



UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARÁ  
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS  
FACULDADE DE BIOTECNOLOGIA

GIOVANE PINHEIRO CUNHA

PROTEOMA DIFERENCIAL DO SORO DE *CANIS LUPUS FAMILIARIS* ACOMETIDOS  
POR CINOMOSE CANINA

BELÉM-PA  
2022

GIOVANE PINHEIRO CUNHA

**PROTEOMA DIFERENCIAL DO SORO DE *CANIS LUPUS FAMILIARIS*  
ACOMETIDOS POR CINOMOSE CANINA**

Trabalho de Conclusão de Curso, apresentado para a obtenção do título de Bacharel em Biotecnologia, Faculdade de Biotecnologia, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Pará.

Orientadora: Dra. Juliana Silva Cassoli

BELÉM-PA  
2022

GIOVANE PINHEIRO CUNHA

**PROTEOMA DIFERENCIAL DO SORO DE *CANIS LUPUS FAMILIARIS*  
ACOMETIDOS POR CINOMOSE CANINA**

Trabalho de Conclusão de Curso, apresentado para a obtenção do título de Bacharel em Biotecnologia, Faculdade de Biotecnologia, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Pará.

Orientadora: Prof. Dra. Juliana Silva Cassoli

Data da apresentação: 30 de Agosto de 2022

**BANCA EXAMINADORA**

---

Prof. Dra. Juliana Silva Cassoli  
Instituto de Ciências Biológicas/UFPA – Orientadora

---

Prof. Dr. Evonnildo Costa Gonçalves  
Instituto de Ciências Biológicas/UFPA – Membro

---

Prof. Dr. Diego Assis das Graças  
Instituto de Ciências Biológicas/UFPA - Membro

Dedico este trabalho ao meu primeiro “aumigo”, Lupi, que partiu, mas continua em minha mente e coração. Também dedico aos meus novos “aumigos”, Pérola e Apollo, que chegaram em minha vida em meio a pandemia e foram essenciais, e ainda mais importante, dedico a minha MÃE, que sempre esteve ao meu lado.

## AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, que me deu forças para chegar até aqui, sempre esteve ao meu lado, me dando saúde, e nunca me desamparando, e ter inserido pessoas incríveis em minha vida, antes e durante a graduação.

Agradeço a minha mãe, Edivanir Pinheiro, que nunca desistiu de mim, que sempre esteve ao meu lado para me apoiar, e sempre lutando para que eu tenha tudo que preciso, por ter aguentado meus surtos durante semana de provas e por ter me ouvido e me dado conselhos que levarei para toda a vida. Mãe, te amo mais que tudo!

Agradeço aos amigos de turma, Beatriz Lobato, Davi Marcon, Gustavo Marques, Joaquim Neto, Naiana Ribeiro e Thiago Borges, que se tornaram essenciais na vida acadêmica e social, e tanto ajudaram para que eu chegasse até aqui, sempre me dando forças para continuar.

Agradeço a Valéria Cristiane, que sempre esteve ao meu lado me apoiando e nas vezes que pensei em desistir, que foram muitas, me aconselhou e não me deixou cometer esse erro, e por todas as vezes que me aguentou em sua casa, até nos momentos finais da escrita deste trabalho.

Agradeço aos meus familiares, em especial aos meus avós maternos e paternos, respectivamente, Antonia Pinheiro e Valdelino Pinheiro, Maria Cunha e Manoel Santino Cunha, e ao meu irmão, Tulio Henrique Cunha, que em momentos necessários estiveram dispostos a me ajudar quando precisei.

Agradeço a Universidade Federal do Pará, Faculdade de Biotecnologia e ao Instituto de Ciências Biológicas, que me proporcionaram um ambiente onde pude crescer como pessoa e para que possa ser um bom profissional.

Agradeço a minha orientadora, Profa. Dra. Juliana Silva Cassoli, pelo acolhimento, confiança, dedicação e ensinamentos repassados, e pela oportunidade de fazer parte de um laboratório que mais que um trabalho, é uma família.

Agradeço ao Laboratório de Ciências Ômicas (OMICs LAB), onde aprendi e pus em prática alguns dos ensinamentos adquiridos. Agradeço também as minhas colegas de laboratório, Carmem Laura e Jaqueline Batista, que foram fundamentais, sempre dispostas a ensinar, dar conselhos, e pelo apoio no desenvolvimento deste trabalho.

Agradeço aos professores da Faculdade de Biotecnologia, em especial: Dr. Agenor Valadares, Dra. Luciana Xavier e Dr. Moyses Miranda, pelos ensinamentos, apoio e dedicação.

Agradeço as minhas amigas do ensino fundamental e médio, Josilayne Ramos, Laila Alexandra, Maria Karolina Monteiro, Neuziane Marques e Thainá Lima, que se colocaram a disposição para me ouvir, ajudar como podiam e pela amizade.

Agradeço a Isabelle Ferreira e Lucas Arruda por todo carinho, amizade, apoio e momentos divididos, vocês foram essenciais para que eu chegasse até aqui.

Por fim, agradeço a Amanda Julião, Ana Gama, Bianca Julião, Sara Oliveira e Yure Jefferson pelo apoio e amizade.

“...You don't have to feel like a waste of space  
You're original, cannot be replaced...  
After a hurricane comes a Rainbow.”  
(Katy Perry – Firework)

## RESUMO

A Cinomose Canina é uma doença infecciosa multissistêmica que acomete cães (*Canis lupus familiaris*) e algumas outras espécies da ordem carnívora, com alta taxa de mortalidade e letalidade entre os canídeos. O diagnóstico é baseado no histórico clínico do animal, na avaliação física e em exames laboratoriais. A proteômica é uma ferramenta que vem sendo utilizada para auxiliar no diagnóstico de doenças infecciosas por meio de identificação e rastreamento de biomarcadores, produzidos pelo organismo em resposta à infecção ou detecção de proteínas do agente infeccioso, presentes no sangue de pacientes infectados. O objetivo deste trabalho foi descrever o proteoma diferencial de cães infectados por *Canine Distemper Virus* em busca de possíveis biomarcadores proteicos produzidos pelos animais em resposta à doença e detectar a presença de proteínas virais nos mesmos. As amostras de soro de animais sadios e doentes (infectados) foram disponibilizadas pelo Laboratório de Tecnologia Biomolecular da UFPA (LTB) e analisadas por RT-PCR para confirmação da infecção. Posteriormente, as amostras (n=4 por grupo) foram preparadas para as análises proteômicas, em que as proteínas presentes no soro passaram por processos de redução, alquilação, digestão e dessalinização, gerando peptídeos tripticos. As análises proteômicas foram realizadas, em triplicata técnica, utilizando uma plataforma de cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massa em escala nano (nanoLC-MS/MS). A identificação, quantificação das proteínas por *label-free* e as análises estatísticas foram feitas usando *softwares* dedicados. Além disso, as análises de biologia de sistemas foram realizadas usando ferramentas computacionais gratuitas disponíveis. As proteínas diferencialmente expressas demonstraram correlação com processos biológicos da resposta inflamatória e resposta imune inata. Dentre elas, as que apresentaram possibilidade para biomarcação foram: Alfa-2-HS-glicoproteína (Fetúina-A) e Proteína de ligação à vitamina D (GC-Globulina). Além disso, uma proteína viral foi detectada somente em amostras de animais doentes. Dessa forma, por meio da proteômica descritiva e diferencial do soro de cães infectados foi possível apontar proteínas que poderão contribuir no diagnóstico e/ou prognóstico da doença.

**PALAVRAS-CHAVE:** Cinomose; Canine distemper virus; LC-MS/MS; Proteômica.

## ABSTRACT

Canine distemper is a multisystemic infection that affects dogs (*canis lupus familiares*) and some other species of the carnivorous order and has a high mortality and lethality rate among canids. The diagnosis is based on the animal's clinical history, physical evaluation, and laboratory testing. Proteomics is a tool that has been used to help in the diagnosis of infectious diseases by the identification and tracking of biomarkers produced by the organism in response to infection, or by the detection of proteins of the infectious agent present in the blood of an infected patient. The objective of this work was to describe the differential proteome of dogs infected with Canine Distemper Virus in search of possible protein biomarkers produced by the animals in response to the disease and to detect the presence of viral proteins. Samples were provided by the Biomolecular Technology Laboratory of UFPA (LTB) and analyzed by RT-PCR for confirmation of such infection. Subsequently, the samples were prepared for proteomic analyses in which the proteins present in the serum underwent the processes of reduction, alkylation, digestion, and desalting, generating tryptic peptides. The proteomic analyses were performed using liquid chromatography coupled to a nanoscale mass spectrometry platform (nanoLC-MS/MS). Label-free protein identification and quantification as well as statistical analyses were performed using dedicated software. In addition to it, systems biology analyses were performed using freely available computational tools. The differentially expressed proteins showed correlation with biological processes of the inflammatory response and innate immune response. Thus, by means of descriptive and differential proteomics from the serum of infected dogs it was possible to point out proteins that may contribute to the diagnosis and/or prognosis of the disease.

**KEYWORDS:** Canine distemper; Canine Distemper Virus; LC-MS/MS; Proteomics.

## LISTA DE ILUSTRAÇÃO

|                                                                                                                                                                           |    |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Figura 1 – Partícula viral do vírus da Cinomose Canina. ....                                                                                                              | 16 |
| Figura 2 – Ciclo de replicação do vírus da Cinomose Canina .....                                                                                                          | 20 |
| Figura 3 – Apresentação clínica de Cinomose em cães .....                                                                                                                 | 22 |
| Figura 4 – Distribuição geográfica de estudos analisando o nível de infecção viral .....                                                                                  | 24 |
| Figura 5 – Fluxograma das etapas comumente seguidas em uma análise proteômica <i>bottom-up/shotgun</i> : Preparação do extrato, digestão e análise por nanoLC-MS/MS ..... | 30 |
| Figura 6 – Gráfico dos processos biológicos de todas identificadas e quantificadas .....                                                                                  | 38 |
| Figura 7 – Gráfico da função molecular de todas identificadas e quantificadas .....                                                                                       | 39 |
| Figura 8 – Gráfico dos componentes celulares de todas identificadas e quantificadas .....                                                                                 | 39 |
| Figura 9 – Rede de proteína-proteína de todas as proteínas identificadas no soro de <i>canis lupus familiaris</i> .....                                                   | 41 |

## **LISTA DE TABELAS**

|                                                             |           |
|-------------------------------------------------------------|-----------|
| <b>Tabela 1 – Estratégias Proteômicas .....</b>             | <b>29</b> |
| <b>Tabela 2 – Proteína do Vírus.....</b>                    | <b>36</b> |
| <b>Tabela 3 – Proteínas Diferencialmente expressas.....</b> | <b>37</b> |

## **LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS**

|        |                                                   |
|--------|---------------------------------------------------|
| CC     | Cinomose Canina                                   |
| RNA    | RiboNucleic Acid                                  |
| EDTA   | Ácido Etilenodiamino Tetra-Acético                |
| CDV    | Canine Distemper Virus                            |
| RT-PCR | Reverse Transcription – Polymerase Chain Reaction |
| VCC    | Vírus da Cinomose Canina                          |

## SUMÁRIO

|                                                                                                               |           |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| <b>1 INTRODUÇÃO.....</b>                                                                                      | <b>12</b> |
| <b>2 OBJETIVOS.....</b>                                                                                       | <b>14</b> |
| <b>2.1 Objetivo geral.....</b>                                                                                | <b>14</b> |
| <b>2.2 Objetivos específicos.....</b>                                                                         | <b>14</b> |
| <b>3 REVISÃO DE LITERATURA.....</b>                                                                           | <b>15</b> |
| <b>3.1 Vírus da Cinomose (CDV) .....</b>                                                                      | <b>15</b> |
| <b>3.2 Epidemiologia.....</b>                                                                                 | <b>17</b> |
| 3.2.1 Prevalência No Brasil.....                                                                              | 18        |
| 3.2.2 Transmissão.....                                                                                        | 19        |
| 3.2.3 Sinais Clínicos.....                                                                                    | 21        |
| 3.2.4 Profilaxia e Controle.....                                                                              | 22        |
| <b>3.3 MÉTODOS DIAGNÓSTICOS.....</b>                                                                          | <b>24</b> |
| 3.3.1 Métodos de detecção.....                                                                                | 25        |
| 3.3.1.1 Imunofluorescencia (IFA) .....                                                                        | 25        |
| 3.3.1.2 ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assays).....                                                       | 25        |
| 3.3.1.3 Imunoensaio Cromatografico.....                                                                       | 25        |
| 3.3.1.4 Isolamento Viral.....                                                                                 | 26        |
| 3.3.1.5 Detecção de RNA Viral (RT-PCR) .....                                                                  | 26        |
| <b>3.4 SANGUE COMO FONTE DE BIOMARCADORES PARA DOENÇAS.....</b>                                               | <b>26</b> |
| <b>3.5 PROTEÔMICA COMO FERRAMENTA PARA DIAGNÓSTICO.....</b>                                                   | <b>27</b> |
| 3.5.1 Análises Proteômicas.....                                                                               | 28        |
| 3.5.2 Proteômica Quantitativa.....                                                                            | 31        |
| <b>4 METODOLOGIA.....</b>                                                                                     | <b>33</b> |
| <b>4.1 Aspectos Éticos.....</b>                                                                               | <b>33</b> |
| <b>4.2 Obtenção das Amostras.....</b>                                                                         | <b>33</b> |
| <b>4.2 Preparação das Amostras.....</b>                                                                       | <b>33</b> |
| <b>4.3 Análises em nanoLC-MS/MS.....</b>                                                                      | <b>34</b> |
| <b>4.4 Identificação e Quantificação Relativa por <i>Label-Free</i>.....</b>                                  | <b>34</b> |
| <b>4.5 Análises <i>In Silico</i> (Biologia De Sistemas) .....</b>                                             | <b>34</b> |
| <b>5 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....</b>                                                                          | <b>36</b> |
| <b>5.1 Análise das proteínas diferencialmente expressas do soro sanguíneo de cães infectados por CDV.....</b> | <b>37</b> |
| <b>6 CONCLUSÃO.....</b>                                                                                       | <b>42</b> |
| <b>REFERÊNCIAS.....</b>                                                                                       | <b>43</b> |
| <b>ANEXO A.....</b>                                                                                           | <b>50</b> |

## 1 INTRODUÇÃO

O Brasil possui cerca de 54,2 milhões de cães em seu território, dados estes obtidos pelo instituto Pet Brasil (IPB), onde a região Norte concentra 6,3% dessa população (IPB, 2019). O convívio entre cães e humanos ocorre há milhões de anos, promovendo benefícios e malefícios relacionados à qualidade de vida de ambos, essa relação sofreu mudanças sociais e comportamentais diminuindo riscos como a transmissão de doenças ou infecções, acidentes, maus tratos e abandono por parte dos tutores, demonstrando caráter ético e legal (ALMEIDA *et al.*, 2014; PAULA *et al.*, 2018).

O bem-estar animal discorre sobre a adoção de práticas contínuas que garantem a saúde física e psicológica dos animais, fundamentando-se nos princípios das cinco liberdades: nutricional, sanitária, ambiental, comportamental e psicológica (Santos *et al.*, 2014). Em caso de animais domiciliados é de responsabilidade dos tutores promover as condições adequadas para o bem-estar animal, assim como é de responsabilidade do Estado a promoção de políticas públicas que visem a saúde e qualidade de vida dos animais não domiciliados (Almeida, 2014).

A ausência de vacinação e/ou erro no uso de protocolo vacinal, são uma das principais causas de falha vacinal (BIEUZUS *et al.*, 2018). Consequentemente, diversos surtos de infecções entre os animais emergem rapidamente, a exemplo da Cinomose Canina (CC), infecção multissistêmica que acomete cães e outros animais da ordem carnívora, doença esta que tem alta letalidade, ficando atrás apenas da Raiva (POSTIGO, 2017; SANTOS, 2018). Essa infecção apresenta um problema de saúde pública animal que necessita de atenção, devido a sua endemia e reemergência em várias regiões que tinham a doença controlada pela vacinação (Fischer *et al.*, 2016).

O diagnóstico correto da cinomose também é um fator determinante no controle da doença. Atualmente, o diagnóstico por RT-PCR (*Reverse Transcription – Polymerase Chain Reaction*) é tido como mais sensível e confiável. No entanto, o alto custo de insumos laboratoriais, equipamentos e limitações como, dificuldades de testar a infinidade de patógenos raros que podem causar uma determinada patologia e, incapacidade de identificar patógenos novos ou inesperados, eventualmente provenientes de saltos entre espécies, acabam dificultando o uso desta metodologia (FISCHER *et al.*, 2016; PESERICO *et al.*, 2019).

A investigação de biomarcadores, por uso de análise imunogenética e proteômica, pode auxiliar na confirmação de diagnóstico por RT-PCR, e/ou ser uma nova ferramenta para diagnóstico. Determinar as proteínas subjacentes envolvidas nos vários estágios da infecção por

CC abre espaço para a descoberta de biomarcadores no diagnóstico e prognóstico, sendo a proteômica uma ferramenta para esse propósito (WHENTTON *et al.*, 2022)

A proteômica é a ciência que abrange identificar e quantificar todos os componentes de um proteoma, conjunto de todas as proteínas expressas por um genoma (Wasinger *et al.*, 2013), e vias bioquímicas que estão envolvidas em fisiopatologias, incluindo características das mesmas, como estrutura primária e covalente, conformações (proteoma estrutural), modificações pós-traducionais, expressão (isoformas, *splicing* alternativo, polimorfismo), localização e mudanças em função de um estímulo, espaço, tempo e tipo celular (Nogueira *et al.*, 2014). Caracterizar quantidade, estabilidade e status de modificações das proteínas são de interesse da proteômica, e servem para aprimorar nossa compreensão básica sobre como as células, seja tecido ou organismo, funcionam e se comunicam, como também para indicar marcadores de processos celulares que ocorreram inadequadamente (MOSELEY *et al.*, 2018). Sendo assim, o objetivo deste trabalho foi investigar possíveis candidatos à biomarcadores proteicos para Cinomose Canina, através do uso da proteômica com a ferramenta de busca de tais moléculas.

## 2 OBJETIVOS

### 2.1 Objetivo geral

O objetivo geral deste trabalho foi realizar o proteoma diferencial do soro de cães acometidos pela cinomose canina com intuito de prospectar possíveis biomarcadores proteicos para essa doença.

### 2.2 Objetivos específicos

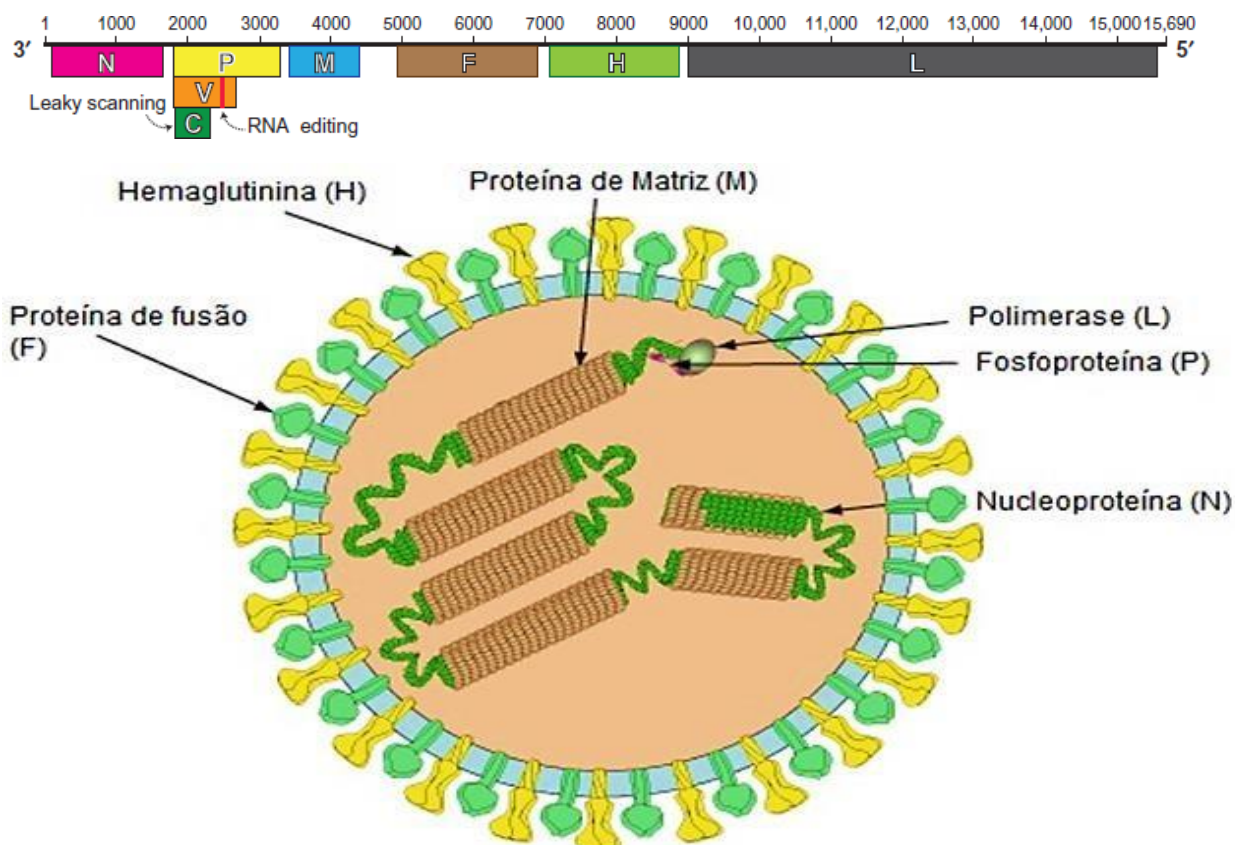
- Realizar o proteoma diferencial do soro de cães infectados pelo Vírus da Cinomose Canina (*Canine Distemper Virus* – CDV);
- Detectar proteínas do CDV no soro das amostras coletadas;
- Prospectar possíveis biomarcadores proteicos que sirvam como indicadores de CDV.

### 3 REVISÃO DE LITERATURA

#### 3.1 Vírus da Cinomose (CDV)

As primeiras investigações sobre a doença e agente etiológico da cinomose canina datam do século XIX. Edward Jenner, médico que desenvolveu a vacina contra a varíola, descreveu os sinais clínicos de *Canine distemper vírus* (CDV) em 1806, mas foi Henri Carré, médico veterinário, quem demonstrou e isolou o agente etiológico pela primeira vez, em 1905 (MURPHY et al., 1999; MELLO et al., 2008). Porém, a teoria não foi aceita na época e a *Bordetella bronchiseptica* foi considerada como o agente etiológico da infecção, visto que essa bactéria era frequentemente encontrada em cães com manifestações clínicas da doença. O patologista Patrick Ladlaw e o veterinário George Dunkin confirmaram em 1926 a etiologia viral de CDV, e a *Bordetella bronchiseptica* passou a ser entendida como uma causa de infecção bacteriana secundária (APPEL; SUMMERS, 1999). Carré, no início do século XX, fez isolamento do agente por meio da inoculação de secreção nasal de cães infectados em cães jovens, assim, reproduzindo experimentalmente a doença (MURPHY et al., 1999; MELLO et al., 2008).

O vírus da Cinomose Canina (VCC) pertence à família dos *Paramyxoviridae*, ao gênero *Morbilivirus* da espécie *Morbilivirus Canino* e da ordem dos *Mononegavirales* (ICTV, 2022). Os *morbilivírus* são esféricos, envelopados, de aproximadamente 100-250 nm de diâmetro. Seu genoma é composto de uma molécula de RNA de fita simples e polaridade negativa (- ssRNA), não segmentada, com tamanho de aproximadamente 15,5 KB. Todos os genomas de morbilivírus codificam seis proteínas estruturais e duas não estruturais, com a seguinte ordem: a hemaglutinina (H), proteína de fusão (F), a proteína de matriz (M), a polimerase (L), a fosfoproteína (P) e a nucleoproteína (N). As duas proteínas acessórias C e V são expressas a partir do quadro de leitura aberto P e estão envolvidas na interferência da resposta imune inata e na infectividade das partículas, como mostrado na Figura 1 (LOOTS et al., 2017; PARDO; JOHNSON; KLEIBOEKER, 2005; POSTIGO, 2017; PFEFFERMANN, 2018).



**Figura 1 – Partícula viral do vírus da Cinomose Canina.** Vírus morfologicamente esférico e envelopado. O genoma dos *Morbilivirus* pode resultar na produção de seis proteínas estruturais e duas não estruturais. Sendo que cada um dos seis genes contém uma ORF (Open Reading frame [fase de leitura aberta]), as proteínas são produzidas individualmente (PFEFFERMANN, 2018). **Fonte:** PFEFFERMANN, 2018; Adaptado de VIRALZONE, 2018.

As duas glicoproteínas de superfície relacionadas com a entrada do vírus na célula hospedeira são a Hemaglutinina (H) que tem a função de adsorção viral na célula hospedeira, e a Proteína de Fusão (F) que tem papel fundamental na dispersão do vírus no hospedeiro por mediar sua penetração na célula (VON MESSLING et al., 2001; LAMB & KOLAKOFSKY, 2013).

A Fosfoproteína (P) forma o complexo polimerase com a proteína Polimerase para a síntese de RNA. A partir do mesmo gene pode ser gerado três proteínas distintas: P, C e V. A proteína P é um componente do complexo e replica-se para a síntese de RNA, embora não seja essencial à replicação viral, pode ser um importante determinante de virulência. A proteína C possivelmente teria um papel na inibição seletiva da síntese de RNA, auxiliando na transição da transcrição primária para a replicação do genoma viral. Quanto à proteína V, sua função também não está claramente elucidada, mas é possível sugerir que esta possui influência na

síntese de RNAm. As proteínas V e C possuem participação na evasão da resposta inata pelo vírus (VON MESSLING, 2017).

A proteína de Matriz (M) atua na maturação e no agrupamento de partículas virais, além de servir como um ponto de ancoragem para as glicoproteínas de superfície (H e F). Ela preenche o espaço entre o nucleocapsídeo e o envelope viral, constituindo assim a proteína mais abundante no vírion. A proteína M está implicada no controle dos níveis de síntese de RNA (VON MESSLING, 2017). Por sua vez, a Nucleoproteína é responsável por empacotar o RNA viral, baseado na expressão gênica, serve como um *template* para a transcrição e replicação pela polimerase viral. Também tem função de agrupar os componentes virais quando interage com a proteína M (VON MESSLING, 2001; VON MESSLING, 2017). Por fim, a proteína Polimerase (L) é a menos abundante nos vírions, sua função está relacionada com a atividade catalítica da RNA-polimerase RNA-dependente (RdRp) (VON MESSLING, 2017).

O CDV é um vírus envelopado, acaba sendo inativado por solventes lipídicos, como clorofórmio e éter. Sua inativação também ocorre por agentes oxidantes, fenol, formalina e soluções de hipoclorito. É sensível a pH ácido e aquecimento a 56°C no tempo de 30 minutos. Vírions são bastante lábeis, porém, em temperaturas de -50°C continuam viáveis por meses (ARNS et al, 2012; BUDASZEWSKI, 2013). Essa família contém vírus que são altamente infecciosos, que tem sua disseminação feita por via respiratória, causando uma imunossupressão intensa em populações que não foram expostas previamente, podendo causar um alto surto de morbidade e mortalidade (VON MESSLING et al., 2003; LEMPP et al., 2014).

### 3.2 Epidemiologia

A Cinomose Canina (CC) é uma doença infectocontagiosa multissistêmica causada pelo *Canine Distemper Virus* (CDV). Esse vírus afeta principalmente cães domésticos (*Canis lupus familiaris*) e outros animais de diferentes espécies da ordem dos carnívoros, como mamíferos das famílias Canidae, Mustelidae, Hyaenidae, Procyonidae, Ailuridae, Viverridae, Felidae, Ursidae, Phocidae, Tayassuidae e Cercopithecidae (ARNS et al., 2012; CHO E PARK, 2005; COTTRELL et al., 2013; LEMPP et al., 2014; SANTOS, 2018).

De acordo com Blancou (2004), há relatos da doença que datam de 1746 na América do Sul e aproximadamente em 1760 na Espanha, Inglaterra, Itália e Rússia. Por volta de 900 cães foram a óbito em 1763 na capital da Espanha, Madri. Nos livros do século XVII, já são relatadas grandes epidemias da doença por toda a Europa. A teoria de que a Cinomose poderia ter sido

importada do Peru para a Europa, aconteceu em 1853, e teria sido levada por colonizadores espanhóis (BAUMANN, 2004).

### 3.2.1 Prevalência No Brasil

A CC tem ocorrência mundial, sem sazonalidade, sem predileção por sexo ou raça e apresenta uma maior incidência em animais jovens não vacinados, mesmo que possa acometer cães de todas as idades. No Brasil, a doença é endêmica e suas informações sobre a epidemiologia molecular dessa infecção viral são escassas. Por isso há uma necessidade de desenvolver estratégias mais apropriadas e eficientes para fazer a caracterização mais completa dos novos isolados de variantes do CDV existentes no Brasil.

A infecção pelo CDV é enzoótica no mundo inteiro. Países em desenvolvimento, como o Brasil, a situação epidemiológica da cinomose é semelhante e apresenta uma frequência relativamente elevada da ocorrência dessa moléstia, pois ainda existe uma escassez na adoção de ações profiláticas por parte dos tutores dos animais ao que se refere as doenças infecciosas e parasitárias. Essa situação é diferente em países desenvolvidos que conseguiram reduzir a incidência da doença pela vacinação massiva, mas ainda apresentam surtos esporádicos de cinomose (ARNS *et al.*, 2012; NELSON e COUTO, 2010; SANTOS, 2018; SILVA *et al.*, 2018). Estima-se que, em nosso país, o grau de infecção seja significativamente maior que o grau da doença, e que acima de 50% das infecções em cães domésticos possam ser subclínicas. Filhotes e cães jovens são mais acometidos pela CC, contudo, a faixa etária entre os três a seis meses apresenta um maior número de casos (MARTINS; LOPES; FRANÇA, 2009).

Budaszewski e colaboradores (2014), com base na análise filogenética do gene H em amostras de animais colhidas de várias regiões do Brasil observaram variantes que pertencem ao genótipo denominado América do Sul-1/Europa, que são incluídos nos isolados do sul do Brasil, Uruguai, Argentina e países europeus e do genótipo Rockborn, que inclui genótipos isolados nos Estados Unidos e China. De acordo com Santos (2018), fica evidenciado as relações dos parâmetros entre patogenicidade e filogenia, dos isolados brasileiros e as cepas usadas como referências advindas de outros países, principalmente as utilizadas para produção de vacinas, que não são bem conhecidas ainda. Sendo assim, investigações adicionais se fazem necessárias para uma melhor caracterização das mudanças que são causadas por mutações genicas na proteína H de CDV que foram isolados no país.

### 3.2.2 Transmissão

A infecção por CC ocorre a qualquer época do ano e se dá através da inalação de aerossóis com partículas virais eliminadas por um animal infectado que entra em contato com o epitélio do trato superior de outro animal. Contato direto com as secreções nasais, orais e urina de animais que estejam infectados são a principal forma de transmissão do CDV.

Inicialmente, sua replicação ocorre dentro das células mononucleares nos tecidos do trato respiratório superior e, então, se espalha rapidamente para as amígdalas e linfonodos regionais. Essa infecção viral acontece devido o tropismo por células que expressam o receptor SLAM (CD150 - molécula de sinalização para ativação linfocítica), presente nos timócitos, linfócitos ativados, macrófagos e células dendríticas (RENDON-MARÍN *et al.*, 2019) (Figura 2). As partículas virais se replicam nos macrófagos e se disseminam pelas células do tecido linfoide e para todo sistema reticuloendotelial (SRE), causando uma viremia primária. O vírus pode ser encontrado no timo, baço, linfonodos, medula-óssea, estômago, intestino e fígado. Posteriormente, com o sistema linfoide infectado, ocorre a imunossupressão que resulta em infecções oportunistas como conjuntivite, rinite e broncopneumonia as quais são comumente vistas nas infecções por CDV. Após a infecção, os animais excretam o vírus nos fluidos corporais por períodos prolongados de até 90 dias (APPEL M. J. G., 1987; APPEL & SUMMERS, 1999; VANDEVELDE e ZURBRIGGEN, 1995; ARNS *et al.*, 2007; NELSON e COUTO, 2010).

Associada ao segundo pico febril, as células mononucleares recém-infectadas levam a uma viremia secundária. A infecção resultante de células epiteliais no pulmão, bexiga e pele ocorre através da interação com o receptor nectina-4 (receptor relacionado a poliovirus 4) (NOYCE; DELPEUT; RICHARDSON, 2013; RENDON-MARÍN *et al.*, 2019).



### 3.2.3 Sinais Clínicos

A Cinomose canina pode se apresentar em três formas clínicas: subaguda, aguda e crônica, com manifestações gastroentéricas, respiratória e neurológicas (SUMMERS et al., 1995). Infecções oportunistas, seja bacteriana e/ou viral, contribuem para um aumento na gravidade dos sintomas clínicos (POZZA, 2005).

Na forma subaguda é observado uma diminuição no apetite, febre, infecção do trato respiratório superior, dispnéia, tosse e secreção oculonasal mucopurulenta (APPEL, 1998). Já na forma aguda os sintomas mais comuns ocorrem após 3 a 6 dias de incubação, onde o animal infectado apresenta uma condição bifásica na temperatura corporal, quando ocorre picos superiores a 41°C, a qual o pico secundário corresponde a uma severa leucopenia (principalmente linfopenia) em conjunto com outros sinais clínicos, como conjuntivite, secreção nasal, anorexia, tosse, vômitos, depressão e diarreia (MURPHY, 1999).

A forma crônica está relacionada aos sintomas neurológicos, que sucedem os sintomas sistêmicos. Contudo, esses sintomas podem resultar de uma infecção subclínica sistêmica. Descoordenação motora e ataques convulsivos são comuns, e pode ocorrer paresia, tremores, hiperqueratose, rigidez cervical, nistagmo e mioclonia. Geralmente, animais infectados por CDV e com sintomas neurológicos acabam não resistindo, já os que se recuperam permanecem com sequelas (APPEL, 1987).

A duração, gravidade e a letalidade da doença estão diretamente ligadas à virulência da cepa, as condições do ambiente e ao perfil imunológico do animal, caracterizados por sinais respiratórios, gastrintestinais, dermatológicos, oftalmológicos e neurológicos (FENNER, 2004; GREENE; APPEL, 2006; MANGIA; PAES, 2008).



**Figura 3: Apresentação Clínica de Cinomose em cães.** A) Hipoplasia de esmalte dentário; B) Blefarite, alopecia periocular, ceratoconjuntivite seca e hiperqueratose em plano nasal; C) Hiperqueratose em plano nasal, blefarite e dermatite ulcerativa; D) Ulceração corneana por ceratoconjuntivite seca; E) Dermatite pustular em abdômen.  
Fonte: TABANEZ, 2019.

São observados com maior frequência, alterações gastrointestinais, respiratórias, oculares e neurológicas. Seus sinais clínicos são parecidos com o de outros agentes patogênicos, o que dificulta no diagnóstico clínico (SHELL, 1990; POZZA, 2005). Essa infecção apresenta uma taxa de morbidade e letalidade alta; cerca de 60 a 70% dos animais infectados vão a óbito, fazendo com que a letalidade dessa enfermidade fique atrás apenas da doença causada pelo vírus da raiva. As cepas *Snyder hill* e *R252* são as que mais causam mortes, por serem altamente neurotrópicas e imunossupressoras (POSTIGO, 2017; SANTOS, 2018).

### 3.2.4 Profilaxia e Controle

Protocolos terapêuticos específicos para tratamento de cães que foram infectados por CC ainda não existem. Entretanto, já é possível encontrar tratamento para sintomas e de suporte, como: antieméticos, antipirético, uso de antimicrobianos para tratar enfermidades bacterianas concomitantes, corticosteroides; suplementação vitamínica e mineral; broncodilatadores e expectorantes; anticonvulsivantes (CRIVELLENTI & CRIVELLENTI, 2012; PORTELA *et al.*, 2017).

A prevenção para a CC depende da vacinação com cepas atenuadas, vacinas com vírus vivo modificado ou vacinas recombinantes (poxvírus aviário como vetor do DNA complementar [cDNA] dos genes das proteínas H e F do CDV), em formulações mono ou polivalentes, a qual é a estratégia mais usada no combate a Cinomose. O sucesso das vacinas disponíveis depende da variabilidade antigênica que existe entre isolados do CDV, além da qualidade dos imunógenos e da resposta de cada indivíduo vacinado (ARNS *et al.*, 2007; MARTELLA *et al.* 2008).

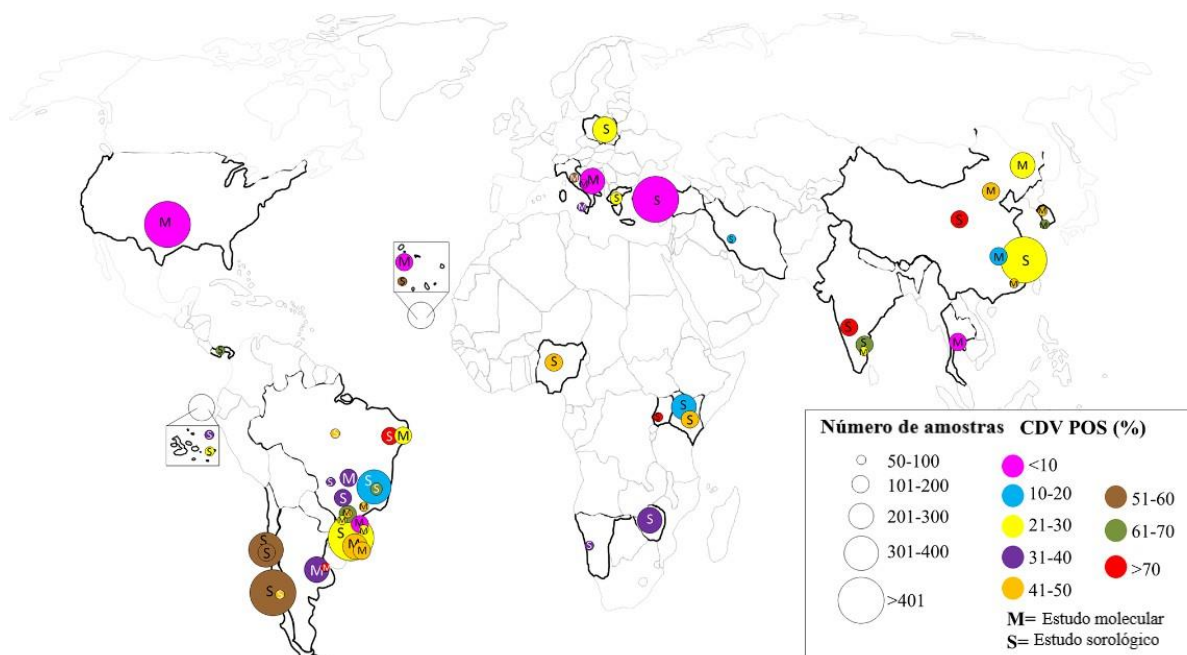
Entretanto, se a produção de anticorpos for intermediária neste período, ou se houver um retardo na produção, o vírus poderá persistir em alguns tecidos, como o nervoso, uveal e tegumentar (coxins). Cães com resposta imune baixa apresentam disseminação do vírus por todos os tecidos, incluindo epitélio gastrointestinal, tegumentar, endócrino, genitourinário e respiratório (TABANEZ, 2019).

Vários fatores podem ser atribuídos à falha vacinal: diferenças individuais dos animais vacinados; genética; idade; nutrição; estado de saúde em que o animal se encontra; meio ambiente e situações de estresse. Porém, o fator de diferenças antigênicas, entre as linhagens do CDV de campo e vacinal, têm chamado mais a atenção dos pesquisadores (DONG *et al.*, 2015; BHATT *et al.*, 2019).

O CDV é caracterizado por mudanças evolutivas com alta diversidade genética, até o momento foram descritas 17 principais linhagens, incluindo América 1-5, Europa selvagem, Ártico, África do Sul, América do Sul-I/Europa, América do Sul 1-3, Rockborn-like e Ásia 1-4. Essas classificações estão relacionadas à origem geográfica onde essas linhagens foram detectadas (BUDASZEWSKI *et al.*, 2016; FISCHER *et al.*, 2016; ANIS *et al.*, 2018; PIEWBANG *et al.*, 2019; ROMANUTTI *et al.*, 2020).

Ao longo dos últimos anos estudos sorológicos e moleculares do CDV têm sido realizados em alguns países (Figura 4). A frequência de positividade, de infecção por CDV, no geral foi alta, entretanto, existe uma menor positividade para aquelas regiões consideradas desenvolvidas, pois a vacinação contra a Cinomose continua com valor elevado na maioria dos países em desenvolvimento (COSTA *et al.*, 2019; DORJI *et al.*, 2020).

Os poucos relatos existentes de pesquisas sorológicas e moleculares, estão concentrados em alguns estados das regiões Sul e Sudeste do país, com variações de positividade entre 8 a 70% (COSTA *et al.*, 2019). Estes dados demonstram a necessidade de estudos epidemiológicos com o intuito de maior conhecimento para vigilância e análise de medidas de controle de saúde pública animal (COSTA, 2021).



**Figura 4: Distribuição geográfica de estudos analisando o nível de infecção viral.** Fonte: COSTA, 2021. (<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0217594>.)

### 3.3 MÉTODOS DIAGNÓSTICOS

O diagnóstico é baseado no histórico clínico do animal, onde temos, avaliação física e exames laboratoriais. Com um diagnóstico rápido e eficiente podemos evitar que infecção passe para a fase neurológica, a qual normalmente chega a ser a mais fatal, e também evitar a transmissibilidade para animais que sejam susceptíveis. As alterações laboratoriais não são conclusivas e o cão pode apresentar anemia, trombocitopenia, neutropenia, linfopenia, hiperproteinemia com hipoalbuminemia. Sinais como vômito, diarreia e desidratação podem levar à hiponatremia, hipocalemia e hipocloridemia. Aumento moderado da atividade das transaminases pode ocorrer principalmente por hipóxia ou infecção secundária (TABANEZ, 2019).

A identificação do patógeno é realizada por testes de PCR, um diagnóstico direto onde é feito a amplificação de ácidos nucleicos alvo. De acordo com Peserico et al. (2019), embora essa abordagem seja altamente específica e constantemente validada, ela sofre uma série de limitações, incluindo as dificuldades de testar a infinidade de patógenos raros que podem causar uma determinada patologia e sua incapacidade de identificar patógenos novos ou inesperados, eventualmente provenientes de saltos entre espécies. Portanto, a disponibilidade de outras técnicas mais rápidas e de amplo alcance tem se tornado cada vez mais importante no meio de diagnóstico laboratorial de doenças infecciosas.

### 3.3.1 Metodos de detecção

#### 3.3.1.1 *Imunoflorescencia (IFA)*

Técnica utilizada para demonstrar se existe a presença de anticorpos, ou de antígeno viral. São usados esfregaços de impressões da conjuntiva, esfregaço de material sanguíneo e biopsias de pele, para antemortem, ou é feito uso de tecidos do intestino, rim, estomago, pulmão, cérebro, rim e bexiga, que são coletados quando feito a necropsia. Células infectadas também podem ser utilizadas, é feita a fixação em lâmina para detecção de anticorpos. Esses anticorpos são marcados com corante fluorescentes que revelam a formação do complexo vírus-anticorpo (POTGIETER *et al.*, 1989; ATHANASIOU *et al.*, 2017).

#### 3.3.1.2 *ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assays)*

O ELISA também faz detecção de anticorpos, ou antígenos, contra o CDV. Outras plataformas do ELISA vêm sendo desenvolvidas com o propósito de contribuir para um diagnóstico mais exato. Uma das plataformas exploradas é a produção da proteína N e sua adsorção aos micropoços da placa de ELISA, permitindo-se assim uma detecção de anticorpos específicos contra o CDV. Sendo assim, com a exploração de outras plataformas, Zhang *et al.* (2020), estão gerando anticorpos monoclonais contra a proteína de Fusão (F), assim permitindo que sejam usadas para detecção de anticorpos que sejam neutralizantes contra o vírus.

#### 3.3.1.3 *Imunoensaio Cromatografico*

Por ser um teste com mais praticidade, ele é bastante usado em clinicas e consultórios veterinários. Os Kits detectam a presença de antígenos virais na amostra biológica. A técnica é feita com um fluxo lateral da amostra, na qual corre por capilaridade em uma membrana de nitrocelulose. Metodo diferenciado de detecção direta que evidencia a interação antígeno-anticorpo (AN *et. al.*, 2008; MARTELLA *et al*, 2008).

#### 3.3.1.4 Isolamento Viral

O isolamento pode ser realizado por meio da inoculação de amostras clínicas (secreção nasal, ocular e sangue) em células de linhagem. Metodologia de rotina laboratorial, pois é demorado, com um custo alto e possibilidade de detecção reduzida (VON MESSLING, 2017).

#### 3.3.1.5 Detecção de RNA Viral (RT-PCR)

A RT-PCR (Reverse Transcription – Polymerase Chain Reaction), é tida como padrão ouro no quesito detecção molecular, e é considerada um método específico de diagnóstico e amostras de soro, sangue total, urina e liquor se apresentam mais sensíveis na detecção de CDV por RT-PCR (TOZATO, 2016; FISCHER et al., 2016). De acordo com Da Costa (2021), a RT-PCR requer ensaios mais especializados para distinção entre vírus de campo e vacinal, sendo ensaios que não estão disponíveis rotineiramente. Fischer e colaboradores (2016) desenvolveram primers para uso de detecção entre as estirpes selvagens e vacinais de CDV, mas o alto custo de insumos laboratoriais e equipamento para utilização de PCR em tempo real, acaba dificultando o uso desta metodologia.

### 3.4 SANGUE COMO FONTE DE BIOMARCADORES PARA DOENÇAS

Os fluidos corporais são excelentes materiais biológicos, pois podem ser utilizados para desenvolvimento de ferramentas de diagnóstico e prognóstico, com uma coleta simples usando técnica pouco invasiva. O plasma ou soro sanguíneo possui uma grande facilidade de acesso e um dos mais difundidos métodos de extração de tecido. Seu uso como fonte de investigação é aplicado em diversas áreas, sendo a área clínica um importante exemplo. O sangue é utilizado para diagnóstico de doenças e para monitoramento da homeostase (SCHIESS; WOLLSCHIED; AEBERSOLD, 2009; GUEST *et al.*, 2015; MAYNE *et al.*, 2016; GEYER *et al.*, 2017).

Toda mudança fisiológica, como exemplo, tecidos doentes, liberam proteínas no sangue e elas podem ser indicadoras de doença ou de estágios de desenvolvimento, quando em concentrações elevadas. Sendo assim, o sangue tem um papel importante na identificação do estado do indivíduo, sendo um interessante alvo de estudo para biomarcadores (SCHIESS; WOLLSCHIED; AEBERSOLD, 2009; GUEST *et al.*, 2015; MAYNE *et al.*, 2016; GEYER *et al.*, 2017).

Sangue, plasma e soro estão entre as fontes mais úteis de marcadores biológicos que podem oferecer informações sobre os processos fisiológicos e patológicos do organismo (OMENN *et al.*, 2005). As frações sanguíneas são bem semelhantes, enquanto o soro é um material de escolha para diversos testes de diagnóstico pelo motivo de anticoagulantes presentes no plasma interferirem em alguns métodos que são empregados, o plasma é um material mais estável para avaliação de proteínas com baixo peso molecular, que são encontradas na matriz líquida (HUIJBERS *et al.*, 2010).

Biomarcadores são utilizados como indicadores de processos biológicos, seja normal ou patogênico, de resposta farmacológica a tratamentos ou intervenção terapêutica, para detectar ou confirmar a presença de uma doença ou condição de interesse, ou até mesmo para identificar indivíduos com um sub-tipo de doença. Os biomarcadores podem ser do tipo molecular, seja na medição de glicose ou medição/detecção de proteínas, presença ou ausência de uma ou mais moléculas bioquímicas aumentadas ou diminuídas (GEYER *et al.*, 2017; BEST, 2021). Tais indicadores, dispõem de várias aplicações, especialmente na área clínica permitindo um diagnóstico mais preciso, fornecendo informações moleculares sobre a patologia da doença e ajuda na escolha de ações terapêuticas mais rápida, oferecem também oportunidade de caracterização de disfunções moleculares associadas a doença ou mesmo a sua progressão, de acordo com a condição manifestada individualmente pelo paciente (Mc GORRY; YUNG, 2003; ANDERSON, 2010).

### **3.5 PROTEÔMICA COMO FERRAMENTA PARA DIAGNOSTICO**

As proteínas são importantes reguladoras da homeostase celular e estimulantes dos mecanismos celulares, e avaliar a interrupção desses mecanismos e estabelecer quais proteínas estão envolvidas, facilitará no diagnóstico e prognóstico (ANJO *et al.*, 2017; WHENTTON *et al.*, 2020).

O surgimento da proteômica ocorreu na era pós-genômica, e é a área que visa descrever o conjunto de proteínas atuantes em diversos processos biológicos. Esta ferramenta é utilizada para estudo global e em larga escala das proteínas de uma célula em um determinado estado fisiológico e determinada condição, relacionando não somente a números de proteínas como interações proteína-proteína e as modificações pós-traducionais. Por meio dela é possível identificar e quantificar as proteínas e as vias bioquímicas envolvidas na fisiopatologia de doenças, e tem sido utilizada para predição de biomarcadores sanguíneos para auxílio no

diagnóstico de doenças (WILKINS *et al.*, 1996; GODOVAC-ZIMMERMANN *et al.*, 2001; JENSEN *et al.*, 2002; GARCIA ROSA, 2019).

Uma vantagem da proteômica comparada a métodos enzimáticos ou baseados em anticorpos, está na utilização da espectrometria de massas (MS), a qual é capaz de mensurar com uma alta precisão as massas de peptídeos derivados da digestão específica de proteínas. A MS não necessita de reagentes para afinidade e pode ser configurada de forma não direcionada, de modo que não precise de conhecimento prévio da doença. Ela é capaz de fornecer rapidamente quantidades substanciais de informações clínicas e biológicas a partir do material biológico acessível. Desta maneira, a proteômica baseada em MS se tornou uma tecnologia poderosa na pesquisa de biomarcadores, e é ideal para ser aplicada em situações que necessitem de respostas mais rápidas (SCHIESS; WOLLSCHIED; AEBERSOLD, 2009; SURINOVA *et al.*, 2011).

### 3.5.1 Análises Proteômicas

A abordagem proteômica vem ganhando espaço como estratégia investigativa e se mostrando eficaz na medicina translacional, do leito do paciente à bancada do laboratório, com a identificação da doença que o acomete e no conhecimento da sua fisiopatologia para a pesquisa de possíveis alvos terapêuticos (CHIOU *et al.*, 2011).

Três técnicas analíticas são utilizadas em estudos proteômicos: eletroforese (uni ou bidimensional), cromatografia líquida (LC) e espectrometria de massas (MS). No entanto, a maioria dos trabalhos atuais em proteômica vêm fazendo uso somente de LC e MS.

O estudo proteômico em larga escala pode ser feito nas modalidades *top-down*, *middle-down* e *bottom-up* (ou *shotgun*) (NOGUEIRA; DOMONT, 2014), cujas características estão resumidas na tabela 1.

**Tabela 1: Estratégias Proteômicas.**

|                                    | <b>Bottom-up/Shotgun Proteomics</b>                        | <b>Middle-down Proteomics</b>     | <b>Top-down Proteomics</b> |
|------------------------------------|------------------------------------------------------------|-----------------------------------|----------------------------|
| <b>Amostra de proteínas</b>        | Lisados celulares ou teciduais, frações subcelulares, etc. |                                   |                            |
| <b>Fracionamento da amostra</b>    | Gel, LC, IEF, etc. (opcional)                              | Dependente de tamanho             | Gel, LC, IEF, etc.         |
| <b>Digestão proteolítica</b>       | Geralmente usando tripsina                                 | Restrita                          | -                          |
| <b>Fracionamento dos peptídeos</b> | SCX, IEF, RPC, etc. (opcional)                             | Dependente de tamanho             | -                          |
| <b>LC-MS/MS</b>                    | Fragmentação de peptídeos                                  | Fragmentação de peptídeos maiores | Fragmentação de proteínas  |
| <b>Banco de dados</b>              | Identificação de proteínas                                 | Identificação de proteínas        | Identificação de proteínas |

LC: Cromatografia líquida; IEF: Focalização isoeletrica; SCX: Cromatografia de troca catiônica; MS/MS: espectrometria de massas em série; RPC: cromatografia de fase reversa.

Fonte: Adaptado de ZHANG et al., 2013.

A abordagem proteômica *top-down* é amplamente aplicada na caracterização de proteínas intactas e de seus fragmentos gerados pelas reações de dissociação por captura de elétron (ECD) ou dissociação por transferência de elétron (ETD) no espectrômetro de massas. Estas reações produzem um sequenciamento mais completo da proteína, pois reduzem as ambiguidades no mapeamento dos fragmentos permitindo a identificação específica de cada tipo proteico, e preservam as modificações pós-traducionais lábeis. Essa metodologia provê maior confiabilidade para quantificação de proteínas, uma vez que as abundâncias das mesmas são medidas diretamente (YATES; RUSE; NAKORCHEVSKY, 2009). Devido a limitações técnicas (separação de proteínas intactas, a qual requer o uso de equipamentos nem sempre acessíveis) para distinguir os envelopes isotópicos de proteínas co-eluentes, a abordagem *top-down* é muitas vezes limitada à análise de proteínas individuais e/ou misturas não muito complexas (YATES; RUSE; NAKORCHEVSKY, 2009).

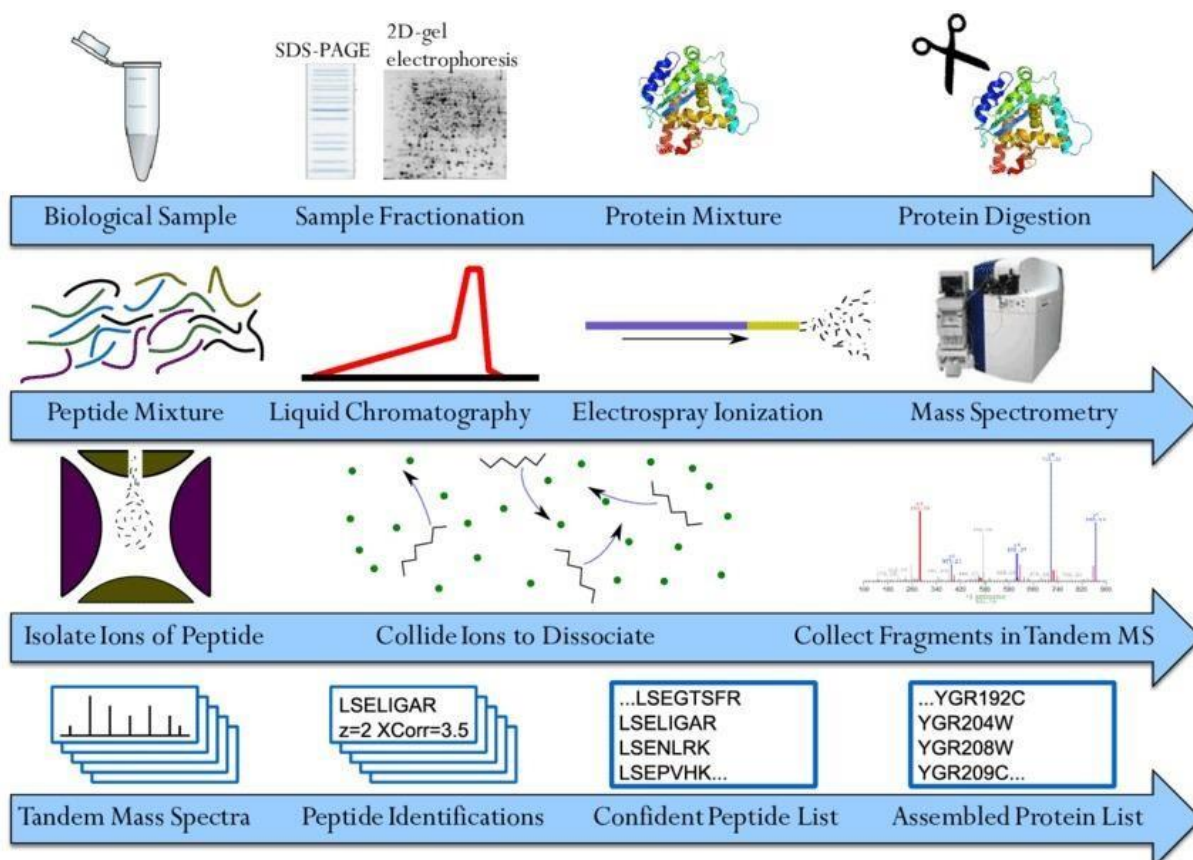
A modalidade *middle-down* é uma abordagem voltada para explorar as vantagens da análise de peptídeos e/ou proteínas de 3 a 20kDa derivados de uma digestão proteolítica parcial ou limitada de um proteoma. Tais vantagens incluem um melhor fracionamento cromatográfico, uma maior cobertura de sequência e caracterização de modificações pós-traducionais. Experimentalmente, a análise de peptídeos de 3 a 20 kDa simplifica as misturas complexas geradas pela estratégia *bottom-up*, melhorando a performance de modalidade *top-down*. Geralmente, utiliza-se reações enzimáticas específicas para um único resíduo ou para uma

sequência específica de resíduos o que gera uma grande proporção de peptídeos de faixa intermediária de tamanho do que a digestão trípica padrão (WOO *et al.*, 2012).

A estratégia *bottom-up* refere-se à caracterização de proteínas pela análise de peptídeos derivados de proteólise (na maioria dos trabalhos, utilizando a tripsina) das mesmas. Parte da metodologia empregada na estratégia *bottom-up* também pode ser utilizada para os estudos do peptidoma. Quando essa estratégia é realizada sobre uma mistura de proteínas, fornecendo uma medida indireta, é denominada proteômica *shotgun* (NOGUEIRA; DOMONT, 2014; ZHANG *et al.*, 2013).

Em um experimento típico de proteômica *shotgun*, a mistura de peptídeos, que pode ser pré-fracionada, é submetida à análise de cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas (LC-MS/MS) em série (*tandem*). A identificação dos peptídeos é feita pela comparação dos espectros de fragmentação dos peptídeos com espectros de fragmentação teóricos gerados da digestão *in silico* de proteínas depositadas em bancos de dados. A dedução das proteínas é obtida pela atribuição das sequências dos peptídeos às sequências das proteínas depositadas. Pelo fato de os peptídeos poderem ser atribuídos a uma única proteína ou a várias delas, as proteínas identificadas são pontuadas e agrupadas com bases em seus peptídeos (ZHANG *et al.*, 2013).

Com os avanços recentes de instrumentação, a proteômica *shotgun* pode ser universalmente adotada devido à facilidade de fracionamento, ionização e fragmentação dos peptídeos. Com isso, é o carro-chefe na análise de proteomas e suas modificações. Nas últimas décadas, esta técnica tem sido usada na área biológica em diferentes pesquisas contribuindo enormemente para o avanço dessa área e sua combinação com métodos da estratégia *top-down* é uma tendência (ZHANG *et al.*, 2013).



**Figura 5:** Fluxograma das etapas comumente seguidas em uma análise proteômica bottom-up/shotgun: preparação do extrato, digestão e análise por MS. Fonte: CHEN, 2012.

### 3.5.2 Proteômica Quantitativa

Atualmente, a maioria das estratégias de quantificação de proteínas baseadas em LC-MS dependem da incorporação metabólica ou ligação covalente de marcadores isotópicos estáveis (*label-based quantitative proteomics*). A marcação metabólica é realizada em nível da proteína intacta dentro de células cultivadas, em crescimento ativo, na presença de meios enriquecidos com  $^{15}\text{N}$  ou em meios contendo resíduos de arginina e lisina marcados com isótopos  $^{13}\text{C}/^{15}\text{N}$ ; conhecidos como marcação isotópica estável de aminoácidos por cultura celular (SILAC) (ODA *et al.*, 1999; ONG *et al.*, 2002).

A marcação covalente é frequentemente realizada em nível de peptídeo através da introdução de uma variedade de reagentes marcados com isótopos estáveis, como  $^{18}\text{O}$  (REYNOLDS; YAO; FENSELAU, 2002), marcações de afinidade isotópicas (ICAT) (GYGI *et al.*, 1999), marcações isobáricas para quantificação relativa e absoluta (iTRAQ) (EVANS *et al.*, 2012), e marcações de massa em tandem (TMT) (THOMPSON *et al.*, 2003).

Desde a década passada, há um interesse crescente da proteômica quantitativa no uso de abordagens de quantificação que não fazem uso de incorporação metabólica ou ligação covalente de marcadores isotópicos estáveis na caracterização de proteomas complexos (*label-free quantitative proteomics*). Em contraste com as abordagens de marcação, cada amostra é processada e analisada individualmente por LC-MS/MS em seu estado isotópico natural. A quantificação é realizada após a aquisição dos dados, usando medições de contagem espectral ou de intensidade de íons (SODERBLOM; THOMPSON; MOSELEY, 2014).

As características mais atraentes dessa estratégia são: a natureza direta da preparação da amostra e a flexibilidade tecnicamente ilimitada do design experimental, tanto para a natureza das amostras analisadas quanto para o número de amostras únicas ou condições biológicas. Embora a estratégia geral desse tipo de experimento proteômico quantitativo ser relativamente direta, os estudos iniciais foram relativamente limitados pela faixa dinâmica de quantificação e a exatidão e precisão da quantificação eram notavelmente menores do que as abordagens quantitativas usando marcações. Isso ocorreu devido à baixa resolução dos espectrômetros de massa e pela falta de softwares mais sofisticados e robustos para as análises dos espectros de MS e MS/MS. No entanto, nos últimos anos houve vários avanços nas estratégias de aquisição de dados e nas soluções bioinformáticas. Isso tem proporcionado a redução de variação técnica e aumento na precisão da quantificação, o que tem tornado a quantificação *label-free* equivalente à quantificação usando marcações nos peptídeos (SODERBLOM; THOMPSON; MOSELEY, 2014). A estratégia quantitativa *label-free* foi utilizada nesse presente projeto.

## **4 METODOLOGIA**

### **4.1 Aspectos Éticos**

Em virtude da resolução nº 11.794/2008 do Conselho Nacional de Saúde, que trata das diretrizes e normas da pesquisa envolvendo animais, o presente trabalho foi submetido à Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal do Pará (UFPA) e aguarda o parecer.

### **4.2 Obtenção das Amostras**

As amostras de soro de cães provenientes de clínicas veterinárias e abrigos de animais, localizados na Região Metropolitana de Belém, foram coletadas por médicos veterinários em tubos contendo gel e ativador de coágulo. Os tubos foram devidamente identificados e refrigerados à temperatura entre 2°C e 8°C e encaminhados para o Laboratório de Tecnologia Biomolecular (LTB) da UFPA, campus Belém. O LTB recebe amostras de clínicas veterinárias da região para a investigação quanto à presença de diferentes enfermidades infecciosas e parasitárias, desempenhando, de forma pioneira, a prestação de serviços direcionados à sanidade e conservação animal, sendo coordenado pelo prof. Dr. Evonnildo Costa Gonçalves. Em seguida, alíquotas das amostras coletadas de animais sadios (n=4) e doentes (infectados) (n=4) foram encaminhadas para o Laboratório de Ciências Ômicas da UFPA, também campus Belém.

### **4.2 Preparação das Amostras**

A preparação das amostras individuais foi realizada de acordo com Melo-Braga e colaboradores (2015) e Thingholm e Larsen (2009), com adaptações para amostras de soro. Amostras de 10 µL de soro de cada animal do estudo foram centrifugadas e diluídas em 50 µL do tampão de desnaturação (6M uréia, 2M tiouréia, 10mM de DTT em 20mM de tampão de bicarbonato de trietilamônio (TEAB). Posteriormente, as amostras foram diluídas 10x em 20 mM de TEAB. Para a alquilação foi adicionado 20 mM de IAA por 30 minutos no escuro à temperatura ambiente. Posteriormente, foi realizada digestão com 10 µL de tripsina (1:100 tripsina/proteína)

por 12 h a 37°C. As reações foram paralisadas com ácido fórmico em uma concentração final de 5% e os tubos foram incubados por 20 min a temperatura ambiente. As amostras foram centrifugadas por 15 min a 14.000x g para remover qualquer pellet. As amostras foram dessalinizadas utilizando cartuchos Supel™-Select HLB SPE (Sigma Aldrich), e a quantificação dos peptídeos foi realizada usando kit de quantificação por fluorimetria (Qubit, Thermo).

#### 4.3 Análises em nanoLC-MS/MS

As análises em triplicata técnica foram realizadas em sistema Acquity UPLC M-Class (Waters Corporation) acoplado ao espectrômetro Xevo G2-XS (Waters Corporation) controlados pelo software MassLynx 4.2 (Waters Corporation).

As amostras de 150 ng de peptídeos foram injetadas e fracionadas em coluna de fase reversa ACQUITY M-Class HSS T3 (100 Å, 1,8 µm, 75 µm × 150 mm, Waters Corporation, Milford, MA). A coluna foi equilibrada com 3% de acetonitrila (ACN) e ácido fórmico (FA) 0,1% e os peptídeos foram eluídos por meio de um gradiente de 4% a 45% (v/v) de acetonitrila e FA 0,1% durante 140 minutos diretamente no espectrômetro de massas. O fluxo utilizado foi o de 300 nL/min.

As análises de MS foram realizadas em instrumento híbrido do tipo ESI-Q-TOF, o Xevo G2-XS. Os espectros de massa foram adquiridos no modo íon positivo e dado-independente (MS<sup>E</sup>) (MOSELEY *et al.*, 2018). Os íons precursores foram continuamente escaneados a 50-1990 m/z no analisador tipo quadrupolo (Q) e transmitidos para o analisador tipo time-of-flight (TOF) no ciclo de baixa energia em alta resolução (40.000 FWHM). Em seguida, os mesmos foram fragmentados por colisão induzida (CID) na câmara de fragmentação no ciclo de alta energia (16-46V) utilizando gás argônio. Os íons fragmentos também foram resolvidos no TOF (ciclo de alta energia) com a mesma faixa de massa dos íons precursores (50-1990 m/z). O espectrômetro foi calibrado usando espectros de MS do ácido fosfórico em solução, usado como sprayer de referência, o qual foi amostrado a cada 30 s durante a aquisição dos espectros (MOSELEY *et al.*, 2018). O m/z 686.8461 foi utilizado para calibrar o instrumento.

#### 4.4 Identificação e Quantificação Relativa por Label Free

Os espectros de MS e MS/MS foram processados usando o software Progenesis<sup>®</sup> QI for Proteomics versão 4.1 (Waters Corporation) e as buscas por identificações foram realizadas

contra a base de dados do proteoma de *Canis lupus familiaris* do Uniprot versão 2022/07 (43,621 proteínas) e de *Canine mobilivirus* do Uniprot versão 2022/07 (7 proteínas) utilizando o mesmo software.

Para as análises qualitativas e quantitativas foram utilizados algoritmos específicos (Apex3D, Peptide 3D e Ion Accounting) também do Progenesis<sup>®</sup> QI for Proteomics, baseados nos parâmetros padrões para contabilidade iônica e quantificação descritos por Li e colaboradores (2009). Esse software utiliza os dados de LC-MS, executa o alinhamento das corridas e a detecção dos picos, criando uma lista de íons peptídicos de interesse que são, então, explorados dentro do Peptide Ion Stats por meio de métodos estatísticos multivariados; sendo que a etapa final é a identificação dos peptídeos e proteínas. Os parâmetros usados para processamento espectros foram os de: 500 counts para limite de baixa energia, 50 counts para o limite de alta energia, alinhamento automático das corridas, 5 como sendo a carga máxima permitida dos íons e 4 para o valor de sensibilidade. Os seguintes parâmetros foram considerados para identificação: 1) Tripsina foi escolhida como a enzima do processo de digestão, permitindo-se até duas clivagens errôneas; 2) Cisteína-carbamidometilação foi definida como modificação fixa; 3) Oxidação da metionina (M) foi escolhida como modificações dinâmica; 4) As identificações foram consideradas positivas somente para peptídeos de alta-confiança (high confidence), contendo uma taxa de falso positivo (FDR) menor do que 1%; 5) Foram considerados três ou mais fragmentos por peptídeo, sete ou mais fragmentos por proteína e três ou mais peptídeos por proteína, sendo pelo menos 1 peptídeo único. A quantificação relativa por label-free foi realizada usando metodologia Hi-N (N=3), segundo Silva e colaboradores (2006). Os dados foram analisados usando One-Way ANOVA e valores de probabilidade de  $p < 0,05$  foram considerados estatisticamente significativos.

#### 4.5 Análises *In Silico* (Biologia De Sistemas)

As proteínas diferencialmente expressas identificadas por *shotgun*, juntamente com a estratégia label-free de quantificação, foram classificadas de acordo com termos e classes da ontologia gênica usando a ferramenta “DAVID Bioinformatics Resources”. Para compreensão da rede de proteínas, foi utilizado a ferramenta String (<http://string-db.org/>).

## 5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1 Análise das proteínas diferencialmente expressas do soro sanguíneo de cães infectados por CDV

No presente estudo, para a caracterização do perfil proteico utilizamos o soro sanguíneo de cães (*Canis lupus familiaris*) acometidos pela cinomose canina, com o total de 8 amostras cedidas pelo Laboratório de Biologia Molecular (LTB), onde, 4 amostras são positivas para a infecção e 4 amostras negativas, usadas como grupo controle. Na busca de possíveis biomarcadores para o CDV.

A análise do perfil proteômico por nanoLC-MS/MS do soro identificou e quantificou 44 proteínas, onde 5 delas foram diferencialmente expressas. Sendo elas: imunoglobulina G, cordina, imunoglobulina G, Alfa-2-HS-Glicoproteína, Proteína de ligação à vitamina D, imunoglobulina G, Superóxido dismutase, Proteína de ligação à vitamina D e imunoglobulina G. Dentre essas, foram reguladas 6 positivas e 3 negativas. Essas proteínas estão listadas na Tabela 3. Além disso, a Fosfoproteína (acesso Q9QPR0), observada na Tabela 2, pertencente ao Canine morbillivirus foi encontrada nas amostras do soro de cães infectados, certificando a presença do vírus.

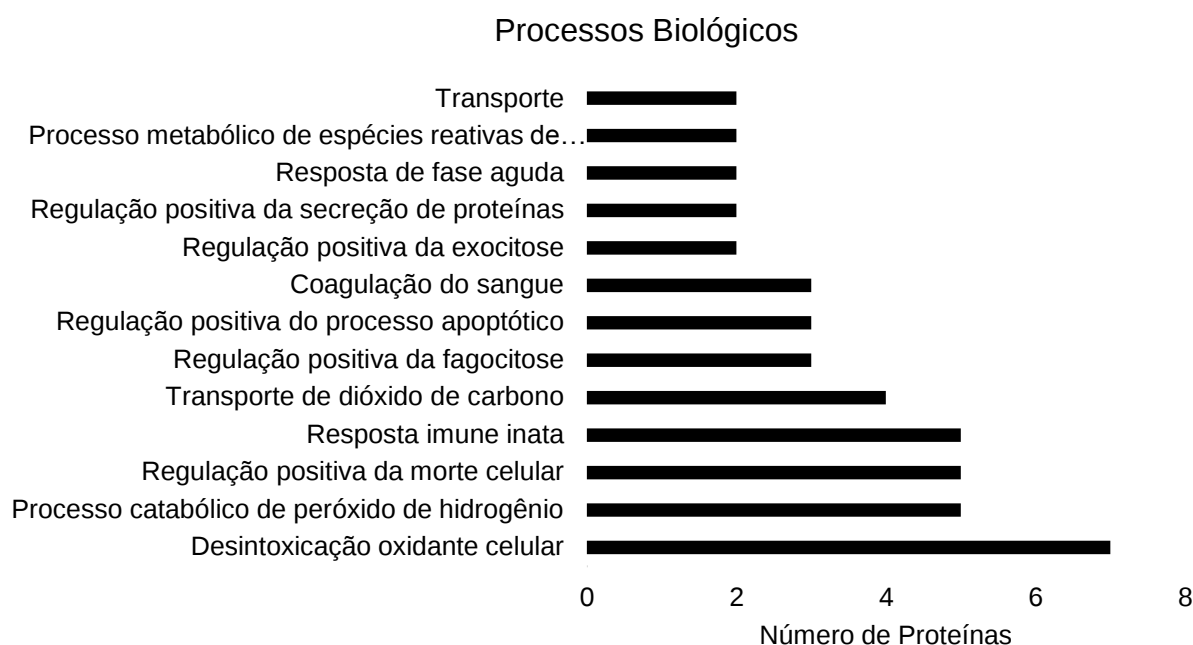
**Tabela 2. Proteína do vírus.**

| Accession | Peptide count | Unique peptides | Anova (p)       | Mass       | Description                                                                |
|-----------|---------------|-----------------|-----------------|------------|----------------------------------------------------------------------------|
| Q9QPR0    | 24            | 24              | 0,00123988<br>7 | 54697,3969 | Phosphoprotein<br>OS=Canine<br>morbillivirus<br>OX=11232 GN=P PE=3<br>SV=1 |

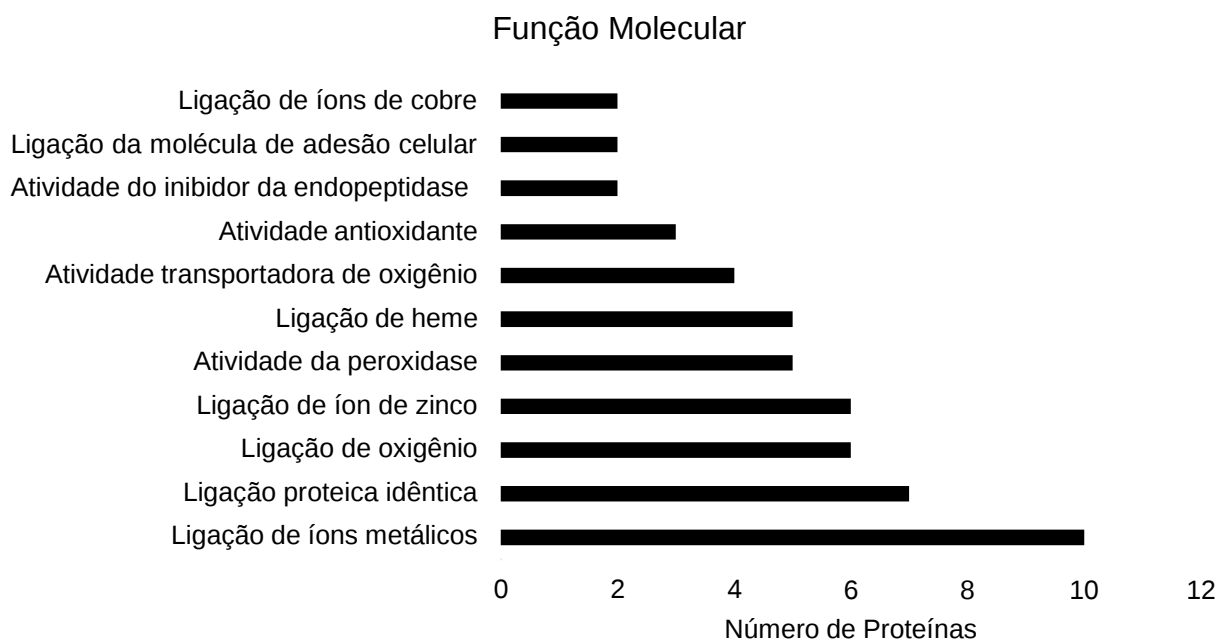
**Tabela 3. Proteínas diferencialmente expressas.**

| <b>Código de Acesso</b> | <b>Proteína</b>                  | <b>Processo Biológico</b>                                                                            | <b>Função Molecular</b>                                 | <b>Componente Celular</b> | <b>Diferencialmente Reguladas</b> |
|-------------------------|----------------------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------|---------------------------|-----------------------------------|
| A0A8I3S934              | Imunoglobulina                   | Resposta inflamatória                                                                                | Ligação antígeno                                        | Região Extracelular       | UP                                |
| A0A8I3SAS7              | Imunoglobulina                   | Resposta imune adaptativa                                                                            | Ligação antígeno                                        | Região Extracelular       | UP                                |
| A0A8I3Q4Q0              | Cordina                          | Processo de especificação de padrões                                                                 | Proteína de desenvolvimento                             | Região Extracelular       | UP                                |
| A0A8I3PIK8              | Alfa-2-HS-glicoproteína          | Regulação da resposta inflamatória                                                                   | Atividade do inibidor da endopeptidase do tipo cisteína | Aparelho de Golgi         | Down                              |
| A0A8I3RWX3              | Proteína de ligação à vitamina D | Aumento da atividade quimiotática de C5 alfa para neutrófilos na inflamação e ativação de macrófagos | Ligação de actina                                       | Região Extracelular       | Down                              |
| A0A8I3NFN0              | Proteína de ligação à vitamina D | Aumento da atividade quimiotática de C5 alfa para neutrófilos na inflamação e ativação de macrófagos | Ligação de actina                                       | Região Extracelular       | Down                              |
| A0A8I3NU27              | Imunoglobulina                   | Resposta imune adaptativa                                                                            | Ligação antígeno                                        | Região Extracelular       | UP                                |
| Q8WNN6                  | Superóxido dismutase [Cu-Zn]     | Remoção de radicais superóxido                                                                       | Ligação de íons de cobre                                | Citosol                   | UP                                |
| A0A8I3RZS1              | Imunoglobulina                   | Resposta imune adaptativa                                                                            | Ligação antígeno                                        | Região Extracelular       | UP                                |

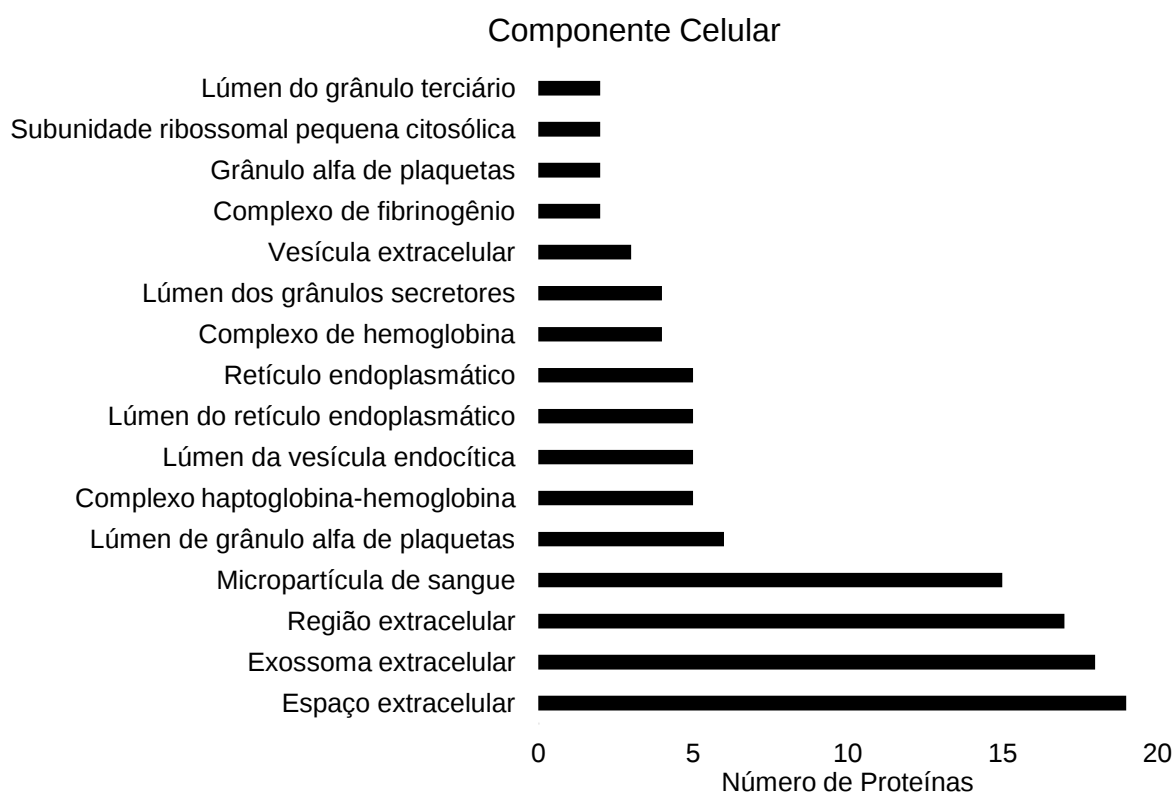
A análise ontológica gênica mostrou que as proteínas diferencialmente expressas estão relacionadas a processos biológicos, como, resposta inflamatória, transporte de oxigênio, coagulação sanguínea processo catabólico de peróxido de hidrogênio, entre outras, como observado na Figura 6. Além disso, a análise de funções moleculares evidência que essas proteínas estão ligadas a ligação da molécula a adesão celular, ligação de oxigênio, atividade do inibidor da endopeptidase, entre outros, observado na Figura 7. Também mostrou onde podem ser localizadas no componente celular: espaço extracelular, região extracelular, vesícula extracelular, retículo endoplasmático, entre outras, como observado na Figura 8.



**Figura 6: Gráfico dos processos biológicos de todas identificadas e quantificadas.**



**Figura 7: Gráfico da Função molecular de todas identificadas e quantificadas.**



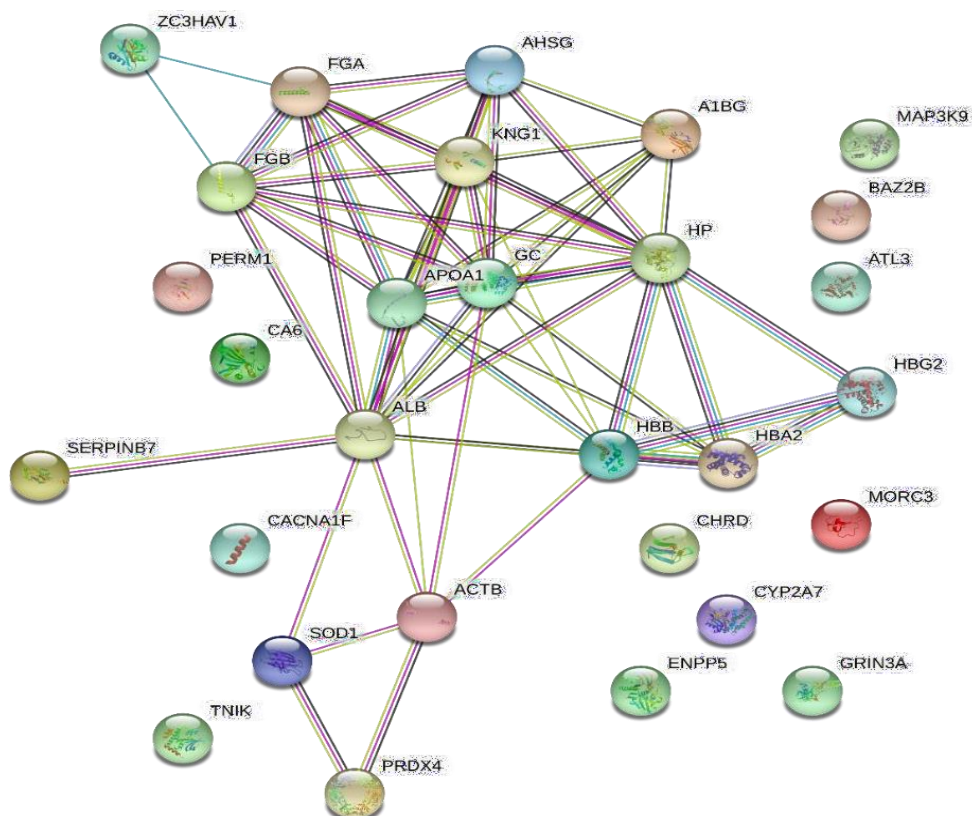
**Figura 8: Gráfico dos Componentes celulares de todas identificadas e quantificadas.**

A abordagem proteômica vem sendo cada vez mais utilizada na aplicação para investigação de doenças caninas, para fim de identificação e quantificação das alterações significativas no proteoma plasmático (KULES, 2020). A proteína de ligação à vitamina D, também conhecida como grupo específico globulina componente (GC-Globulina), proteína carreadora de vitamina D e seus metabolitos, e ligada a SIRS (Síndrome da resposta inflamatória sistêmica) (GRESSNER, 2008), teve sua expressão significativamente reduzida neste trabalho, assim como no trabalho desenvolvido por Kules (2020), onde foi feito o estudo proteômico do plasma de canis lúpus familiaris acometidos pela infecção piometra, que demonstrou uma baixa expressão em proteínas do sistema imunitário, que foram resposta à doença inflamatória. De acordo com ele, a GC-Globulina, com suas concentrações reduzidas por conta de enfermidades inflamatórias, se mostra uma proteína importante como biomarcador. De acordo com Mori e colaboradores (2011), a Alfa-2-HS-glicoproteína, também conhecida como Fetuina-A, que está ligada ao metabolismo ósseo, é uma das proteínas de fase aguda a qual está relacionada a sua expressão negativa após o organismo sofrer processos inflamatórios e de trauma que acarretam para que essa proteína seja regulada negativamente. E sugere que a mesma possui um papel como anti-inflamatório no mecanismo de desativação dos macrófagos, componentes importantes na resposta imune inata.

Em 2018, Galán e colaboradores realizaram a análise por LC-MS/MS do soro de cães infectados por *Babesia canis*, onde mostrou que a fosfoproteína mais abundante do soro é a Alfa-2-HS-glicoproteína, representando cerca de 50-70% de todas as fosfoproteínas circulantes. Os primeiros estudos do proteoma do sangue canino são recentes, sendo o trabalho de Galán et al. o primeiro a realizar uma análise do fosfoproteoma do soro de cães. Nesse estudo ainda é relacionado as similaridades funcionais das proteínas encontradas no soro canino com as de humanos, na qual a proteína Fetuina-A também demonstra ser abundante no soro humano, tendo como base as contagens espectrais.

Estudos sobre *Canis lúpus familiaris* ainda são escassos, e na base de dados do Uniprot ainda tem poucas proteínas caracterizadas, mas foi possível encontrar similaridades com as proteínas caracterizadas do *Homo sapiens*, na Tabela 2. está descrito a porcentagem de similaridade entre as proteínas, dadas pelo Uniprot.

A seguir, na figura 9 é demonstrado a rede de interação entre as proteínas encontradas no soro de cães.



**Figura 9: Rede de proteína-proteína de todas as proteínas identificadas no soro de canis lúpus familiaris.** Significado das cores das linhas: linha azul claro (de banco de dados com curadoria), linha roxa (determinado experimentalmente); linha amarela (mineração de texto); linha preta (co-expressão); e linha lilás (homologia proteica).

Dessa forma, a análise proteômica demonstrou proteínas com possível potencial para atuar como biomarcadores de CDV. Entretanto, análises mais detalhadas são necessárias para os resultados obtidos.

## 6 CONCLUSÃO

A Cinomose canina por ser uma infecção viral com uma alta variabilidade genética, acaba sendo de difícil erradicação, até para países desenvolvidos, o que leva a uma abordagem de diagnóstico mais precisa. O que leva à utilização da proteômica, que oferece uma relação entre infecção e patologia com o resultado clínico imediato dos pacientes infectados com o vírus, na perspectiva de reconhecer novas proteínas na patogênese da doença e que podem servir como biomarcadores.

Assim, neste estudo foi possível obter o perfil proteico do soro de cães acometidos por CDV, o que nos levou a identificar proteínas que foram diferencialmente expressas que sirvam como possíveis biomarcadores para a infecção, sendo elas: Alfa-2-HS-glicoproteína (Fetúina-A) e Proteína de ligação à vitamina D (GC-Globulina). Por sua vez, essas proteínas estão ligadas a processos biológicos relacionados a resposta imune inata, resposta inflamatória. Além disso, foi possível também detectar a presença de proteínas do vírus (Fosfoproteína, Q9QPR0) nas amostras do soro dos cães infectados.

O presente estudo abre perspectivas para pesquisas mais aprofundadas sobre biomarcadores da cinomose. Estudos utilizando maior número de amostras de cães infectados e sintomatologias estabelecidas para nova busca de proteínas candidatas e verificação da potencialidade das mesmas para biomarcação se fazem necessário.

## REFERÊNCIAS

- Arns, C. W. et al. Paramyxoviridae. In: Flores, E. F. (Ed.). *Virologia Veterinária: Virologia Geral e Doenças Viricas*. 2. ed. Santa Maria: Editora UFSM, 2012. cap. 27, p. 759-792.
- VAN REGENMORTEL, M.H.V.; FAUQUET, C.M.; BISHOP, D.H.L ET AL. *Virus Taxonomy: The Classification and nomenclature of viruses*. REPORT of the international Committee on Taxonomy of viruses, 7. San Diego: Academic, 2000. 1167pp.
- POSTIGO, Julia Pereira. **Desenvolvimento de testes rápidos imunocromatográficos para detecção de cinomose canina**. 2017. Dissertação (Mestrado em Química Analítica e Inorgânica) – Instituto de Química de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2017. Doi:10.11606/D.75.2017.tde-14062017-101449. Acesso em: 22/02/2022.
- BRAZ, Gissandra Farias. Padronização da técnica de imunofluorescência direta para o diagnóstico da cinomose canina. 2009. Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de Minas Gerais, Escola de Veterinária, Minas gerais, 2009. Disponível em: <http://hdl.handle.net/1843/SSLA-7UZNRM>. Acesso em: 22/02/2022.
- SHELL, L.G. Canine Distemper. *Comp. Small Anim.*, vol.12, p.173-179, 1990.
- BLANCOU, Jean. Dog distemper: imported into Europe from South America?. *Historia Medicinae Veterinae* vol. 29,2, p. 35-41, PMID: 15376360, 2004. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15376360/>. Acesso em: 22/02/2022.
- BAUMANN, G. Ortomixovírus e Paramixovírus. In: BEER, J. *Doenças Infecciosas em Animais Domésticos*. São Paulo: Roca, 2004. cap. 9, p.120-166.
- POZZA, Michel. Detecção e análise molecular do vírus da cinomose canina. 2005. Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Faculdade de Agronomia, Rio Grande do sul, 2005.
- Viralzone. Morbillivirus. Disponível em: <https://viralzone.expasy.org/86> . Acesso em: 07 de jun. 2022.
- GREENE, C.E.; APPEL, M. J. Canine Distemper In: GREENE, C. E (Eds). *Infectious Diseases of the Dog and Cat*. Philadelphia: Elsevier, 2006.
- BEST (Biomarkers, EndpointS, and other Tools) Resource. p. 58, [s.d.].
- LOOTS, A. K. et al. Advances in canine distemper virus pathogenesis research: a wildlife perspective. **Journal of General Virology**, v. 98, n. 3, p. 311–321, 1 mar. 2017.
- PARDO, I. D. R.; JOHNSON, G. C.; KLEIBOEKER, S. B. Phylogenetic Characterization of Canine Distemper Viruses Detected in Naturally Infected Dogs in North America. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 43, n. 10, p. 5009, out. 2005.
- PESERICO, A. et al. Diagnosis and characterization of canine distemper virus through sequencing by MinION nanopore technology. **Scientific Reports**, v. 9, n. 1, p. 1714, dez. 2019.

PFEFFERMANN, K. et al. Morbillivirus Pathogenesis and Virus–Host Interactions. Em: **Advances in Virus Research**. [s.l.] Elsevier, 2018. v. 100p. 75–98.

POSTIGO, J. P. **Desenvolvimento de testes rápidos imunocromatográficos para detecção de cinomose canina**. Mestrado em Química Analítica e Inorgânica—São Carlos: Universidade de São Paulo, 19 jun. 2017.

SANTOS, R. M. DOS [UNESP. Cinomose em cães naturalmente infectados: técnicas diagnósticas e análise filogenética do gene da hemaglutinina do vírus da cinomose. 9 out. 2018. Cottrell, W.O.; Kell, M.K.; Brooks, J.W.; Mead, D.G.; Phillips, J.E. First report of clinical disease associated with canine distemper virus infection in a wild black bear (*Ursus americana*). *Journal of Wildlife Diseases*, 49(4): 1024-1027, 2013.

Lempp, C.; Spitzbarth, I.; Puff, C.; Cana, A.; Kegler, K.; Techangamsuwan, S.; Baumgärtner, W.; Seehusen, F. **New aspects of the pathogenesis of canine distemper leukoencephalitis**. *Viruses*, 6(7): 2571-2601, 2014.

Budaszewski, R. F.; Pinto, L. D.; Weber, M. N.; Caldart, E. T.; Alves, C. D. B.; Martella, V.; Ikuta, N.; Lunge, V. R.; Cana, C. W. Genotyping of canine distemper vírus in strains circulating Brazil from 2008 to 2012. **Virus Research**. 180, 76-83. 2014.

Nelson, R. W.; Couto, C. G. **Medicina interna de pequenos animais**. 4.ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2010.

VON MESSLING, Veronika; ZIMMER, Gert; HERRLER, Georg; HAAS, Ludwig; CATTANEO, Roberto. The Hemagglutinin of Canine Distemper Virus Determines Tropism and Cytopathogenicity. **Journal Of Virology**, v. 75, n. 14, p. 6418-6427, 15 jul. 2001. American Society for Microbiology. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1128/jvi.75.14.6418-6427.2001>.

LAMB, R.A.; KOLAKOFSKY, D.. Paramyxoviridae: the viruses and their replication. In: KNIPE, David M.; HOWLEY, Peter M. *Fields Virology*. Philadelphia, Usa: Lippincott Williams & Wilkins, A Wolters Kluwer, 2013. Cap. 33. p. 957-995.

VON MESSLING, Veronika. Paramyxoviridae and Pneumoviridae. In: MACLACHLAN, N. James; DUBOVI, Edward J.. *Fenner's Veterinary Virology*. 5. ed. London: Academic Press, 2017. Cap. 17. p. 345-348.

TABANEZ, Paulo Cesar Rodrigues. **Cinomose: há algo de novo?**. São Paulo, 2019. p. 12. Disponível em: <https://www.vetsmart.com.br/cg/estudo/13904/boletim-tecnico-cinomose-ha-algo-de-novo#:~:text=Recomendou%2Dse%20que%20animais%20ap%C3%B3s,al%C3%A9m%20da%20exposi%C3%A7%C3%A3o%20do%20indiv%C3%AAduo>. Acesso em: 18/05/2022.

ANDERSON, N. L. The Clinical Plasma Proteome: A Survey of Clinical Assays for Proteins in Plasma and Serum. **Clinical Chemistry**, v. 56, n. 2, p. 177-185, 1 fev. 2010.

GEYER, P. E. et al. Revisiting biomarker Discovery by plasma proteomics. **Molecular Systems Biology**, v. 13, n. 9 p. 942, set. 2017.

MCGORRY, P. D.; YUNG, A. R., Early Intervention in Psychosis: Na Overdue Reform, **Australian & New Zeland Journal of Psychiatry**, v. 37, n. 4, p. 393-398, 2003.

MELLO, F. C.; AMARAL, G. A. C.; RODRIGUES, C. F. M.; PINTO, E. A. T.; Lot, R. F. E. Aspectos clinicopatológicos da cinomose em cães. In: **Revista científica eletrônica de Medicina Veterinária**, Garça - SP, Jan. 2008.

MURPHY, F. A. ET AL. *Veterinary Virology*. 3. ed. San Diego: Elsevier, 199. p. 629.

CRIVELLENTI, Leandro Z. et al (org.). Casos de rotina em medicina veterinária de pequenos animais. São Paulo: **Medvet**, 2012. (2).

PORTELA, Vanessa AB.; LIMA, Thais M.; MAIA, Rita C.C. Canine distemper: a literature review. *Medicina Veterinária (UFPE)*, v. 11, n. 3, p. 162-171. 2017.

BULE, Mohammed; KHAN, Fazlullah; NIAZ, Kamal. Antivirals: past, present and future. **Recent Advances In Animal Virology**, p. 425-446, 2019. Springer Singapore. Disponível em: [http://dx.doi.org/10.1007/978-981-13-9073-9\\_22](http://dx.doi.org/10.1007/978-981-13-9073-9_22).

Arns, C. W.; Spilki, F. R.; Almeida, R. S. Paramyxoviridae: Vírus da Cinomose. In: Flores, E. F. **Virologia Veterinária**. Santa Maria: Ufsm, p. 674-677, 2007.

Martella, V.; Elia, G.; Buonavoglia, C. Canine Distemper Virus. **Veterinary Clinics Small Animal Practice**. Italy, v. 38, p. 787-797, 2008.

BUDASZEWSKI, Renata da Fontoura. Análise filogenética do vírus da cinomose canina no Brasil. Dissertação (Mestrado) - Curso de Ciências Veterinárias, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2013.

Rendon-Marin, S.; Budaszewski, R.F.; Canal, C.W.; Ruiz-Saenz, J. Tropism and molecular pathogenesis of canine distemper virus. *Virology Journal*. 2019; Disponível em: <https://doi.org/10.1186/s12985-019-1136-6>.

DA SILVA, V.C.L et al. Molecular detection, epidemiological analysis, and risk factors associated with infection by canine distemper virus in Recife, Pernambuco. v. 12. n. 1. p. 1-9. 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.26605/medvet-v12n1-2136>

VON MESSLING, Veronika; SPRINGFELD, Christoph; DEVAUX, Patricia; CATTANEO, Roberto. A Ferret Model of Canine Distemper Virus Virulence and Immunosuppression. **Journal Of Virology**, v. 77, n. 23, p. 12579-12591, 2003. American Society for Microbiology. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1128/jvi.77.23.12579-12591.2003>.

MANGIA, S. H.; PAES, A. C. Neuropatologia da cinomose. **Veterinária e Zootecnia**, Botucatu, v. 15, n. 3, p. 416–427, 2008. DOI: 10.35172/rvz.2008.v15.392. Disponível em: <https://rvz.emnuvens.com.br/rvz/article/view/392>. Acesso em: 18/04/2022.

Fenner W.R. 2004. Doenças do cérebro, p.586-638. In: Ettinger S.J. & Feldman E.C. (Eds), Tratado de Medicina Interna Veterinária: doenças do cão e do gato. Vol.1. 4ª ed. Guanabara Koogan, Rio de Janeiro. 1038p.

Summers, B.A.; Cummings J.F.; De Lahunta, A. 1995. **Veterinary Neuropathology**. Mosby, St Louis. 527p.

APPEL, M. J. G. Canine distemper vírus. In: HORZINEK, M. **Virus Infections of carnivores**. Amsterdam: Elsevier Science, 1987. p. 133-159.

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

APPEL, M.J.G.; SUMMERS, B.A. Canine Distemper: Current Status. Recent Advances in Canine Infectious Diseases. 1999. Disponível em: <https://www.ivis.org/library/recent-advances-canine-infectious-diseases/canine-distemper-current-status>. Acesso em: 15/04/2022.

NOYCE, R.S.; DELPEUT, S.; RICHARDSON, C.D. Dog nectin-4 is an epithelial cell receptor for canine distemper virus that facilitates virus entry and syncytia formation. *Virology* 436: 210–220, 2013.

Fischer, C. D. B.; Gräf, T; Ikuta, N.; Makiejczuk, A.; Lehmann, F.; Passos, D. T.; Silveira Jr, M. A. T.; Fonseca, A. S. K.; Canal, C. W.; Lunge, V. R. Phylogenetic analysis of canine distemper virus in South America clade 1 reveals unique molecular signatures of the local epidemic. **Infection, Genetics And Evolution**, 41, p.135-141, 2016.

Tozato, C. C.; Zadra, V. F.; Basso, C. R.; Araujo Jr, J. P. Canine distemper virus detection by different methods of One-Step RT-qPCR. *Ciência Rural*, 46, p.1601-1606, 2016.

COSTA, V. G. DA. **Isolamento e caracterização molecular do vírus da cinomose canina, análise de antivirais e produção de uma proteína M recombinante**. 2021. 152 f. Tese (Doutorado em Biotecnologia e Biodiversidade) – Universidade de Brasília, Brasília, 2021.

AN, D. J.; Kim, T. Y.; Song, D. S.; Kang, B. K.; Park, B. K. An immunochromatography assay for rapid antemortem diagnosis of dogs suspected to have canine distemper. *J Virol Methods*. 2008;147:244-49. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jviromet.2007.09.006>. Acesso em: 19/06/2022.

Potgieter, L. N. D.; Ajidagba, P. A. Quantitation of canine distemper virus and antibodies by enzyme-linked immunosorbent assays using protein A and monoclonal antibody capture. *J Vet Diagn Invest*. 1989; 1:110-115. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1177/104063878900100203>. Acesso em: 19/06/2022.

ZHANG, Yuan; XU, Gang; ZHANG, Lu; ZHAO, Jiakai; JI, Pinpin; LI, Yaning; LIU, Baoyuan; ZHANG, Jingfei; ZHAO, Qin; SUN, Yani. Development of a double monoclonal antibody-based sandwich enzyme-linked immunosorbent assay for detecting canine distemper virus. **Applied Microbiology And Biotechnology**, v. 104, n. 24, p. 10725-10735, 7 nov. 2020. Springer Science and Business Media LLC. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1007/s00253-020-10997-y>. acesso em: 19/06/2022.

ATHANASIOU, L. V.; Kantere, M. C.; Kyriakis, C. S.; Pardali, D.; Adamama, M. K.; Polizopoulou, Z. S. Evaluation of a direct immunofluorescent assay and/or conjunctival cytology for detection of canine distemper virus antigen. *Viral Immunol*. 2017;31(3):272-275. <http://dx.doi.org/10.1089/vim.2017.0101>

Silva, J. C.; Gorenstein, M.V.; Li, G-Z; Vissers, J. P. C. and Geromanos. Molecular and Cellular Proteomics (2006); 5 : 144-156 Absolute Quantification of Proteins by LCMSE

Emidio, Nayara Braga, et al. “Proteômica: uma introdução aos métodos e aplicações”. HU Revista, vol. 41, no 3 e 4, 2015. periodicos.ufjf.br. Disponível em: <https://periodicos.ufjf.br/index.php/hurevista/article/view/2482>. Acesso em: 15/05/2022.

CHIOU, Shyh-Horng et al., Clinical proteomics: Current status, challenges, and future perspectives, The Kaohsiung Journal of Medical Sciences, v. 27, n. 1, p. 1–14, 2011.

GYGI, S. P. et al., Quantitative analysis of complex protein mixtures using isotope-coded affinity tags. Nature Biotechnology, v. 17, n. 10, p. 994–999, out. 1999.

NOGUEIRA, F. C. S.; DOMONT, G. B. Survey of Shotgun Proteomics. In: MARTINS- DE-SOUZA, D. (Ed.). Shotgun Proteomics. Methods in Molecular Biology. New York, NY: Springer New York, v. 1156. p. 3–23. 2014.

ODA, Y. et al., Accurate quantitation of protein expression and site-specific phosphorylation. Proceedings of the National Academy of Sciences, v. 96, n. 12, p. 6591–6596, 8 jun. 1999.

ONG, S.-E. et al., Stable Isotope Labeling by Amino Acids in Cell Culture, SILAC, as a Simple and Accurate Approach to Expression Proteomics. Molecular & Cellular Proteomics, v. 1, n. 5, p. 376–386, maio 2002.

REYNOLDS, K. J.; YAO, X.; FENSELAU, C. Proteolytic <sup>18</sup>O Labeling for Comparative Proteomics: Evaluation of Endoprotease Glu-C as the Catalytic Agent †. Journal of Proteome Research, v. 1, n. 1, p. 27–33, fev. 2002.

SODERBLOM, E. J.; THOMPSON, J. W.; MOSELEY, M. A. CHAPTER 6. Overview and Implementation of Mass Spectrometry-Based Label-Free Quantitative Proteomics. In: EYERS, C. E.; GASKELL, S. (Eds.). New Developments in Mass Spectrometry. Cambridge: Royal Society of Chemistry, 2014. p. 129–153.

THOMPSON, A. et al., Tandem Mass Tags: A Novel Quantification Strategy for Comparative Analysis of Complex Protein Mixtures by MS/MS. Analytical Chemistry, v. 75, n. 8, p. 1895–1904, abr. 2003.

ZHANG, Y. et al., Protein Analysis by Shotgun/Bottom-up Proteomics. Chemical Reviews, v. 113, n. 4, p. 2343–2394, 10 abr. 2013.

WOO, P. C. Y.; LAU, S. K. P.; LAM, C. S. F.; et al., Discovery of Seven Novel Mammalian and Avian Coronaviruses in the Genus Deltacoronavirus Supports Bat Coronaviruses as the Gene Source of Alphacoronavirus and Betacoronavirus and Avian Coronaviruses as the Gene Source of Gammacoronavirus and Deltacoronavirus. Journal of Virology, v. 86, n. 7, p. 3995–4008, 2012.

YATES, J. R.; RUSE, C. I.; NAKORCHEVSKY, A. Proteomics by Mass Spectrometry: Approaches, Advances, and Applications. Annual Review of Biomedical Engineering, v. 11, n. 1, p. 49–79, ago. 2009.

WHETTON, Anthony D.; PRESTON, George W.; ABUBEKER, Semira; et al., Proteomics and Informatics for Understanding Phases and Identifying Biomarkers in COVID-19 Disease. *Journal of Proteome Research*, v. 19, n. 11, p. 4219–4232, 2020.

GODOVAC-ZEMMERMAN J, BROWN, LR: Perspectives for mass spectrometry and functional proteomics. *Mass Spectrom Rev* 2001, 20(1):1-57.

ANJO, Sandra I.; FIGUEIREDO, Francisco; FERNANDES, Rui; et al., A proteomic and ultrastructural characterization of *Aspergillus fumigatus* conidia adaptation at different culture ages. *Journal of Proteomics*, v. 161, p. 47–56, 2017.

LI, G.-Z.; VISSERS, J. P. C.; SILVA J. C.; GOLICK, D.; GORENSTEIN, M. V.; GEROMANOS, S. J. Database searching and accounting of multiplexed precursor and product ion spectra from the data independent analysis of simple and complex peptide mixtures. **PROTEOMICS**, v. 9, n. 6, p. 1696–1719, 2009.

INTERNATIONAL COMMITTEE ON TAXONOMY OF VIRUSES (ICTV). Coronaviridae [2020]. Disponível em: < <https://talk.ictvonline.org/>>. Acesso em: 25 nov. 2021.

INSTITUTO PET BRASIL. **Censo Pet: 139,3 milhões de animais de estimação no Brasil**. São Paulo; Disponível em: <http://institutopetbrasil.com/imprensa/censo-pet-1393-milhoes-de-animais-de-estimacao-no-brasil>. Acesso em:10/05/2022.

AMERICAN Veterinary Medical Association. One Health – What is One Health?).

BRASIL, 1988. Constituição Federal.

BRASIL, 1998. Lei 9.605.

Dong XY, Li WH, Zhu JL, Liu WJ, Zhao MQ, Luo YW, Chen JD. Detection and differentiation of wild-type and vaccine strains of canine distemper virus by a duplex reverse transcription polymerase chain reaction. *IRJVR*. 2015;16(2):172-75. <http://dx.doi.org/10.22099/IJVR.2015.3197>

Anis, E., Holford, A.L., Galyon, G.D. & Wilkes, R.P. Antigenic analysis of genetic variants of canine distemper virus. *Vet. Microbiol.* **219**, 154-60. (2018) <http://dx.doi.org/10.1016/j.vetmic.2018.03.014>

Piewbang, C., Radtanakatikanon, A., Puenpa, J., Poovorawan, Y. & Techangamsuwan, S. Genetic and evolutionary analysis of a new Asia-4 lineage and naturally recombinant canine distemper virus strains from Thailand. *Sci. Rep.* **9**, 3198 (2019). <http://dx.doi.org/10.1038/s41598-019-39413-w>

Costa, V.G.d. *et al.* Molecular and serological surveys of canine distemper virus: A meta-analysis of cross-sectional studies. *PLoS ONE* **14**, 5: e0217594 (2019). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0217594>

Budaszewski, R.F., Streck, A.F., Weber, M.N., Siqueira, F.M. & Guedes, R.L.M., Canal, C.W. Influence of vaccine strains on the evolution of canine distemper virus. *Infect. Genet. Evol.* **41**, 262-269 (2016). <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2016.04.014>

Fischer, C.D.B. *et al.* Phylogenetic analysis of canine distemper virus in South America clade 1 reveals unique molecular signatures of the local epidemic. *Infect. Genet. Evol.* **41**, 135-41 (2016). <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2016.03.029>

BHATT, M. *et al.* Phylogenetic analysis of haemagglutinin gene deciphering a new genetically distinct lineage of canine distemper virus circulating among domestic dogs in India. **Transboundary And Emerging Diseases**, v. 66, n. 3, p. 1252-1267, 27 fev. 2019. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1111/tbed.13142>.

DORJI, T. S. *et al.* Seroprevalence and risk factors of canine distemper virus in the pet and stray dogs in Haa, western Bhutan. **Bmc Veterinary Research**, v. 16, n. 1, p. 1-10, 13 maio 2020. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1186/s12917-020-02355-x>.

ROMANUTTI, C. *et al.* Virus isolation and full-length genome sequencing of a representative canine distemper virus wild type strain of the South America 2 clade. **Journal Of Virological Methods**, v. 279, p. 113857, maio 2020. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jviromet.2020.113857>.

ALMEIDA, J. F. *et al.* Educação Humanitária Para o Bem-estar de Animais de Companhia. **ENCICLOPEDIA BIOESFERA**, Centro Científico Conhecer.Goiânia, v. 10, n. 18, p. 1366-1374, jul. 2014.

BIEZUS, G. *et al.* Ocorrência de parvovirose e cinomose em cães no planalto catarinense. *Revista de Ciências Agroveterinárias*. Santa Catarina, p. 396-401, 2018.

PAULA, J. M. de *et al.* Perfil populacional de cães e gatos e bem-estar animal em Chapecó, SC. *Revista Brasileira de Higiene e Sanidade animal*. v. 12, n. 4, p. 437-449, dez. 2018.

NOGUEIRA, F. C. S.; DOMONT, G. B. Survey of shotgun proteomics. Em: MARTINS-DE-SOUZA, D.(Ed). **Shotgun proteomics: methods and protocols**. Methods in Molecular Biology. New York, NY: Springer, 2014, p. 3-23.

WHETTON, A. D. *et al.* Proteomics and Informatics for Understanding Phases and Identifying Biomarkers in COVID-19 Disease. *Journal of Proteome Research*, v. 19, n. 11, p. 61-65, nov. 2020.

GALÁN, A. *et al.* LC-MS/MS analysis of the dog serum phosphoproteome reveals novel and conserved phosphorylation sites: Phosphoprotein patterns in babesiosis caused by *Babesia canis*, a case study. **PLOS ONE**, v. 13, n. 11, p. e0207245, 28 nov. 2018.

KULEŠ, J. *et al.* The plasma proteome and the acute phase protein response in canine pyometra. **Journal of Proteomics**, v. 223, p. 103817, 15 jul. 2020.

CHEN, Y.-Y. *et al.* Refining comparative proteomics by spectral counting to account for shared peptides and multiple search engines. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 404, n. 4, p. 1115–1125, 3 maio 2012.

## ANEXO A

Tabela com todas as proteínas identificadas, processos biológicos, funções moleculares, componentes celulares e porcentagem de similaridade com proteínas de *Homo Sapiens*.

| <b>Código de Acesso</b>                | <b>Proteína</b>                  | <b>Processo Biológico</b>                                                                            | <b>Função Molecular</b>                                 | <b>Componente Celular</b> | <b>Códigos <i>Homo sapiens</i></b> | <b>Diferencialmente expressas</b> | <b>% de similaridade</b> |
|----------------------------------------|----------------------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------|---------------------------|------------------------------------|-----------------------------------|--------------------------|
| A0A8I3S934                             | Imunoglobulina                   | Resposta inflamatória                                                                                | Ligação antígeno                                        | Região Extracelular       | P01876                             | UP                                | 70.2                     |
| A0A8I3S6H5                             | Imunoglobulina                   | resposta imune adaptativa                                                                            | ligação antígeno                                        | Região Extracelular       | P01876                             | UP                                | 70.2                     |
| A0A8I3PXR5<br>A0A8I3Q4Q0               | Cordina                          | processo de especificação de padrões                                                                 | Proteína de desenvolvimento                             | Região Extracelular       | Q9H2X0                             | UP                                | 92.5                     |
| A0A8I3PIK8                             | Alfa-2-HS-glicoproteína          | regulação da resposta inflamatória                                                                   | atividade do inibidor da endopeptidase do tipo cisteína | Aparelho de Golgi         | P02765                             | Down                              | 69.2                     |
| A0A8I3NFI3<br>A0A8I3NFP8<br>A0A8I3RWX3 | Proteína de ligação à vitamina D | aumento da atividade quimiotática de C5 alfa para neutrófilos na inflamação e ativação de macrófagos | ligação de actina                                       | Região Extracelular       | P02774                             | Down                              | 82.8                     |
| A0A8I3NFN0                             | Proteína de ligação à vitamina D | aumento da atividade quimiotática de C5 alfa para neutrófilos na inflamação e                        | ligação de actina                                       | Região Extracelular       | P02774                             | Down                              | 82.8                     |

| <b>Código de Acesso</b> | <b>Proteína</b>                      | <b>Processo Biológico</b>                        | <b>Função Molecular</b>                               | <b>Componente Celular</b>         | <b>Códigos <i>Homo sapiens</i></b> | <b>Diferencialmente expressas</b> | <b>% de similaridade</b> |
|-------------------------|--------------------------------------|--------------------------------------------------|-------------------------------------------------------|-----------------------------------|------------------------------------|-----------------------------------|--------------------------|
|                         |                                      | ativação de macrófagos                           |                                                       |                                   |                                    |                                   |                          |
| A0A8I3NU27              | .                                    | .                                                | .                                                     | .                                 | P01876                             | UP                                | 70.2                     |
| Q8WNN6                  | Superóxido dismutase [Cu-Zn]         | remoção de radicais superóxido                   | ligação de íons de cobre                              | Citosol                           | P00441                             | UP                                | .                        |
| A0A8I3RZS1              | Imunoglobulina                       | resposta imune adaptativa                        | ligação antígeno                                      | Região Extracelular               | P01876                             | UP                                | 70.2                     |
| A0A8I3MCD6              | Imunoglobulina                       | resposta imune adaptativa                        | ligação antígeno                                      | Região Extracelular               |                                    |                                   | 86.5                     |
| A0A8I3Q3B7              | TAO kinase 3                         | resposta celular ao estímulo de dano ao DNA      | atividade inibidora de quinase                        | citoplasma                        | P80192                             |                                   | 98.5                     |
| A0A8I3P3N6              | Anidrase carbônica                   | transporte de dióxido de carbono                 | atividade carbonato desidratase                       | citosol                           | P23280                             |                                   | 88.1                     |
| A0A8I3P587              | Imunoglobulina - IGHM                |                                                  | .                                                     | Membrana                          |                                    |                                   | 58.7                     |
| A0A8I3P7Z69             | Serpin family A member 7             | regulação negativa da atividade da endopeptidase | atividade do inibidor da endopeptidase do tipo serina | espaço extracelular               | O75635                             |                                   | .                        |
| P60524                  | Subunidade beta da hemoglobina - HBB | processo catabólico de peróxido de hidrogênio    | .                                                     | complexo haptoglobina-hemoglobina | P68871                             |                                   | 89.7                     |
| A0A8I3P8Q5              | Regulador induzido por PPARGC1 e     |                                                  | .                                                     | .                                 | Q5SV97                             |                                   | 52.1                     |

| <b>Código de Acesso</b> | <b>Proteína</b>                                                   | <b>Processo Biológico</b>   | <b>Função Molecular</b>                                 | <b>Componente Celular</b>                   | <b>Códigos <i>Homo sapiens</i></b> | <b>Diferencialmente expressas</b> | <b>% de similaridade</b> |
|-------------------------|-------------------------------------------------------------------|-----------------------------|---------------------------------------------------------|---------------------------------------------|------------------------------------|-----------------------------------|--------------------------|
|                         | ESRR, músculo 1                                                   |                             |                                                         |                                             |                                    |                                   |                          |
| A0A8I3PBR7              | Cininogênio 1                                                     | .                           | atividade do inibidor da endopeptidase do tipo cisteína |                                             | P01042                             |                                   | 74.1                     |
| A0A8I3P225              | GLOBIN domain-containing protein                                  | transporte de O2            | .                                                       | .                                           |                                    |                                   | 85                       |
| A0A8I3S3A0              | Peroxirredoxina 1                                                 | .                           | atividade de peroxidase                                 | Membrana                                    | Q13162                             |                                   | 99.4                     |
| A0A8I3P3K1              | Imunoglobulina - IGHM                                             |                             | .                                                       | Membrana                                    |                                    |                                   | 80.8                     |
| P02648                  | Apolipoproteína AI                                                | estabilização de proteínas  | ligação lipídica                                        | partícula de lipoproteína de alta densidade | P02647                             |                                   | 85                       |
| O18840                  | Actina, citoplasmática 1                                          | motilidade celular          | ligação de proteína quinase                             | citoesqueleto                               | P60709                             |                                   | 100                      |
| P19006                  | Haptoglobina                                                      | resposta inflamatória aguda | atividade de endopeptidase do tipo serina               | espaço extracelular                         | P00738                             |                                   | 80.5                     |
| A0A8I3NM85              | Membro da família Ectonucleotídeo pirofosfatase/fosfodiesterase 5 | .                           | .                                                       | Membrana                                    | Q9UJA9                             |                                   | 87.5                     |

| <b>Código de Acesso</b> | <b>Proteína</b>                     | <b>Processo Biológico</b>                  | <b>Função Molecular</b>   | <b>Componente Celular</b>       | <b>Códigos <i>Homo sapiens</i></b> | <b>Diferencialmente expressas</b> | <b>% de similaridade</b> |
|-------------------------|-------------------------------------|--------------------------------------------|---------------------------|---------------------------------|------------------------------------|-----------------------------------|--------------------------|
| A0A8I3QM75              | Serotransferrina                    | Transporte de íons                         | .                         | Região extracelular             |                                    |                                   | 71                       |
| A0A8I3MWS0              | Glicoproteína alfa-1-B              | .                                          | .                         | componente integral da membrana | P04217                             |                                   | 65.5                     |
| A0A8I3RXA2              | Cadeia alfa de fibrinogênio         | coagulação do sangue                       | .                         | Membrana                        | P02671                             |                                   | 63.8                     |
| A0A8I3N5H6              | Dedo de zinco tipo CCCH contendo 13 | .                                          | .                         | .                               | Q7Z2W4                             |                                   | 68.8                     |
| A0A8I3QCF9              | Imunoglobulina - IGHM               | .                                          | .                         | Membrana                        |                                    |                                   | 85.8                     |
| A0A8I3S271              | Proteína contendo domínio ICAM_N    | Adesão celular                             | .                         | Membrana                        |                                    |                                   | 40.9                     |
| A0A8I3NBD6              | Cadeia beta de fibrinogênio         | coagulação do sangue                       | .                         | região extracelular             | P02675                             |                                   | 84                       |
| A0A8I3NS90              | .                                   | .                                          | .                         | .                               |                                    |                                   | 73                       |
| A0A8I3Q3I6              | Proteína de dedo de zinco 41        | regulação da transcrição, modelada por DNA | ligação de íons metálicos | .                               | Q14149                             |                                   | 85.6                     |
| A0A8I3PB96              | Imunoglobulina - IGHM               | .                                          | .                         | Membrana                        |                                    |                                   | 85.8                     |
| A0A8I3PZG4              | quinase de interação TRAF2 e NCK    | .                                          | .                         | .                               | Q9UKE5                             |                                   | 99.3                     |

| <b>Código de Acesso</b> | <b>Proteína</b>                                                  | <b>Processo Biológico</b>                     | <b>Função Molecular</b>              | <b>Componente Celular</b> | <b>Códigos <i>Homo sapiens</i></b> | <b>Diferencialmente expressas</b> | <b>% de similaridade</b> |
|-------------------------|------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------|--------------------------------------|---------------------------|------------------------------------|-----------------------------------|--------------------------|
| A0A8I3NNK2              | Receptor de glutamato                                            | transporte de ions                            | canal ionico controlado por ligante  | Membrana celular          | Q8TCU5                             |                                   | 95                       |
| A0A8I3MX03              | Proteína contendo o domínio Peptidase S1                         | .                                             | Homólogo de serina protease          | .                         |                                    |                                   | 74.9                     |
| P60529                  | Subunidade alfa da hemoglobina                                   | processo catabólico de peróxido de hidrogênio | atividade transportadora de oxigênio | complexo de hemoglobina   | P69892                             |                                   | 83.7                     |
| A0A8I3Q4I0              | Bromodomínio adjacente ao domínio dedo de zinco 2B               | regulamento de transcrição                    | ligação de DNA                       | Nucleo                    | Q9UIF8                             |                                   | 96                       |
| A0A8I3PNE1              | Subunidade alfa do canal de cálcio tipo L dependente de voltagem | transporte de calcio                          | canal de calcio                      | Membrana                  | O60840                             |                                   | 93.7                     |
| A0A8I3PVG6              | [Histona H3]-trimetil-L-lisina(9) demetilase                     | organização da cromatina                      | atividade dioxigenase                | Nucleo                    | Q8VCD7                             |                                   | 88.1                     |
| A0A8I3NXZ9              | Peroxirredoxina 2                                                | .                                             | oxidoredutase                        | Membrana                  | Q13162                             |                                   | 88.2                     |
| A0A8I3MJB5              | Atlastin GTPase 1                                                | .                                             | atividade GTPase                     | Membrana                  | Q6DD88                             |                                   | 95.3                     |

| <b>Código de Acesso</b> | <b>Proteína</b>                                 | <b>Processo Biológico</b>                 | <b>Função Molecular</b>              | <b>Componente Celular</b> | <b>Códigos <i>Homo sapiens</i></b> | <b>Diferencialmente expressas</b> | <b>% de similaridade</b> |
|-------------------------|-------------------------------------------------|-------------------------------------------|--------------------------------------|---------------------------|------------------------------------|-----------------------------------|--------------------------|
| P49822                  | Albumina                                        | regulação negativa do processo apoptótico | ligação de ácidos graxos             | espaço extracelular       | P02768                             |                                   | 80.4                     |
| A0A5B8JID5              | Subunidade alfa1 da hemoglobina                 | Transporte de O2                          | atividade transportadora de oxigênio | complexo de hemoglobina   | P69905                             |                                   | 83.8                     |
| A0A8I3MJ33              | Proteína contendo domínio GLOBIN                | Transporte de O2                          | atividade transportadora de oxigênio | complexo de hemoglobina   |                                    |                                   | 83.1                     |
| A0A8I3MY51              | Albumina                                        | regulação negativa do processo apoptótico | ligação de ácidos graxos             | Espaço extracelular       | P69905                             |                                   | 81.9                     |
| A0A8I3MY68              | Albumina                                        | regulação negativa do processo apoptótico | ligação de ácidos graxos             | Espaço extracelular       | P69905                             |                                   | 78.2                     |
| A0A8I3P0W1              | .                                               | .                                         | .                                    | .                         |                                    |                                   | 66                       |
| A0A8I3P9B9              | Proteína contendo domínio GLOBIN                | Transporte de O2                          | atividade transportadora de oxigênio | complexo de hemoglobina   |                                    |                                   | 86.4                     |
| A0A8I3P260              | .                                               | .                                         | .                                    | .                         |                                    |                                   | 70.7                     |
| A0A8I3P615              | Citocromo P450 família 26 subfamília B membro 1 | .                                         | ligação de íons de ferro             | Citoplasma                | P20853                             |                                   | 96.8                     |

| <b>Código de Acesso</b> | <b>Proteína</b>                                                         | <b>Processo Biológico</b>              | <b>Função Molecular</b>              | <b>Componente Celular</b> | <b>Códigos <i>Homo sapiens</i></b> | <b>Diferencialmente expressas</b> | <b>% de similaridade</b> |
|-------------------------|-------------------------------------------------------------------------|----------------------------------------|--------------------------------------|---------------------------|------------------------------------|-----------------------------------|--------------------------|
| A0A8I3PC15              | Proteína contendo domínio GLOBIN                                        | Transporte de O2                       | atividade transportadora de oxigênio | complexo de hemoglobina   |                                    |                                   | 84.4                     |
| A0A8I3PH35              | Proteína contendo domínio GLOBIN                                        | Transporte de O2                       | atividade transportadora de oxigênio | complexo de hemoglobina   |                                    |                                   | 87.8                     |
| A0A8I3PPR1              | Proteína fosfatase, dependente de Mg <sup>2+</sup> /Mn <sup>2+</sup> 1F | regulação positiva da expressão gênica | ligação de íons metálicos            | Citosol                   | Q19775                             |                                   | 82.2                     |
| A0A8I3RPI6              | Proteína contendo domínio GLOBIN                                        | Transporte de O2                       | atividade transportadora de oxigenio | complexo de hemoglobina   |                                    |                                   | 83.1                     |

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP) de acordo com ISBD  
Sistema de Bibliotecas da Universidade Federal do Pará  
Gerada automaticamente pelo módulo Ficat, mediante os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

---

C972p Cunha, Giovane Pinheiro.  
PROTEOMA DIFERENCIAL DO SORO DE CANIS LUPUS  
FAMILIARIS ACOMETIDOS POR CINOMOSE CANINA /  
Giovane Pinheiro Cunha. — 2022.  
57 f. : il. color.

Orientador(a): Prof<sup>ª</sup>. Dra. Juliana Silva Cassoli  
Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação) - Universidade  
Federal do Pará, Instituto de Ciências Biológicas, Faculdade de  
Biotecnologia, Belém, 2022.

1. Cinomose. 2. Canine distemper vírus. 3. LC-MS/MS. 4.  
Proteômica. I. Título.

CDD 660.6

---