencadear o prolongamento da enfermidade ou a morte em

animais vacinados. Mesmo com esta amenização, sua administração não se recomenda em animais imunodeprimidos (BIRCHARD; SHERDING, 2003).

Métodos profiláticos vacinais devem ser submetidos a testes para assegurar a sua capacidade inócua e imunogênica. Dentre eles, são considerados essenciais o de esterilidade (garantir a não existência de contaminação fúngica ou bacteriana), estabilidade (avalia a estabilidade genética e fenotípica dos vírus atenuados; ou para atestar a estabilidade antigênica em vacinas inativadas), inocuidade (certifica-se de não desencadear efeitos indesejáveis) e potência (capacidade imunogênica) (MURPHY; PASTORET, 1999).

A capacidade da resposta imunológica adequada é avaliada, sob o controle de eficiência, a partir de testes de potencialização e realizados em espécies de animais específicos à utilização da vacina. Mesmo assim, modelos murinos também podem ser utilizados, desde que a resposta imunológica destas cobaias seja estipulada previamente comparada à resposta do hospedeiro natural (PINK e KIENY, 2004; MINGXIAO, 2006).

A resposta sorológica induzida é quantificada a partir capacidade imunogênica de antígenos originados de vacinas. A partir de grupo vacinal de animais, anticorpos específicos contra o vírus são identificados por técnicas sorológicas como ELISA ou soroneutralização, após a distribuição intercalada de diferentes produtos. Além disso, faz-se a monitoração da resposta induzida a partir do acompanhamento de animais por um longo período determinado a mercê de cada protocolo. Este método restringe-se pelo fato de que somente se quantifica a resposta humoral (PLOTKIN, 2005).

Diversas classes vacinais contra vírus são licenciadas para uso veterinário, sendo a grande parte, constituído por vírus vivos atenuados ou vírus inativados. A utilização de novas biotecnologias, principalmente envolvendo a manipulação genética, tem originado inúmeros projetos e expectativas no aparecimento de novas opções terapêuticas. Algumas vacinas recombinantes já estão no mercado, enquanto várias outras estão em fase de desenvolvimento ou de testes (PLOTKIN, 2005; MINGXIAO, 2006).

Entretanto, grande parte destas vacinas necessita ser ainda avaliada quanto as suas comprobatórias eficácia e segurança; por este déficit de informação ainda possuem pouca participação no mercado veterinário. De outro modo, algumas vacinas produzidas por antigos modelos ainda mantêm o seu local definido no mercado devido à sua garantia de eficácia e segurança (PLOTKIN, 2005).

O surgimento frequente de mutações ou taxa de mutação viral, a partir do descontrole dos mecanismos replicativos das polimerases, é o primeiro fator que afeta o desenvolvimento da resistência vacinal. Seguido pelo tamanho do alvo para a mutação, onde, alguns locais do interior do gene são mais ou menos susceptíveis a sofrer alterações em relação a outros. Além do número de replicações de cópias de genomas virais produzidas. E, por ultimo, a aptidão viral - variante genética reproduzida em relação a outras, como exemplo, a tipo selvagem (FYFE, et al., 1978; BABA, et al., 1999; KNIPE, et al., 2007).

A dinâmica das infecções virais têm grandes impactos sobre a interação entre os efeitos da terapia antiviral e do sistema imunológico. Afecções agudas em animais imunocompetentes são geralmente aniquiladas pelo sistema imunológico em pouco tempo, resultando na diminuição do status febril, além da minimização de outros sintomas. Mesmo assim, a profilaxia pode ser a abordagem mais eficaz, pois, muitas doenças são recorrentes causadas pela reativação de infecções virais latentes em pacientes imunocomprometidos (BABA, et al., 1999; KNIPE, et al., 2007).

Vacinas contra enfermidades víricas do gênero *morbillivirus* contém, em geral, vírus vivos atenuados; formuladas com quantidades variáveis de unidades formadoras de placa (UFP) e cada uma, composta com sua respectiva cepa. A imunogenicidade vacinal é diretamente associada entre a produção de anticorpos e a quantidade de UFP, assim como com a idade e condição imune. Entretanto, a produção de anticorpos, em vacinas mais potentes é, muitas vezes, inferior após a infecção natural (CARVALHO, et al., 1976).

Grande parte destas vacinas, como exemplos: CDV e Vírus do Sarampo (*Measles Virus*- MV); são desenvolvidas por propagação em células de animais ou cultivadas em ovos de galinha embrionados. Assim, estirpes de vírus são

adaptadas a esta produção e se tornam menos virulentos para o organismo em relação às cepas selvagens. São comercialmente fornecidas, em geral, liofilizadas com vírus vivos atenuados e acompanhadas com solvente para injeção (SCHATNER, 2005;).

Cerca de 93% dos pacientes, adultos, considerados saudáveis, apresentam soroconversão adequada após uma única dose vacinal. Em jovens ou imunocomprometidos, estas taxas são significativamente inferiores e o declínio nos títulos de anticorpos é mais acentuado, portanto, obrigatoriamente, estes indivíduos deverão receber duas ou mais doses contra a enfermidade presente (CARVALHO, et al., 1976; VESIKARE, et al. 2007). Não há interferência significativa na resposta imunológica à maior parte das vacinas contra *morbilivírus*, deste modo, podem ser administradas simultaneamente com outras vacinas (CARVALHO, et al., 1976).

A administração vacinal correta reduz significativamente a incidência da enfermidade vírica, além de diminuir o estímulo natural à memória imunológica, o que, impõe a necessidade da revacinação de doses de reforço da vacina para manter a taxa de títulos protetores de anticorpos (CARVALHO, et al., 1976).

Surtos e endemias de CDV ainda são frequentes em várias regiões, mesmo em animais vacinados, comparada a vacinação contra o Vírus do Sarampo em países em desenvolvimento, onde o MV, continua endêmico. Inúmeros fatores são responsáveis pela diminuição da eficácia vacinal, como: infidelidade na logística da cobertura vacinal e transmissão da enfermidade em idade precoce. Em animais muito jovens, anticorpos maternos podem interferir na replicação de vírus vivo atenuado com o vírus vacinal, o que, resulta, em proteção abaixo da taxa ideal da vacinação (BRICKS, et al., 2007).

2.3. Resposta imune a *Morbilivírus*

Enfermidades víricas são responsáveis por milhares de mortes no mundo todos os anos. Os vírus têm como característica principal a necessidade de parasitar uma célula hospedeira para iniciar e completar seu ciclo de proliferação. Tal indispensabilidade se dá devido apenas por apenas possuírem informações

genéticas mínimas para realizarem sua duplicação, contidas em moléculas de DNA ou RNA as quais carregam e, para que esta mensagem seja transformada em proteínas virais, esses patógenos precisam manipular e utilizar a maquinaria celular (MARTIN et al., 1998).

A grande parte dos vírus infecta seus hospedeiros pelas mucosas, principalmente através de vias aéreas, trato gastrointestinal e urogenital, onde células de Langherans podem capturar o agente invasor, dando início à resposta imune inata nos linfonodos periféricos, além de outros mecanismos de defesa, como ambiente ácido da mucosa gástrica e defensinas que são expressas por células epiteliais e neutrófilos e conseqüentemente causando a destruição dos mesmos (MARTIN et al., 1998; TANG et al., 1999).

Um grupo de moléculas envolvidas na emissão de sinais entre as células durante o desencadeamento das respostas imunes, as citocinas, são também, vitais na condução da resposta imune inata quando células são infectadas por vírus ou ao entrar em contato com produtos virais. A ausência dessas desencadeia sérias conseqüências resultando em um quadro de imunodeficiência, o qual favorece o desenvolvimento de infecções secundárias (BARMAK et al., 2003).

Na imunidade inata, observam-se receptores envolvidos na resposta contra vírus, os do tipo Toll (TLR: Toll like receptor), principais alvos de reconhecimento de ácidos nucleicos. Devido à grande variação genômica que os vírus podem conter, o sistema imune apresenta variações de TLRs com especificidade para cada tipo de DNA ou RNA. Toda esta variedade é de suma importância para que o sistema imune se mantenha informado e responda às infecções virais de maneira adequada (FINBERG et al., 2003; TAKEUCHI et al., 2007).

Vírus de RNA, como o CDV, são reconhecidos por específicos TRLs que desencadeiam uma cascata de respostas culminando na produção de INF (interferon) do tipo I principalmente pelas células dendríticas plasmocitoides (TAKEUCHI et al., 2007). Porém, as vias de reconhecimento podem se interagir, uma vez que os vírus de DNA sempre têm uma fase de seu desenvolvimento intracelular em que a produção de RNA de fita simples é necessária para

produção de suas proteínas, o que também ocorre com os vírus de fita dupla (BARBER et al., 2001).

Tais interações causam uma resposta imune baseada na produção de citocinas inflamatórias, principalmente TNF- α (fator de necrose tumoral), IL-1, IL-6, IL-12, IL-15, IL-18 e a quimiocina MIP 1. Com a diminuição da produção de algumas destas, principalmente interferon do tipo 1 e IL-12 ou qualquer tipo de anomalia desencadeia uma resposta falha e maior susceptibilidade a infecções (VIDAL et al., 2006).

A interação da proteína citoplasmática RIG-I (gene induzido por ácido retinoico I) com RNA de dupla fita viral tem como consequência a produção de interferon do tipo I que, associada a citocinas inflamatórias desencadeia a ativação das células NK (natural killer). Estas células têm grande importância na resposta imune inata contra vírus, pois são capazes de eliminar células infectadas por esses patógenos (TAKEUCHI et al., 2007).

A interação com a célula parasitada agregada ao sinal proveniente das citocinas inflamatórias induz a célula NK a liberar seu conteúdo citolítico que levarão à morte da célula infectada. Outro mecanismo de inibição da infecção viral utilizado pelas células NK é a lise de células que não expressam MHC (complexo de histocompatibilidade maior) de classe I, uma vez que a expressão desta molécula pode ser inibida pelo vírus infectante (VAN DOMMELEN et al., 2006).

A infecção dos cães pelo CDV é seguida por replicação viral em todo o sistema linfóide periférico respiratório. Posteriormente, propagam-se ao baço, timo, nódulos linfáticos e medula óssea, resulta em linfopenia e imunossupressão severa (MIELE, et al., 2003). Mais além, a depender da virulência, estirpe CDV, idade do hospedeiro e status imunológico, sistemas adjacentes podem ser infectados (BEINEKE, et al., 2009; GREENE, 2012; CHARLLOTE et al., 2014).

Insuficiente resposta humoral durante esta fase infectante pode promover viremia secundária, a qual pode resultar em disseminação viral para vários tecidos epiteliais e mesenquimais, assim como o sistema nervoso central. Resposta imune anti-viral satisfatória pode permitir ao indivíduo recuperação (VANDELVEDE, et al., 2005; VANDELVEDE & ZURBRIGGEN, 2005; CHARLLOTE et al., 2014).

Grande parte dos vírus consegue sobrepujar a resposta imune inata devido, principalmente, a sua alta taxa de replicação e/ou mutação; contudo, paralelamente à resposta inata, também ocorre a ativação da resposta antígeno específica ou adaptativa. Devido à natureza da infecção intracelular dos vírus, os antígenos dos mesmos são apresentados principalmente no contexto do MHC de classe I, desencadeando uma resposta de linfócitos TCD8+, que será potencializada pela ativação de linfócitos TCD4, após mecanismos de apresentação cruzada (VAN DOMMELEN et al., 2006; TAKEUCHI et al., 2007; CHARLLOTE et al., 2014).

Células TCD4 podem se diferenciar em um padrão Th1 ou Th2 dependendo das citocinas presentes no ambiente da infecção. Já se sabe que a maioria das infecções virais induz à produção de interferons e por células da resposta imune inata, na tentativa de conter a infecção de células adjacentes. Em geral, na resposta imune adaptativa observa-se uma preferência para ativação do padrão Th1 (VAN DOMMELEN et al., 2006).

No entanto, podem ocorrer respostas mistas que induz em uma resposta do padrão Th1 no início da infecção, já na fase final da doença, essa resposta muda para o padrão Th2. Porém, o mecanismo de defesa mais ativo, contra a infecção viral, é o mediado por linfócitos TCD8+ específicos. Essas células reconhecem uma célula infectada, eliminando-a através da indução de apoptose ou pela liberação de proteínas citolíticas (VAN DOMMELEN et al., 2006; TAKEUCHI et al., 2007).

Outro mecanismo eficiente da imunidade adaptativa contra vírus é a produção de anticorpos. Os anticorpos antivirais atuam principalmente como moléculas neutralizantes para evitar a interação do vírus com a célula do hospedeiro. Esses anticorpos neutralizantes se ligam ao envelope viral ou a antígenos do capsídeo. Anticorpos do tipo IgA são importantes para a neutralização de vírus que entram em contato através das mucosas respiratória e intestinal. Além de também participar no controle da infecção viral por opsonização e por ativação do sistema complemento (VIDAL et al., 2006; TAKEUCHI et al., 2007).

Os vírus, especialmente os maiores e mais complexos, que carregam moléculas de DNA, têm diversas estratégias para escapar do sistema imune. Uma delas é camuflar sua identidade por meio de mutações. Essa variação genética, em geral, leva à mudança de antígenos presentes na cápsula viral; inibindo ação de anticorpos previamente formados (BARBER et al., 2001).

A constatação de infecções víricas, do gênero *morbilivirus*, é discernida a partir de avaliações clínicas, testes sorológicos específicos e/ou pela propagação viral em células de animais. Novos procedimentos e técnicas têm sido valiosos para a compreensão dos mecanismos de imunidade a enfermidades deste gênero. Imunidade a estas infecções são observadas a partir da aquisição de anticorpos transplacentariamente no nascimento, infecção natural e/ou vacinação com vírus atenuado (ALBRECHT, et al., 1977; CARVALHO, et al., 1976; ABBAS, et al., 2004).

Estudos sobre a imunidade contra tais infecções são discutidos a partir da resposta de anticorpos pós-infecção, aparecimento ou não de sinais clínicos no primeiro ano de vida, persistência de anticorpos seguida à infecção natural ou vacinação e pela titulação de anticorpos ao longo da vida a partir do primeiro contato com o agente (KOERT, et al., 2000; ABBAS, et al., 2004).

Inquéritos clínicos e epidemiológicos indicam que Vírus da Cinomose Canina e o Vírus do Sarampo, raramente ocorrem em lactentes durante os primeiros meses de vida. Imunidade correlacionada com o histórico de prévio contato materno à infecção viral (SAUL KRUGMAN, et al., 1965; CARVALHO, et al., 1976; KOERT, et al., 2000) .

Em casos de exposição à *morbilivirus*, mecanismos de proteção, desencadeiam a neutralização do vírus e inibição completa a infecção. Por outro lado, quando anticorpos passivos estão abaixo do limiar mínimo de proteção, multiplicações de vírus podem ocorrer, apesar da presença do anticorpo. Nesta situação, a imunidade passiva-ativa propaga-se seguida a infecção subclínica ou moderada doença, com ou sem sinais clínicos, solidando uma proteção permanente (KOERT, et al., 2000; WELTER, et. Al., 2000).

A infecção pelo CDV pode ocorrer paralela com ou subsequente a outras manifestações, clínicas ou subclínicas, além de afetar o cerebelo e regiões

periventriculares. Na forma neurológica, inicia-se com a infecção da matéria cinzenta e propaga-se à matéria branca. O curso da enfermidade é determinado a partir da correlação das descrições das alterações histológicas associada às alterações neuropatológicas (BEINEKE et al., 2009; IMBSCHWEILER et al., 2012; ULRICH, et al., 2014).

Alterações morfológicas a partir da descrição histológica após a infecção experimental com o CDV são correspondidas aos diferentes estágios de lesão no indivíduo a respeito. Replicações do CDV em células gliais da substância branca são observadas a partir do 16º dia pós-infecção, destacando os astrócitos como seu alvo principal (ZURBRIGGEN et al., 1993; ULRICH, et al., 2014).

A quantidade de antígeno viral detectável é diminuída a partir da progressão da infecção, acompanhada ao aumento da inflamação de um modo antiparalelo. A diminuição da expressão proteica pode indicar uma infecção viral restrita a células neurais em estágios mais avançados da doença. Fator que contribui para a persistência da estirpe viral, pronunciada na substância branca do foco inflamatório (MUTINELLI et al., 1989; ZURBRIGGEN et al., 1998).

Inibição da infecção por interferons (INF) e a morte de células infectadas mediadas por células NK estão associados a mecanismos da imunidade aos vírus. A produção de INF é desencadeada a partir do reconhecimento do RNA viral por receptores endossômicos, e ativação de cinases citoplasmáticas. INF inibe a replicação viral em células infectadas a partir da não produção de certas proteínas, desencadeando a morte desta célula, além da identificação e morte celular de células infectadas por células NK (KOERT, et al., 2000; WELTER, et al., 2000; ABBAS, et al., 2004).

Imunidade a infecções por vírus são adquiridas por anticorpos, que, bloqueiam a ligação viral à célula hospedeira, e linfócitos T citotóxico, os quais, aniquilam as células infectadas. Porém, estes anticorpos são somente eficazes durante o estágio extracelular, ou seja, no início do curso infeccioso ou quando liberados por brotamento de células infectadas, neutralizando-o. Além da neutralização, anticorpos podem eliminar estes agentes infecciosos a partir da fagocitose, no geral, em mucosas (ALBRECHT, et al., 1977; KOERT, et al., 2000; ABBAS, et al., 2004).

Vírus de RNA são altamente mutáveis, e tais redistribuições nestes genomas, podem alterar seus antígenos e não serem mais alvos de resposta imunológica. Devido à variação antigênica, grande parte dos *morbillivirus*, podem se tornar resistentes à imunidade gerada na população por prévias infecções. Casos de endemias pelo Vírus da Cinomose Canina são recorrentes devido a grande variação de cepas (KOERT, et al., 2000; ABBAS, et al., 2004).

3. OBJETIVOS

3.1. Geral

Avaliação da resposta imune, em modelo murino, de vacinas comerciais originadas de laboratórios estrangeiros e laboratórios nacionais de diferentes fabricantes, contra a cinomose canina.

3.2. Específicos

Identificar anticorpos neutralizantes a partir da imunização vacinal pela técnica de soroneutralização.

Identificar a estimulação de esplenócitos murinos no ensaio de linfoproliferação baseado em CFSE em proliferação celular por citometria de fluxo.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. Animais

Camundongos BALB/C foram adquiridos do Biotério Central da Universidade Federal de Viçosa-UFV, com quatro semanas de idade e peso aproximado de 23 gramas. Os mesmos foram alocados no infectório da rede Mineira de Biotecnologia Aplicada a Agropecuária localizado no Departamento de Veterinária da mesma instituição com livre acesso à ração, à água e sob ciclo claro/escuro.

4.2. Imunização

Os animais foram imunizados com seis diferentes vacinas comerciais contra a cinomose canina, três originadas de laboratórios nacionais e três de laboratórios estrangeiros, nos quais se avaliaram as respostas humoral e celular a partir dos ensaios de soroneutralização e de linfoproliferação baseado na marcação CFSE em proliferação celular por citometria de fluxo, respectivamente (Tabela 1).

Tabela 1. Discriminação de 06 vacinas vivas atenuadas em relação aos seus grupos, antígenos, origem e cepas vacinais, respectivamente.

VACINA	GRUPOS	ANTÍGENO	ORIGEM	CEPA
01	G1	CDV	EUA	ONDERSTEPOORT
02	G2	CDV	EUA	ONDERSTEPOORT
03	G3	CDV	HOLANDA	ONDERSTEPOORT
04	G4	CDV	BRASIL	ROCKBORN
05	G5	CDV	BRASIL	ROCKBORN
06	G6	CDV	BRASIL	ONDERSTEPOORT

As administrações vacinais ocorreram em três diferentes momentos com intervalos de 14 dias a partir do dia 0, as coletas de sangue em quatro distintos momentos, dias 0, 14, 28 e 42 previamente as inoculações das vacinas e a eutanásia dos animais ocorreu no quadragésimo segundo dia (Figura 1).

As coletas de sangue foram realizadas por punção periocular e eutanásia dos camundongos pelo método de tração cervical para a remoção asséptica do baço com destino ao método de linfoproliferação celular “*in vitro*”.

Todos os princípios éticos na experimentação animal foram seguidos de acordo com o Comitê de Ética em Experimentação Animal (Anexo 1).

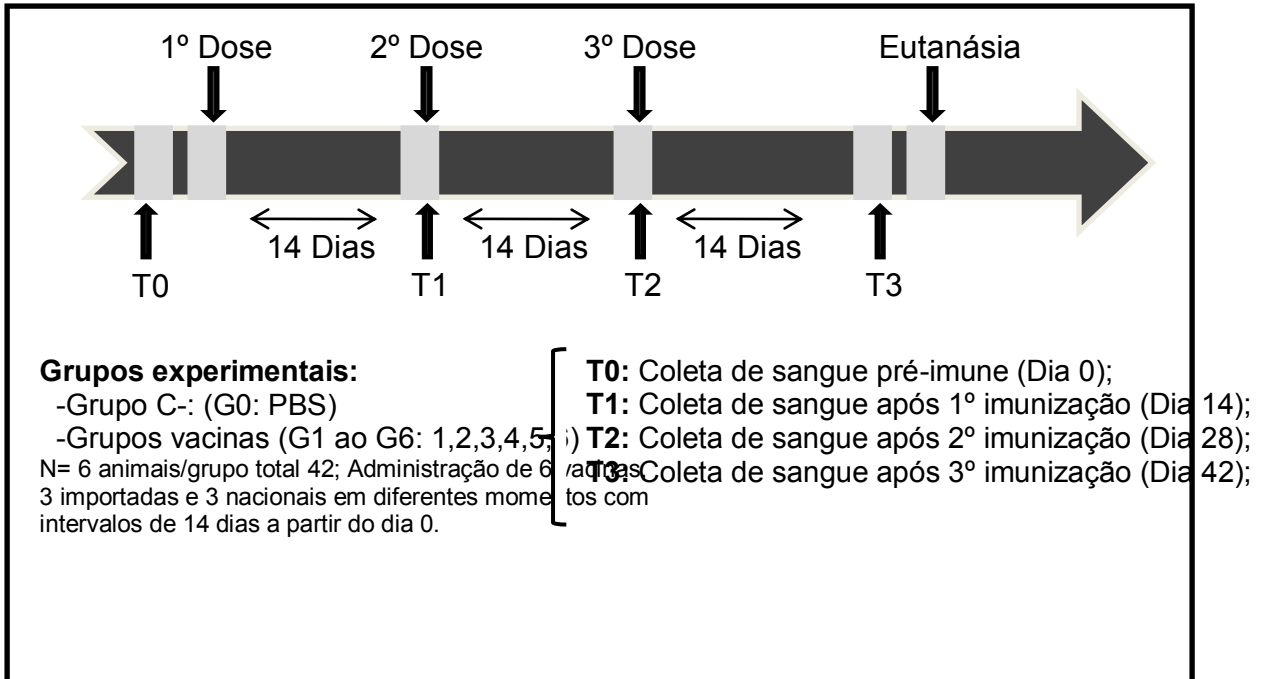


Figura 1. Imunização dos animais com 06 vacinas comerciais, 03 originadas de laboratórios estrangeiros e 03 de laboratórios nacionais, em três momentos com intervalos de 14 dias a partir do dia 0. Quatro coletas de sanguíneas (dias 0, 14, 28 e 42);

4.3. Delineamento experimental

Para definir o tamanho da amostra, utilizou-se o programa WinPepi, com nível de significância de 5% em um grau de certeza de 10%, o qual conferiu ao teste um poder de 90%. Foi aplicada a fórmula $N = (2DP^2 / \delta^2) \times f(a,b)$, onde adotou-se $DP = 0,5$ e $\delta = 1,5$, sendo $F(a,b) = 6$, isso gerou um valor inteiro de 6 animais por grupo. Foram agrupados em sete diferentes grupos, sendo um controle não vacinado, que permitiu a comparação das respostas imunológicas humoral e celular após as inoculações por via subcutânea de seis diferentes vacinas comerciais contra a cinomose canina.

4.4. Ensaio de soroneutralização

O procedimento foi realizado com o soro dos camundongos de cada grupo respectivo tratado e inativado em banho maria a 56° C por um período de 30

minutos. Posteriormente, os soros foram disponibilizados em microplacas de 96 cavidades TPP®, sendo que a primeira coluna de cada microplaca constituiu-se pelo controle celular (ausência de soro) e suspensão viral da cepa de campo da cinomose canina (CDV). A primeira linha foi constituída pelo controle de toxicidade do soro. Essa linha recebeu uma suspensão celular e soro não-diluído. A diluição do soro analisado foi processada entre as linhas B e H da microplaca na base dois crescente do soro (1:2, 1:4, 1:8, 1:16, 1:32, 1:64, 1:128).

Dessa forma, cada amostra de soro foi equivalente a cada uma das colunas das placas, e cada diluição do soro ocupou uma linha da microplaca em ordem decrescente de concentração. Posteriormente às diluições, cada cavidade recebeu uma dose constante de vírus contendo 100 TCID₅₀ da cepa de campo CDV, com exceção da coluna um e da linha um. Após incubação da mistura soro-vírus por 1 hora a 37 °C em estufa de CO₂, a suspensão de células VERO-SLAM, passagem 48, de 50 µL na concentração de 5x10⁴ células/poço foi adicionada e seguidamente incubada a 37°C sob atmosfera de 5% de CO₂.

A leitura do teste foi realizada após 72 horas de incubação através do monitoramento do efeito citopático. Foram considerados títulos de anticorpos neutralizantes para o CDV, as recíprocas das maiores diluições do soro capazes de inibir a replicação viral e, conseqüentemente, a produção de efeito citopático. Amostras de soro de referência positiva e negativa foram utilizadas como controles.

4.5. Ensaio de linfoproliferação celular e citometria de fluxo

Os camundongos dos respectivos grupos foram eutanasiados para a remoção asséptica dos órgãos esplênicos e alocação dos mesmos em meio RPMI, que em capela de fluxo laminar foram gentilmente macerados para a obtenção de células esplênicas totais. Estas células foram lavadas com meio RPMI incompleto e centrifugadas a 1600 RPM por 7 minutos a 4°C. Posteriormente, foram ressuspendidas e incubadas por 5 minutos com tampão de lise (nove partes de cloreto de amônio a 0,16 M e uma parte de Tris-HCl a 0,17 M). As mesmas foram

novamente lavadas e ressuspensas para uma concentração de 3×10^7 células/mL em meio RPMI incompleto.

Sob tal concentração, iniciou-se a marcação com CFSE. Estas células foram marcadas com uma concentração de 2 μ M de CFSE (CaboxyFluorescein diacetate Succinimidyl Ester) –SIGMA, CellTrace™ CFSE Proliferation Kit C34554, de acordo com as normas do fabricante, durante 5 minutos a 37° C, logo em seguida, a reação foi parada pela adição de um volume de meio RPMI seguida de uma nova incubação de 2 minutos em temperatura ambiente (CARVALHO et al., 2010). Após lavagens das células marcadas com CFSE foram, mais uma vez, ressuspensas em meio RPMI completo com 10% de SFB numa concentração de 5×10^5 células/mL.

Posteriormente, foram alocadas em placas de cultivo celular de 96 cavidades TPP® (100 μ L/poço) e incubadas a 37°C sob atmosfera de 5% de CO₂ por 48 horas de acordo com cada tratamento respectivo: tratamentos com meio RPMI suplementado com 5% de SFB (controle negativo) e com antígeno total derivado do vírus da cinomose canina na concentração de 2 μ g/mL.

Para a preparação do antígeno viral na estimulação esplênica uma alíquota de 15 mL do vírus da cepa de campo da cinomose canina (CDV) passagem quatro, na titulação de $10^{4,3}$ TCID₅₀/50mL foi precipitada com 6,8 gramas de sulfato de amônio saturado, totalizado uma concentração de 70% da amostra. Após a total diluição do soluto, a mesma foi mantida overnight em geladeira a 4° C e centrifugada no dia seguinte a 3000 rpm por 20 minutos. Logo em seguida, todo o sobrenadante foi desprezado até a secagem total do pelete e ressuspendido em 600 μ L do meio RPMI. A concentração proteica de 6,29 mg/mL da solução foi dosada no Nanodrop Lite Spectrophotometer (Thermoscientific) e esta foi utilizada no tratamento viral na concentração 2 μ g/mL/poço em um MOI aproximado de 0,8 para estimulação celular.

Após o período de incubação (48 horas), cada grupo foi respectivamente aliquotado em microtubos e encaminhado ao Núcleo de Microscopia e Microanálise do Centro de Ciências Biológicas e da Saúde da Universidade Federal de Viçosa para leitura de linfócitos em geral marcados no ensaio de

linfoproliferação baseado em CFSE e analisados por citometria de fluxo (BD FACSVerserTM, Saint Luis, EUA).

4.6. Análise estatística

Os resultados do teste de soroneutralização foram expressos como a média das duplicatas. A significância da diferença entre os grupos foi calculada utilizando-se o teste ANOVA, seguido do teste Dunnett disponível no programa GraphPad Prism 5.0.

Os resultados da citometria de fluxo foram analisados pelo programa BDFacSuite software.

5. RESULTADOS

5.1. Avaliação dos títulos de anticorpos segundo os grupos avaliados

Para avaliação dos títulos de anticorpos neutralizantes para o vírus da cinomose canina, foi utilizada a técnica de soroneutralização, a qual expressa a perda da capacidade infectante do vírus como índice soroneutralizante e prevenção do efeito citopático (formação de sincícios) viral nas células. Neste estudo, foi utilizada a célula VERO-SLAM e a cepa viral de campo CDV, passagem quatro, com título de 100 TCID₅₀.

O soro analisado foi processado em uma diluição crescente (1:2, 1:4, 1:8, 1:16, 1:32, 1:64, 1:128), consideradas através do monitoramento do título de anticorpos neutralizantes. As recíprocas diluições capazes de inibir a replicação viral coíbem a produção do efeito citopático. Amostras de referência negativa e positiva foram utilizadas como controles.

Foram analisados sete grupos, G0 ao G6, sendo o primeiro como controle negativo (PBS) e os demais com seis diferentes vacinas comerciais, G1 ao G3, vacinas de laboratórios estrangeiros e G4 a G6, nacionais, respectivamente. A resposta humoral dos animais foi avaliada por três imunizações com intervalo de 14 dias a partir dia 0, ou seja, dias 14, 28 e 42. Houve a comparação entre os animais de cada grupo e entre os grupos.

De acordo com a análise de variância (ANOVA) seguido ao Dunett houveram diferenças significativas $p < 0,001$ do grupo G0 em relação aos grupos G4, G5 e G6 nos dias 14, 28 e 42, após as três imunizações e, $p < 0,05$ ao G2 somente no dia 42. Os grupos G1 e G2 diferiram $p < 0,001$ em relação aos grupos G4, G5 e G6 nos dias 14, 28 e 42. O grupo G3 diferiu $p < 0,001$ com os últimos três grupos em todos os intervalos analisados. Entre os grupos G4 e G5, não houve nenhuma diferença significativa em nenhuma imunização, diferentemente dos grupos G5 e G6, os quais demonstraram $p < 0,001$ nos dias 14 e 28.

São constatadas na Figura 2, após a primeira inoculação vacinal (14 dias), diferenças significativas $p < 0,001$ somente nos grupos G4, G5 e G6 em relação ao controle não vacinado (G0).

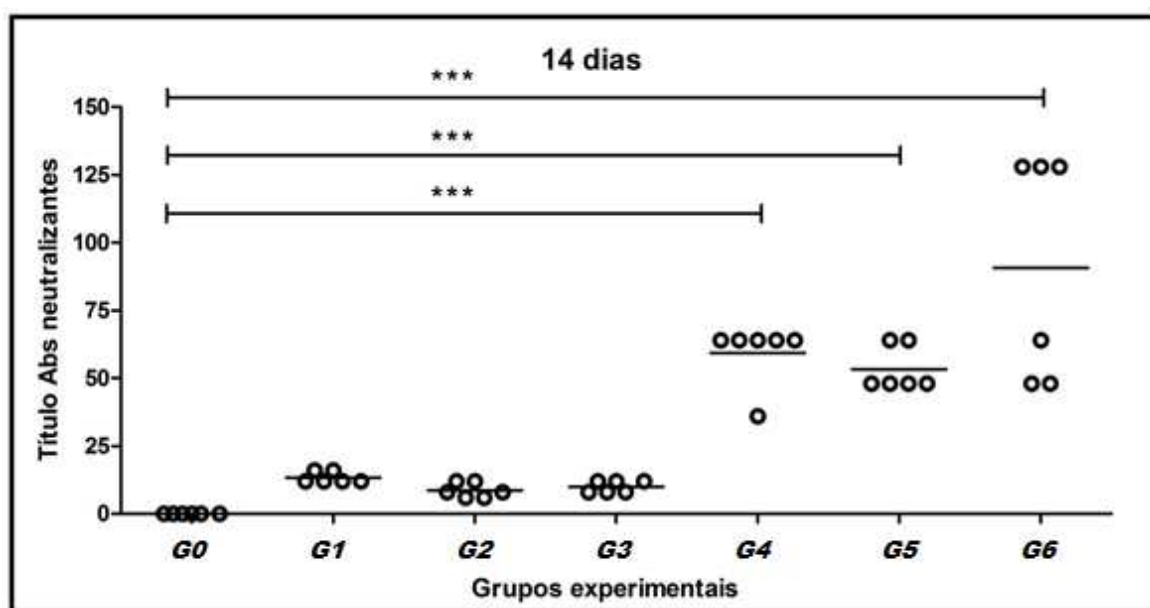


Figura 2. Título de anticorpos neutralizantes dos grupos vacinados em relação ao controle não vacinado (G0) após a primeira imunização (dia 14); (* $p < 0,05$; *** $p < 0,001$).

São constatadas na Figura 3, após a segunda inoculação vacinal (28 dias), diferenças significativas $p < 0,001$ somente nos grupos G4, G5 e G6 em relação ao controle não vacinado (G0).

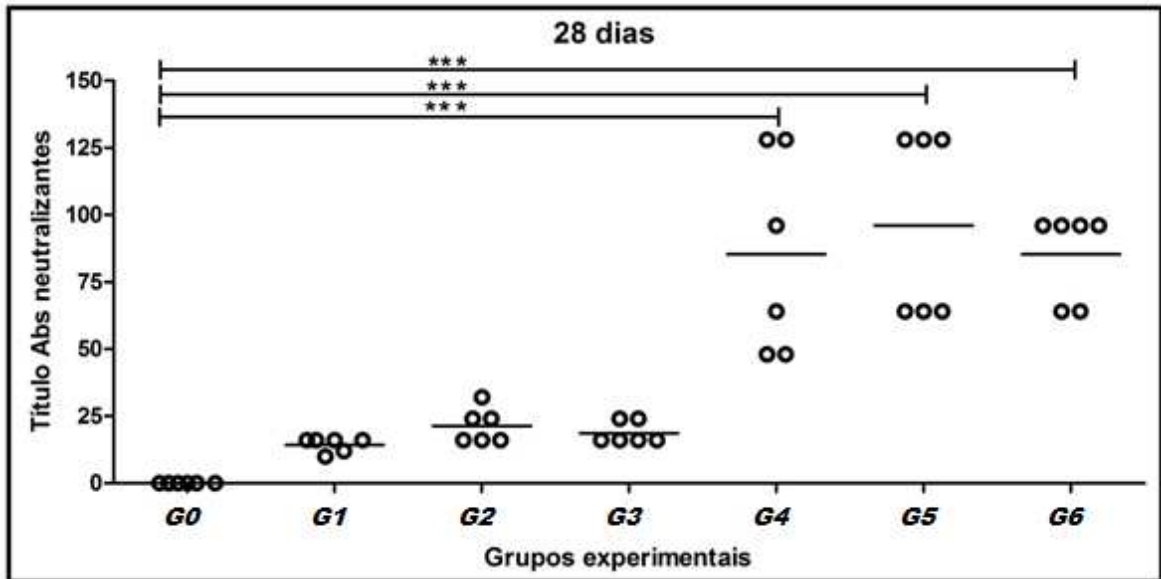


Figura 3. Título de anticorpos neutralizantes dos grupos vacinados em relação ao controle não vacinado (G0) na segunda imunização (dia 28); (* $<0,05$; *** $<0,001$).

Constatam-se na Figura 4, após a terceira inoculação vacinal (42 dias), diferenças significativas $p < 0,001$ nos grupos G4, G5 e G6 e $p < 0,05$ nos grupos G1 e G2 em relação ao controle não vacinado (G0).

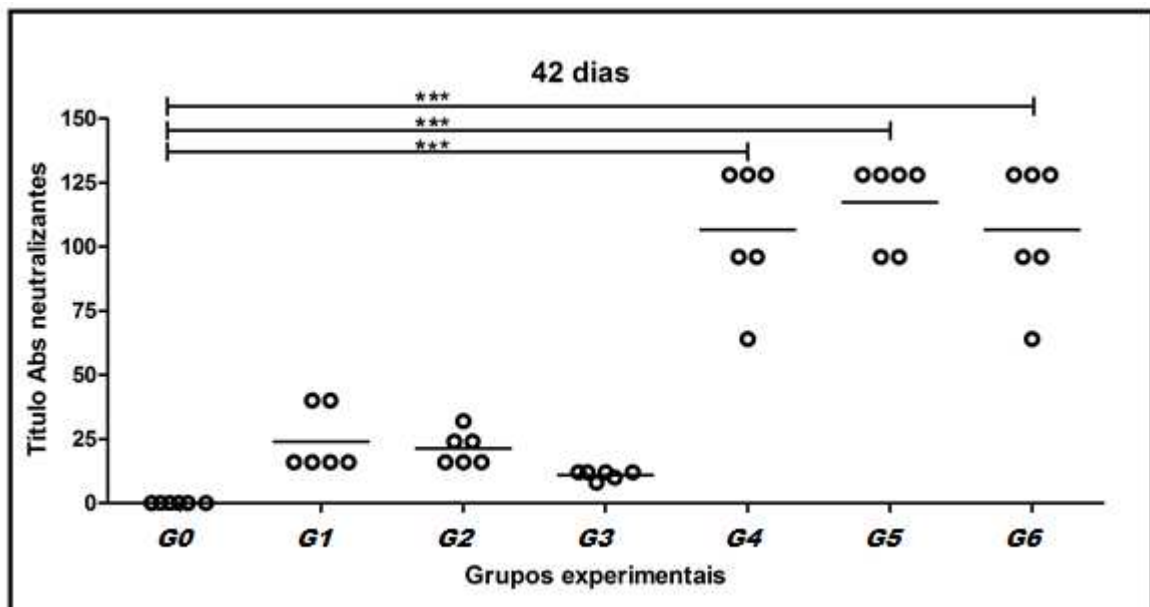


Figura 4. Título de anticorpos neutralizantes dos grupos vacinados em relação ao controle não vacinado (G0) na terceira imunização (dia 42); (* $<0,05$; *** $<0,001$).

A Figura 5 apresenta a ausência de anticorpos neutralizantes no G0, grupo não imunizado com vacina (PBS) nos dias 0, 14, 28 e 42 e em todos os outros grupos no dia 0, soro pré-imune. É ressaltada diferença estatística entre os grupos G4 e G6 e G5 e G6 nos dias 14 e 28. Não há diferença significativa entre os grupos G4, G5 e G6 no dia 42.

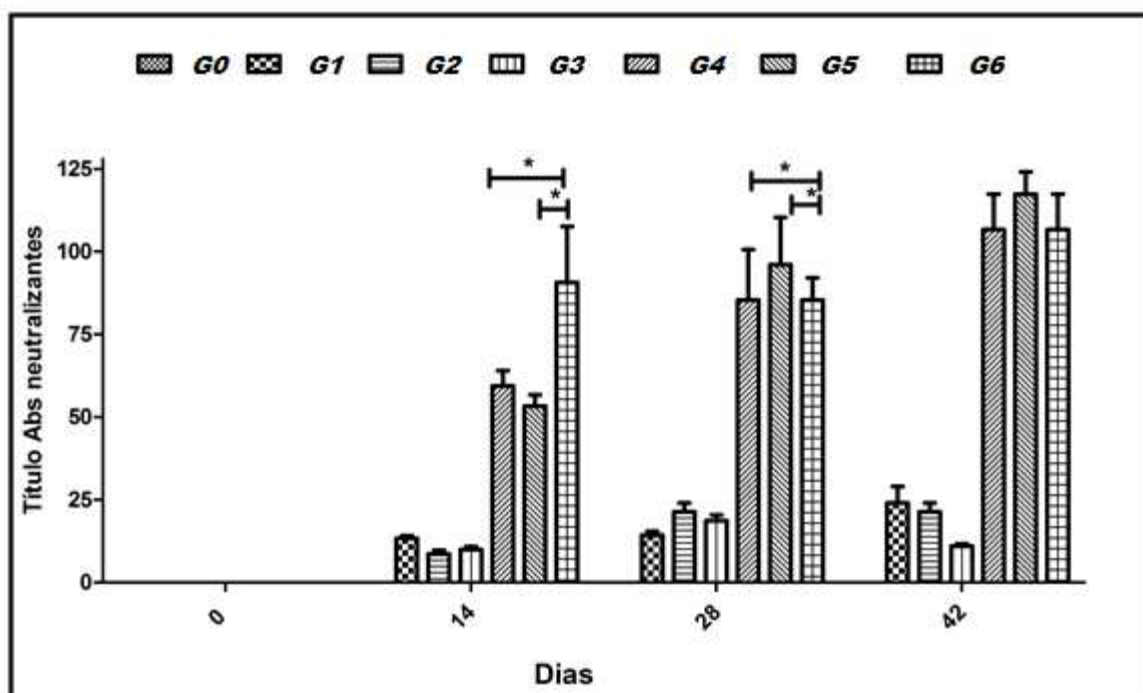


Figura 5. Correlação entre o título de anticorpos neutralizantes e o período entre três imunizações vacinais a partir do dia 0 com intervalos de 14 dias (0, 14, 28 e 42 dias); Teste ANOVA, seguido do teste Dunnett(* $0 < 0,05$; *** $0 < 0,001$).

5.2. Análises da proliferação de linfócitos por marcação de CFSE

Foi estudada a resposta de células linfocitárias murinas ao estímulo de diferentes vacinas comerciais e “*in vitro*” houve estimulação celular pelo vírus da cinomose canina (CDV) no ensaio de linfoproliferação com marcação de CFSE em proliferação celular por citometria de fluxo. Para determinação da taxa de proliferação, foram analisados os parâmetros FSC/CFSE, e avaliadas as percentagens de células nas regiões correspondentes apenas às células viáveis. As células não-viáveis foram marcadas 1 μ L de Iodeto de Propídeo (Sigma) e desconsideradas da análise.

Os resultados obtidos por citometria são dispostos sob a forma representada nas Figuras 6, 7 e 8. Cada ponto diz respeito a uma célula, que é distribuída em função do seu tamanho (FSC) e fluorescência (CFSE). Após a seleção de uma população representativa de 5000 células viáveis em cada grupo, procedeu-se à avaliação do estímulo do vírus. O eixo horizontal diz respeito à intensidade de fluorescência à marcação de CFSE e o vertical ao número de células viáveis. Como o objetivo foi avaliar a proliferação de linfócitos sob estímulo de diferentes vacinas comerciais “*in vivo*” e “*in vitro*” estimulação celular pelo vírus da cinomose canina (CDV), seria de se esperar um acréscimo de células deslocadas à esquerda dos gráficos *Dot Plot*, ressaltando uma possível multiplicação destas em relação ao estímulo viral.

Relativa à Figura 6, observa-se que o grupo G0, controle sem qualquer estimulação vacinal (PBS), meio (controle negativo) e vírus (controle positivo, estímulo viral), não exerceu proliferação celular sendo representada pela percentagem de 3,19 e 3,31% numa população de células viáveis, respectivamente. No grupo G1-meio e vírus, representado pela vacina 01, houve multiplicação celular, 6,84 e 10,06% e no G2-meio e vírus, vacina 02, foi observada um estímulo (4,66 e 13,38%).

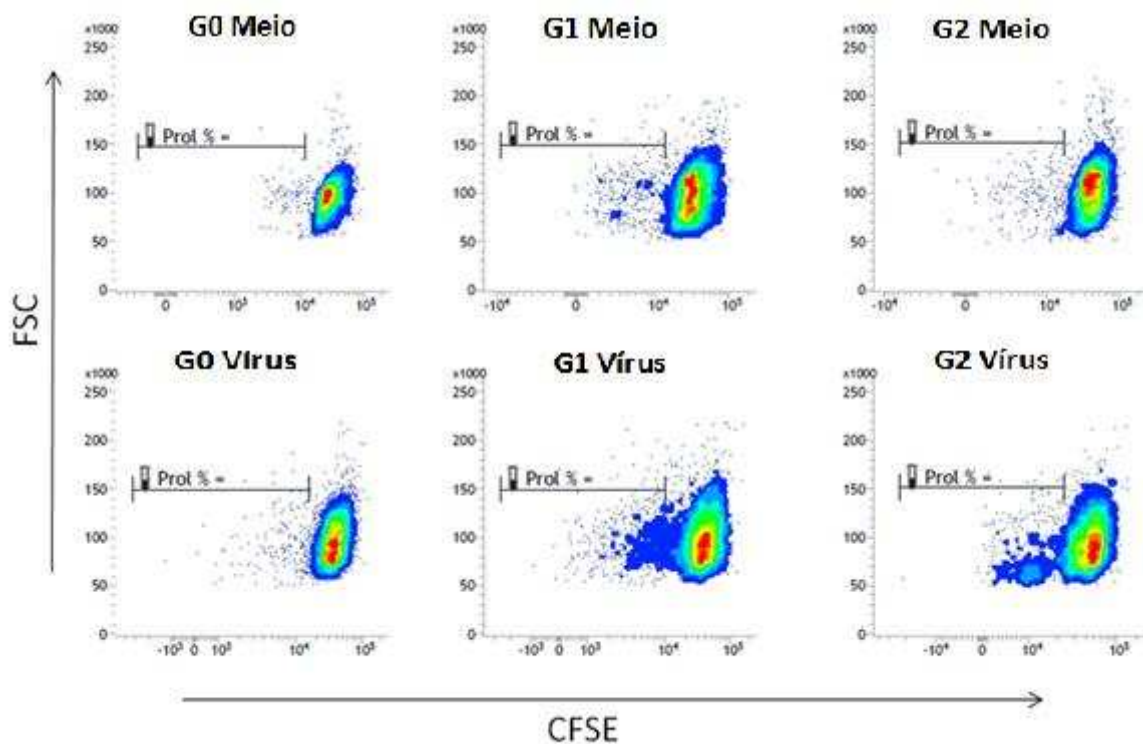


Figura 6. Distribuição das células em função do seu tamanho (FCS) e intensidade de fluorescência (CFSE), em que se definiu uma região contendo somente células viáveis.

Na Figura 7, o grupo G3, vacina 03, apresenta-se ligeiramente reativo (7,0 e 9,06%, meio e vírus, respectivamente). Nos grupos G4 e G5, vacinas 04 e 05, houve significativas estimulações linfocitárias pelo vírus em relação ao seu controle expressas por 5,42 e 21,64 e 3,34 e 25,2%.

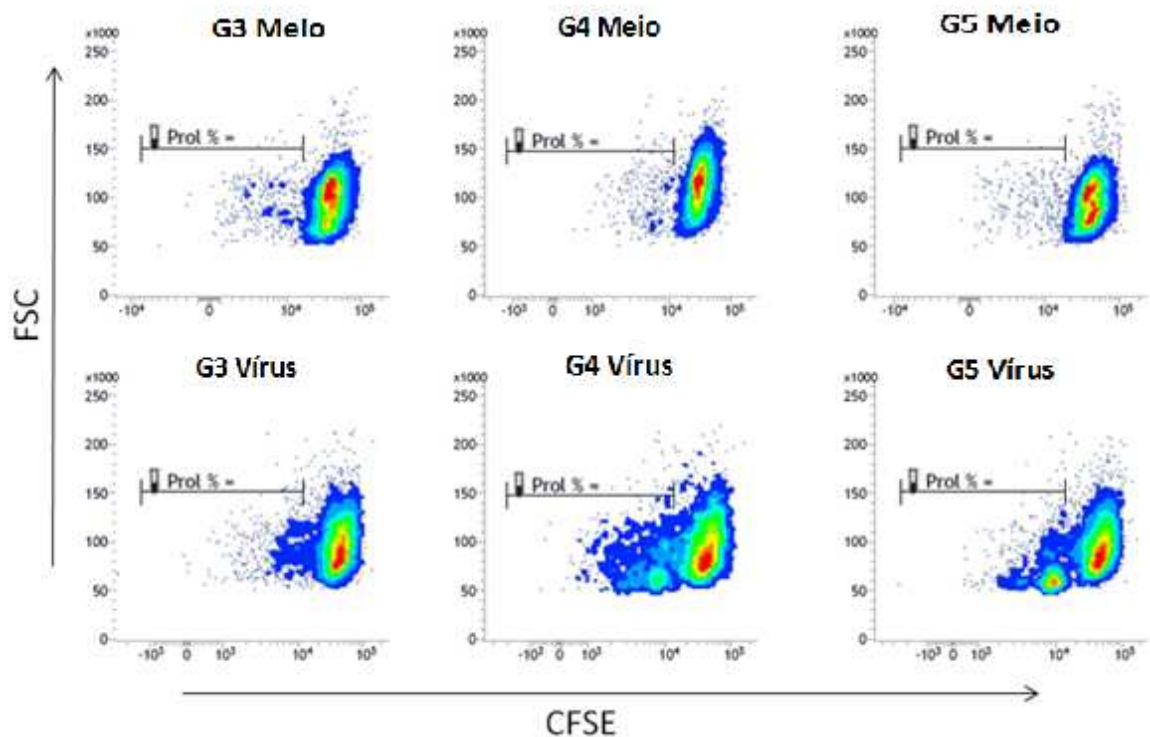


Figura 7. Distribuição das células em função do seu tamanho (FCS) e intensidade de fluorescência (CFSE), em que se definiu uma região contendo somente células viáveis.

O grupo G6, vacina 06, há proliferação de linfócitos do controle viral ao meio, de 6,95 e 19,2%, a qual é observada pelo aumento da multiplicação celular em direção ao lado esquerdo do gráfico (Figura 8).

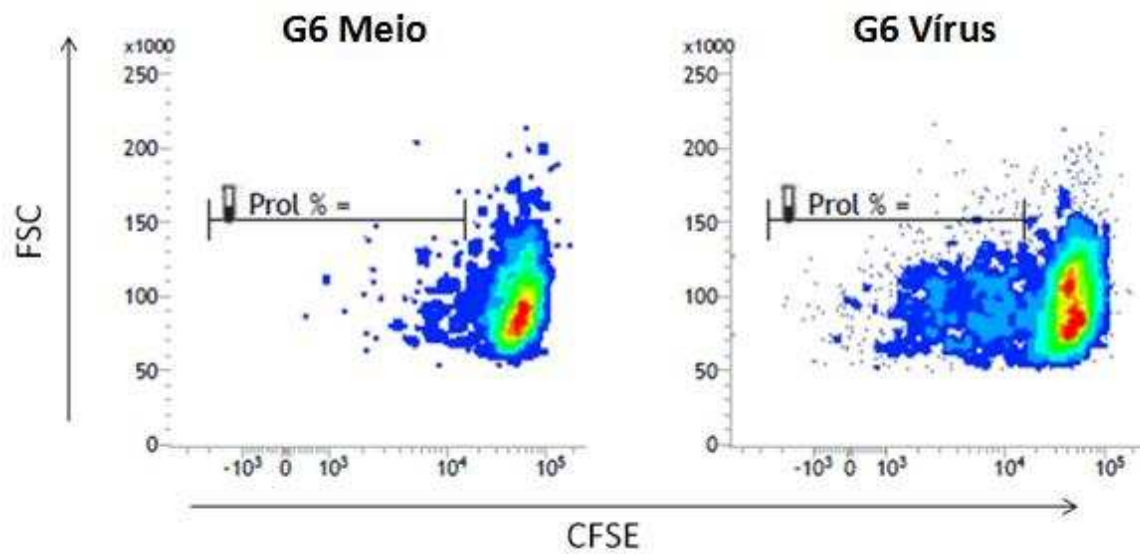


Figura 8. Distribuição das células em função do seu tamanho (FCS) e intensidade de fluorescência (CFSE), em que se definiu uma região contendo somente células viáveis.

É demonstrada na Figura 9 uma correlação entre o controle negativo (meio) e o estímulo viral (CDV) dos grupos experimentais em relação à percentagem de intensidade de fluorescência à marcação pelo CFSE, a qual ressalta um maior estímulo viral dos grupos G5, G4 e G6 em relação aos grupos G2, G1 e G0 (controle, PBS), respectivamente.

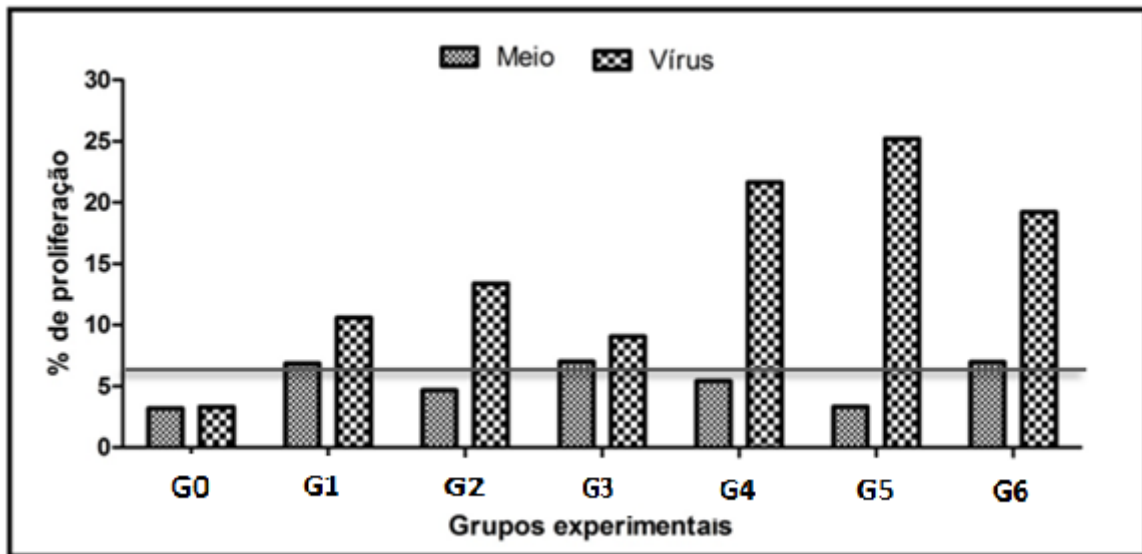


Figura 9. Correlação entre os grupos experimentais G0 ao G6 e a percentagem da intensidade de fluorescência a marcação CFSE.

6. DISCUSSÃO

O maior título de anticorpos neutralizantes para o vírus da cinomose canina foi constatado nas vacinas 4, 5 e 6, dispostas respectivamente nos grupos G4, G5 e G6 as quais foram capazes de coibir a replicação viral nas menores diluições em comparação aos demais grupos vacinados avaliados e o grupo não vacinado. Da mesma forma, Fabiana et al., 2007 e Olson et al, 1977, descreveram diferenças significativas entre os títulos médios de anticorpos neutralizantes nos grupos de animais vacinados e não vacinados.

Monti, 2004, ressaltou que 90% dos cães não vacinados não apresentaram títulos de anticorpos neutralizantes contra o CDV, sugerindo ao não contato prévio ao vírus. Similaridade observada neste trabalho, ressaltada no dia 0 (pré-inoculação) e no grupo G0, onde não houve exposição dos animais ao antígeno.

O estudo foi realizado em modelos murinos, camundongos Balb/c, não receptivos a infecção pelo CDV. Mesmo assim, houve enorme confiabilidade nos resultados devido ao modelo agregar inúmeras vantagens, como avaliar grande quantidade de indivíduos, total controle da enfermidade no ambiente e nos animais, exclusão de qualquer contaminação cruzada entre os grupos, alevada similaridade genética, padronização ambiental, fácil manutenção e observação, ciclos vitais curtos, grande quantidade de informações básicas disponível e baixo custo.

Biazzono, et al, 2001, resalta uma ascensão significativa do título pré-vacinal para o pós-vacinal de filhotes cães para títulos protetores acima de >100. Títulos menores a este valor apontam uma resposta de capacidade inferior, sendo o animal susceptível à infecção natural (Guimarães et al., 2009).

De acordo com McCaw et al., 1998, cães que desenvolvem títulos de anticorpos contra a cinomose maiores de >100 são imunogenicamente protegidos. Título também estudado por Appel, 1969, o qual descreveu a sobrevivência de cães susceptíveis após a exposição com o vírus selvagem.

Greene, 1990, ressalta que nenhuma vacina imuniza 100% de uma população, devido às inúmeras variantes biológicas, além de outros fatores. Ainda assim, é questionável a imunogenicidade vacinal de cães já previamente vacinados, devido aos baixos títulos de anticorpos encontrados em cães com histórico de vacinação conhecidos (RIKULA et al, 2000).

Grande parte das vacinas comerciais contra o vírus da cinomose canina é polivalente, ou seja, possui, além do CDV, outras cepas, o que, compromete o desencadeamento de uma adequada resposta imunológica (DAVIES & PIDFORD, 1991). Schultz, 1995, sugere que vacinas com múltiplos agentes devem ser cautelosamente utilizadas, devido a estas, promoverem uma menor resposta no título de anticorpos contra todos os antígenos. Além destas, interferem entre seus antígenos desencadeando uma competição entre as células apresentadoras de antígenos, a qual pode impedir que o hospedeiro responda normalmente a cada um deles.

Biazzono et al., 2001, mensuraram os títulos de anticorpos pela soroneutralização em filhotes de cães negativos para anticorpos passivos anti-CDV, mantidos em isolamento, vacinado com três doses de vacina monovalente para cinomose. Foram constatados títulos elevados em todos estes cães, mesmo 30 dias após a administração da primeira dose. Em outros animais, nas mesmas condições, mas com a presença de anticorpos maternos, constataram-se títulos negativos após a vacinação, que segundo Lima, 2013 e Greene, 1990, a vacinação na presença de anticorpos de origem materna é a causa mais comum de interferência vacinal em filhotes.

Fabiana, et al., 2007 verificou a correlação entre os títulos de anticorpos até cinco doses da vacina contra o CDV no teste de soroneutralização, a qual não se constatou aumento significativo do título entre a 6^o e a 5^o dose. De acordo com Olson et al., 1997, o título de anticorpos atinge um patamar de estabilidade, assim, ressalta a necessidade de somente revacinar cães adultos para a permanência constante estável deste título.

No presente estudo, mesmo havido uma boa resposta de anticorpos após a primeira imunização em algumas vacinas, alguns animais somente obtiveram a capacidade de induzir o título esperado após a terceira vacinação. Estes dados foram fortalecidos com os estudos de Biazzono, et al, 2001 e Stoffel, 2000, os quais observaram que muitos cães responderam acima do adequado ao antígeno representado pelo vírus vacinal.

Embora os animais deste trabalho não tenham sido acompanhados por períodos prolongados, Lima, 2013, explica o declínio do título de anticorpos após 12 meses e a última imunização pode se dá pelas variações individuais nas respostas ao imunógeno vacinal.

Biazzono, et al, 2001, consideraram a resposta ao vírus vacinal da cinomose canina lenta e progressiva, observadas com aumentos significativos nos títulos de anticorpos somente após a última administração do imunógeno. Corroborando com os resultados deste estudo, em modelo murino, também houve, em alguns grupos, gradativos aumentos nas concentrações de anticorpos.

Welter et al., 2000 compararam duas vacinas contra o CDV em filhotes de furões sem a proteção de anticorpos maternos após 2 inoculações, 3 e 6 semanas e, como resultados constataram a ausência de anticorpos neutralizantes antes da primeira imunização e após esta, foi identificada significativa elevação na titulação. Não houve diferença $p < 0,05$ entre após as primeiras e segundas imunizações. O que contrapõe o atual trabalho, no qual houve diferenças significativas $p < 0,05$ e $p < 0,001$ entre as vacinas e após cada imunização.

Welter et al., 2000, compararam a indução de títulos de anticorpos neutralizantes pela administração de vacinas por via intranasal e parenteral, o qual demonstrou uma significativa diferença entre as duas. Respectivamente, a primeira forma de imunização desencadeou uma progressiva estimulação de anticorpos neutralizantes a cada imunização, corroborando com o atual estudo e na indução parenteral não houve diferença $p < 0,05$ entre as primeiras e segundas imunizações.

A citometria de fluxo é uma técnica quantitativa que estuda múltiplas propriedades físicas e biológicas de uma única partícula celular. Usada para

confirmar diagnósticos e fornecer valiosas informações prognósticas (CARVALHO et al., 2010).

Neste estudo, foi avaliada a estimulação de linfócitos em geral, de origem esplênica murina, com estímulo de seis vacinas contra a cinomose canina e um controle negativo (PBS) “*in vivo*” e por estímulo pelo vírus da cinomose canina (CDV) “*in vitro*” marcados no ensaio de linfoproliferação baseado em CFSE por citometria de fluxo. Foram analisadas somente células linfocitárias viáveis sob os parâmetros: tamanho e marcação (FSC/CFSE) em relação à melhor proliferação destas. No estudo de Lemos et al., 2007, a citometria de fluxo foi o teste com maior confiabilidade de elevadas sensibilidade e especificidade, na discriminação de cães naturalmente infectados de cães vacinados.

Agostinho, 2013, cita que a viabilidade de células do sangue periférico canino foi afetada pelo CDV em animais e poderiam ter sido detectadas por maior intensidade marcação de CFSE e sugere uma exposição precoce do antígeno viral pode ser descritas para outros *Morbillivirus*.

Castilho et al., 2005, relataram a primeira análise filogenética de onze amostras positivas de CDV derivadas do sistema nervoso central de cães no Brasil, baseada na sequência parcial do gene N – altamente conservado em estirpes do CDV envolvido diretamente na indução de anticorpos neutralizantes e que desempenha um papel essencial na ligação do vírus e entrada em células hospedeiras, e ressaltaram significativa similaridade com as cepas CDV Onderstepoort e Lederle, presente em grande parte de vacinas comerciais disponíveis no mercado.

Panzer et al., 2012, mencionaram um nível de divergência menor que 2,7% entre as linhagens de cepas de CDV sul-americanas e europeias e 4,3% em relação às demais. Tal semelhança genética pode indicar uma possível origem comum dos vírus ou uma homogeneização genética contínua devido ao intercâmbio comercial entre essas regiões. E, dentre as linhagens sul-americanas, algumas podem ter sido transferidas para carnívoros selvagens por cães domésticos ou vice-versa, e as diferenças observadas podem ser consequências da adaptação a um novo hospedeiro.

Relatos do ressurgimento do CDV em populações de cães vacinados resultam da atenuação insuficiente do vírus da vacina ou pelo surgimento de novas cepas de campo com a capacidade de evadir a resposta imune gerada por vacinas atuais. Panzera et al., 2012, contestam esta hipótese de uma reversão do vírus vacinal devido a cães vacinados, em seu estudo, terem sido afetados por cepas de campo de CDV. Não se sabe por completo a eficácia das vacinas comerciais utilizadas, mas pressupõe-se que podem ser parcialmente comprometidas pelas suas variações antigênicas e genéticas.

A diversidade genética dos isolados do CDV em todo o mundo tem levantado preocupações sobre a possível alteração do perfil antigênico de variantes que poderiam comprometer a imunidade induzida por cepas vacinais (IWATSUKI et al., 2000; MARTELLA et al., 2006, 2008.; UEMA et al., 2005). Espinal et al., 2014, confirmaram infecção pelo CDV em animais vacinados e somente a análise filogenética de um cão exclui qualquer possibilidade da doença ser causada por uma estirpe de vacina com virulência residual. A explicação mais plausível para infecção pelo CDV em um filhote aos quatro meses de idade seria a administração de apenas uma vacinação ou incapacidade de desenvolver uma resposta imunitária primária ou inadequado protocolo vacinal.

Martella et al., 2011, mostraram que alguns isolados virais de campo a partir de cães domésticos e carnívoros selvagens apresentaram identidade de nucleotídeos acima de 99% com a estirpe Rockborn. Espinal et al., 2014, a partir de estudos de metagênese, sugerem a existência de uma nova linhagem de CDV em circulação em populações de cães domésticos no oeste sul-americano, e que esse vírus do tipo selvagem é claramente distinta das estirpes vacinais e de outras linhagens conhecidas.

Análises filogenéticas moleculares e evolutivas do CDV revelam que o surgimento da infecção pelo CDV em novas espécies hospedeiras pode ser associado a mutações que afetam o receptor de ligação da proteína H. Zhao et al., 2014, vacinaram canídeos selvagens em províncias do nordeste da China com cepas vacinais CDV3 e Onderstepoort contra o CDV e em 16 animais confirmados positivos com base no exame histopatológico de lesões, detecção de

antígeno de CDV e demonstração de CDV RNA por RT-PCR foi constatado a similaridade genética com estirpes do CDV latino americanas.

Hashiguchi et al., 2007, ressaltam que alterações na N-glicosilação, identificada na proteína H de algumas cepas do CDV, tem sido associadas ao aumento da virulência em casos de CDV, além disso, esta proteína sugere o mascaramento de epítomos antigênicos que podem impedir a ligação de anticorpos neutralizantes contra a mesma e por conseguinte desencadear falhas vacinais.

Zhao, et al., 2014, observaram semelhanças na disposição estrutural de aminoácidos em isolados do CDV e ressaltaram um papel importante desta na adaptação das cepas virais em novos hospedeiros. O CDV é capaz de sofrer mutações, pelo que relativamente poucas mudanças estruturais em posições específicas de aminoácidos em antígenos de superfície podem potencialmente resultar em mudanças significativas na especificidade viral. A caracterização molecular antigênica de estirpes do CDV é essencial para a compreensão dos mecanismos que estão envolvidos nas falhas e diferenças vacinais.

Budaszewski et al., 2014, constataram um percentual significativo de cães sul-americanos vacinados contra CDV, mesmo assim, positivos assintomáticos para esta enfermidade e ressaltam que a associação do diagnóstico clínico e patológico não foram acompanhados pela epidemiologia molecular da análise do gene H. No Brasil, estudos epidemiológicos são escassos, mas alguns dados sugerem que o CDV é endêmico em populações de cães urbanos explicado pelo grande número destes hospedeiros serem abandonados e alguns proprietários se encontrarem em situações econômicas precárias. Os mesmos autores acharam significativos percentuais de cães positivos e assintomáticos, o que se estima a grande susceptibilidade de animais subclínicos capazes de transmitir o vírus, agindo como reservatórios. (GREENE & APPEL, 2006).

Budaszewski et al., 2014, propôs várias hipóteses para explicar as falhas vacinais dos seus 12,2% dos cães positivos para CDV considerados vacinados com base nos registros clínicos, tais como imunização de hospedeiros imunocomprometidos, protocolos incorretos de vacinação, armazenamento inadequado destas vacinas, resposta imune deficiente e o surgimento de novas

cepas divergentes antigenicamente capazes de escapar da proteção imunológica provocada pelas mesmas.

A partir dos resultados expostos neste estudo, pressupõe-se que, apesar da elevada similaridade de alguns genes responsáveis pela capacidade imunogênica vacinal, vacinas comerciais desenvolvidas por laboratórios nacionais foram imunogenicamente superiores ($p > 0,05$) as vacinas originadas de laboratórios estrangeiros, devido a estas, serem desafiadas com cepa nacional, ou seja, o desempenho imunogênico de vacinas nacionais é superior às estrangeiras quando desafiadas com cepas circulantes e adaptadas em território nacional. Resultado que não desmerece, em alguma hipótese, a resposta imunogênica de vacinas estrangeiras em território estrangeiro. Além de vacinas originadas de laboratórios estrangeiros são de elevado valor, até o triplo do valor comercial em relação as nacionais.

7. CONCLUSÕES

1º. Foram identificados melhores títulos de anticorpos neutralizantes pela técnica de soroneutralização em vacinas nacionais (vacinas 4, 5 e 6) ($p < 0,05$).

2º. Foi identificada uma taxa de proliferação elevada de CFSE em vacinas nacionais 4, 5 e 6.

3º. Conclui-se que, vacinas originadas de laboratórios nacionais foram imunogenicamente superiores as vacinas originadas de laboratórios estrangeiros quando desafiadas com cepa nacional.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABBAS, A. K.; LICHTMAN, A. H.; PILLAI, S.. **Imunologia celular e molecular**. 6ª edição. 2004. Saunders Elsevier.

ALBRECHT, M. D.; FRANCIS, A.; ENNIS, M. D.; BETHESDA, M. D.; EDWARD, J.; SALTZMAN, M. D.; HOLLYWOOD, F. A.; SAUL KRUGMAN, M. D.. Persistence 12 months: of maternal Mechanism antibody in infants beyond of measles vaccine failure. **Journal of P E D I A T R I C S**. 1977. 715-718.

AGOSTINHO, S. D.. Avaliação mitocondrial em células mononucleares periféricas caninas infectadas com o vírus da cinomose. Araçatuba: [s.n], 2013. **Dissertação de Mestrado** – UNESP AMARAL, M. T.. **Cinomose**. 2000. Disponível em: <<http://www.homeopatiaveterinaria.com.br/cinomose.2005.Htm>>. Acesso em 24 mar. 2014.

AMUDE, A. M.; ALFIERI, A. A.; ALFIERI, A. F. The nervous form of distemper. **Veterinária e Zootecnia**. 2006.13:125-136.

AMUDE, A. M.; ALFIERI, A. A.; ALFIERI, A. F.. Clinicopathological findings in dogs with distemper encephalomyelitis presented without characteristic signs of the disease. **Research in Veterinary Science**. 2007. 82:416-422.

AMUDE, A. M.. Encefalomielite pelo vírus da cinomose canina: aspectos neuroclínicos e neuropatológicos e uso das técnicas de RT-PCR e imunohistoquímica no auxílio do diagnóstico *post mortem* [Canine distemper encephalomyelitis: neuroclinical and neuropathological aspects, and the use of RT-PCR and immunohistochemical assay in the post mortem diagnosis] 2008. **These (PhD in Animal Science)** – Universidade Estadual de Londrina, Centro de Ciências Agrárias, Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal, Londrina.

ANGULO, R.; FULCHER, D. A.. Measurement of *Candida*-Specific Blastogenesis: Comparison of Carboxyfluorescein Succinimidyl Ester Labelling of T Cells, Thymidine Incorporation, and CD69 Expression **Cytometry (Communications in Clinical Cytometry)** 1998. v.34, p.143–151.

APPEL, M. J.. Pathogenesis of canine distemper, 1969. **Am. J. Vet. Res.** 30, 1167–1182.

APPEL, M. J.. **Virus infection of carnivores**, 1982.

APPEL, M. J.. Canine distemper virus, 1987. In: HORZINEK, M. C. M. (Ed.), **Virus Infections of Vertebrates**, vol. 1. **Elsevier Science Publishers B.V.**, Amsterdam, Oxford, New York, Tokyo, pp. 133–159.

APPEL, M. J.; Pathogenesis of canine distemper. **American Journal Veterinary Research**. 1969. v. 30, n. 7, p. 1167-1182.

APPEL, M. J. G.; GILLESPIE, J. H. Canine distemper virus. In: GARD, S.; HALLAUER, C.; MEYER, K. F. (Eds). Virology monographs, II. New York: Springer-Verlag, 1972. p. 1-96.

APPEL, M. J.. **Virus infection of carnivores**, 1993. Elsevier, Amsterdam, p.133-159, 1998. Baumgärtner, W.. Virale Infektionskrankheiten bei Welpen und Junghunden unter besonderer Berücksichtigung der Staupevirusinfektion. **Prakt. Tierarzt.** 74, 26–32.

APPEL, M.J.; SUMMERS, B.A. Pathogenicity of morbilliviruses for terrestrial carnivores, 2006. **Vet Microbiology**, v.44, p.187-191.

APPEL, M. J.; SUMMERS, B. A. Canine distemper current status, 1999. In: Carmichael, L.E.(Ed.). Documento n. A01103.1199, Recent Advances in Canine Infectious Disease. **International Veterinary Information Service**, Ithaca NY, Disponível em: <http://www.ivis.org/advances/infectdiscarmichael/appel/chapter_frm.asp>. Acesso em 02 mar. 2014.

AVMA Council report. Canine and feline immunization guidelines. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, 2004. v. 195, n. 3, p. 314-317.

BABA, M; NISHIMURA, O.; KANZAKI, N.; et al.. A small-molecule, nonpeptide CCR5 antagonist with highly potent and selective anti-HIV-1 activity. **Proc Natl Acad Sci U S A** 1999. 96:56.

BABIUK, L. A. Nucleic acid vaccines: research tool or commercial reality. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, 2000. v. 76, p. 1-23.

BARBER, G. N.. Host defense, viruses and apoptosis. **Cell Death Differ.** 2001. 8:113-26.

BARMAK, K.; HARHAJ, E. W.; WIGDAHL, B.. Mediators of central nervous system damage during the progression of human T-cell leukemia type I-associated myelopathy/tropical spastic paraparesis. **J. Neurovirology.** 2003. 9:522-9.

BAUMGÄRTNER, W.; **Nat. Prod. Rep.**, 1993,1, 355-70.

BLINXENKRONE-MOLLER, J. A.; ROBSON, D. S.; GILLESPIE, J. H.; BURGHER, J. A.; DOUGHTY, M. F. A nomograph that predicts the age to vaccinate puppies against distemper, **The Cornell Veterinarian**, 1989. v. 49, p. 158-167.

BECKFORD, A.P.; KASCHULA, R.O.; STEPHEN, C. Factors associated with fatal cases of measles. A retrospective autopsy study. **S. Afr. Med. J.** 1985., v.68, p.858–863.

BEINEKE, A.; SEEHUSEN, F.; BAUMGÄRTNER, W.. Pathogenesis and immunopathology of systemic and nervous canine distemper. **Vet. Immunol. Immunopathol.** 2009., v.127, p.1–18.

BRAUND, K. W.; PUFF, C.; BAUMGÄRTNER, W.; **Nat. Prod. Rep.**, 1994,1, 355-70.

BRICKS, L. F.; SATO, H. K.; OSELKA, G. W.. Varicella vaccines and measles, mumps, rubella, and varicella vaccine. Sociedade Brasileira de Pediatria. **Jornal de Pediatria**. 2006. 0021-7557/06/82-03-Supl/S101.

BIRCHARD, S. J.; SHERDING, R. G.. **Manual Saunders, Clínica de pequenos animais**. 2003. 2. ed. São Paulo: Rocca.

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

BUDASZEWSKI, R.F.; PINTO, L. D.; WEBER, N. M.; CALDART, E. T.; ALVES, C. D. B. T.; MARTELLA, V.; IKUTA, N.; LUNGE, V. R.; CANAL, C. W. Genotyping of canine distemper virus strains circulating in Brazil from 2008 to 2012. **Virus Research**. 180 (2014) 76–83.

BUTL, I.; MARTIN, A. and ROBERTS, S.. The E1^{E4} Protein of Human Papillomavirus Interacts with the Serine-Arginine-Specific Protein Kinase SRPK1. **Journal Virology**, 2007. v. 81, n. 11, p. 5437–5448.

CARVALHO, A. T.; RIBEIRO, G. A.; NOGUEIRA, R. F.. Citometria de fluxo no estudo das doenças infecto-parasitárias. 2010. Instituto Oswaldo Cruz.

CARVALHO, R. P. S.; ALFRED, S. E.; LUITGARD, G.; PANNUTI, C.S.. Anticorpos para os vírus da rubéola, do sarampo e da caxumba em crianças de são paulo, brasil. **Rev. Saúde Pública**, São Paulo. 1976. 10: 279-84.

CASTILHO, J. G.; BRANDÃO, P. E.; CARNIELI, P.; OLIVEIRA, R. N.; VIEIRA. C. I.; MACEDO, Z. M. P.; CARRIERI M. L.; KTATAIT, I. Molecular analysis of the N gene of canine distemper virus in dogs in Brazil. **Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.** 2007. v.59, n.3, p.654-659.

CERRUTI-SOLA, S.; KRISTENSEN, F.; VAN DEDEVELDE, M.; BICHSEL, P.; KIHM, U.. Lymphocyte responsiveness to lectin and myelin antigens in canine distemper infection in relation to the development of demyelinating lesions, 1983. **J. Neuroimmunol.** 4, 77–90.

CHARLOTTE, L.; INGO, S.; CHRISTINA, P.; ARMEND, C.; KRISTEL, K.;SOMPORN, T.; WOLFGANG, BAUMGÄRTNER; FRAUKE, S.; New Aspects of the Pathogenesis of Canine: Distemper Leukoencephalitis. **Viruses**. 2014, 6, 2571-2601.

COLLINS, L.; RINDONE, B.; SANTANIELLO, E.; SCOLASTICO, C. A..Total synthesis of mycophenolic acid, some analogues and some biogenetic intermediates. **Tetrahedron**, 1990. v. 28, n. 15, p. 4395-4404.

CORRÊA, C. N. M. CINOMOSE. IN: CORRÊA, W. M.; CORRÊA, C. N. M. (Eds). **Enfermidades Infecciosas dos Mamíferos Domésticos**. 1992. Rio de Janeiro: Medsi, p.655-670.

DE CLERCQ, E.. Advances in antiviral drug design. Amsterdam: **Elsevier Science**, 2003. v. 4, 230 p.DAHEISER, R. L.; GEE, G. K.; PEREZ, J. J. Total synthesis of mycophenolic acid. **J. Am. Chem.Soc.**, 2003. v. 108, n. 4, p. 806-810.

DEMETER, Z.; LAKATOS, B.; PALADE, E.A.; KOZMA, T.; FORGACH, P.; RUSVAI, M. Genetic diversity of Hungarian canine distemper virus strains. **Vet Microbiology**, 2007, v.122, p.258-269.

D'INTINO, G, VACCARI, F; SILVILIA, S; SCAGIARIINI, A; GANDINI, G; GIARDINO, L; CALZÀ, L.. A molecular study of hippocampus in dogs with convulsion during canine distemper virus encephalitis. **Brain Research**. 2006.1098:186-195.

DUPREX, W.P.; DUFFY, I.; MCQUAID, S.; HAMILL, L.; COSBY, S.L.; BILLETER, M.A.; SCHNEIDER-SCHAULIES, J.; TER MEULEN, V.; RIMA, B.K. The H gene of rodent brain-adapted measles virus confers neurovirulence to the Edmonston vaccine strain. **J. Virol.**, 1999. v.73, p.6916–6922.

ELIA, G.; BELLOLI, C.; CIRONE, F.; LUCENTE, M.S.; CARUSO, M.; MARTELLA, V.; DECARO, N.; BUONAVOGLIA, C.; ORMAS, P. In vitro efficacy of ribavirin against canine distemper vírus. **Antiviral Research**. 2008., v.77, p.108-113.

EGBERINK, J. F.; LEATHER, C. W.; GORHAM, J. R.; MCKEIRNAN, A. J.; APPEL, M. J. Pathogenesis of two strains of lion (*Panthera leo*) morbillivirus in ferrets (*Mustela 79 putorius furo*). **Vet. Pathol**. 2008.v.38, p.311–316.

ESPINAL, M. A.; DIAZ, F.; RUIZ-SAENZ, J. Phylogenetic evidence of a new canine distemper vírus lineage among domestic dogs in Colombia, South America. **Veterinary Microbiology**. 172 (2014) 168–176.

ETTINGER, S. J.. **Tratado de Medicina Interna Veterinária**. 2004. 5. ed. Autor do capítulo: Johnny D. Hoskins. São Paulo: Manole Ltda; cap. 88, p.440 – 456.

FABIANA, S. M.; VIANA, J. A.; BEVILACQUA, P. D.; MORAES, P. M.; SALCEDO, J. H. P. Anticorpos contra o vírus da cinomose de cães vacinados em diferentes estabelecimentos. **Revista Ceres**, vol. 54, núm. 311, febrero, 2007, pp. 14-19.

FYFE, J. A.; KELLER, P. M.; FURMAN, P. A.; et al.. Thymidine kinase from herpes simplex virus phosphorylates the new antiviral compound 9-(2-hydroxyethoxymethyl) guanine. **J Biol Chem** 1978; 253: 8721 - 8727.

FRASER, Y.; YANG, J.; ZHANG, Y.; **Faming Zhuanli Shenqing Gongkai Shuomingshu**, Cn, 1997, 16 pp.

FELDMAN, B. F.; ZINKL, J. G.; JAIN, N. C. **Schalm's veterinary hematology**. 2000. 5ª ed. Lippincott: Williams & Wilkins.

FINBERG, F.; BACKMANN, P. A.; GIBBS, E. P. J.; MURPHY, F. A.; STUDDERT, M. J.; WHITE, O.. Paramyxoviridae In: **Virologia Veterinária**. 2003. Zara goza: Acribia Cap. 27, p. 503-522.

FENNER, F. J. et al.. **Veterinary Virology**. 1993. 2ed. California: Academia press Limited, p. 666.

FLORES, E. F.. **Virologia veterinária**. 2007. Santa Maria: Ed. da Universidade Federal de Santa Maria – UFSM/RS.

GEBARA, C. M. S. et al.. Lesões histológicas no sistema nervoso central de cães com encefalite e diagnóstico molecular da infecção pelo vírus da cinomose canina. **Arquivo Brasileiro de Medicina veterinária e Zootecnia**, 2004. v. 56, n.2,p 162-174.

GEBARA, C. M. S.; WOSIACKI, S. R.; NEGRÃO, F. J.; OLIVEIRA, D. B.; BELONI, S. N. E.; **Vet Microbiology**. 2004. v.122, p.258-269.

GENELHU, M. S. **Anigen Rapid CDV Ag Test Kit**. Belo Horizonte, 2006. 1 bula de kit. Disponível: www.boieasy.com.br. Acesso: 15/12/2013.

GERBER, J. D.; MARRON, A. E.. Cell-mediated immunity and age at vaccination associated with measles inoculation and protection of dogs against canine distemper. **Am. J. Vet. Res.** 1976. 37, 133–138.

GUEDES, T.; NIKOLAKAKI, E.; MYLONIS, I.; GEORGATSOU, E.. Serine-arginine protein kinases: a small protein kinase family with a large cellular presence. **FEBS Journal**, 2011. v. 278, p. 570–586.

GUIMARÃES, M.C.C.; AMARAL, L. G.; BORGES; F.V. Characterization of an IgY polyclonal antibodies directed against the canine distemper virus. *The Cornell Veterinarian*, 2009, v. 48, p. 102-126

GRIFFIN, J.N.. Canine distemper. In: Greene, C.E. (Ed.), **Infectious Diseases of the Dog and Cat**. 1998. WB Saunders Company, Philadelphia, London, Toronto, Montreal, Sydney, Tokyo, pp. 9–22.

GREENE, C. E. Immunoprophilaxis and immunotherapy. In: GREENE, C. E. **Infectious diseases of the dog and cat**. Philadelphia: W. B. Saunders, 1990. p. 21-54.

GREENE, C. E.; APPEL, M. J.. Canine distemper. In: GREENE, C. E. (Org.) **Infectious diseases of the dog and cat**. 3th ed. St. Louis: 1992. **Saunders Elsevier**.

GREENE, G. E, APPEL, MJ. Canine distemper. In: Greene GE, ed. **Infectious Diseases of Dog and the Cat**. 3rd ed. St Louis: Saunders Elsevier; 2006. p. 25-41.

GREENE, C.E. Infectious Diseases of the Dog and Cat, 4th ed.; Elsevier/Saunders: **St. Louis**, MO, USA, 2012; p. 1354. HASHIMOTO, M.; UNE, Y.; MOCHIZUKI. Hemagglutinin genotype profiles of canine distemper virus from domestic dogs in Japan. **Archives of Virology**. 2001. Viena, v. 146 n. 1, p. 149-155.

HENDERSON, L. M.. Overview of marker and differential diagnostic test technology. **Biologicals**, 2005. v. 33, p. 203-209.

HEARDLEY, S. A.; AMUDE, A. M.; ALFIERI, A. F.; BRACARENCE; ALFIERI, A. A.; SUMMERS, B. A.. Molecular detection of canine distemper virus and the immunohistochemical characterization of the neurologic lesions in naturally occurring old dog encephalitis. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**. 2001. 21:588–597.

HIGGINS, R. J.; KRAKOWKA, S. G.; METZLER, A. E.; KOESTNER, A.. Primary demyelination in experimental canine distemper virus-induced encephalomyelitis in gnotobiotic dogs. **Acta Neuropathologica**. 1982. 58:1-8.

IMBSCHWEILER, I.; SEEHUSEN, F.; PECK, C.T.; OMAR, M.; BAUMGÄRTNER, W.; WEWETZER, K. Increased P75 Neurotrophin Receptor Expression in the Canine Distemper Virus Model of Multiple Sclerosis Identifies Aldynoglia Schwann Cells That Emerge in Response to Axonal Damage. *Glia* 2012, 60, 358–371.

IWATSUKI, K.; OKITA, M.; OCHIKUBO, F., GEMMA, T.; SHIN, Y. S.; MIYASHITA, N.; MIKAMI, T.; KAI, C.. Immunohistochemical analysis of the lymphoid organs of dogs naturally infected with canine distemper virus. **J. Comp. Pathol**. 1995,113, 185–190.

IWATSUKI, S.; IGOR DVORCHIK, F.; WALLIS, M.; FACS, D.; MADARIAGA, J. R.; BRIAN CARR, F.; FUNG, J. J.; STARZL, T. Liver transplantation for hepatocellular Carcinoma: A proposal of a prognostic scoring system. **J. Am Coll Surg**. Oct 2000; 191(4): 389–394.

JENSEN, P. A.; GRISEMER, R. A.; KING, N. W... Effect of adrenalectomy on the lymphoid lesions in dogs with experimentally induced canine distemper. **Am. J. Vet. Res**. 2002. 31, 2385–1

JOHNSTON, I. C.; TER MEULEN, V.; SCNEIDER-SCHAULIES, J.; SCHNEIDER-SCHAULIES, S. A.. Recombinant measles vaccine virus expressing wild-type glycoproteins: consequences for viral spread and cell tropism. **J. Virol.**, 1999. v.73, p. 6903–6915.

JONES, T.C.; HUNT, R. D.; KING, N. W.. **Patologia Veterinária**. 2000. São Paulo: Manole, p.1415.

KAUFFMAN, C. A.; BERGMAN, A. G.; O'CONNOR, R. P.. Distemper virus infection in ferrets: an animal model of measles-induced immunosuppression. **Clin. Exp. Immunol.** 1982. 47, 617–625.

KNIPE; DAVID, M.; HOWLEY; PETER, M. **Fields Virology**, 5th Edition. Copyright 2007.

KRAKOWKA, S.; OLSEN, R.; CONFER, A.; KOESTNER, A.; MCCULLOUGH, B. Serologic response to canine distemper viral antigens in gnotobiotic dogs infected with canine distemper virus. **J. Infect. Dis.** 1977. v.132, p.384–392.

KRAKOWKA, S.; KOESTNER, A.. Comparison of canine distemper virus strains in gnotobiotic dogs: effects on lymphoid tissues. **Am. J. Vet. Res.** 1980. 38, 1919–1922.

KRAKOWKA, S.; HIGGINS, R. J.; KOESTNER, A.. Canine distemper virus: Review of structural and functional modulations in lymphoid tissues. **Am. J. Vet. Res.** 1985. v.41, p.284–292.

KRAKOWKA, S.. Mechanisms of in vitro immunosuppression in canine distemper virus infection. **J. Clin. Lab. Immunol.** 1982. 8, 187–196.

KRAKOWKA, S.; AXTHELM, M. K.; JOHNSON, G. C.. Canine distemper virus. In: OLSEN, R. G., KRAKOWKA, S.; BLAKESLEE, J. R.. (Eds.), **Comparative Pathobiology of Viral Diseases**, 1975. vol. 2. CRC Press, Boca Raton, pp. 137–164.

KOERT, J.; STITTELAAR; LINDA, S.; WYATT; RIK, L.; DE SWART; HELMA, W.; VOS; JAN GROEN; AMERONGEN, G. V.; ROBERT, S.; VAN BINNENDI, J. K.; SHMUEL ROZENBLA, T. T.; BERNARD, M.; ALBERT, D. M. E.; OSTERHAUS.. Protective Immunity in Macaques Vaccinated with a Modified Vaccinia Virus Ankara-Based Measles Virus Vaccine in the Presence of Passively Acquired Antibodies. **JOURNAL OF VIROLOGY**, May 2000. p. 4236–4243.

KOUTINAS, S.; CORK, L. C.; WINKELSTEIN, J. A.; AXTHELM, M. K.. Establishment of central nervous system infection by canine distemper virus: breach of the blood-brain barrier and facilitation by antiviral antibody. **Vet. Immunol. Immunopathol.** 2002.17, 471–482.

KUMAGAI, K.; YAMAGUCHI, R.; UCHIDA, K.; TATEYAMA, S.. Lymphoid apoptosis in acute canine distemper. **J. Vet. Med. Sci.** 2004. 66, 175–181.

KUCERS, A.. The use of antibiotics: a clinical review of antibacterial, antifungal and antiviral drugs. 5. ed. Oxford, UK: **Butterworth-Heinemann**. 1992.

LAINE, M. C.; PENG, T. Y.; TARN, W. Y. Functional interplay between viral and cellular SR proteins in control of post-transcriptional gene regulation. **FEBS Journal**, 2009. v.276, p. 1517–1526.

LAMB, R. A.; KOLAKOFSKY, D.. Paramyxoviridae: the viruses and their replication. In: Knipe, D.M., Howley, P.M. (Eds.), **Fields of Virology**. 2001. 4th ed., vol. 1. Lippincott Williams&Wilkins, Philadelphia, pp. 1305–1443.

LAMB, R.A.; PATERSON, R.G.; JARDETZKY, T.S. Paramyxovirus membrane fusion: Lessons from the F and HN atomic structures. **Virology**. 2006. v.344, p.30-37.

LAN, N. T.; YAMAGUCHI, R.; UCHIDA, K.; SUGANO, S.; TATEYAMA, S.. Growth profiles of recent canine distemper isolates on Vero cells expressing canine signalling lymphocyte activation molecule (SLAM). **J. Comp. Pathol.** 2006. 133, 77–81.

LEMONS, E. M.; ANDRADE, R. A.; ARAÚJO M. S. S.; BRAGA, L. B.; REIS, A. B. Novas metodologias para o diagnóstico sorológico diferencial da infecção por Leishmania (Leishmania) chagasi e a soroconversão pós-vacinal. 2007. Vol: 40: **Suplemento III**.

LIMA, R. S. C. Public survey of knowledge concerning canine distemper and protective measures. *Canadian Veterinary Journal*. 2013. v. 27, p. 321-323.

MAEDA, H.; OZAKI, K.; TAKAGI, Y.; SAWASHIMA, K.; NARAMA, I.. Distemper skin lesions in a dog. *Zentralbl. Veterinärmed.* 1994. 41, 247–250.

MARRON, S. H.. Tratamento experimental de cães naturalmente infectados com o vírus da cinomose na fase neurológica com o uso de ribaverina e dimetil-sulfoxido (DMSO), 2008. Disponível em: <[http:// www.dominiopublico.gov.br](http://www.dominiopublico.gov.br) >. Acesso em: novembro, 2013.

MARTELLA, V.; CIRONE, F.; ELIA, G.; LORUSSO, E.; DECARO, N.; CAMPOLO, M.; DESARIO, C.; LUCENTE, M. S.; BELLACICCO, A. L.; BLIXENKRONE-MØLLER, M.; CARMICHAEL, L. E.; BUONAVOGLIA, C. Heterogeneity within the hemagglutinin genes of canine distemper virus (CDV) strains detected in Italy. **Veterinary Microbiology**. 116 (2006) 301–309.

MARTELLA, V.; ELIA, G.; LUCENTE, M. S.; DECARO, N.; LORUSSO, E.; BANYAI, K.; BLIXENKRONE-MOLLER, M.; LAN, N. T.; YAMAGUCHI, R.; CIRONE, F.; CARMICHAEL, L.E.; BUONAVOGLIA, C.. Genotyping canine distemper virus (CDV) by a hemi-nested multiplex PCR provides a rapid approach for investigation of CDV outbreaks. **Vet Microbiol.** 2007. v.122, p.32-42.

MARTELLA, V.; MATTHIJNSSENS, J.; CIARLET, M.; MUSTAFIZUR R.; ATTOUI, H.; BANYAI, K.; ESTES, M. K.; GENTSCH, J. R.; KIRKWOOD, C.Recommendations for the classification of group A rotaviruses using all 11 genomic RNA segments. **Arch Virol.** 2008; 153(8): 1621–1629.

MARTIN, M. P.; DEAM, M.; SMITH, M. W.. Genetic acceleration of AIDS progression by a promoter variant of CCR5. **Science**. 1998. 282:1907-11.

McCULLOUGH, B.; KRAKOWKA, S.; KOESTNER, A.. Experimental canine distemper virus-induced lymphoid depletion. **Am. J. Pathol.** 1974. 74, 155–170.

McCAW, D. L.; THOPSON, M.; TATE, D.; BONDERER, A.; CHEN, Y.. Serum distemper virus and parvovirus antibody titers among dogs brought to a veterinary hospital for revaccination. *Journal of Veterinary Medical Association*. 1998. v. 213, n. 1, p. 72-75.

MIELE, J.A.; KRAKOWKA, S. Antibody Responses to Virion Polypeptides in Gnotobiotic Dogs Infected with Canine Distemper Virus. **Infect. Immun.** 1983, 41, 869–871.

MINGXIAO, M.. Construction and immunogenicity of a recombinant fowlpox vaccines coexpressing HA of AIV H5N1 and chicken IL18. **Vaccine**, 2006. v. 24, p. 4.304-4.311.

MONTI, F.S.. Anticorpos contra o vírus da cinomose em cães vacinados em diferentes estabelecimentos da área urbana do município de Viçosa/MG. Tese de mestrado. 2004. Universidade Federal de Viçosa-UFV/MG.

MORITZ, A.; FRISK, A.; BAUMGA"RTNER, W.. The evaluation of diagnostic procedures for the detection of canine distemper virus infection. **Eur. J. Comp. Anim. Pract.** 2000. 10, 37–47.

MORITZ, A.; BAUMGA"RTNER, W.; FRISK, A. L.; KO"NING, M.. Sensitivita" t und spezifita" t der CDV-PR-PCR zur diagnose der kaninen staupe. **Tiera"rztliche Praxis** 2000. 31(K) 60–66.

MORO, L.; SOUSA, M.; MORAES, A.; SANTOS, C.; NUNES, F. G.; CARNEIRO, J. E.; CARNEIRO, R. A.; CARVALHO, R.; VASCONCELOS, A. C.. Apoptosis in canine distemper. **Arch. Virol.** 2004. 148, 153–164.

MORO, L.; ALVES, C.M.; SANTOS, F.G.A.; MARTINS, A.S.; VASCONCELOS, A.C. Apoptose na desmielinização da cinomose canina (Revisão da literatura). **Jornal Biosci de Med. Vet.** 2003. v.20, n.2, p.171-178.

MOSS, W. J.; GRIFFIN, D. E. Global measles elimination. **Nat. Rev. Microbiol.** 2006. v.4, p.900-908.

MULLER, G.; WU"NSCHMANN, A.; BAUMGA"RTNER, W.; BIRKUN, A.; KOMAKHIDZE, A.; STANEV, T.; JOIRIS, C. R.; Immunohistochemical and serological investigations of morbillivirus infection in Black Sea harbour porpoises (*Phocoena phocoena*). **Vet. Microbiol.** 2002. 2332, 183–190.

MURPHY F.et al.. **Veterinary virology**. 3rd Ed. New York: Academic Press, 1999.

MURPHY, F. A.. Vaccination against viral diseases. In.: *Veterinary virology*. 3. ed. New York: **Academic Press**, 1999. Cap. 13, p. 225-244.

MUTINELLI, F.; VANDEVELDE, M.; GRIOT, C.; RICHARD, A. Astrocytic Infection in Canine Distemper Virus-Induced Demyelination. *Acta Neuropathol.* 1989, 77, 333–335.

NAVA, A. F.; CULLEN, L. J. R.; SANA, D. A.; NARDI, M. S.; FILHO, J. D.; LIMA, T. F.; ABREU, K. C.; FERREIRA, F.. First evidence of canine distemper in brazilian free-ranging felids. *Ecohealth.* 2008., v.5, n.4, p.513-518.

OLSON, P.; FINNSDÓTTIR, H.; KLINGEBORN, B.; HEDHAMMAR, A.. Duration of antibodies elicited by canine distemper virus vaccinations in dogs. *The Veterinary Record.* 1997, v. 141, p. 654-655.

RIKULA, U.; PANKALA, L.; JALKANEN, L.; SIHVONEN, L. Distemper vaccination neutralising antibodies in vaccinated dogs. *The Veterinary Record.* 2000. v. 18, p. 598-603.

PANZERA. Y.; CALDERÓN. M. G.; SARUTEA, N.; GUASCO. S.; CARDEILLA. A.; BONILAA. B.; HERNÁNDEZ. M.; FRANCIAA. L.; BERDÓ. G.; TORRE. J.; PÉZEZ. R. Evidence of two co-circulating genetic lineages of canine distemper virus in South America. *Virus Research.* 163 (2012) 401–404.

PINTO, L. A. Avaliação *ex vivo* da proliferação espontânea em pbmc de indivíduos infectados pelo htlv-1 por citometria de fluxo. 2010.**Dissertação de mestrado.** UFBA

PRINGLE, J. W.. Total synthesis of mycophenolic acid. *Tetrahedron*, 1999. v. 49, n. 48, p. 4789-4798.

PASTORET, P. P.. Veterinary vaccinology. *Comptes Rendus de Àcadémie des Sciences. Série III. Sciences de la Vie*, 1999. v. 322, p. 967-972.

PINK, J. R.; KIENY, M. P. 4th Meeting on novel adjuvants currently in/close to Human Clinical Testing World Health Organization - Organisation Mondiale de la Sante Fondation Mérieux, Annecy, France, 23-25 June 2003. *Vaccine*, 2004. v. 22, p. 2.097-2.102.

PLOTKIN, S. A. Six revolutions in vaccinology. *The Pediatric Infectious. Disease Journal*, 2005. v. 24, p. 1-9.

PUFF, C.; KRUEWIG, C.; IMBSCHWEILER, I.; BAUMGAËRTNER, W.; ALLDINGER, S.. Influence of persistent canine distemper virus infection on expression of RECK, matrix-metalloproteinases and their inhibitors in a canine macrophage/monocytic tumour cell line (DH82). 2008. *Vet. J.*

QUAH, B. J. C.; WARREN, H.; PARISH, C. R. Monitoring lymphocyte proliferation *in vitro* and *in vivo* with the intracellular fluorescent dye carboxyfluorescein diacetate succinimidyl ester. *Nature Protocols.* 2007. 2, 2049 – 2056.

RODEHEFFER, U.; CRESTANI, F.; MOHLER, H.; **Trends Pharmacol Sci**, 2001,22, 188-94.

SAUL KRUGMAN, M. D.; JOAN P.; GILES, M. D.; HARRIET FRIEDMAN, R.; SHIRLEY STONE, M. D.. Studies on immunity to measles. **Journal of P E D I A T R I C S**. 1965. 471 – 488.

SCHOBESBERGER, M.; SUMMERFIELD, A.; DOHERR, M. G.; ZURBRIGGEN, A.; GRIOT, C.. Canine distemper virus-induced depletion of uninfected lymphocytes is associated with apoptosis. **Vet. Immunol. Immunopathol.** 2005.104, 33–44.

SCIABICA, K. S.; DAI, Q. J.; SANDRI-GOLDIN, R. M.. ICP27 interacts with SRPK1 to mediate HSV splicing inhibition by altering SR protein phosphorylation. **EMBO Journal**, 2003. v.22, n.7, p.1608-1619.

SCHATTNER A "Consequencia ou coincidência: A ocorrência, patogênese e significado das manifestações auto-imunes após vacinas virais". *Vaccine*. **J.VACCINE**.2005. 3876-86 : 10.1016.

SCHEIDEL, L. M.; DURBIN, R. K.; STOLLAR, V. Sindbis virus mutants resistant to mycophenolic acid and ribavirin. **Virology**1987; p.158.

SCHULTZ, R. D. Vaccine Failure. In: SMITH, C. A. Are we vaccinating too much? **Journal of American Veterinary Medical Association**, 1995. v. 207, n. 4, p. 421-425.

STOFFEL, M. H.; FRIESS, A. E.; HARTMANN, S. H. Ultrastructural evidence of transplacental transport of immunoglobulin G in bitches. **Veterinary Medicine**, 2000. v. 51, p. 427.

SUMMERS, R.G. **Cinomose canina**. In: BIRCHARD, S. J. & SCHERDING, R. G. Manual Saunders: Clínica de Pequenos Animais. 1999. 2. ed. São Paulo: Roca.p.117-120.

SILVA, M. C.; FIGHERA, R. A.; BRUM, J. S.; GRAÇA, D. L.; KOMMERS, G. D.; IRIGOYEN, L. F.; BARROS, C. S. L.. Aspectos clinicopatológicos de 620 casos neurológicos de cinomose em cães. *Pesquisa Veterinária Brasileira*. 2007. 27:215-220.

SHERDING, R.G. Cinomose canina. In: BIRCHARD, D.V.M; SHERDING, R.G. **Manual Saunder: clínica de pequenos animais**. 2003. 3.ed. São Paulo: Roca, p. 2048.

STEPHENSEN, C. B.; WELTER, J.; THAKER, S. R.; TAYLOR, J.; TARTAGLIA, J.; PAOLETTI, E.. 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.** 1997. 71, 1506–1513.

SWANGO, L.; BOSTIN, K... Screening of natural products for antimicrobial agents. *European Journal of Clinical Microbiology Infectious Disease*, 1997, 9, 455-461.

SUMMERS, B. A.; CUMMINGS, J. F.; DELAHUNTA, A.. **Veterinary neuropathology**. 1995. Mosby, St. Louis.

SHOEN, D. A.; SKILLING, D.; IVERSEN, P.; SMITH, A. W.. Inibição de infecções Vesivirus em cultura de tecido de mamíferos com oligómeros anti-sentido de morfolino. **Ácido Nucleico Antisense Dev droga**. 11: 2006, 317-25.

SCHOBESBERGER, M.; ZURBRIGGEN, A.; SUMMERFIELD, A.; VANDEVELDE, M.; GRIOT, C. Oligodendroglial Degeneration in Distemper: Apoptosis or Necrosis? **Acta Neuropathol**. 1999. 97, 279–287.

SCHULTZ, R. D. Current and future canine and feline vaccination programs. **Veterinary Medicine**, 1998, v. 93, n. 3, p. 233-254.

SUTER, C. B.; WELTER, J.; THAKER, S. R.; TAYLOR, J.; TARTAGLIA, J.; UEMA, M.; OHASHI, K.; WAKASA, C.; KAI, C.. Phylogenetic and restriction fragment length polymorphism analyses of hemagglutinin (H) protein of canine distemper virus isolates from domestic dogs in Japan. **Vir. Res**. 2005, v.109, p.59-63.

TANG, B.; PELLEGRINO, R.; MENGJINI, A.; TOMASELLI, B.; **J Essent Oil Res**, 1999,11,251-252.

TAKEUCHI, T.; KOBAYASHI, M.; KANEKO, K.; MITSUHASHI, H.; **Chem Pharm Bull**, 2007,35, 4460-4.

TAKEUCHI, O.; AKIRA, S.. Signaling pathways activated by microorganisms. **Curr Opin Cell Biol**. 2007. 19:185-91.

TATSUO, H.; ONO, N.; YANAGI, Y.. Morbilliviruses use signaling lymphocyte activation molecules (CD150) as cellular receptors. **J. Virol**. 2001. 75, 5842–5850.

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

TIPOLD, A.; VANDEVELDE, M.; WITTEK, R.; MOORE, P.; SUMMERFIELD, A.; ZURBRIGGEN, A. Partial protection and intrathecal invasion of CD8(+) T cells in acute canine distemper virus infection. **Vet Microbiol**. 2001., v.83, p.189–203.

TIZARD, I.; NI, Y. Use of serologic testing to assess immune status of companion animals. *Journal of American Veterinary Medical Association*, 1998. v. 213, n. 1, p. 54-60.

UEMA, M.; OHASHI, K.; WAKASA, C.; KAI, C. Phylogenetic and restriction fragment length polymorphism analyses of hemagglutinin (H) protein of canine

distemper virus isolates from domestic dogs in Japan. **Virus Research**. Vol. 109, Issue 1, 2005, Pages 59–63.

ULRICH, R.; PUFF, C.; WEWETZER, K.; KALKUHL, A.; DESCHL, U.; BAUMGÄRTNER, W. Transcriptional Changes in Canine Distemper Virus-Induced Demyelinating Leukoencephalitis Favor a Biphasic Mode of Demyelination. **PLoS One**. 2014.

VANDEVELDE, M.; ZURBRIGGEN, A.. The neurobiology of canine distemper virus infection. **Vet. Microbiol**. 2004. 44, 271–280.

VANDEVELDE, M.; ZURBRIGGEN, A.. Demyelination in canine distemper virus infection: a review. **Acta Neuropathol**. 2005. 109, 56–68.

VAN DOMMELEN, S. L.; SUMARIA, N.; SCHREIBER, R. D.; SCALZO, A. A.; SMAYTH, M. J.; DEGLI-ESPOSTI, M. A.. Perforin and granzymes have distinct roles in defensive immunity and immunopathology. **Immunity**. 2006. 25:835-48.

VESIKARI T, SADZOT-DELVAUX C, RENTIER B, GERSHON A. "O aumento da cobertura e eficiência do sarampo, caxumba e rubéola e varicela introdução da vacinação universal na Europa: um papel para a vacina combinada". **Pediatr Infect Dis J**. 2007. 632-8 - 10,

VIDAL, S. M.; LANIER, L. L.. NK cell recognition of mouse cytomegalovirus-infected cells. *Curr Top. Microbiol Immunol*. **2006**. 298:183-206.

ZIKL, Z.; FU, X. D.. Regulation of splicing by SR proteins and SR protein-specific kinases. **Chromosoma**, 2000. v. 122, p. 191-207.

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. 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. **The Veterinary Journal**. 200 (2014) 191–194.

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**. 2004. U.S.A. 101, 14216–14221.

ZURBRIGGEN, A.; YAMAWAKI, M.; VANDEVELDE, M. Restricted Canine Distemper Virus Infection of Oligodendrocytes. **Lab. Invest**. 1993, 68, 277–284.

ZURBRIGGEN, A.. Selective spread and reduced virus release leads to canine distemper virus persistence in the nervous system. **Veterinary Microbiology**, 1995. v. 44, p 281-288.

ZURBRIGGEN, A.; SCHMID, I.; GRABER, H.U.; VANDEVELDE, M. Oligodendroglial Pathology in Canine Distemper. **Acta Neuropathol**. 1998, 95, 71–77.

WELTER, J. J.; TAYLOR, J.; TARTAGLIA, E.; PAOLETTI; STEPHENSEN, S. B. Vacina contra a Infecção pelo Vírus da Cinomose Canina em Filhotes de Furões com e sem Proteção por Anticorpos Maternos, com o Uso de Vacinas Recombinantes com Poxvírus Atenuado. 2000. **Vaccine** 17:308–313.

WRIGHT, M. M. G.; LAGROTA, M. D.; SANTOS, M. M.; MIRANDA, F. P.; CÂMARA, J.; COUCEIRO, S.. Inhibitory activity of extracts of *Althernantera brasiliensis* (Amaranthaceae) against the herpes simplex virus, **Phytother.** 1974. p. 8, 358–361.

WUNSCHMANN, A.; ALLDINGER, S.; KREMMER, E.; BAUMAGARTNER, W.. Identification of CD4+ and CD8+ cell subsets and B cells in the brain of dogs with spontaneous acute, subacute-, and chronic-demyelinating distemper encephalitis. **Vet. Immunol. Immunopathol.** 1999.67, 101–116.

WYSS-FLUEHMANN, G.; ZURBRIGGEN, A.; VANDEVELDE, M.; PLATTET, P. Canine distemper virus persistence in demyelinating encephalitis by swift intracellular cell-to-cell spread in astrocytes is controlled by viral attachment protein. **Acta Neuropathol.** 2010., v.119, p.617–630.

YAMAGUCHI, R.; KOJIMOTO, A.; SAKAI, H.; UCHIDA, K.; SUGANO, S.; TATEYAMA, S.. Growth characteristics of canine distemper virus in a new cell line CCT cells originated from canine malignant histiocytosis. **J. Vet. Med. Sci.** 2005. 67, 203–206.

ANEXOS

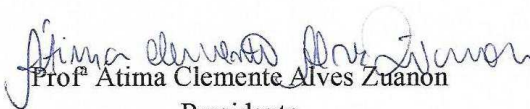
Anexo 1: Certificado de aprovação dos princípios éticos na experimentação animal da resolução normativa editada pelo CEUA/MCTI.

CERTIFICADO

A Comissão de Ética no Uso de Animais - CEUA/UFV certifica que o processo nº 73/2014, intitulado “Avaliação em modelo murino da resposta imune de vacinas comerciais contra o vírus da Cinomose Canina (CDV)”, coordenado pelo professor Abelardo Silva Júnior do Departamento de Veterinária, está de acordo com a Legislação vigente (Lei Nº 11.794, de 08 de outubro de 2008), as Resoluções Normativas editadas pelo CONCEA/MCTI, a DBCA (Diretriz Brasileira de Prática para o Cuidado e a Utilização de Animais para Fins Científicos e Didáticos) e as Diretrizes da Prática de Eutanásia preconizadas pelo CONCEA/MCTI, portanto sendo aprovado por esta Comissão em 04/12/2014, com validade de 12 meses.

CERTIFICATE

The Ethic Committee in Animal Use/UFV certify that the process number 73/2014, named “Evaluation in murine model of immune response of commercial vaccines against Canine Distemper Virus (CDV)”, is in agreement with the actual Brazilian legislation (Lei Nº 11.794, 2008), Normative Resolutions edited by CONCEA/MCTI, the DBCA (Brazilian Practice Guideline for the Care and Use of Animals for Scientific Purposes and Teaching) and the Guidelines of Practice the Euthanasia recommended by CONCEA/MCTI therefore being approved by the Committee on December 04, 2014 valid for 12 months.


Profª Atima Clemente Alves Zuanon

Presidente

Comissão de Ética no Uso de Animais – CEUA/UFV