

Christian Hirsch

**VÍRUS DA LEUCOSE ENZOÓTICA BOVINA: FILOGENIA E REGULAÇÃO
GÊNICA DE LTR E *POL* EM AMOSTRAS BRASILEIRAS**

Tese apresentada à Universidade Federal de Minas Gerais, Escola de Veterinária, como requisito parcial para obtenção de título de Doutor em Ciência Animal.

Área: Medicina Veterinária Preventiva

Orientador: prof. Dr. Rômulo Cerqueira Leite

Belo Horizonte
UFMG – Escola de Veterinária
2005

H669v Hirsch, Christian, 1968-

Vírus da leucose enzoótica bovina: filogenia e regulação gênica de LTR
e *pol* em amostras brasileiras / Christian Hirsch. – 2005.
106 p. : il.

Orientador: Rômulo Cerqueira Leite

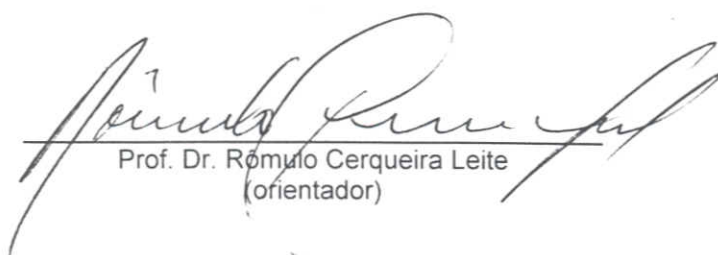
Tese (doutorado) – Universidade Federal de Minas Gerais, Escola de
Veterinária

Inclui bibliografia

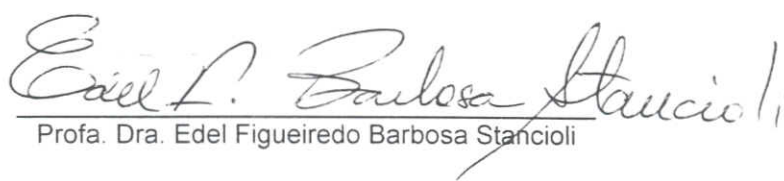
1. Bovino – Doenças – Teses. 2. Vírus da leucose bovina – Teses. 3.
Filogenia – Teses. 4. Leucose bovina – Teses. I. Leite, Rômulo Cerqueira.
II. Universidade Federal de Minas Gerais. Escola de Veterinária. III. Título.

CDD – 636.089 692

Tese defendida e aprovada em 12 de agosto de 2005, pela Comissão Examinadora constituída por:



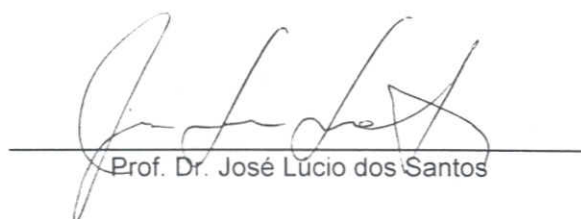
Prof. Dr. Rômulo Cerqueira Leite
(orientador)



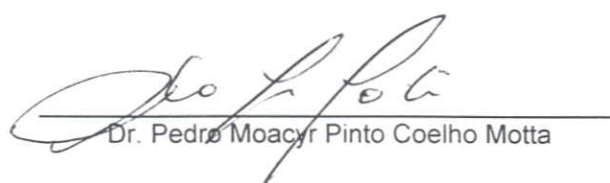
Profa. Dra. Edel Figueiredo Barbosa Stancioli



Prof. Dr. Jenner Karlisson Pimenta dos Reis



Prof. Dr. José Lucio dos Santos



Dr. Pedro Moacyr Pinto Coelho Motta



Dr. Marcelo Fernandes Camargos

"WHICH CAME FIRST: THE CHICKEN OR THE CANCER VIRUS?"

A virus, discovered 90 years ago in a chicken tumor, was the directional arrow that pointed to looking for cancer's cause in our own genes.

Modern cancer research can be traced to modest beginnings—a chicken coop filled with tumor-ridden birds. In 1909, an upstate farmer brought one of his fowl to Francis Peyton Rous, a scientist at the Rockefeller Institute for Medical Research in New York City. Rous made an amazing discovery: the chicken's tumors were caused by an infection with a virus. What's more, he could infect a healthy chicken with "cancer" simply by injecting it with a solution taken from a sick hen's tumor. Cancer, Rous reasoned, was not only caused by a virus, it was potentially contagious..."

by Eva Emerson Disponível em:
<http://www.usc.edu/hsc/info/pr/ccr/98winter/first.html>.
Acessado em: (13/09/2005)

Este trecho de reportagem abre a presente obra por se referir, de forma bem humorada, ao fascinante ramo multidisciplinar das Ciências Biológicas que estuda os vírus oncogênicos e suas relações com o hospedeiro. O trabalho oferece uma contribuição nesse maravilhoso campo da Ciência, tomando como foco aspectos genéticos do retrovírus Bovine Leukemia Virus. Sinto-me feliz e agradecido, por todo o aprendizado que estes meses de estudo me propiciaram, aqui parcialmente descritos, e pela possibilidade de me inserir, mesmo que modestamente, nesse contexto. Fica também registrada a minha admiração em relação a seres humanos como Rous, que fazem do nosso mundo um lugar melhor, usando a Ciência como ferramenta.

Christian Hirsch

Belo Horizonte, inverno de 2005.

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho a memória do meu avô, Leopoldo Hirsch.

AGRADECIMENTOS

A Deus, por sua infinita sabedoria e paciência, o que nos permite recomeçar sempre.

Aos meus pais Luiz e Helga e aos meus avós, pela minha infância e adolescência cheia de bons momentos e boas oportunidades, que contruíram a base para se chegar até aqui.

À minha esposa Rosângela e aos meus filhos Ana Mayra, Rodolfo e Isadora, pela companhia, confiança, paciência e, principalmente, amor.

Aos meus tios Walfrido e Ileana, Egon e Célia e aos "meio-irmãos" compadres Fernando e Andréia, pelo imenso apoio durante minha estadia em Belo Horizonte.

Ao meu orientador, professor Rômulo Cerqueira Leite, pelo exemplo e comprometimento com o sucesso deste trabalho.

A professora Edel Figueiredo Barbosa Stancioli, pelo apoio técnico, moral e material incondicionais, durante a execução dos experimentos e redação desta tese, além do exemplo no trabalho.

Ao professor Jenner Karlsson Pimenta dos Reis e ao colega Médico Veterinário Dr. Marcelo Fernandes Camargos, pela possibilidade de acesso ao banco de DNAs do Retrolab e pelo apoio técnico na execução dos experimentos

À professora Fátima Soares Motta Noronha, pelo convívio e acesso ao LABMIC.

Aos professores Andrey Pereira Lage, Daniel Stancek, Erna Geessien Kroon, Iran Borges, José Sérgio de Resende, Lincoln Pimentel Ribeiro, Maurílio Andrade Rocha, Nelson Rodrigo da Silva Martins e Zélia Inês Portella Lobato, pelos ensinamentos e convívio.

Aos colegas do LABMIC Brenda, Cláudia, Daniela, Eduardo, Giovanna, Guilherme, Haleta, Jacqueline, Luciana, Milena, Myrian, Pollyanna, "Rafael 1 e Rafael 2" e Weverton, e aos colegas do Retrolab Daniel, Daniela, Elizângela, Fernanda, Gissandra, Hessen, Jerônimo, Pedro e Valéria, pelo convívio, aprendizado, companherismo e amizade.

Aos colegas técnico-administrativos da EV/UFGM e da FEP/MVZ André, Cássia, Cleusa, Creuza, Doracy, Duílio, Eduardo, Eliana, Heloisa, João, Jorge, Júnia, Mirli, Nelson, Nilda, Renata e Sávio, pelo apoio nos trabalhos e pelo convívio.

À bibliotecária Rosilene Figueiredo de Almeida, pela revisão das referências bibliográficas.

Aos amigos Cássio, Nádia, Simone e Suely, pelo convívio, risadas e desabafos da hora do almoço e, além disso, a Nádia por me aturar na sala de informática e formatar este trabalho!

Aos colegas professores do Setor de Medicina Veterinária Preventiva do DMV/UFLA, Adriana Mello Garcia Rabelo, Antônio Marcos Guimarães, Christiane Maria Barcelos Magalhães da Rocha, Geraldo Márcio da Costa, Henrique César Pereira Figueiredo e Idael Christiano Almeida Santa Rosa, pelo apoio e viabilização do meu treinamento.

À UFGM, magnífica Universidade que me acolheu, à UFLA, pelo emprego e liberação parcial para minhas atividades de doutorado e à CAPES, pela bolsa parcial PICDT.

SUMÁRIO

	Pág.
RESUMO	13
ABSTRACT	14
1. INTRODUÇÃO	15
2. BIBLIOGRAFIA CONSULTADA.....	15
2.1 Aspectos econômicos	15
2.2 Frequência de Infecção Pelo BLV no Brasil	16
2.3 Classificação e Características Estruturais do BLV	16
2.4 Organização, Função e Importância da Região 5'LTR do BLV	18
2.5 Regulação da Transcrição do BLV: Inter-relação de Tax, LTR e Elementos Celulares	23
2.6 Organização e Importância do Gene <i>pol</i> e da Proteína TR do BLV	26
2.7 Filogenia e Variabilidade Genética do BLV	27
2.8 Aspectos Relativos ao Diagnóstico Sorológico da LEB: Uso e Limitações.....	29
2.9 O Uso da PCR no Diagnóstico e Pesquisa do BLV	30
3. MATERIAL E MÉTODOS	32
3.1 Amostras de DNA Bovino.....	32
3.2 Obtenção do DNA.....	33
3.3 Reações de PCR.....	34
3.3.1 PCR de β -Actina Bovina	34
3.3.2 Reações de PCR para 5'LTR e <i>pol</i> do BLV	35
3.4 Análise do Polimorfismo de Comprimento de Fragmentos Restringidos (<i>Restriction Fragment Length Polymorphism</i> - RFLP) dos Produtos de PCR 5'LTR e <i>pol</i> do BLV	35
3.5 Sequenciamento Direto dos Produtos de PCR	36
3.6 Análise dos Resultados de Sequenciamento.....	37
3.7 Inferência Filogenética	37
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	38
4.1 PCR de Normalização Utilizando Gene β -Actina Bovina	38
4.2 Experimento de Comparação de Desempenho Entre a PCR de Normalização Utilizando Gene β -Actina Bovina e a PCR Para Região 5'LTR do BLV	40
4.3 PCR Para Região 5'LTR do BLV	42
4.4 PCR para Região <i>pol</i> do BLV	44
4.5 Análise do Polimorfismo de Comprimento de Fragmentos Restringidos (<i>Restriction Fragment Length Polymorphism</i> - RFLP) dos Produtos de PCR <i>pol</i> do BLV <i>In Vitro</i>	47
4.6 Estudos da Variabilidade Genética do Vírus BLV e Inferências Filogenéticas, A Partir da Região 5'LTR	49
4.7. Análise do Polimorfismo de Comprimento de Fragmentos Restringidos (<i>Restriction Fragment Length Polymorphism</i> -RFLP) das seqüências 5'LTR <i>In Silico</i>	62
4.8 Estudos da Variabilidade Genética do Vírus BLV e Inferências Filogenéticas, A Partir da Região <i>pol</i> /IN	63

5.	CONCLUSÕES	77
6.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	78
	ANEXO 1	87
	ANEXO 2	88
	ANEXO 3	101
	ANEXO 4	105
	ANEXO 5	106

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.	Organização estrutural do BLV, destacando-se as duas moléculas de RNA, as nucleoproteínas e as proteínas estruturais. Adaptado de Voyles (1993).....	17
Figura 2.	Apresentação gráfica da região 5'LTR do BLV: sub-regiões U5, R e U3 encontradas no DNA proviral (baseado em Sagata et al., 1985b, n° acesso GenBank K02120)	19
Figura 3.	Organização funcional da região 5'LTR do BLV, apresentando os elementos promotores e reguladores já identificados e sua localização dentro das sub-regiões U3, R e U5	23
Figura 4.	Esquema da expressão gênica do BLV	24
Figura 5.	Processo de transcrição do HTLV-1	25
Figura 6.	Perfil de migração em gel de agarose dos resultados de amplificação do gene da β -actina bovina, 295pb, a partir de amostras de DNA componentes do banco de DNAs do Retrolab/EV/UFGM	39
Figura 7.	Perfil de migração em gel de agarose das bandas da PCR para 5'LTR/BLV, amplificadas partir de DNAs com resultados de amplificação considerados insatisfatórios ou satisfatórios frente a PCR de β -actina bovina. Imagem negativa para facilitar a identificação visual de bandas	41
Figura 8.	Perfil de migração em gel de agarose das bandas com 582pb, amplificadas por meio da PCR 5'LTR/BLV, executada em 13 amostras de DNA bovino oriundas do banco de DNA do Retrolab/EV/UFGM. Imagem negativa para facilitar a identificação visual de bandas	43
Figura 9.	Perfil de migração em gel de agarose das bandas com 783pb, amplificadas por meio da PCR <i>pol</i> /BLV, executada em 13 amostras de DNA bovino oriundas do banco de DNA do Retrolab/EV/UFGM. Imagem negativa para facilitar a identificação visual de bandas	46
Figura 10.	Perfil de migração em gel de agarose de produto de restrição enzimática de DNA: RFLP de confirmação de produto purificado da PCR <i>pol</i> /BLV, em amostras do banco de DNA do Retrolab. Imagem negativa para facilitar a identificação visual de bandas	48
Figura 11.	Ilustração da região de corte da enzima Xho-I no genoma de cinco amostras seqüenciadas no presente projeto, dentro da região IN do gene <i>pol</i> . Ilustração obtida a partir da imagem gerada no programa MultAlin.....	49

Figura 12.	Alinhamento de 423 nucleotídeos de parte da região 5'LTR do BLV das 22 seqüências obtidas de amostras brasileiras e da seqüência de referência K02120. Apenas os nucleotídeos diferentes da seqüência consenso estão apresentados. Os números dispostos verticalmente indicam aposição de cada nucleotídeo na seqüência. Os números dispostos horizontalmente nas extremidades superiores indicam a posição em relação ao genoma K02120	56
Figura 13.	Relações filogenéticas de seqüências de parte da região 5'LTR do vírus BLV, obtidas de DNAs extraídos de bovinos naturalmente infectados em quatro regiões brasileiras distintas: Pedro Leopoldo-MG, Coronel Pacheco-MG, Londrina-PR e Corumbá-MS. Os valores dos "nós" representam a confiabilidade, em porcentagem, dos ramos à direita, resultados de bootstrap em 1000 replicatas	58
Figura 14.	Relações filogenéticas de seqüências de parte da região 5'LTR do vírus BLV, obtidas de DNAs extraídos de bovinos naturalmente infectados em quatro regiões brasileiras distintas: Pedro Leopoldo-MG, Coronel Pacheco-MG, Londrina-PR e Corumbá-MS, e sete seqüências obtidas no GenBank. Os valores dos "nós" representam a confiabilidade, em porcentagem, dos ramos à direita, resultados de bootstrap em 1000 replicatas	60
Figura 15:	Proposta de diferenciação genética de amostras do BLV, por meio do perfil de restrição enzimática da região 5'LTR, e estabelecimento de correlação geográfica. Os sinais (+) indicam presença do sítio, enquanto que (-) indicam a ausência. Baseado no mapa de restrição obtido no programa WebCutter (BCM Search launcher).	62
Figura 16.	Alinhamento de 694 nucleotídeos de parte da região <i>pol</i> do BLV das cinco seqüências obtidas de amostras brasileiras e da seqüência de referência K02120. Apenas os nucleotídeos diferentes da seqüência consenso estão apresentados. Os números dispostos verticalmente indicam aposição de cada nucleotídeo na seqüência. Os números dispostos horizontalmente nas extremidades superiores indicam a posição em relação ao genoma K02120	68
Figura 17.	Alinhamento de 230 nucleotídeos de parte da região <i>pol</i> do BLV das 10 seqüências obtidas de amostras brasileiras e da seqüência de referência K02120. Apenas os nucleotídeos diferentes da seqüência consenso estão apresentados. Os números dispostos verticalmente indicam aposição de cada nucleotídeo na seqüência. Os números dispostos horizontalmente nas extremidades superiores indicam a posição em relação ao genoma K02120	70
Figura 18.	Relações filogenéticas de seqüências com 694pb de parte da região <i>pol</i> do vírus BLV, obtidas entre de DNAs extraídos de bovinos naturalmente infectados em três regiões brasileiras distintas: Pedro Leopoldo-MG, Coronel Pacheco-MG e Londrina-PR. Os valores dos "nós" representam a confiabilidade, em porcentagem, dos ramos à direita, resultados de bootstrap em 1000 replicatas	71
Figura 19.	Relações filogenéticas de seqüências com 694pb de parte da região <i>pol</i> do vírus BLV, obtidas entre DNAs extraídos de bovinos naturalmente infectados em três regiões brasileiras distintas: Pedro Leopoldo-MG, Coronel Pacheco-MG e Londrina-PR, e seqüências obtidas no GenBank. Os valores dos "nós" representam a confiabilidade, em porcentagem, dos ramos à direita, resultados de bootstrap em 1000 replicatas	71

Figura 20.	Relações filogenéticas de seqüências com 230pb, de parte da região <i>pol</i> do vírus BLV, obtidas entre DNAs extraídos de bovinos naturalmente infectados em três regiões brasileiras distintas: Pedro Leopoldo-MG, Coronel Pacheco-MG e Londrina-PR. Os valores dos “nós” representam a confiabilidade, em porcentagem, dos ramos à direita, resultados de bootstrap em 1000 replicatas.....	72
Figura 21.	Relações filogenéticas de seqüências com 230pb, de parte da região <i>pol</i> do vírus BLV, obtidas entre DNAs extraídos de bovinos naturalmente infectados em três regiões brasileiras distintas: Pedro Leopoldo-MG, Coronel Pacheco-MG e Londrina-PR, e sete seqüências disponíveis no GenBank. Utilizou-se a seqüência do HTLV-1 NC001436 (acesso GenBank) como grupo externo. Os valores dos “nós” representam a confiabilidade, em porcentagem, dos ramos à direita, resultados de bootstrap em 1000 replicatas.....	73
Figura 22.	Alinhamento de 231 aminoácidos de parte da região <i>pol</i> do BLV das cinco seqüências obtidas de amostras brasileiras, mais cinco seqüências disponíveis no GenBank. Alinhamento com programa ClustalW. Apenas os nucleotídeos diferentes da seqüência consenso estão apresentados. Os números dispostos verticalmente indicam a posição de cada nucleotídeo na seqüência.....	75
Figura 23.	Alinhamento de 76 aminoácidos de parte da região <i>pol</i> do BLV das 10 seqüências obtidas de amostras brasileiras, mais sete seqüências disponíveis no GenBank. Alinhamento com programa ClustalW. Apenas os nucleotídeos diferentes da seqüência consenso estão apresentados. Os números dispostos verticalmente indicam a posição de cada nucleotídeo na seqüência.....	76

LISTA DE QUADROS

Quadro 1.	Identificação, número de acesso e região genômica das seqüências utilizadas na obtenção dos consensos e geração das análises filogenéticas na região 5'LTR/BLV, oriundas do GenBank.....	38
Quadro 2.	Identificação, número de acesso e região genômica das seqüências utilizadas na obtenção dos consensos e geração das análises filogenéticas na região <i>pol</i> /BLV, oriundas do GenBank.....	38
Quadro 3.	Classificação da qualidade do DNA de amostras do banco de DNA do Retrolab, utilizando PCR normalizadora direcionada para amplificação de parte do gene da β -Actina Bovina, e sua distribuição em função do local de procedência.....	39
Quadro 4.	Freqüência de resultados positivos e negativos da PCR para região 5'LTR do BLV, segundo o local de origem do DNA.....	42
Quadro 5.	Freqüência de resultados positivos e negativos da PCR para região <i>pol</i> /BLV, segundo o local de origem do DNA.....	45

RESUMO

Este trabalho apresenta os resultados da investigação de duas regiões do genoma do vírus BLV - *Bovine Leukemia Virus*, em amostras brasileiras. As amostras de DNA bovino, de animais infectados pelo BLV, pertencem ao banco de DNA do Retrolab/EV/UFMG, oriundas de quatro localidades diferentes no Brasil. Três PCRs foram desenvolvidas: uma foi projetada para amplificar o gene constitutivo da β -actina bovina e desenvolvida para acessar a qualidade dos DNAs. A segunda PCR foi utilizada na amplificação de um fragmento de 582pb dentro da região promotora da transcrição do BLV, 5'LTR. A terceira PCR procurou amplificar um fragmento de 783pb da porção terminal do gene *pol* do BLV, correspondente a região codificadora da Integrase. Os resultados das amplificações, sua importância, seqüenciamento e análises filogenéticas são apresentados e discutidos. Ambas PCRs de amplificação de fragmentos do genoma do BLV atenderam ao objetivo básico de gerar produtos para o seqüenciamento. Foram obtidos vinte e dois seqüenciamentos da região 5'LTR e dez seqüenciamentos da região *pol*. A análise filogenética destes genomas apontou para um elevado grau de conservação na região 5'LTR, e permitiu a caracterização de cinco agrupamentos, embora não tenha sido possível associar estes agrupamentos com as regiões brasileiras de origem dos DNAs. Em relação ao país de origem dos vírus seqüenciados, esta árvore sugere a formação de um agrupamento Brasil - Argentina, um agrupamento norte-americano (FLK), um agrupamento Japão - Bélgica - Brasil, um agrupamento Brasil e um agrupamento Brasil - Austrália. Foi executada uma análise de restrição enzimática *in silico* destes fragmentos, cujo resultado corrobora em parte os achados na árvore filogenética e sugere a formação de um macro-agrupamento sul-americano, aglutinado uma amostra Argentina e todas as amostras brasileiras, porém nenhuma amostra de outra parte do mundo. Além disto, a comparação das 22 amostras brasileiras indicou a presença de uma região mais variável em um segmento de 88pb, coincidente com as DAS, seqüências ativadoras a jusante, descritas por Kiss-Toth e Unk em 1994. A interação deste achado com a atividade de transcrição viral e a patogenia é discutida. Para a região *pol*, uma árvore filogenética foi gerada com valores de bootstrap consistentes, entretanto o pequeno número de DNAs seqüenciados, assim como dos disponíveis no banco de dados genômicos mundial GenBank, para esta região, não permitiu a inferência de agrupamentos consistentes. Destacou-se nos seqüenciamentos de *pol* a existência de uma região mais variável na extremidade terminal, que levou a importantes alterações dos aminoácidos em algumas amostras.

Palavras-chave: BLV; LTR; *pol*; análise filogenética; transcrição viral

ABSTRACT

This work presents the results of the inquiry of two regions of the genome of BLV virus - Bovine Leukemia Virus, in Brazilian samples. The samples of bovine DNA, of BLV- infected animals, belong to the bank of DNA of the Retrolab/EV/UFGM, deriving of four different localities in Brazil. Three PCRs had been developed: one was projected to amplify the constituent gene of the bovine β -actina and developed to have access the quality of the DNAs. The second PCR was used in the amplification of an 582bp fragment inside the promoter region of the BLV, 5'LTR, and the third PCR looked for to amplify an 783bp fragment within the terminal portion of the *pol* gene, correspondent to the Integrase codifying region. The results of the amplifications, its importance, sequences and phylogenetic analyses are presented and argued. Both PCRs designed to amplify fragments from the BLV genome had reached the basic objective to generate the proposed products. Twenty two sequences from the 5'LTR and ten sequences from *pol* region had been gotten. The phylogenetic analysis of the 5'LTR pointed with respect to one high degree of conservation, and the construction of an phylogenetic tree allowed the characterization of five groupings. However, has not been possible to associate these groupings with the Brazilian regions of origin of the DNAs. In relation to the country of origin of the sequenced viruses, this tree suggests the formation of a grouping Brazil - Argentina, a North American grouping with only one sample, FLK derived, a Japan - Belgium - Brazil grouping, a Brazil-only grouping and a Brazil - Australia grouping. An restriction fragment length polymorphism - RFLP *in silico* analyse of these fragments was executed, whose result corroborates in part the tree findings and suggests the formation of a South American macro-grouping, agglutinating the Argentina sample and all Brazilian samples, but no one sample of other part of the world. Moreover, the comparison of the 22 Brazilian samples indicated the presence of a more changeable region in a segment of 88bp, coincident with the DAS, downstream activator sequences, described by Kiss-Toth and Unk in 1994. The interaction of this finding with the viral transcription activity and the patogeny is argued. For the *pol* region, an phylogenetic tree was generated, showing consistent values of bootstrap. However, the small number of DNAs sequenced, as well as the available in the world-wide GenBank data base for this region, did not allow the inference of consistent groupings. Was distinguished the existence of a more variable region in the terminal extremity from this sequences, that presented important amino acid changes in some samples.

Key-words: BLV; LTR; *pol*; phylogenetic analyses; viral transcription

1 INTRODUÇÃO

A Leucose Enzoótica Bovina (LEB) é uma enfermidade infecciosa viral, caracterizada por um período de incubação prolongado, alterações hematológicas e neoplasias linfóides. A forma neoplásica da LEB acomete 1% a 5% dos bovinos infectados e é caracterizada por infiltração linfoproliferativa em vários sistemas orgânicos desses animais. O sistema linfático é mais atingido, seguido pelo cardiovascular, digestivo e reprodutivo. Essas infiltrações são denominadas de linfossarcomas, apresentando caráter maligno e fatal. Os restantes 95% a 99% dos bovinos permanecem sem sinais clínicos, porém apresentam resposta imunológica humoral contra as proteínas virais, assim como uma infecção persistente pelo agente. Destes animais assintomáticos, 30% apresentam um quadro de aumento persistente da contagem dos linfócitos circulantes no sangue, conhecido como linfocitose persistente, ocorrendo uma desproporção entre células T e B duas e meia vezes maior para esta segunda célula. Embora assintomáticos, não está claro se estes animais sofrem, ou não, prejuízos em relação a sua produtividade, havendo dados controversos.

Trabalhos de investigação epidemiológica sobre os níveis de infecção pelo *Bovine Leukemia Virus* – BLV, o vírus causador da LEB, em rebanhos brasileiros, apontam para uma grande disseminação deste agente. A elevada frequência de infecções favorece o surgimento de amostras mutantes dentro da população viral, o que pode acarretar a emergência de variantes com novas características de patogenicidade, destas destacando-se a variabilidade antigênica, a oncogenicidade e a transmissão interespecie de hospedeiros. Dentro deste contexto, cresce a importância da investigação do genoma do vírus BLV, circulante no Brasil. No presente trabalho foi feita a investigação de parte da região genômica promotora de transcrição do vírus BLV, denominada 5'LTR ("Long Terminal Repeat" – terminação longa repetida), e de

parte do gene *pol*, responsável pela codificação da informação genética da enzima Integrase, essencial para a introdução do DNA proviral no genoma celular.

As informações biológicas aqui descritas são as primeiras sobre estas regiões do genoma do BLV, oriundas de amostras virais circulantes no Brasil, e visam oferecer mais subsídios sobre o eixo Tax – LTR – Transcriptase reversa, que é o ponto central de enfoque nos estudos de desenvolvimento de uma vacina contra os deltaretrovírus. A presente tese teve como objetivo a caracterização molecular parcial das amostras do BLV, oriundas de regiões fisiográficas brasileiras diferentes. Para tanto, padronizou-se uma reação de PCR para a região LTR do BLV e outra para a região da Integrase, dentro do gene *pol*. O objetivo seguinte foi seqüenciar e estabelecer o consenso para cada amostra, seguindo do depósito da informação no GenBank, o que foi acompanhado da determinação da variabilidade nessas regiões gênicas do estabelecimento de inferências filogenéticas. Procurou-se verificar diferenças entre amostras, entre regiões geográficas amostradas e em relação às seqüências previamente depositadas no GenBank. Em relação à região promotora 5'LTR, pretendeu-se, ainda, verificar se as eventuais mutações observadas estão ocorrendo em sítios importantes para a expressão do BLV, previamente caracterizados na literatura.

2. BIBLIOGRAFIA CONSULTADA

2.1 Aspectos Econômicos

A LEB, durante a evolução da forma clínica neoplásica, é responsável por significativa redução na produtividade bovina e invariavelmente resulta na morte do animal acometido. A morte, por si só, constitui-se em significativo prejuízo, porém a redução na produtividade também é um fator negativo que está presente nessa doença e é resultante de vários fatores que atuam de forma independente ou associada. A

diminuição na produção leiteira e o emagrecimento, ocorrência comum no animal com linfossarcomas, levam a depreciação econômica do mesmo. Por outro lado, a observação das lesões nas carcaças e vísceras obriga o veterinário responsável pela inspeção do abate a condenar parcialmente ou totalmente a carne oriunda deste tipo de animal (Leite et al., 1984; Murphy et al., 1999).

Durante o curso clínico ocorre marcada deficiência imunológica que predispõe o bovino a várias doenças, elevando o custo de permanência do animal na fazenda devido aos gastos com medicamentos, mão de obra e alimentação, que não retornam mais, dada a característica fatal do curso da doença. Da mesma forma, o caráter difuso das infiltrações neoplásicas leva ao surgimento de sinais pouco específicos que induzem a tentativas de tratamento infrutíferas e dispendiosas. Do ponto de vista reprodutivo, a doença é responsável por quadro de infertilidade permanente, o que acarreta a redução da vida útil do animal e perda de patrimônio genético (Kahrs, 1985; Blood e Radostits, 1989).

A ausência do quadro neoplásico em um bovino também não assegura a manutenção da produtividade integral, sendo este um campo ainda aberto a maiores investigações. Estudos demonstraram que populações de bovinos soro-reagentes contra o BLV apresentam redução na produção leiteira de até 3,5% e taxa de descarte precoce mais alta (Langston et al., 1978; Brenner et al., 1989; Pollari et al., 1993), além de maior propensão a mastites e outras doenças (Garcia et al., 1995). Por outro lado, Motton e Buehring (2003) demonstraram que o BLV está associado com a redução da produção da caseína *in vitro*, sugerindo uma ação direta deste vírus sobre as células epiteliais da glândula mamária bovina.

De forma indireta, a infecção pelo BLV também pode atuar negativamente sobre a lucratividade do produtor. Isto porque animais soro-reagentes podem sofrer restrições comerciais, bem como animais não reagentes, mas oriundos de rebanhos

com LEB. Touros sorologicamente reagentes também podem ser rejeitados em centrais de inseminação mais criteriosas e o sêmen por eles produzido poderá requerer testes de controle da sanidade específicos. O conjunto dos fatores acima descrito é responsável pelas perdas econômicas atribuídas a LEB (Pelzer, 1997) e justificam pesquisas que beneficiem o maior conhecimento desta doença e seu controle.

2.2 Frequência da infecção pelo BLV no Brasil

No Brasil, a população bovina apresenta elevada frequência de infecção pelo BLV, com índices médios ao redor de 50% de amostras soropositivas, observada em diferentes grupos de amostras testadas por diversos autores. Em revisão bibliográfica realizada por Del Fava (1995) encontram-se resultados positivos variando de 4% até 70%. Hirsch (1998) observou mais de 52% de animais reagentes entre os bovinos com mais de dois anos de vida, na região de Pitangueiras - SP. Artigos de revisão mais recentes ratificam esta ampla variação na prevalência, dependendo do local e do tipo de criação estudada, abrangendo todo o território nacional (Braga et al., 1998; Leite et al., 2001). Em uma análise realizada em 24 propriedades de uma micro-região no sul de Minas Gerais no ano de 2000, o índice médio de animais infectados entre aqueles em idade produtiva foi de 62,5%, havendo propriedades que atingiram índices de 98% de soropositivos nos bovinos com mais de 24 meses de vida (Hirsch e colaboradores, dados não publicados). Estes dados são muito relevantes, quando se considera que a micro-região está incrustada na maior bacia leiteira do país. Por sua vez, estes são corroborados por uma avaliação abrangente da frequência de animais soro-reagentes a IDGA no Estado de Minas Gerais, (Camargos et al., 2002a), que observaram resultados semelhantes.

2.3 Classificação e Características Estruturais do BLV

O BLV é um RNA vírus membro da família Retroviridae, subfamília Orthoretrovirinae, gênero Deltaretrovirus (International

Committee of Taxonomy of Viruses – ICTV, 2005). É considerado um retrovírus exógeno nos bovinos, ou seja, sem transmissão associada aos gametas, com significativa semelhança genômica ao HTLV-1 e HTLV-2 – da ordem de 50% (Oroszlami et al., 1984; Sagata et al., 1984; Sagata et al., 1985b).

O BLV é uma partícula retroviral do tipo C, na antiga classificação morfológica dos oncornavírus, com aproximadamente 100 a 130nm de diâmetro. Essa partícula, quando observada na microscopia eletrônica após sua liberação pela célula hospedeira, é caracterizada por apresentar um nucleocapsídeo denso, centralizado e esférico, envolvido por envelope que contém glicoproteínas na forma de espículos ou peplômeros, bem visíveis. Isto as difere de outros vírus com partículas tipo A, que são defectivas e encontradas apenas dentro de células, e as do tipo B, que possuem o nucleocapsídeo excêntrico. As partículas do tipo D apresentam o tamanho um pouco maior e seus espículos são menos proeminentes (Coffin et al., 1997).

Estruturalmente o vírion do BLV possui um genoma RNA, que consiste em duas moléculas de cadeia simples, sentido positivo, não segmentadas e idênticas, portanto com genoma diplóide (Murphy et al., 1999). Ligadas ao RNA viral estão mais de 30 moléculas de Transcriptase Reversa (TR), enzima viral multifuncional que está associada ao processo de transformação do RNA viral em DNA proviral e sua inserção no genoma celular durante a infecção (Baltimore, 1970; Temin e Mizutani, 1970). O conjunto RNA e TRs compõem a parte central da partícula viral do BLV e está empacotado dentro de um capsídeo de simetria icosaédrica, cuja proteína estrutural mais importante é a p24, além da proteína da matriz p15, que possui uma sequência específica de aminoácidos capazes de ligar-se ao RNA, favorecendo seu empacotamento (Kato et al., 1991). Uma ilustração desta estrutura viral pode ser observada na figura 1.

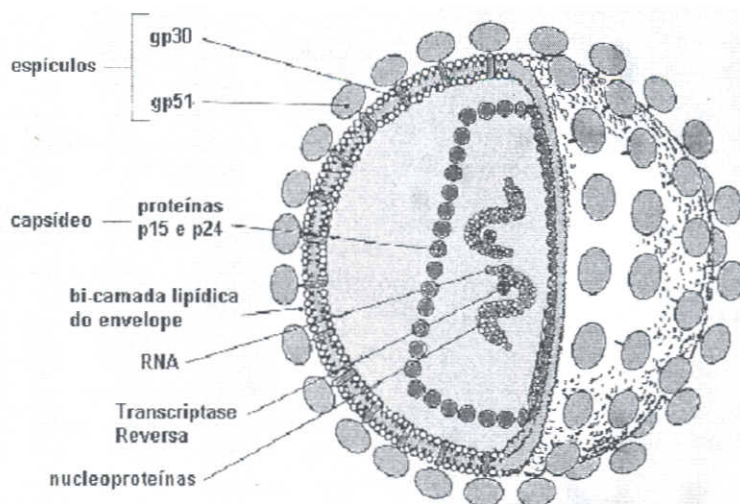


Figura 1. Organização estrutural do BLV, destacando-se as duas moléculas de RNA, as nucleoproteínas e as proteínas estruturais. Adaptado de Voyles (1993).

Externamente e envolvendo o nucleocapsídeo, este vírus possui um envelope lipoprotéico derivado da membrana citoplasmática da célula infectada. Inseridas nesse envelope estão várias moléculas da glicoproteína gp51, do tipo peplômero, responsáveis pela união vírus-célula no momento da infecção celular e onde estão importantes epítomos indutores de resposta imune humoral (Onuma et al., 1981). Para ancorar a gp51 no envelope e manter este unido ao capsídeo, existe uma proteína transmembrana, denominada gp30. A pesquisa de anticorpos anti-gp51, conjuntamente com os anticorpos anti-p24 ou não, é empregada no diagnóstico sorológico da LEB (Mamoun et al., 1990).

O genoma deste vírus, na forma de DNA proviral, é composto por 8.714 nucleotídeos, segundo seqüenciamento publicado por Sagata et al. (1985b), ao longo dos quais encontra-se a extremidade 5'LTR (terminação longa repetida) com 530 bases, seguida do gene *gag*, compreendendo o trecho entre as bases de número 628 até 1.806; o gene *pol* é a fração seguinte, entre as bases 2.467 até 4.875, seguido pelo gene *env*, situado entre os nucleotídeos de número 4.821 e 6.368. A fração genômica seguinte é única e característica do BLV, denominada pX_{blv}. Esta contém duas ORFs (*open reading frames* - janelas abertas de leitura) responsáveis, respectivamente, pela expressão das proteínas Tax e Rex, além de G4 e R3 (Sagata et al., 1985a; Derse, 1988). A região 3'LTR compreende o trecho de 529 bases até o final do genoma (Sagata et al., 1985b).

2.4 Organização, Função e Importância da Região 5'LTR do BLV

A região LTR dos retrovírus foi descrita a mais de duas décadas e, desde então, ficou clara sua participação nos processos de transcrição dos retrovírus (Temin, 1981). Nos chamados retrovírus complexos ou transativadores, a função da região 5'LTR é atuar como promotora de transcrição do genoma viral e co-participar na regulação da transcrição, junto com as proteínas

transativadoras, que são produtos de transcrição do terço final do genoma destes vírus (Fujisawa et al., 1985; Dougherty e Temin, 1987). As proteínas que se ligam a estas seqüências também atuam sobre a transcrição de genes celulares e, possivelmente, são um dos fatores relacionados com a capacidade tumorigênica do BLV (Tajima et al., 2003) e de outros oncornavírus primariamente não tumorigênicos (Lenz et al., 1984). Sua importância maior, do ponto de vista da terapêutica, está no fato de que o entendimento dos mecanismos envolvidos na regulação da transcrição poderá ser útil na inibição dos efeitos maléficos da infecção pelos retrovírus, havendo possibilidades de atuações estratégicas na estimulação ou inibição da transcrição viral (Achachi et al., 2005).

Assim como outros retrovírus transativadores, o DNA proviral do BLV apresenta nas extremidades de seu genoma uma região não codificadora de proteínas denominada LTR (terminações longas repetidas) (Sagata et al., 1984). Cada LTR contida no DNA proviral contém a seqüência U3-R-U5, onde U3 e U5 representam seqüências únicas derivadas das terminações 3' e 5' do RNA viral, respectivamente, enquanto que R representa uma região com terminações redundantes finalizadas por pequenos fragmentos repetidos e invertidos derivados do RNA viral, flanqueados por outros fragmentos derivados do genoma da célula hospedeira (Varmus, 1988).

A seqüência U3, derivada da extremidade 3' do RNA viral, só está presente na extremidade 5' da região 5'LTR do genoma dos retrovírus durante sua fase de DNA proviral, da mesma forma que U5, derivada da extremidade 5' do RNA viral, só está presente na extremidade 3'LTR nesta situação. A figura 2 apresenta a região 5'LTR do DNA proviral do BLV, representada de forma esquemática, mostrando as sub-regiões principais.

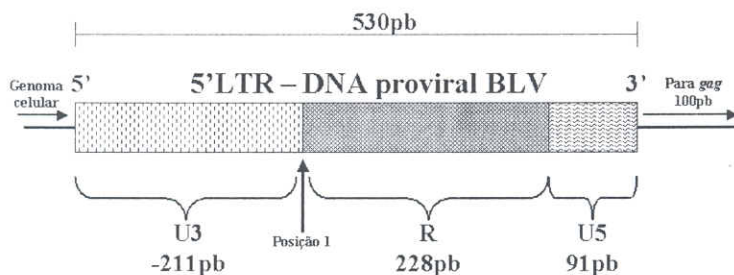


Figura 2: Apresentação gráfica da região 5'LTR do BLV: sub-regiões U5, R e U3 encontradas no DNA proviral (baseado em Sagata et al., 1985b, nº acesso GenBank K02120)

A origem das sub-regiões U3 e U5 nas extremidades 5' e 3', respectivamente, está relacionada à etapa de transcrição reversa do genoma do vírus, da sua forma RNA fita simples, polaridade positiva, para a forma de DNA dupla fita, ou DNA proviral (Freed, 2001). Um detalhe estrutural das LTR dos membros do gênero Deltaretrovirus é sua sub-região R, que se apresenta significativamente mais longa que nos vírus do gênero Lentivirus, estendendo-se ao longo de 228pb de sua posição inicial G (posição 1 do RNA) até o sítio de poliadenilação - Poli(A) C-A que é precedido das seqüências corretas para a complementação deste sinal (T-T-T-G-C-N- (G ou C)-T-T-G-C-A), e seguida a jusante por outra seqüência caracterizadora deste sítio, T-T-G-T (Sagata et al., 1985). No HIV, a sub-região R possui apenas 97 bases de tamanho (Chen et al., 2003).

A expressão do DNA proviral dos retrovírus é governada pela interação da unidade promotora contida na região LTR com o aparato transcricional celular e, portanto, é necessário que as seqüências contidas na região LTR sejam reconhecidas pelas proteínas celulares (Derse e Casey, 1986). Os dois componentes essenciais da unidade promotora viral são as seqüências promotoras ("promoters") e as reguladoras ("enhancers"). Estas últimas controlam a utilização das seqüências promotoras, dentro da unidade promotora, em um determinado ambiente celular e, conseqüentemente, controlam vários

mecanismos biológicos importantes como a taxa de replicação viral, tropismo tecidual e espectro da doença em relação aos hospedeiros (Lewin, 1999).

Ao seqüenciar a região 5'LTR do BLV, Sagata et al. (1985b), encontraram elementos básicos de transcrição na sub-região U3, as seqüências CAT box e TATA Box, porém apresentando seqüências peculiares, além de observar seqüências reguladoras adjacentes que se assemelhavam às seqüências observadas em regiões reguladoras da expressão de imunoglobulinas, nos linfócitos B.

Utilizando sistema de expressão transiente baseado no gene de cloranfenicol acetil-transferase, modificado pela inserção de fragmentos de 5'LTR do BLV como promotores, Derse e Casey (1986) identificaram duas seqüências atuantes como promotoras de transcrição. A primeira, com 75pb, está situada na sub-região U3, na altura da posição -175 a -100. A segunda foi identificada na sub-região R - U5, e está situada ao longo de 250pb a jusante da posição 1, contendo ao menos cinco núcleos promotores de transcrição. Os autores também observaram que estes dois conjuntos promotores atuavam independentemente e, embora a região situada em U3 possuísse uma atividade mais forte que a situada em U5, o efeito de ambas era sinérgico.

Para investigar a região promotora U3, Katoh et al. (1989) utilizaram a mesma

abordagem de Derse e Casey (1986) e concluíram que esta região possui três seqüências cuja composição correspondiam às seqüências previamente descritas no genoma humano, denominadas de CREs, elementos responsivos ao AMP cíclico, capazes de serem reconhecidas pelas proteínas da família ATF, fatores ativadores de transcrição celular. Estes autores também demonstraram que as seqüências equivalentes no genoma celular poderiam ser transativadas por p38Tax/BLV, reforçando a idéia da interferência do BLV na regulação dos mecanismos transcricionais celulares. Por serem transativadas por Tax, estes elementos passaram a ser denominados TxRE, elementos responsivos a Tax.

Nos trabalhos de Willems et al. (1991) e Willems et al. (1992), foi utilizada a estratégia de confronto entre uma biblioteca de fagos expressando o produto de cDNAs isolados de RNAs mensageiros obtidos de extrato de tumor induzido pelo BLV, e os fragmentos de seqüências do elemento promotor de 75pb situado na região U3. Desta forma, os autores confirmaram o achado de três seqüências com 21pb (TxRE-1, 2 e 3), semelhantes às descritas na mesma região no HTLV, contendo um core comum de 8pb, T-G-A-C-G-T-C-A, previamente descrito por Katoh e seus colaboradores. Além disso, determinaram que uma das proteínas específicas para estas seqüências era a CREB2, membro da família CRB/ATF.

Aprofundando os conhecimentos relativos a região promotora do BLV, Kiss-Toth e Unk (1994) caracterizaram as DAS – (downstream activator sequences, seqüências ativadoras a jusante) e demonstraram sua atividade promotora de transcrição, independente da presença das proteínas Tax e Rex. Estas seqüências possuem três núcleos – DAS-1 a 3, e constituem no núcleo da região promotora em R/U5, caracterizado por Derse e Casey (1986). Por serem independentes de Tax, podem atuar em conjunto com a região promotora em U3 ou não, o que sugere um importante papel para esta região nas fases iniciais pós-infecção celular, onde o nível de

proteínas virais transcritas ainda é baixo. Trabalhando com extrato nuclear de células Hela, os autores demonstraram a capacidade destas seqüências de se conjugar a proteínas relacionadas à expressão gênica celular, correlacionando-as com seqüências equivalentes no HIV (DREs). Entretanto, por se tratar de extrato celular, os autores não caracterizaram qual proteína interage especificamente com a DAS.

Este mesmo grupo de autores (Unk et al., 1994) descrevem o achado de três sítios de ligação para a proteína AP-4 (C-A-G-C-T-G), denominado motivo E Box, dentro das seqüências TxREs, flanqueando estas. Empregando técnicas de mutagênese sítio-direcionada, mudança da mobilidade do DNA em eletroforese e transfecção celular com vetor de expressão transiente, estes autores confirmaram que estas seqüências são essenciais no processo de ativação da transcrição do BLV. Como estas seqüências também atuam em processos transcricionais da célula durante fases de multiplicação e diferenciação, os autores acreditam estar elas também envolvidas no processo de transformação dos linfócitos B na leucose enzoótica bovina.

Utilizando uma abordagem mais específica, por meio da conjugação de proteínas purificadas NF- κ B e teste de “DNAase I footprinting”, Brooks et al. (1995) identificaram um sítio de ligação para esta proteína, dentro da seqüência promotora em U3, situada entre -70 e -118 acima do sítio de partida do RNA (posição 1). Os autores ainda observaram que várias proteínas diferentes desta família (p49, p50 e p65) podem se conjugar a este sítio e que, quando inserida em vetor de expressão transiente, a seqüência por elas reconhecida no promotor do BLV, pode ativá-lo. Como esta seqüência também é promotora dos genes de cadeia leve de anticorpos, expressados por linfócitos B, os autores especulam sobre a possibilidade destes elementos estarem associados ao desenvolvimento de linfossarcomas nos bovinos.

Para verificar a participação das demais proteínas CREB/ATF na transativação do BLV, Adam et al. (1996) utilizaram o teste de mudança da mobilidade do DNA em eletroforese. Desta forma os autores demonstraram a formação de cinco complexos moleculares DNA + CREB/ATF + Tax/BLV, nos quais estavam envolvidas as moléculas CREB, ATF-1 e ATF-2. Em experimentos paralelos, os autores confirmam também que estes são os principais elementos promotores da transcrição viral.

O papel da regulação da transcrição de retrovírus por hormônios captou grande interesse a partir do momento em que ficou caracterizada a estimulação por glicocorticóides, do vírus MMTV (Mouse Mammary Tumor Virus), via sua região LTR (Parks et al., 1974). Com o objetivo de verificar a participação dos hormônios insulina, prolactina, 17 β -estradiol, progesterona e dexametasona na ativação da transcrição do BLV, Neirmann e Buehring (1997) empregam a mensuração da atividade de transcriptase reversa e expressão transiente de vetor transfectado como ferramenta. As autoras demonstraram a existência de um GRE – elemento responsivo à glicocorticóides e confirmam a participação do corticosteróide dexametasona como co-adjuvante no processo, exigindo para isso a presença de Tax. Os hormônios insulina e/ou prolactina, desde que juntas com o corticóide, também podem aumentar a transcrição do BLV. Em trabalho posterior do mesmo grupo (Xiao e Buehring, 1998), foi descrita a seqüência responsiva a corticóides na sub-região U3 do BLV.

Procurando mapear as seqüências envolvidas da promoção de transcrição do BLV, dentro da região promotora U3, e o papel delas na regulação da transcrição, Xiao e Buehring (1998) demonstraram a existência de quatro unidades funcionais nesta região. Estas são um núcleo funcional iniciando-se na posição um e estendendo-se até a posição 5' do TATA Box, uma região reguladora dual (regulação positiva e negativa) envolvendo CRE2, AP-4, NF- κ B e GRE e duas regiões reguladoras positivas,

CRE1 e DR3. Estes autores também demonstram a sensibilidade destas regiões a mutações pontuais, com interferências negativas na capacidade de transcrição.

Apesar da indiscutível importância promotora da sub-região U3, faltavam ainda maiores análises sobre a importância das seqüências situadas na sub-região R, haja vista sua participação independente de Tax. Nesse sentido Kiermer et al. (1998) confirmaram que uma seqüência de 46pb situada na metade à jusante de R possui atividade promotora quando inserida em vetores de expressão transiente, atuando como seqüência reguladora positiva (enhancer), independente da presença de Tax. Além disso, identificaram um sítio de reconhecimento para os fatores promotores de transcrição dependentes de transdução de sinais por Interferon, IRF-1 e IRF-2, sugerindo que este elemento promotor deve ser importante para a transcrição do BLV nos estágios iniciais de replicação. Considerando que a produção de interferons é um evento importante nas fases iniciais de combate às infecções virais, os autores sugerem a idéia de que este seja um mecanismo utilizado pelo BLV para manipular as defesas do organismo hospedeiro em seu favor, no início da infecção, de forma a aumentar o número de células infectadas. Confirmando estes achados, Attal et al. (2000) observaram um potente efeito promotor e regulador desta região no BLV e no vírus correlato HTLV-1, em certos tipos celulares, enquanto que em outros foi nulo ou muito pouco, sugerindo um papel fundamental de região reguladora para as seqüências em R como dependente do micro ambiente intra-nuclear.

Uma das questões importantes na regulação da transcrição do BLV diz respeito ao impacto das mutações dentro das seqüências promotoras e reguladoras. A esse respeito Merezak et al. (2001) demonstraram que a introdução de consensos perfeitos dentro dos núcleos das três regiões TxREs aumentou a ligação das moléculas CREBs/ATF a elas o que, no entanto, não afetou a capacidade promotora de transcrição da LTR na presença de Tax. Por outro lado, essas seqüências de

consenso mutantes aumentaram em mais de 20 vezes a atividade promotora da LTR, em termos de níveis basais, na ausência da proteína viral Tax. O mesmo fenômeno não foi observado *in vitro* nas seqüências para NF- κ B, IRF, GRE e E Box, onde não ocorreu alteração da atividade basal transcricional.

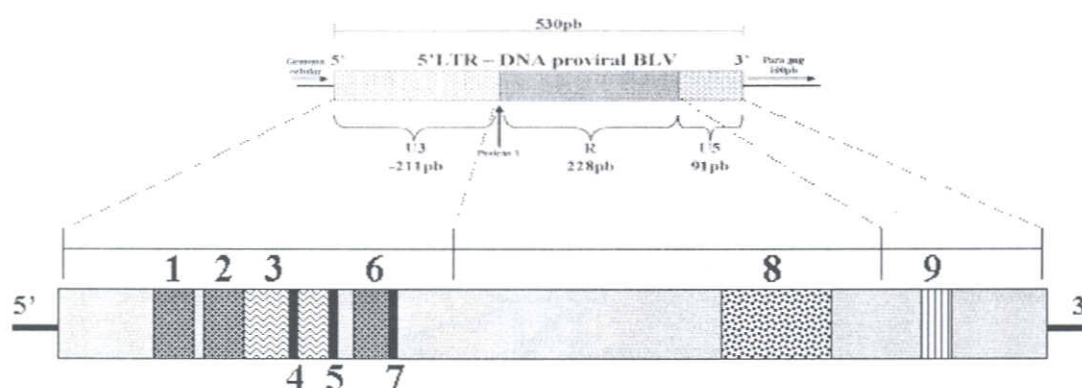
Em experimentos *in vivo* realizados em ovinos, os autores observaram que todos os mutantes, excetuando-se aqueles com mutações nos sítios de CREBs/ATF nas TxREs, mantiveram sua capacidade infectiva e replicativa em níveis semelhantes ao das amostras selvagens, competindo em igualdade. Entretanto, os mutantes apresentando um consenso de seqüências nos núcleos das TxREs sofreram drástica redução da carga proviral nos ovinos, em relação às amostras selvagens. Estas observações são muito importantes, pois sugerem que o BLV utiliza-se de variabilidade em suas seqüências promotoras para manter sua atividade de transcrição basal em níveis controlados e impedir, desta forma, o reconhecimento do sistema imune.

Em 2002, Calomme et al. descrevem o achado de um motivo E Box (C-A-C-G-T-G) na região R, a jusante da posição 1. Este achado é importante, pois os motivos E Box, até então, haviam sido caracterizados apenas nos núcleos da TxREs, ou seja, em U3. Como estes motivos são reconhecidos diretamente pelas proteínas da família "hélice-alça-hélice" (bHLH), tais como c-Myc, Max, USF e TFE3, que são promotores de transcrição celulares, estava caracterizada a existência de uma seqüência promotora de transcrição dentro da região reguladora do BLV. Destas proteínas, os autores demonstraram que USF-1 e USF-2 ligam-se especificamente a seqüência encontrada no BLV. Mais ainda, este trabalho demonstra que a ligação com estas proteínas é extremamente sensível a variações na seqüência de DNA e que

mutações induzidas em apenas dois dos nucleotídeos são suficientes para reduzir em 25% a capacidade indutora de transcrição basal (independente de Tax) da região 5'LTR do BLV, quando transfectada em linfócitos B. Quando estas mutações foram acompanhadas de mutações no sítio de reconhecimento IRF situado a jusante, a atividade de transcrição basal da LTR caiu em mais de duas vezes, mostrando a relevância deste conjunto para a atividade transcricional do BLV.

No trabalho que executaram, Deconinck et al., (2003) descrevem a caracterização de outra região do genoma do BLV, importante para a expressão, presente dentro de U3. Esta seqüência é o sítio de ligação para um fator de transcrição protéico denominado de PU.1/Spi-B, membro da família das proteínas ETS - diretamente relacionada com a indução de câncer, e que já havia sido caracterizada como promotoras em outros retrovírus. A seqüência de ligação para esta proteína foi caracterizada na posição - 95 a - 84, dentro de U3 do BLV. Os autores ainda demonstram que a atividade transcricional dependente de Tax não é afetada pelo bloqueio mutacional desta seqüência, embora a atividade basal na ausência de Tax seja significativamente reduzida.

Talvez o detalhe mais importante da descoberta desta seqüência ligante a PU.1/Spi-B seja o fato de que estas são proteínas promotoras de transcrição específicas de células B e macrófagos. Isso justificaria, ao menos em parte, a especificidade da transcrição do BLV em relação a estas células, especialmente linfócitos B, encontrada por Wu et al., (2003), contrastando com o amplo espectro de leucócitos que pode ser infectado e desenvolver transcrição pelo lentivírus BIV, Bovine Immunodeficiency Virus. A figura 3 apresenta um esquema gráfico definindo a localização dos elementos discutidos neste tópico, dentro de 5'LTR.



Legenda: Componentes promotores e reguladores presentes na região 5'LTR do BLV, e suas respectivas posições, baseado no genoma K02120 publicado por Sagata et al. (1985b): **1) TxRE - 1** (- 164 a - 143), contendo os núcleos CREBs/ATF (- 157 a - 150) e E Box (AP- 4) (- 151 a - 146); **2) TxRE - 2** (- 139 a - 119), contendo os núcleos CREBs/ATF (- 132 a - 125) e E Box (AP- 4) (- 125 a - 121); **3) Sequência NF- κ B** (- 118 a - 77), contendo o núcleo para SP.1/Spi-1 (- 97 a - 92); **4) Sequência CAAT Box** (- 97 a - 92); **5) Sequência GRE** (- 74 a - 60); **6) TxRE - 3** (- 64 a - 44): contendo os núcleos CREBs/ATF (- 57 a - 50) e E Box (AP- 4) (- 51 a - 46); **7) Sequência TATA box** (- 43 a - 37); **8) Sequência DAS**: contendo os núcleos DAS-1 (145 a 151), DAS-2 (161 a 166), DAS-3 (184 a 195) e sequência E Box (AP-4) em DAS (172 a 177); **9) Sequência IRF** (249 a 264).

Figura 3: Organização funcional da região 5'LTR do BLV, apresentando os elementos promotores e reguladores já identificados e sua localização dentro das sub-regiões U3, R e U5.

2.5 Regulação da Transcrição do BLV: Inter-relação de Tax, LTR e Elementos Celulares

O DNA proviral do BLV contém duas regiões LTR, carregando sequências idênticas dentro de U3-R-U5. Conforme discutido no tópico anterior, as sequências promotoras estão concentradas em U3 (TxREs), enquanto que as reguladoras são encontradas em U3 e U5 (DAS). Os três elementos genéticos de maior importância na ativação da transcrição do BLV são as TxREs, segmentos com 21pb muito conservados que contêm núcleos ligantes às proteínas ativadoras responsivas ao AMP-cíclico CREBs/ATF-1. O conjunto de proteínas

celulares que se ligam às TxREs é capaz de determinar uma regulação positiva ou negativa da transcrição, sendo dependentes de Tax para sua atividade promotora de transcrição plena (Calomme et al., 2004).

Entretanto, nas fases imediatamente após a infecção celular, não existe concentração suficiente de Tax para ativar a transcrição via promotores TxREs, pois o RNAm que a origina ainda não foi transcrito em quantidade para tal. Nesse momento, além da atividade transcritora basal das TxREs, parece assumir ação promotora complementar os núcleos da DAS, situada em R (Kiss-Toth e Unk, 1994). O processo de transcrição do BLV e tradução de seus transcritos está ilustrado na figura 4.

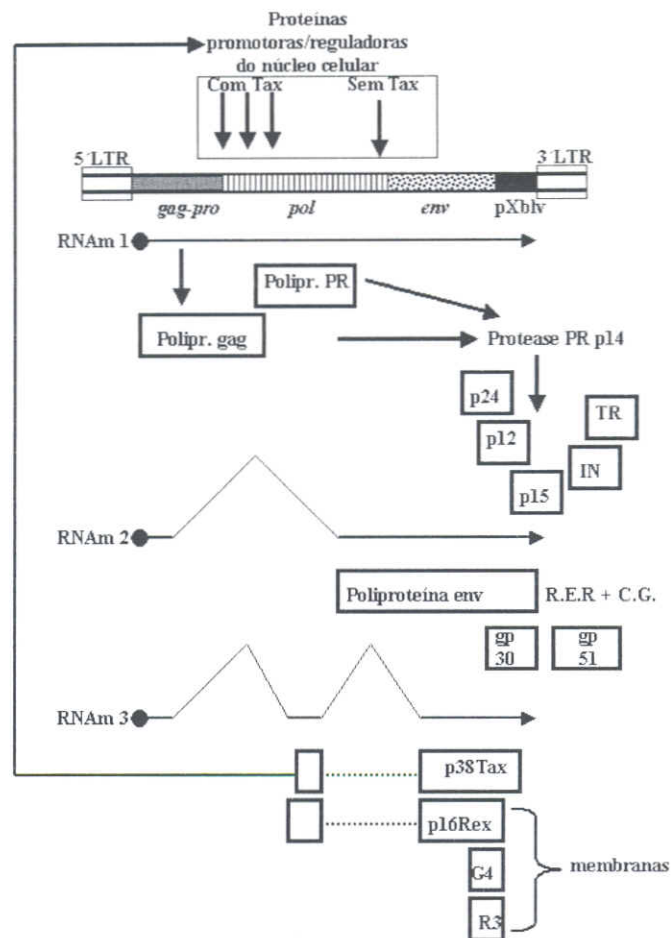


Figura 4: Esquema da expressão gênica do BLV: Os RNAm são gerados por mecanismo de excisão de íntrons (*splicing*) e sobreposição de frames de leitura. São produzidas as proteínas estruturais e de replicação, destacando-se Tax que voltará para o núcleo para interagir com os complexos protéicos na região U3, atuando como elemento promotor de transcrição principal. Adaptado de ilustração para HTLV de: Macnabs e Onions (2005), com o auxílio de Burny et al. (1988).

Conforme ilustra a figura 4, Tax e 5'LTR desenvolvem um papel central na transcrição do BLV. Tax é uma proteína de peso molecular 38Kda, expressa na região pX_{blv}. Nesta mesma região são transcritos outros RNAm, por mecanismo de sobreposição de frames de leitura e de excisão de introns de RNAm. Portanto, além de Tax, também Rex (p16), G4 e R3 são expressas a partir da mesma região. Rex é

uma proteína de 16Kda e que tem a função de exportar os RNAm nascentes, apresentando um sítio de reconhecimento para estes RNAs em sua estrutura (Burny et al., 1988; Fuente e Kashanchi, 2004).

Dada sua relevância no processo transcrricional, Tax tem sido alvo de investigações sobre seus mecanismos de atuação. Ching et al. (2004), investigaram o

processo de ligação de Tax às seqüências promotoras em U3. Para tanto, utilizaram o sistema de vetor de expressão transiente, montando vetores com cada um dos segmentos já caracterizados na região U3, mais um promotor mínimo de HTLV (TATA Box) e extrato nuclear celular. Cada vetor montado foi submetido a um experimento com ou sem Tax. Além de demonstrar que em certos vetores Tax poderia aumentar em até 70 vezes a transcrição, os autores confirmaram a grande predileção desta proteína pelos complexos proteicos celulares conjugados aos TxREs. Os principais elementos celulares observados neste processo foram as proteínas bZIP (CREBs), dominante do processo, ATF-1, 2 e 4 e *c-fos* (no HTLV), auxiliares no processo.

Para verificar a importância das proteínas complementares à ligação Tax – CREBs –

DNA, no processo de transcrição do HTLV, Basbous et al. (2003), empregaram os mesmos princípios de ferramentas que Ching et al., mas utilizando proteínas purificadas do grupo CREBs/ATF. O objetivo era determinar porque havia a necessidade de proteínas complementares, se CREBs era a dominante do processo e seu complexo com Tax já era suficiente para estabelecer a transcrição. Estes autores observaram que a função destas proteínas acessórias é atuar de forma competitiva com proteínas do grupo hZIP, pois a ligação desta última nas proteínas CREBs determinava a incapacidade de montagem do complexo DNA – CREBs – ATF – Tax, suprimindo a transcrição. Este é, portanto, um dos mecanismos utilizados pelo HTLV e, muito provavelmente, também pelo BLV, para regular sua transcrição. Mecanismos semelhantes devem ocorrer nos outros elementos de 5'LTR.

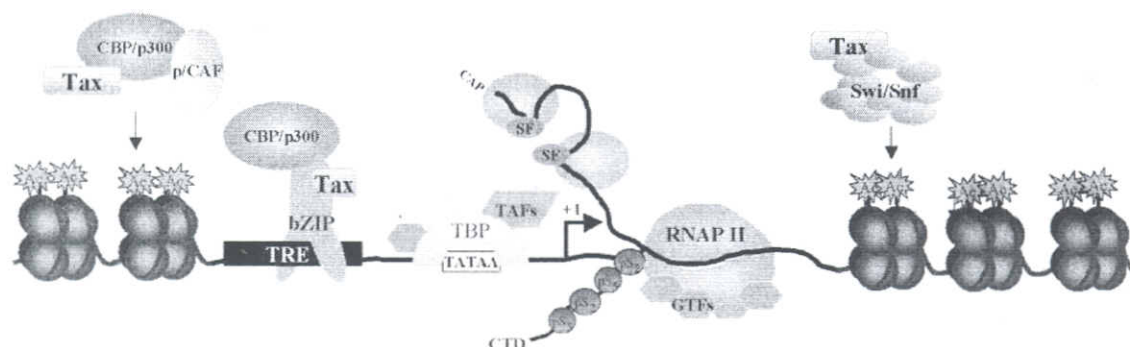


Figura 5: Processo de transcrição do HTLV-1. Imagem publicada por Fuente e Kashanchi (2004), representando o processo de ligação das proteínas Tax e CREBs, além de proteínas auxiliares, nos elementos promotores do HTLV. Destaque para o processo de ligação Tax – CBP/p300 – p/CAF no processo de acetilação das histonas, de forma a expor a região promotora do HTLV, situada imediatamente a jusante, e permitir a ligação do complexo transcritivo, composto pelos elementos promotores, reguladores e da RNA polimerase. Tax também atua na regulação negativa do processo, ao se conjugar com proteínas do grupo Swi/Snf na ação de deacetilação das histonas e conseqüente não disponibilização do DNA para a ligação das proteínas promotoras e reguladoras.

Conforme ilustra a figura 5, a participação do processo celular de controle de transcrição envolvendo a remodelação da cromatina também está envolvido no controle da transcrição do HTLV e do BLV. Este processo é mediado pelo equilíbrio competitivo de duas enzimas, Histona acetil-transferase (HAT) e Histona deacetilase (HDAC), onde a primeira reduz a acetilação das histonas, permitindo o desenrolamento do DNA e conseqüente exposição das regiões a serem transcritas, enquanto que a segunda remove a acetilação e promove o enovelamento do DNA na histona, impedindo sua transcrição.

Este processo foi demonstrado na transcrição do BLV por Calomme et al. (2004). No trabalho destes autores foi caracterizada a participação do grupo de proteínas Max-Mad-mSin3 atuando como reguladoras negativas do processo, promovendo o recrutamento de HDAC e deacetilando as histonas, o que inibiu a transcrição. Este trabalho também demonstrou que o sítio de ligação para as proteínas Max-Mad-mSin3 são as seqüências E-Box dentro das TxREs. Desta forma os autores postularam que um dos controles transcrpcionários do BLV seria mediado pela ocupação dos E box por AP-4 (promoção de transcrição) ou por Max-Mad-mSin3 (inibição). Anteriormente a estes trabalhos, demonstrando a importância da acetilação no processo de transcrição viral, Tajima et al. (2003) mostraram que a inibição da transcrição do BLV não é dependente da metilação do DNA proviral, na região 5'LTR. Este tema é extremamente atual e mais investigações deverão ser publicadas nos próximos anos a fim de esclarecer estes mecanismos regulatórios.

2.6 Organização e Importância do Gene *pol* e da Proteína TR do BLV

O gene *pol* do BLV contém as seqüências necessárias para a produção das enzimas TR e IN e, segundo Sagata et al. (1985b), possui 2.408pb, iniciando-se em 2.467 e estendendo-se até 4.875. No caso do HIV-1, a região gênica *pol* é responsável, junto

com *gag*, pela transcrição de um RNAm que é traduzido em uma poliproteína com 160Kda. O fracionamento pós-transcricional desta poliproteína é produzido pelo peptídeo com ação protease PR. Este é um polipeptídeo homodímero com duas cadeias de 99 aminoácidos, que também é transcrito dentro da mesma poliproteína e cujo surgimento se daria por uma possível ação autocatalítica ainda não esclarecida. Após a clivagem promovida por PR, surgem os precursores de Gag (55Kda), a transcriptase reversa RT (heterodímero com 66kda e 51Kda) e a Integrase IN, com 32Kda (Freed, 2001).

No BLV os genes *gag*, *pro* e *pol* são fundidos e sua expressão se dá de forma diferenciada, por meio de três frames diferentes e sobrepostos. A proteína p14 Protease (PR) é originada de um frame que se sobrepõe a montante em *gag* e a jusante em *pol*. Portanto, na mesma região são originados três RNAm, um codificando a poliproteína Gag, precursora das proteínas p24 e p15; o segundo é precursor da PR p14 e o terceiro de TR/IN (p66) (Burny et al., 1988; Perach e Hizi, 1999). Em relação à Integrase IN do BLV, até o presente momento não foi determinado o sítio de clivagem acessado pela protease PR para sua liberação do restante da proteína RT. Desta forma, ainda não está determinado a partir de qual base inicia-se a transcrição correspondente a esta proteína. Entretanto, esta enzima é codificada pela porção do terço distal do gene *pol*, abrangendo um fragmento equivalente a um terço do total do gene. Da mesma forma que 5'LTR, não existem muitas informações sobre as seqüências desta região, em amostras latino-americanas, o que reforça a importância desta investigação.

Na replicação dos retrovírus, a transferência de DNAs parcialmente sintetizados de uma fita molde para outra é obrigatória para a síntese final do DNA proviral, atuando os fragmentos transferidos como iniciadores para a TR realizar a síntese da fita complementar (Chen et al., 2003). Este processo de transferência é mediado pela

TR (Coffin et al., 1997), que catalisa três ações diferentes: DNA polimerase dependente de RNA, DNA polimerase dependente de DNA e RNAase H. Em virtude dos vários passos de síntese de cadeias senso e anti-senso envolvidas nesse processo, existe um proporcional aumento de probabilidade de inserção de bases errôneas no DNA proviral nascente. Como a TR do BLV não tem atividade de conferência de leitura ("proof-reading"), estes erros tendem a ser incorporados (Avidan et al., 2002).

Dentro do contexto de combate às infecções retrovirais, o conhecimento das TR e seu gene é importante, já que esta enzima é, ao lado da protease PR, um dos alvos eletivos para atuação das drogas anti-retrovirais, que buscam impedir a infecção ou inibir a replicação (Jounkheere et al., 2000). Um dos aspectos mais complexos na terapêutica anti-retroviral é a emergência de variantes virais com propriedades gênicas, antigênicas e biológicas diferentes, capazes de burlar o sistema imune e as drogas, levando ao recrudescimento dos efeitos negativos do vírus no hospedeiro (Huang et al., 1998).

Em relação aos aspectos específicos de patogênese e variabilidade genética dos Deltaretrovírus, os estudos da TR e seu gene buscam contribuir no esclarecimento de um ponto central e intrigante da biologia dos vírus deste gênero: porque o BLV e o HTLV apresentam uma conhecida conservação do seu genoma, se o processo de replicação é semelhante aos demais retrovírus complexos, que são muito variáveis? No trabalho de Mansky e Temin (1994), uma resposta ao menos parcial para esta questão é oferecida, pois os autores investigam a TR do BLV e concluem que sua atividade replicativa apresenta um melhor nível de fidedignidade, quando comparado a outros retrovírus. Entretanto, trabalhos mais recentes utilizando TR recombinante de BLV, expressa em *Escherichia coli* e purificada, não encontraram a mesma resposta, apresentando esta enzima uma taxa de inserção de bases errôneas semelhante às encontradas no HIV-1 (Perach e Hizi, 1999;

Avidan et al., 2002). Este mesmo grupo de trabalho acrescentou mais algum conhecimento sobre esta enzima, demonstrando que a TR/BLV possui todas as propriedades enzimáticas já descritas em vírus mais bem estudados, como o HIV-1. Além disso, encontraram que a TR/BLV é preferencialmente dependente de Mg^{2++} , em detrimento de Mn^{2++} e que, mesmo estando conjugada a um substrato DNA, seu monômero não perde suas atividades enzimáticas. Finalmente, demonstraram que esta enzima é mais resistente a ação inibidora de TR dos nucleosídeos trifosfatos, em relação a outras TR.

2.7 Filogenia e Variabilidade Genética do BLV

A epidemiologia da LEB é caracterizada pela existência de muitos bovinos infectados e sem sinais clínicos. Nos rebanhos brasileiros observa-se esta situação, associada a uma extensa disseminação do BLV entre os animais, sendo rara a propriedade livre deste vírus. Segundo Steinhauer e Holland (1987), os vírus do tipo RNA apresentam uma tendência elevada a apresentarem diferenças genômicas numa mesma população viral, diferenças estas marcadas por graus variados de mutações. Este fenômeno é uma estratégia evolutiva deste tipo de vírus, que permite a emergência de novas variantes virais, mais aptas a estabelecer infecções produtivas. A maior variabilidade genética propicia maiores chances de ocorrer variabilidade antigênica (escape do sistema imune), patogênica (alteração de perfil de tropismo celular, maiores níveis de replicação e interferência na fisiologia celular) e epidemiológica (transposição interespecíes e maior transmissibilidade). A velocidade com que surgem novos mutantes virais numa população de hospedeiros está diretamente relacionada com as oportunidades de replicação obtidas pelo vírus. Portanto, considerando a grande quantidade de animais infectados pelo BLV no Brasil, e que o BLV é um RNA vírus, pode-se propor a hipótese de que existam diferentes variantes virais circulando nos rebanhos bovinos desse país.

Os trabalhos de Mamoun et al. (1990) e Willems et al. (1993) demonstram a ocorrência de variações genômicas entre vírus BLV de regiões diferentes e mesmo entre aqueles da mesma região geográfica. Entretanto, esta variabilidade gênica não ocorre de forma igualitária ao longo do genoma deste vírus, havendo regiões mais conservadas e outras mais variáveis (Sagata et al, 1985b). Esta variabilidade é muito menor do que a observada nos vírus da subfamília *Lentivirinae*, mas ocorre e pode dar origem a alterações na composição dos aminoácidos. Em relação à expectativa de se encontrar mutações em função de erros da TR, Mansky e Temin (1994) encontraram uma ação replicativa mais fiel da transcriptase reversa nesse vírus. Entretanto, relatos mais recentes de experimentos utilizando TR de BLV recombinante em *Escherichia coli*, apontam para uma probabilidade de erro semelhante a TR do HIV-1.

Segundo Sagata et al. (1985b), o gene *pol* é o mais conservado, ou seja, menos susceptível a mutações, dentre os três genes do BLV, fato que se observa nos demais retrovírus e está relacionado com a necessidade da conservação estrutural da enzima transcriptase reversa, essencial para a replicação desse grupo viral. Esta menor variação também está presente nos demais oncornavírus, havendo uma significativa homologia de *pol* entre retrovírus oncogênicos de grupos diferentes (Chiu et al, 1984). Isso demonstra ser esta região importante para a replicação viral, além de sugerir a origem destes vírus a partir de um ancestral comum (Toh et al., 1983). Por ser bastante conservada, espera-se também que um teste de PCR direcionado para amplificar este gene apresente uma boa sensibilidade, tornando-a eletiva para o diagnóstico.

Em relação a variações nas glicoproteínas de envelope, Molteni et al (1996) demonstraram uma pequena taxa de variação, restrita aos aminoácidos componentes de três (F, G e H) dos oito epítomos observados na molécula gp51. Estes epítomos foram caracterizados por Bruck et al (1982a e b) e Bruck et al (1984 a

e b), por meio de um painel de anticorpos monoclonais, denominando-os seqüencialmente de A a H. Em trabalho anterior ao de Molteni e colaboradores, Mamoun et al (1990) também haviam demonstrado uma variabilidade gênica junto a *env*, identificando dois padrões que foram denominados Japonesa-Americana (vírus lambda BLV-1, Vdm e amostra FLK-BLV) e Européia (amostras T15-2, LB285 e LB59).

Quanto às porcentagens dessas variações de nucleotídeos, ao seqüenciar e comparar as variações genômicas do gene *env* de amostras brasileiras do BLV, Camargos e colaboradores (2002b) encontraram uma variação que não excedeu o valor de 5%, e uma variação de aminoácidos que não ultrapassou os 4%. Coulston e colaboradores (1990) encontraram uma variação de nucleotídeos da ordem de 4% nos genes *pol* e *env*, e de 6% para a região do gene *gag*, ao seqüenciar uma amostra de BLV australiano. Dube et al. (2000) demonstraram uma variação muito semelhante ao seqüenciar e comparar uma amostra argentina, relatando 5% de variação genômica, valor semelhante encontrado por Licursi et al. (2003), ao analisar e comparar uma região de *env* de BLV, de amostras japonesas e argentinas.

A diversidade genética e dispersão do BLV foram estudadas numa população de 445 bovinos da região central da Argentina. Nesse estudo foram observados quatro agrupamentos genéticos em função de sua região *env* e em função das seqüências previamente depositadas no GenBank, sendo o primeiro agrupamento composto por amostras confluentes para um padrão Argentina/Brasil. O segundo agrupamento reuniu amostras com perfil Europa/Brasil, enquanto que o terceiro e quarto reuniram amostras japonesa/alemã e Austrália/EUA, respectivamente (Monti et al., 2005).

Além da variabilidade de *gag*, *pol* e *env*, outra região já acessada nesse sentido é a região pX_{blv} (McGirr e Buehring, 2005). Foi analisada a variabilidade dos genes de Tax e Rex, assim como a variabilidade das proteínas preditivas destas seqüências. O gene *tax* variou 5%, enquanto que *rex*

variou mais, 7%. Porém, a maior variabilidade foi observada na proteína Rex, que apresentou um índice de 11%, certamente a maior variabilidade já observada para alguma sequência ou proteína do BLV.

Quando se confrontam os dados de variabilidade dos Lentivirus com os deltaretrovírus, fica clara a maior estabilidade genética da população deste segundo grupo viral. Apesar de quantitativamente menores, o impacto destas mutações sobre a patogenia viral e a sensibilidade de métodos indiretos de diagnóstico ainda necessitam ser esclarecidas. Além disso, não há dados sobre a variabilidade genômica das regiões LTR e *pol* de amostras de BLV brasileiras, o que reforça a idéia de que são necessários estudos genômicos sobre estas regiões deste vírus no Brasil.

2.8 Aspectos Relativos ao Diagnóstico Sorológico da LEB: Uso e Limitações

A existência de muitos animais infectados e sem sinais clínicos, portanto constituindo-se em portadores inaparentes, é um aspecto relevante. Estes animais contribuem, de forma silenciosa, para a disseminação do BLV, e a segregação é mais difícil, já que requer análises laboratoriais para sua identificação (Miller e Van der Maaten, 1976). Além disso, a grande frequência de bovinos infectados pelo BLV nas populações bovinas brasileiras favorece o surgimento e seleção de amostras virais mutantes devido a maior atividade viral. Estes vírus mutantes podem apresentar propriedades antigênicas, patogênicas e epidemiológicas diferenciadas (Willems et al., 1993). Isto exige, portanto, a constante avaliação da sensibilidade e especificidade diagnóstica dos testes já desenvolvidos, além de estudos de adaptação ou criação de novos métodos.

Os primeiros testes de detecção da presença do vírus BLV em bovinos foram feitos mediante a observação de partículas virais tipo C em culturas de linfócitos estimuladas por agentes mitogênicos (Miller et al., 1969). Em 1972, Miller e Olson

desenvolveram o primeiro teste de anticorpos precipitantes em tubo, dirigido contra proteínas do capsídeo, seguido da padronização de um teste de fixação de complemento em 1974 (Miller e Van Der Maaten, 1974). A seguir ocorreu o desenvolvimento do primeiro teste diagnóstico sorológico do tipo imunodifusão dupla em gel de ágar (IDGA), utilizando o mesmo antígeno (Miller e Van Der Maaten, 1976). Esta prova foi melhorada com a substituição deste antígeno pela gp51, que conferiu ao teste maior sensibilidade (Onuma et al., 1981).

O advento de técnicas sorológicas do tipo ELISA (Enzyme Linked Immunosorbent Assay) para diagnóstico da LEB veio suprir a necessidade de um teste sorológico mais prático e sensível que a IDGA, tanto do ponto de vista analítico quanto de diagnóstico (Ressang et al., 1978). As décadas de 80 e 90 foram marcadas pela popularização desses testes imunoenzimáticos, empregando-se "kits" comercialmente disponíveis, direcionados a detectar tanto anticorpos contra p24 quanto contra gp51 (Altaner et al., 1982). Por sua vez, os testes ELISA para diagnóstico de infecção pelo BLV, empregando anticorpos monoclonais, promoveram um aumento significativo na especificidade desta técnica (Kozaczynska, 1999). As provas do tipo IDGA e ELISA são utilizadas mundialmente no diagnóstico sorológico da LEB, e estão referendadas no Manual da OIE - Organização Mundial de Sanidade Animal (2004).

Tanto a técnica padrão de IDGA, quanto o método de ELISA, apresentam índices de sensibilidade e especificidade bastante altos. Monke et al. (1992) estimou em 99,8% a especificidade e 98,5% a sensibilidade da IDGA, em 12.549 testes sorológicos feitos em touros de centrais de inseminação. Segundo Fechner et al. (1996), a acurácia dos testes ELISA podem ser ainda maiores. Corroborando esta afirmação, Camargos (2005) testou o desempenho do método de IDGA e ELISA, utilizando reagentes e kits disponíveis no Brasil. Foi observado que os testes ELISA apresentaram 100% de sensibilidade e especificidade, enquanto

que o teste IDGA apresentou 100% de especificidade e 93,4% de sensibilidade.

Entretanto, apesar da boa sensibilidade e especificidade das técnicas sorológicas de IDGA e ELISA, alguns problemas de detecção de animais infectados podem ocorrer quando estas são empregadas. Estes problemas podem interferir negativamente na execução de programas de controle da LEB, podendo atrasá-los e gerar maiores perdas econômicas. O uso das técnicas de IDGA e ELISA foi questionado quando se descobriu que alguns bovinos infectados pelo BLV podem apresentar baixos títulos de anticorpos, títulos transientes ou mesmo ausentes (Hopkins e Digiacomo, 1997; Camargos et al., 2004). Durante o período negativo da resposta humoral pós-infecção (a chamada "janela imunológica"), que na LEB pode durar entre 3 a 16 semanas, os testes sorológicos podem apresentar baixa acurácia (Agresti et al., 1993). Por outro lado, durante a fase periparturiente, vacas podem apresentar resultados falso-negativos devido à queda dos títulos de anticorpos séricos, uma vez que estes são drenados do plasma pela glândula mamária para compor o colostro (Burridge et al., 1982b). Já os bezerros podem apresentar anticorpos detectáveis nos testes sorológicos em virtude de uma infecção intra-uterina (Van der Maaten et al., 1981) ou em função da transferência passiva de anticorpos maternos, via colostro. Neste último caso, os testes sorológicos apresentarão resultados falso-positivos até seis meses de idade do bezerro e não permitirão distinguir este animal do infectado durante a gestação ou nos primeiros meses de vida (Burridge et al., 1982a).

Estas dificuldades apresentam uma importância relativa menor quando os testes são aplicados em rebanhos com elevada frequência de animais infectados, pela diluição dos resultados errôneos dentro do universo de animais acertadamente diagnosticados. Entretanto, quando o objeto de investigação é a prevalência da LEB ou a detecção de animais infectados em rebanhos com baixa frequência destes, como por exemplo, nas fases finais de um

programa de controle e erradicação, aumenta a probabilidade relativa de resultados falso-negativos na ordem de 10% para testes do tipo ELISA e mais de 17% para os testes tipo IDGA, quando comparados com outros métodos mais sensíveis (Fechner et al., 1996).

2.9 O Uso da PCR no Diagnóstico e Pesquisa do BLV

As limitações do uso de testes sorológicos no diagnóstico da LEB, discutidas no tópico anterior, sugerem a necessidade de desenvolvimento de técnicas mais acuradas para o diagnóstico de LEB. A viabilização das biotécnicas de diagnóstico baseadas na amplificação de porções do genoma do agente etiológico, pela amplificação do RNA viral ou do DNA proviral ofereceu, entre outros benefícios, a possibilidade de superar alguns destes problemas de diagnóstico, principalmente em relação à sensibilidade diagnóstica insuficiente, além de abrir novas perspectivas de estudos genômicos e proteômicos, principalmente quanto à relativa praticidade, quando comparada às metodologias convencionais (Belak e Thoren, 2001).

Para o diagnóstico da infecção pelo BLV e pesquisas genômicas, a principal metodologia usada é a PCR – reação em cadeia da polimerase, e suas variações, principalmente a *Nested* – PCR e a RT-PCR (*Reverse Transcriptase* – PCR), que são consideradas como métodos de diagnóstico diretos e definitivos, pois identificam diretamente o material genético do BLV na amostra, na forma de DNA proviral ou RNA viral, respectivamente (Blankenstein et al., 1998).

Em relação ao uso da PCR no diagnóstico da LEB, o primeiro relato é feito por Naif et al. (1990), que obtiveram sucesso com uma PCR direcionada para amplificar um fragmento de *env*, a partir de massas tumorais e linfócitos. Com interpretação em gel de agarose corado com brometo de etídeo, esta PCR foi capaz de amplificar o produto a partir de 100pg de DNA celular. Neste mesmo trabalho, os autores demonstraram um drástico aumento na

sensibilidade, quando uma análise de hibridização foi usada para detectar e confirmar o produto da reação.

Aplicando a mesma abordagem, mas usando como sonda um iniciador marcado com biotina e revelado por estreptavidina, Naif et al. (1992) demonstraram a maior sensibilidade analítica deste método em relação ao IDGA convencional. A PCR foi capaz de detectar DNA proviral de BLV em bezerros com duas semanas pós-infecção, enquanto que a técnica sorológica não detectou nenhum até quatro semanas pós-infecção.

Também visando determinar a precocidade da técnica de PCR na detecção de infecção em animais experimentalmente inoculados com BLV, Kelly et al. (1993) empregaram a técnica direcionada ao gene *gag*. Esta foi capaz de demonstrar a presença do vírus sete dias pós-infecção, enquanto que a prova de IDGA demorou entre três a cinco semanas para detectar a presença de anticorpos.

Usando a técnica de PCR direcionada para amplificar duas regiões do DNA proviral de BLV, inseridas nos genes *gag* e *env*, Agresti e colaboradores (1993) demonstraram a eficiência do método na detecção do vírus em DNA de linfócitos de bezerros neonatos. Também demonstraram que esta técnica é mais precoce nesse processo, quando comparada com a sorologia convencional usando IDGA.

Os resultados referentes a maior sensibilidade diagnóstica da técnica de PCR em detrimento da técnica de IDGA também foram confirmados por Kuzmac et al. (1991), que empregaram a região 5'LTR de DNA proviral de BLV como molde para amplificação de um fragmento de 282pb. Uma demonstração da elevada especificidade que pode ser obtida por esta técnica foi feita por Eaves et al. (1994), onde nenhum animal não infectado apresentou resultado positivo em 194 animais testados, utilizando uma PCR desenhada para amplificar uma região conservada do gene *env*.

Em um modelo de estudo utilizando infecção experimental, Klintevall e colaboradores (1994) testaram a eficiência de uma PCR do tipo dupla-PCR (*Double-PCR* ou *Nested-PCR*, como é mais conhecida), direcionada para amplificação de um fragmento do gene *env*, comparando esta com as provas de formação de sincício em co-cultivo de linfócitos, sorologias baseada nas técnicas de ELISA e IDGA para detecção de anticorpos anti-gp51 e p24, além de *Western-blotting*. A *Nested-PCR* mostrou-se capaz de identificar a infecção a partir do 7º dia pós infecção, em DNA de células mononucleares sangüíneas, enquanto que nenhuma das demais técnicas apresentou resultados positivos antes do 26º dia pós infecção.

Em um experimento semelhante na Argentina, utilizando iniciadores para o gene *env*, González et al. (1999) obtiveram resultados parecidos, porém mais tardios. Os primeiros animais que apresentaram resultados positivos a PCR, o fizeram após duas semanas, enquanto que as primeiras soroconverções só ocorreram após quatro semanas.

Fechner et al. (1996) utilizaram dois protocolos de PCR, planejados para amplificar regiões dos genes de *env* e *tax*, propondo a avaliação de desempenho de ambas em bovinos naturalmente infectados e fazendo a comparação com as técnicas indiretas de ELISA e IDGA. Este experimento ratificou, mais uma vez, a maior sensibilidade de ambas PCR em relação às técnicas sorológicas convencionais. Por outro lado, como a especificidade foi semelhante entre as três, os autores propõem que a técnica de PCR pode ser uma metodologia a ser usada de forma rotineira no controle da LEB.

O trabalho destes autores também verificou a viabilidade do uso da PCR na detecção do DNA proviral em DNA extraído de vários tecidos e secreções dos bovinos infectados, mostrando que a técnica também é útil na investigação da patogênese viral. Essa teoria já havia sido investigada por Rasmussen et al. (1991), que utilizaram um conjunto de iniciadores direcionados para as

regiões entre os genes *pol* e *env*, e apenas para o gene *env*, na diferenciação etiológica de neoplasias linfóides em bovinos. Estes autores também concluíram que a PCR é uma metodologia adequada para o uso no diagnóstico e pesquisa do BLV, podendo diferenciar os casos de linfossarcoma causados por este vírus dos demais.

Para verificar a sensibilidade e especificidade de uma PCR do tipo *semi-nested*, na detecção de DNA proviral de BLV em cultura de células e sua aplicação na quantificação de células infectadas *in vitro* e *in vivo*, Mirsky et al. (1993) selecionaram três iniciadores para a região do gene *env* e três para o gene da prolactina bovina. Ao aplicar as PCR em células diluídas com o auxílio de citometria de fluxo, os autores confirmaram a elevada sensibilidade analítica da técnica, que foi capaz de amplificar a partir de 10pg de DNA e apresentar resultado positivo em diluições de até uma célula infectada em um milhão de células não infectadas. Utilizando linfócitos extraídos de vacas doadoras infectadas, a técnica foi capaz de produzir amplificação a partir de um linfócito infectado.

Uma variação do uso da PCR foi aplicada por Xie e colaboradores (1997) pela primeira vez no estudo da patogenia intracelular do BLV. Estes conjugaram uma PCR *in-situ*, aplicada diretamente sobre uma cultura recente de linfócitos B, e a técnica de hibridização *in-situ*, com sondas marcadas com biotina, para demonstração dos locais de amplificação nos linfócitos. Tanto os iniciadores da PCR, quanto as sondas empregadas foram direcionadas para a ORF pX_{BLV}.

Conforme discutido, o uso de metodologias sorológicas pode apresentar mais de 10% de falhas em relação a PCR (Fechner et al., 1996). Estas falhas podem representar um importante fator limitador do controle da LEB em determinadas circunstâncias como, por exemplo, quando empregados na avaliação individual de um animal de alto valor econômico e genético, ou nas fases finais de um programa de erradicação. Com o objetivo de verificar o desempenho da PCR

nesta última situação, Beier et al. (1998) investigaram o seu uso direcionado para o gene *gag*, em situações de baixa frequência de animais sororreagentes ou com resultados sorológicos duvidosos, demonstrando uma significativa maior sensibilidade da técnica, em função de sua precocidade na detecção de bovinos infectados.

Neste mesmo trabalho, os autores demonstram a importância da seleção criteriosa de pares de iniciadores, dada sua inferência direta na sensibilidade e especificidade da PCR. Nesse sentido, anteriormente Marsolais et al. (1994), demonstraram uma variação no valor da sensibilidade analítica da PCR, de 50% a 90%, dependendo do par de iniciadores escolhidos e a origem fisiográfica dos animais testados. Estes resultados sugerem que a ocorrência de variações genômicas virais interferem no uso da PCR em diagnóstico

No mesmo sentido, Blankenstein et al. (1998) analisaram a utilização de uma *Nested-PCR* dentro de um programa de controle e erradicação da LEB na Alemanha. Estes demonstraram que mesmo a maior eficiência deste método não foi suficiente para garantir a detecção de todos os animais infectados, o que inviabilizou a erradicação da doença nas propriedades envolvidas no experimento, no prazo proposto de seis meses. Por outro lado, os autores concluíram que iniciadores desenhados para a região 5'LTR produziram uma PCR mais sensível que outra empregando iniciadores para *env*.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Amostras de DNA Bovino

As amostras de DNA bovino que foram analisadas compõem parte do estoque existente no laboratório RETROLAB/DMVP/ EV/UFGM, todas com resultado positivo em PCR para o gene *env* (Camargos et al., 2002b) e cujos bovinos doadores são sorologicamente reagentes na prova de IDGA/gp51BLV. Foram consideradas como

unidade amostral para o desenvolvimento desta tese 73 amostras de DNA extraídos de bovinos e dois DNAs extraídos de culturas de células FLK (Fetal Lamb Kidney), gentilmente cedidos pelo Setor de Virologia do Laboratório Nacional Agropecuário de Minas Gerais (LANAGRO/MG), e MDBK (Madin-Darby Bovine Kidney ATCC CCL-22), gentilmente cedida pelo Laboratório de Vírus da EV/UFGM, cuja relação está descrita no anexo 1.

Os animais doadores dos DNAs utilizados nos experimentos pertencem a propriedades situadas em quatro municípios brasileiros, que caracterizaram a área de abrangência geográfica deste trabalho, a saber: município de Pedro Leopoldo, região central do Estado de Minas Gerais (referência na tese: PLMG), município de Coronel Pacheco, Zona da Mata do Estado de Minas Gerais (CPMG), município de Londrina, oeste do Estado do Paraná (LDPR) e município de Corumbá, sudoeste do Estado do Mato Grosso do Sul (CRMS).

3.2 Obtenção do DNA

Foi obtido a partir de um concentrado de células mononucleares de sangue periférico (PBMC), extraído a partir de aproximadamente 5,0ml de sangue total. Este foi colhido por meio de punção venosa, utilizando o sistema BD-Vacutainer® (Becton Dickinson, EUA), em tubos contendo heparina, a seguir enviados imediatamente para o laboratório, sob refrigeração a 4°C. Para obtenção do PBMC foi utilizado o produto Ficoll-Hypaque (Pharmacia/Pfizer, EUA), empregando-se protocolo recomendado pelo fabricante. O sedimento de células obtido foi re-suspendido em 500µL de solução tamponada de salina-fosfato – PBS, pH 7,4.

Para liberação do DNA celular optou-se pelo método de lise enzimática, utilizando a Proteinase K. Após três lavagens com solução tampão PBS anteriormente descrita, o sedimento de PBMC foi digerido com proteinase K (Sigma-Aldrich, EUA), utilizando-se 1mg de enzima/ml e

aproximadamente 500µL de tampão de digestão (100mM de NaCl, 10mM de tris-HCl - pH 8,0, 25mM de EDTA e 0,5% de dodecilsulfato de sódio), por 18 horas, a 37°C.

O produto da digestão foi submetido, então, ao protocolo de extração de DNA empregando a combinação fenol/clorofórmio/álcool isoamílico, na proporção 25:24:1, onde para cada 500µl de produto de digestão foi adicionado 500µl desta mistura. Após ser homogeneizada, cada amostra foi centrifugada a 10.000 x g, 4°C por cinco minutos. A fase superior foi coletada e a esta acrescentou-se 500µl da solução clorofórmio:álcool isoamílico, na proporção 24:1, homogeneizando-se novamente. O material foi novamente centrifugado nas mesmas condições anteriores e a seguir procedeu-se à precipitação do DNA, acrescentando-se 2,5 vezes o volume de etanol 100% gelado (-20°C) e 10% v/v de acetato de sódio 3M pH 5,8, à fase superior. Durante a precipitação, o material foi armazenado a -20°C por 18 horas. Após este período o material foi centrifugado por trinta minutos a 13.000rpm e 4°C, o sedimento foi lavado com 1ml de etanol 70% gelado e centrifugado por cinco minutos a 10.000 x g, a 4°C. O sobrenadante foi desprezado por inversão do tubo e o sedimento foi mantido a temperatura ambiente para secagem. Após completamente seco, este foi ressuscitado com 50µl de água ultra-pura filtrada em Milli-Q (Millipore, Germany), estéril. Após a verificação qualitativa e quantitativa do DNA, empregando-se espectrofotometria (Shimadzu, Japan) com comprimento de onda de 260nm e 280nm, o produto foi congelado a -20°C até o momento do uso. O universo de amostras de DNA foi construído ao longo de cinco anos, a partir de 2000, período no qual as alíquotas foram mantidas congeladas, com eventuais descongelamentos para uso em experimentos, cuja frequência e duração não se tem registro.

3.3 Reações de PCR

Para padronização de cada PCR, todas especificamente desenvolvidas para este trabalho, diferentes concentrações de $MgCl_2$ e temperatura de alinhamento foram testadas, definindo-se a melhor opção de reação em função da qualidade das bandas obtidas. De forma genérica, foram utilizados em todas as reações tampão de reação 1X, $MgCl_2$ ajustado, 0,4 μ l da mistura de dNTPs na concentração 10,0mM, 0,1 μ l (5U/ μ l) da enzima *Taq* DNA Polimerase, 20picomoles dos iniciadores senso e anti-senso, 2,0 μ l de DNA, na concentração entre 10 e 100ng/ μ l e água ultra-pura estéril como veículo q.s.p. 20 μ L. Todos os reagentes, excetuando-se a água, pertencem ao kit "PCR Core System I" (PROMEGA Corporation, EUA).

As PCR foram realizadas em termociclador PT100 (MJ Research Incorporated, EUA), utilizando o seguinte programa: 95°C por cinco minutos – 1 ciclo, seguido de 35 ciclos de 95°C por 30 segundos, temperatura de alinhamento ajustada para cada par de iniciador, seguida de extensão a 72°C por um minuto, terminando com um período de extensão final de 72°C por sete minutos e 4°C até a retirada. Antes das reações, cada microtubo de PCR recebeu duas gotas de óleo mineral estéril como isolante, a fim de prevenir evaporações e manter todos os componentes da reação em equilíbrio.

O produto de cada PCR foi submetido à eletroforese em gel de agarose (Invitrogen Brasil), preparada em concentração variável conforme o objetivo do experimento: para gerar registros fotográficos utilizou-se a concentração de 1,5%, enquanto que para a extração de DNA a partir das bandas utilizou-se a concentração recomendada pelo fabricante do kit de extração (0,8%). Como diluente da agarose utilizou-se solução tampão TBE 1X (tris-borato-EDTA, ácido ethylenodiamino tetraacético). Para a extração de bandas de DNA empregou-se como diluente o tampão TAE 1X (tris-acetato EDTA), conforme a exigência do kit. Após fusão em aparelho de microondas, adicionou-se 2,0 a 6,0 μ l de brometo de etídeo a 10mg/ml, como corante revelador,

dependendo do volume do gel. As corridas eletroforéticas foram realizadas em cuba horizontal de eletroforese (Sub-Cell GT, Bio-Rad Laboratories, EUA), estando os géis imersos em solução tampão TBE 0,5X ou TAE 0,5X, conforme o tampão empregado na agarose. O produto de cada reação foi misturado a 2,0 μ l de tampão de corrida 6X e aplicado no gel. Em cada gel, uma canaleta foi reservada para receber 2,0 μ l de marcador de tamanho molecular de 100pb ou 250pb (Invitrogen, Brasil). O conjunto foi submetido à eletroforese com carga de 100V por um tempo de uma hora, utilizando fonte de energia apropriada (Power-Pac, Bio-Rad Laboratories, EUA). Os géis foram transportados para um aparelho transiluminador e as bandas foram visualizadas sob luz ultravioleta (UV). As imagens foram captadas em aparelho ImageMaster VLS (Amersham Biosciences/GE Healthcare, Suécia), onde foi fotografado sob luz UV.

Cada amostra de DNA foi submetida a um tratamento térmico, previamente a cada PCR, de forma a manter as fitas complementares de DNA parcialmente afastadas entre si, com o objetivo de facilitar a ligação dos iniciadores nos sítios apropriados e reduzir a formação de amplificações inespecíficas, conforme preconizam Chou et al., (1992) e Radstrom et al., (2004). Cada amostra foi diluída 1:1 em água ultrapura estéril e aquecida a 100°C por 10 minutos. Após isto foram resfriadas de forma abrupta em banho de gelo, onde foram mantidas até o momento do uso na PCR.

3.3.1 PCR de β -Actina Bovina

O objetivo da padronização e aplicação da PCR de β -actina bovina foi verificar a integridade do DNA (análise qualitativa) na amostra em condições reais de PCR, além de verificar a existência de quantidade suficiente de DNA para uma PCR adequada (análise semi-quantitativa), mediante a amplificação de parte do gene β -actina bovina, constitutivo do genoma bovino. Antes de proceder aos ensaios de PCR para o BLV, a acessibilidade do DNA em

sistemas de PCR foi testada utilizando-se como normalizador o gene da β -actina bovina. A partir de um universo de 73 amostras de DNA existentes no banco de DNA do Retrolab, foram executadas as PCR para amplificação de parte do gene da β -actina bovina, teste desenvolvido no Laboratório de Microorganismos Intracelulares – LABMIC do ICB/UFMG. Esta PCR amplifica uma porção de 295pb do gene da β -actina, segundo sequência depositada no GenBank (nº de acesso: AY141970). As seqüências dos iniciadores foram selecionadas com o auxílio do programa Oligo Primer Analysis, versão 3.3 (Rychlik e Rhoads, 1989), sendo: iniciador senso 5'-TCACCCACACGGTGCCCATC TATGA-3' e iniciador anti-senso 5'-CAGCGGAACCGCTCATTGCCGATGG-3'. Os iniciadores empregados foram sintetizados na escala de 50nanomoles (Invitrogen, Brasil), sendo diluídos posteriormente para a concentração de 100picomoles como solução estoque. Após padronização, ficou definido como concentração ideal de $MgCl_2$ o valor de 3,0mM. A temperatura de alinhamento foi definida em 65°C por 30 segundos.

3.3.2 Reações de PCR para 5'LTR e *pol* do BLV

A PCR direcionada para a região 5'LTR do BLV amplifica uma porção de 582pb da região 5'LTR do DNA proviral do BLV, segundo sequência depositada no GenBank (nº de acesso: K02120, Sagata et al., 1985b). As seqüências dos iniciadores foram selecionadas com o auxílio do programa Oligo Primer Analysis, versão 3.3 (Rychlik e Rhoads, 1989), sendo: iniciador senso 5' GCCACCGCCCCGTAAACCAG 3' e iniciador anti-senso 5' AGAGACCC AAAATGCCGCGG 3'. Da mesma forma foi selecionado o par de iniciadores para a região final do gene *pol*, sendo o iniciador senso: 5' GACCCCCGTTCCCCCGCTAC 3' e anti-senso: 5' TCGGTTGTGGGCGTC TTCGG 3'. O produto desta amplificação possui 783pb. Os iniciadores empregados foram sintetizados na escala de 50 nanomoles (Invitrogen, Brasil), sendo

diluídos posteriormente para a concentração de 100picomoles como solução estoque.

Diferentes concentrações de $MgCl_2$ foram testadas em ambas as reações de PCR, definindo-se como melhor opção de reação para 5'LTR aquela contendo 1,5mM. Para a PCR *pol*, a concentração do $MgCl_2$ foi ajustada em 2,0mM/ μ l. Volumes de 20,0 μ l/reação até 50,0 μ l/reação foram empregados em ambas PCR, conforme a necessidade do experimento, ajustando-se os componentes proporcionalmente.

Para amplificação da região 5'LTR foi utilizado o programa: 95°C por cinco minutos – 1 ciclo, seguido de 35 ciclos de 95°C por 30 segundos, 61°C por um minuto e 72°C por um minuto, terminando com um período de extensão final de 72°C por sete minutos e 4°C até a retirada. Para amplificação da região *pol*, a seguinte condição de reação foi empregada: 95°C por cinco minutos – 1 ciclo, seguido de 35 ciclos de 95°C por 30 segundos, 58°C por um minuto e 72°C por um minuto, terminando com um período de extensão final de 72°C por cinco minutos e 4°C até a retirada.

3.4 Análise do Polimorfismo de Comprimento de Fragmentos Restringidos (*Restriction Fragment Length Polymorphism* - RFLP) dos Produtos de PCR 5'LTR e *pol* do BLV

As enzimas foram selecionadas a partir do mapa de restrição fornecido pelo programa "WebCutter", disponível no site *BCM Search Laucher* – *Baylor College of Medicine HGSC*, no endereço <http://searchlauncher.bcm.tmc.edu/seq-util/seq-util.html>. Os produtos da PCR para 5'LTR e *pol*, produzidos em volume final de 50 μ l e corridos em gel de agarose a 0,8%, com tampão TAE 0,5X na cuba e 1,0X no gel, foram submetidos a um experimento de restrição enzimática. Uma vez obtida a banda com o tamanho esperado, conforme cada PCR desenhada, esta foi excisada do gel de agarose com auxílio de um bisturi e do transiluminador, tomando-se o cuidado de reter o menor volume de gel possível,

sem perder material de DNA. Cada pedaço de gel de agarose foi acondicionado em microtubo de 1,5ml, pesado para estimação do volume e submetido à extração do DNA.

O processo de extração do DNA do gel de agarose foi efetuado com o uso de kit comercial SNAP gel purification kit (Invitrogen, EUA), conforme instruções do fabricante. As amostras de DNA obtidas foram eluídas em 40µl de água ultra-pura estéril e acondicionadas em microtubos de 1,5ml, conforme orientação do protocolo do kit. Posteriormente o DNA de cada extração foi submetido a um processo de concentração para um volume final de 12µl, por meio da precipitação em 2,5 vezes o seu volume em etanol P.A.100%, mais 10% de acetato de sódio 3M, pH 5,8, por 18 horas a -20°C. Após esta etapa, cada microtubo foi submetido a centrifugação por 30 minutos a 4°C, com força de 10.000 x g. A seguir, o sobrenadante foi desprezado e cada tubo evertido sobre papel toalha, afim de proceder a secagem em temperatura ambiente, após o qual 12µl água ultra-pura estéril foi adicionada.

Para cada amostra submetida ao processo de restrição enzimática, foram destinados os seguintes volumes do DNA: 1,0µl para quantificação subjetiva em gel de agarose, 5,0µl para corrida sem restrição e 6,0µl para uso na reação e posterior corrida. A enzima *SacI* com tampão Buffer J e protocolo de digestão do fabricante (Promega, EUA) foi empregada na RFLP da região 5'LTR. Segundo perfil de restrição obtido *in silico*, são esperados três fragmentos sendo um com 255pb, outro de 230pb e um terceiro de 97pb. Para o fragmento do gene *pol*, foi empregada a enzima *Xho-I* e tampão Buffer D, segundo protocolo do fabricante (Promega, EUA). Segundo análise *in silico* do genoma K02120, o produto de 783pb da PCR *pol*/BLV apresenta apenas um ponto de corte para esta enzima, produzindo dois fragmentos com 437pb e 306pb, respectivamente.

As reações de restrição foram preparadas empregando-se um volume final de 20µl. Para cada reação foram misturados 1,0µl de

enzima, 6,0µl de DNA, 0,2µl de soro albumina bovina (10µg/µl), 2,0µl de tampão de restrição e 10,8µl de água ultra-pura. As condições de reação foram 37°C, por quatro horas. Os produtos de restrição enzimática, assim como os DNAs não digeridos, foram submetidos à eletroforese em gel de agarose a 2,0%, corado com brometo de etídeo, tampão TBE, a 100V por uma hora. A seguir os géis foram fotografados em aparelho ImageMaster (Pharmacia/Pfizer, EUA) e tiveram suas imagens analisadas.

3.5 Sequenciamento Direto dos Produtos de PCR

De 20ng a 100ng de DNA obtido a partir de PCRs de 5'LTR e *POL*/BLV, executadas em volumes finais de 50µl, foram enviados para sequenciamento direto de produto de PCR. Previamente, cada produto de reação das PCRs foi submetido a separação das bandas de DNA em gel de agarose, conforme descrito anteriormente, e as bandas específicas foram extraídas com o auxílio do kit SNAP gel purification (Invitrogen, EUA). A seguir o produto foi concentrado mediante precipitação com etanol 100%, conforme já descrito, e ressuspenso em 15µl de água ultra-pura. O processo de sequenciamento, baseado no método de terminação em cadeia por Dideoxi descrito por Sanger et al. (1977), de diferentes lotes de DNA, foi executado em três laboratórios diferentes: Laboratório de sequenciamento de DNA do BIOAGRO/UFV, Viçosa-MG, Plataforma de Sequenciamento de DNA do CENARGEN/EMBRAPA, Brasília-DF e no Núcleo Aplicado de Genética - NAGE, do ICB/UFMG, Belo Horizonte-MG. No processo foi utilizado o kit *Thermo Sequenase Fluorescent Labelled Primer Cycle Sequencing* (Amersham Life Science, EUA) disponível para o sequenciamento automático nos sequenciadores ALF System (Pharmacia/Pfizer, EUA) e/ou ABI377 (Perkin Elmer Cetus, EUA). Os iniciadores específicos para cada região foram enviados junto com os lotes de amostras, na concentração de 3,2 picomoles/µl. Os resultados dos sequenciamentos senso e anti-senso de cada fita de DNA foram

encaminhados diretamente aos responsáveis, por e-mail, na forma de arquivos gráficos de cromatogramas.

3.6 Análise dos Resultados de Sequenciamento

As seqüências recebidas na forma de arquivo gráfico cromatograma foram abertas com o auxílio do programa Chromas (Technelysium Pty, Austrália) e exportadas para arquivos do WordPad (Microsoft, EUA). A confirmação da especificidade das seqüências obtidas foi confirmada com o auxílio do programa BlastN (Altschul et al. 1990), disponível no sítio do National Institute of Health (NCBI <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>). Este programa também forneceu a informação das seqüências depositadas no GenBank (NCBI) que apresentavam consenso com às seqüências do projeto e que poderiam ser utilizadas em análises filogenéticas. As seqüências confirmadas foram editadas na forma FASTA, com o auxílio do programa Search Launcher (Baylor College of Medicine, <http://searchlauncher.bcm.tmc.edu/seq-util/seq-util.html>), de forma a permitir a alimentação adequada dos demais programas de análises filogenéticas. Para edição das seqüências e remoção das ambigüidades, obtendo o consenso, cada seqüência senso foi alinhada com sua respectiva cadeia anti-senso, com o auxílio do programa MultAlin (Corpet, 1998). Na figura gerada por este programa determinou-se os pontos de dúvida, que foram confrontados nos cromatogramas, com o auxílio do programa Chromas. Após a edição da fita senso de cada amostra seqüenciada, estas foram confrontadas com seqüências modelo disponíveis no GenBank, por meio do programa MultAlin e

novamente os pontos ambíguos foram conferidos nos cromatogramas, de forma a propiciar uma informação consistente e segura do consenso de cada DNA. Uma vez assim editadas, as seqüências geradas foram utilizadas para alimentar os programas ClustalW (Thompson et al., 1998) e MEGA3 (Kumar et al., 2004), com o objetivo de gerar as inferências filogenéticas.

3.7 Inferência Filogenética

As seqüências obtidas referentes às regiões 5'LTR e *POL/BLV*, foram utilizadas na procura de seqüências similares de diversas áreas geográficas mundiais, previamente depositadas no banco mundial de dados gênicos (GenBank), utilizando-se para isso a ferramenta BlastN. A relação de seqüências utilizadas como referência e na geração das árvores filogenéticas para a região 5'LTR encontra-se no quadro 1, e as utilizadas para a região *pol* no quadro 2. A seguir, três conjuntos de seqüências foram criados e submetidos às análises: um conjunto contendo apenas as amostras obtidas no trabalho desta tese, um segundo conjunto agrupando as seqüências obtidas no GenBank e um último grupo contendo ambas. Cada conjunto de DNAs foi alinhado com o auxílio do programa ClustalW, que acompanha o software MEGA3 onde a seguir foram geradas as árvores filogenéticas. Estas foram obtidas utilizando o sistema de geração de árvores filogenéticas Neighbor-Joining (NJ) (Saitou e Nei, 1987), empregando bootstrap de 1000 replicatas e parâmetros de distância evolutiva ajustados pelo método de substituição de nucleotídeos Kimura 2-parâmetros.

Identificação do locus	Número de acesso	País de origem	Tamanho da sequência	Referência bibliográfica
BLVCG	K02120	Japão	8.714	Sagata et al., 1985b
BLVLTR3	K01617	EUA	792	Couez et al., 1984
BLVGPE	D00647	Austrália	7.933	Coulston et al., 1990
BLVLTRA3	K03103	EUA	612	Derse et al., 1985
BOVLTRX1	M12527	Japão	606	Sagata et al., 1984
BLVLTRX2	M19208	Japão	614	Sagata et al., 1984
AF257515	AF257515	Argentina	8.588	Dube et al., 2000

Quadro 1: Identificação, número de acesso e região genômica das seqüências utilizadas na obtenção dos consensos e geração das análises filogenéticas na região 5'LTR/BLV, oriundas do GenBank.

Identificação do locus	Número de acesso	País de origem	Tamanho da sequência	Referência bibliográfica
BLVCG	K02120	Japão	8.714	Sagata et al., 1985b
AF033818	AF033818	EUA	8.419	Coffin et al., 1997
BLVGPE	D00647	Australia	7.933	Coulston et al., 1990
AF257515	AF257515	Argentina	8.588	Dube et al., 2000
BLVGAGA	M10987	EUA	4.680	Rice et al., 1985

Quadro 2: Identificação, número de acesso e região genômica das seqüências utilizadas na obtenção dos consensos e geração das análises filogenéticas na região *pol*/BLV, oriundas do GenBank.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 PCR de Normalização Utilizando Gene β -Actina Bovina

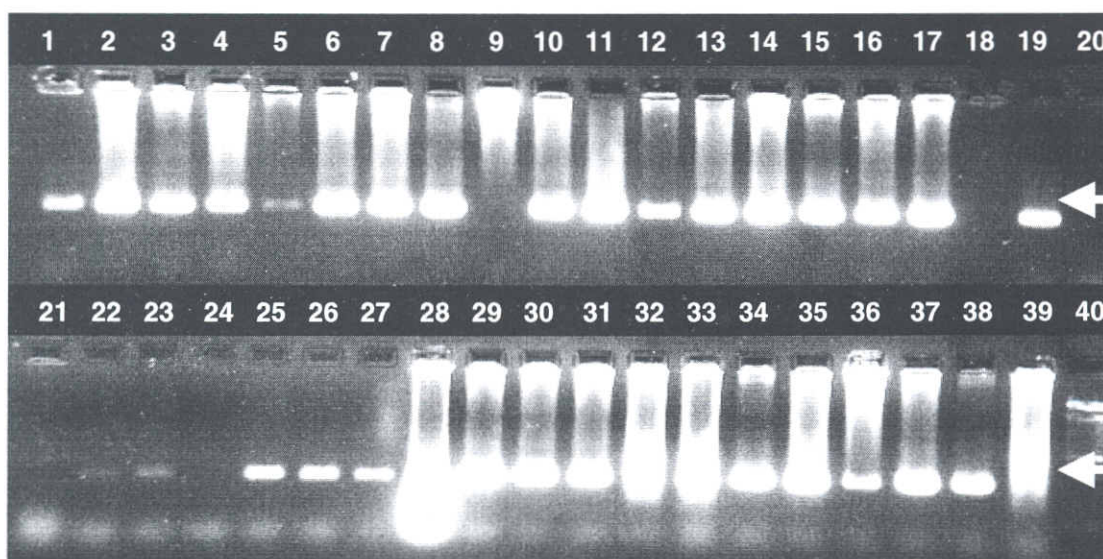
O resultado parcial das amplificações do gene β -actina bovina nas 73 amostras de DNA bovino, componentes do banco de DNA do Retrolab, pode ser observado na figura 6. De acordo com a presença e qualidade da banda de 295pb gerada, a amostra de DNA foi classificada como adequada, duvidosa ou inadequada, e o resultado desta classificação foi disposto no quadro 3. Os parâmetros de presença e intensidade de luminosidade sob luz U.V. das bandas, além da existência ou não de arraste (relativos a degradação de DNA e presença de impurezas), foram os elementos de classificação qualitativa

individual do resultado das amplificações. Após esta avaliação, as amostras consideradas como apresentando condições adequadas totalizaram 63 DNAs, enquanto que duas amostras foram consideradas duvidosas e oito amostras inadequadas.

Além das amostras do banco de DNAs, também foram testados DNAs extraídos de culturas de células FLK (Fetal Lamb Kidney – contendo o DNA proviral de BLV, amostra americana FLK, cedida gentilmente pelo Laboratório Nacional Agropecuário-LANAGRO/MG/MAPA) e MDBK (Mardin-Darby Bovine Kidney – ATCC CCL-122), gentilmente cedidas pelo Laboratório de Vírus do DMVP/EV/UFMG.

Local de Procedência	Amostra adequada	Amostra duvidosa	Amostra inadequada	Total por procedência
Pedro Leopoldo – MG	36	**	**	36
Coronel Pacheco – MG	05	**	03	08
Londrina – PR	16	01	01	18
Corumbá – MS	06	01	04	11
Total por classificação	63	02	08	Total geral: 73

Quadro 3: Classificação da qualidade do DNA de amostras do banco de DNA do Retrolab, utilizando PCR normalizadora direcionada para amplificação de parte do gene da β -Actina Bovina, e sua distribuição em função do local de procedência.



Legenda da figura 6:

Canaleta	Amostra	Canaleta	Amostra	Canaleta	Amostra	Canaleta	Amostra
1	01-linfos	11	33-herm	21	FLK	31	195vera
2	01-aneti	12	23-M	22	150	32	2480
3	03	13	40-afile	23	153	33	7504
4	16-conta	14	54-vilma	24	154	34	96253
5	17-antje	15	74-gessy	25	155	35	3563
6	19-silvia	16	92-touro	26	156	36	Rochedo
7	19-blesje	17	97-blesje	27	160	37	9104
8	20-blesje	18	Vazia	28	07	38	141
9	28-pietje	19	117-PM04	29	147-antje	39	8824
10	30-irene	20	138	30	172	40	P.T.M. ^(*)

(*)P.T.M. = padrão de tamanho molecular

A seta indica a posição das bandas amplificadas, com tamanho de 295pb.

Figura 6: Perfil de migração em gel de agarose dos produtos de amplificação do gene da β -actina bovina, 295pb, a partir de algumas das amostras de DNA componentes do banco de DNAs do Retrolab/EV/UFGM, para ilustração dos diferentes comportamentos de amplificação.

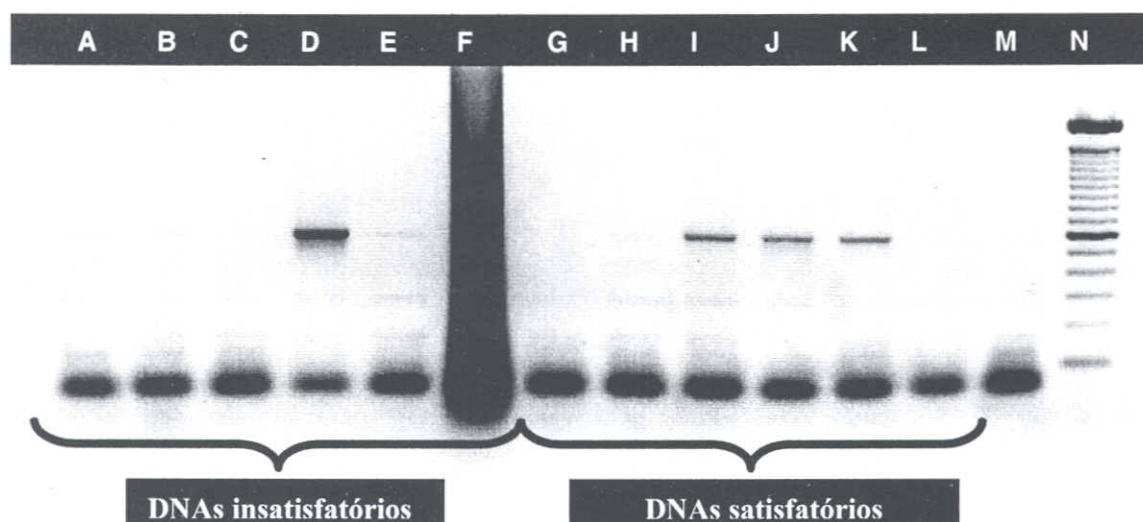
Houve amplificações satisfatórias (canaletas 25, 26 e 27, por exemplo) e insatisfatórias, tais como a não amplificação (canaletas 22 e 24), amplificação com arrasto (canaleta 28), degradação de DNA (canaleta 32, 33 e 39) e amplificações fracas (canaleta 5). O resultado observado na canaleta 21, amostra FLK persistentemente infectada por BLV, demonstrou que o DNA não se encontrava em condições apropriadas. O mesmo material, quando submetido a PCR para região 5'LTR/BLV, também não produziu amplificação satisfatória, o que deveria ocorrer já que se trata de DNA de células persistentemente infectadas pelo BLV. Apesar de ser de origem ovina, havia a expectativa de amplificação do gene β -actina bovina a partir do genoma da FLK, haja vista dados de literatura que apontam um elevado grau de conservação neste gene entre os vertebrados (Bellis et al., 2003, Tao et al., 2004). De fato, ao submeter amostra de DNA distante evolutivamente dos bovinos, oriundo de *Cyprinus carpio* (carpa comum), a PCR de β -actina bovina produziu amplificação, demonstrando a veracidade desta informação. Desta forma, concluiu-se que seria necessário novo procedimento de extração de DNA desta linhagem celular, para os experimentos posteriores. Nas canaletas 79 e 89 estão os produtos de amplificação a partir do genoma de células MDBK, que atuaram como controle positivo da reação e que apresentam um padrão visual consistente de amplificação, obtido em ambas reações.

4.2 Experimento de Comparação de Desempenho Entre a PCR de Normalização Utilizando Gene β -Actina Bovina e a PCR Para Região 5'LTR do BLV

Os resultados observados para os DNAs de FLK e MDBK corroboram a expectativa de

que a PCR para amplificação do gene normalizador, aqui utilizando o codificador da β -actina bovina, é uma ferramenta útil na triagem qualitativa de amostras. A fim de confirmar esta correlação nas amostras extraídas dos bovinos, um experimento de PCR foi executado, empregando a PCR de amplificação da região 5'LTR/BLV. Foram comparadas a amplificação dos DNAs das amostras FLK "antiga", 150, 153, 28pietje, 1715 e 07, todas com desempenho insatisfatório na PCR da β -actina bovina (canaletas 21, 22, 23, 9, 86 (esta não presente na figura 6) e 28, respectivamente) com a amplificação das amostras MDBK, FLK "nova", 387, 20blesje, 842 e 157S03, todas com padrão de amplificação adequado (fotos dos géis não incluídos). Os resultados estão ilustrados na figura 7.

Os resultados observados na figura 7 mostram que, das seis amostras consideradas insatisfatórias frente a PCR de β -actina bovina, apenas uma produziu amplificação satisfatória na PCR para 5'LTR/BLV (canaleta D, 28pietje), enquanto que outras três (FLK "antiga", 150 e 1715, canaletas A, B e E, respectivamente), produziram bandas muito tênues. A amostra 153 (C) não amplificou e a amostra 7 (F) produziu o mesmo padrão de arrasto, compatível com a situação de degradação do DNA, que foi observado na PCR de β -actina bovina.



Legenda da figura 7:

Amostras insatisfatórias FLK "antiga"(A), 150(B), 153(C), 28pietje(D), 1715(E) e 07(F).

Amostras satisfatórias MDBK (G), FLK "nova"(H), 387(I), 20blesje(J), 842(K) e 157S03(L).

M = controle de Mix.

N = padrão de tamanho molecular, 100pb.

Figura 7: Perfil de migração em gel de agarose das bandas da PCR para 5'LTR/BLV, amplificadas partir de DNAs com resultados de amplificação considerados insatisfatórios ou satisfatórios frente a PCR de β -actina bovina. Imagem negativa para facilitar a identificação visual de bandas.

Em contraposição, das seis amostras consideradas satisfatórias na PCR de amplificação do gene bovino, três apresentaram resultados positivos para PCR 5'LTR/BLV - 387(I), 20blesje(J), 842(K) e uma, FLK "nova"(H) produziu uma amplificação muito tênue. A amostra 157S03 não amplificou. A amostra MDBK não poderia amplificar por não ser portadora do DNA proviral (controle negativo). Conclui-se, portanto, que das sete amostras consideradas insatisfatórias, apenas uma (14,3%) apresentou resultados satisfatórios em outra reação de PCR. Já entre os DNAs satisfatórios, três em cinco (60%) obtiveram bom desempenho. É importante mencionar que as amostras 150 e 153 pertencem ao grupo de DNAs oriundos de Corumbá - MS que, de maneira geral, apresentou desempenho de amplificação insatisfatório em todos os experimentos, o que explica o baixo índice de seqüenciamento com

sucesso de amostras dessa reação (apenas a amostra 160S03 pode ser seqüenciada em sua porção LTR).

A amplificação por PCR de fragmentos de genes constitutivos do genoma de bovinos já foi empregada na pesquisa do BLV. Rasmussen et al. (1991), empregando o gene da kappa-caseína como alvo, e Mirsky et al. (1993), que utilizou o gene da prolactina, padronizaram PCRs de amplificação de genes constitutivos ou normalizadores, com vistas a inferências quantitativas, já que o número de cópias destes genes no genoma são conhecidos. O gene da β -actina bovina é constitutivo do genoma bovino e se apresenta em duas cópias (Suchyta et al., 2003), com um elevado nível de conservação intra e interespécies de mamíferos (Bellis et al., 2003; Tao et al., 2004), o que o caracteriza como modelo adequado para a análise proposta.

Os resultados obtidos no presente experimento são a primeira descrição do uso de PCR direcionada para este gene de bovinos, com vistas a inferências da existência e viabilidade de DNA nas amostras estocadas. Este tipo de análise é útil quando existem dúvidas quanto à viabilidade de uma amostra de DNA, em termos de acessibilidade em sistemas de PCR. Vários são os motivos que podem levar a estas dúvidas, destacando-se a ausência de informações precisas sobre a qualidade do processo de obtenção da mesma, tempo de estoque prolongado, intercorrência de acidentes no processo de obtenção e conservação e dificuldade de processamento rápido de materiais colhidos a campo. Além de fatores relacionados à obtenção do DNA, a presença de inibidores da enzima *Taq* DNA polimerase também pode interferir no sucesso de amplificação. São relacionados como fatores inibidores os contaminantes biológicos sangue, urina, muco, esperma, fezes e outros fluidos corpóreos presentes na amostra, além de resíduos químicos tais como etanol, formol e parafina (Panaccio e Lew, 1991; Wolk et al., 2001). Normalmente, quando se observam resultados negativos de amplificação em experimentos envolvendo amplificação de DNA, especialmente na fase de padronização da reação, são feitas novas

tentativas antes de se chegar à conclusão de que o DNA está apresentando problemas. Tal fato pode ser evitado com a aplicação preliminar deste tipo de PCR direcionada para gene constitutivo ou normalizador.

4.3 PCR Para Região 5'LTR do BLV

A PCR desenvolvida para a amplificação da região 5'LTR do BLV foi padronizada com o objetivo de permitir posteriores estudos sobre a variabilidade gênica nos produtos amplificados a partir das amostras brasileiras do BLV. A existência de várias seqüências dentro desta região, que estão relacionadas com a atividade de transcrição do vírus, justifica esta investigação. Por outro lado, a existência de poucas informações sobre a 5'LTR do BLV de amostras latino-americanas enfatizam esta justificativa, havendo apenas um depósito de seqüência relativa a esta região no GenBank (AF257515).

Esta PCR foi aplicada em 51 DNAs do banco do Retrolab, apresentando um sucesso de amplificação em 74,5%. O quadro 4 apresenta um detalhamento dos resultados obtidos, frente a origem das diversas amostras.

Local de procedência	Resultado positivo	Resultado negativo	Total/ origem	% de positivos
Pedro Leopoldo – MG	19	9	28	68
Londrina – PR	10	0	10	100
Coronel Pacheco – MG	4	0	4	100
Corumbá - MS	4	3	7	57
FLK	1	1	2	50
Totais analisados	38	13	51	74,5

Quadro 4: Frequência de resultados positivos e negativos da PCR para região 5'LTR do BLV, segundo origem do DNA

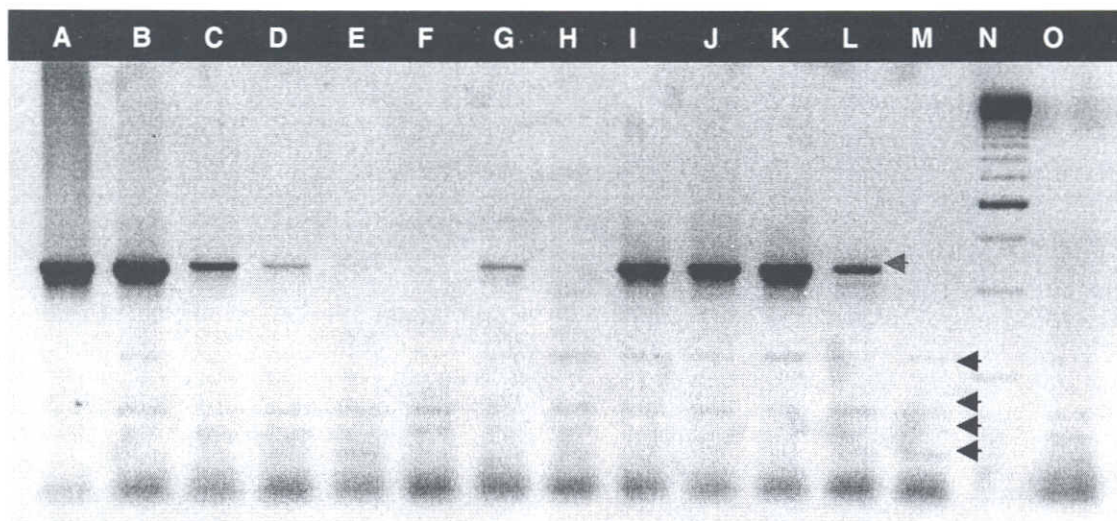
O produto esperado nesta reação, segundo genoma depositado no GenBank com o número de acesso K02120, consiste em um fragmento de 582pb, iniciado-se na posição -181 e se estendendo até a posição 401, tomando-se como referência de posição 1 a primeira base situada na região mais

proximal dentro da sub-região U da LTR. Desta forma, o produto cobre 500 bases do total de 530 bases descritas no genoma K02120, sendo 86% da sub-região U3, 100% da sub-região R e 100% da sub-região U5, se estendendo mais 82 bases na seqüência a montante do gene *gag*. A

última base situa-se 15 posições a montante do código de iniciação (start códon) de *gag* (atg). Este produto abrange 94,3% do total de 5'LTR.

Do total de 51 DNAs submetidos a PCR 5'LTR/BLV, ao final do processo foram

obtidas 22 seqüências cujo tamanho médio é de 529pb (91% do total esperado), variando de 429pb (73,7%) a 572 (98,3%). Todas as seqüências estão relacionadas e identificadas no anexo 2. A figura 8 apresenta os resultados de amplificação da PCR 5'LTR/BLV em 13 amostras de DNA oriundas do banco do Retrolab/EV/UFG.



Legenda da figura 8: Canaletas A, B, C, D, E, F, G, H, I, J, K, L, M: Amplificação das amostras 54vilmaLDPR, 74gessyLDPR, 92touroLDPR, 155CRMS, 156CRMS, 157CRMS, 160CRMS, 01linfosCPMG, 141PLMG, 1749PLMG, 1751PLMG, 991PLMG e 977PLMG, respectivamente.

Canaleta N: padrão de tamanho molecular de 250pb.

Canaleta O: controle de mix.

Setas pretas: bandas consideradas inespecíficas, assinaladas na última canaleta de amostras.

Figura 8: Perfil de migração em gel de agarose das bandas com 582pb, amplificadas por meio da PCR 5'LTR/BLV, executada em 13 amostras de DNA bovino oriundas do banco de DNA do Retrolab/EV/UFG. Imagem negativa para facilitar a identificação visual de bandas.

Analisando a figura 8 é possível observar que nove das treze amostras apresentaram amplificação consistente (canaletas A, B, C, D, G, I, J, K e L). A amostra da canaleta E amplificou, mas de forma fraca. As amostras 157CRMS (F) e 01linfos (H) apresentaram um discreto contorno no tamanho esperado. Possivelmente, se o produto destas PCR fosse submetido a um sistema mais sensível como a eletroforese em gel de poliacrilamida (Sambrook et al., 1989), haveria a visualização de banda. Apenas a amostra da canaleta M não apresentou

qualquer vestígio de banda na posição esperada.

É interessante notar que as amostras oriundas de Corumbá-MS, que haviam apresentando um conjunto de resultados menos satisfatório na PCR de normalização do gene da β -actina bovina, também apresentaram um sinal de amplificação mais fraco na PCR para a região 5'LTR do BLV (canaletas D, E, F e G), reforçando a associação entre os resultados de uma PCR de gene normalizador e outros tipos de PCR, quando aplicadas no mesmo DNA.

Outro dado interessante observado na figura 8 é que a amostra 01-linfossarcoma apresentou um sinal muito fraco de amplificação da região 5'LTR (canaleta H), o que também foi observado nos experimentos subsequentes de produção de DNA para seqüenciamento. Esta fraca amplificação pode estar correlacionada com uma menor disponibilidade de DNAs molde no material extraído de tecido neoplásico, o que é o caso específico desta amostra, uma vez que a literatura menciona a ocorrência de aproximadamente 25% de DNAs provirais de BLV defectivos nas células tumorais, além da ausência de material genético viral em parte das células neoplásicas (Burny et al., 1988)

Os DNAs que foram amplificados e posteriormente seqüenciados a partir desta PCR mostraram-se específicos para BLV, após submissão ao programa BlastN (relação de seqüências integrais disponíveis no anexo 2). Estes resultados demonstram que esta PCR atendeu aos objetivos primários de geração de DNA para seqüenciamento, produzindo resultados positivos entre os animais de todas as quatro unidades amostrais. A grande cobertura da região foco 5'LTR, propiciada pelo local de ligação dos iniciadores escolhidos, torna esta PCR apropriada para análise moleculares do BLV. Entretanto, sua sensibilidade diagnóstica foi relativamente baixa, não atingindo 75% no conjunto das amostras testadas e nas condições de qualidade de DNA que se apresentaram. Este índice está muito aquém da sensibilidade diagnóstica apresentada pela técnica sorológica de IDGA ou ELISA, cuja especificidade é de 100% e a sensibilidade varia de 93,4% para a IDGA a 100% do teste ELISA (Camargos, 2005). Possivelmente a aplicação de um sistema semi-nested ou nested PCR ao produto desta reação tenderão a elevar esta sensibilidade, talvez permitindo seu uso mais eficiente na detecção de animais infectados. Estas possibilidades não foram alvo de investigação neste trabalho.

Saah e Hoover (1997) diferenciam o dueto sensibilidade/especificidade *analítico* de um sistema diagnóstico, da sensibilidade/especificidade *diagnóstico* do mesmo teste. Estes autores demonstram que um sistema pode apresentar uma excelente capacidade de detectar pequenas quantidades de uma substância em uma amostra (como o caso da PCR, detectando DNA), apresentando excepcional sensibilidade analítica sem, no entanto, apresentar uma boa sensibilidade diagnóstica, ou seja, sem ser eficiente em detectar um número satisfatório de indivíduos portadores de um agente, dentre aqueles infectados. Esta aparente discrepância está justificada por fatores intrínsecos e extrínsecos da PCR. De forma intrínseca a PCR é um teste com elevada sensibilidade analítica, entretanto elementos externos presentes na amostra e o tipo de DNA podem reduzir a eficiência desta técnica. Dentre os fatores extrínsecos, destacam-se os elementos inibidores de PCR, tais como sangue, secreções e resíduos químicos do processo de extração do DNA, que poderiam estar presentes nas amostras cujo resultado foi negativo. Por outro lado, o DNA presente pode ter sido degradado pela presença de nucleases, tornando um resultado outrora positivo em negativo.

4.4 PCR para Região *pol* do BLV

A PCR desenvolvida para a amplificação da região gênica *pol* do BLV foi padronizada, da mesma forma que a PCR para 5'LTR, com o objetivo de permitir posteriores estudos sobre a variabilidade gênica nos produtos amplificados a partir das amostras brasileiras do BLV.

A PCR *pol*/BLV foi aplicada em 33 DNAs do banco do Retrolab e no DNA de FLK, obtendo 53% de sucesso de amplificação. O quadro 5 apresenta um detalhamento dos resultados obtidos, frente a origem das diversas amostras.

Local de procedência	Resultado positivo	Resultado negativo	Total/ origem	% de positivos
Pedro Leopoldo – MG	2	5	7	28,5
Londrina – PR	9	1	10	90
Coronel Pacheco – MG	4	4	8	50
Corumbá - MS	2	5	7	16,7
FLK	1	1	2	50
Totais analisados	18	16	34	53

Quadro 5: Frequência de resultados positivos e negativos da PCR para região *pol*/BLV, segundo o local de origem do DNA.

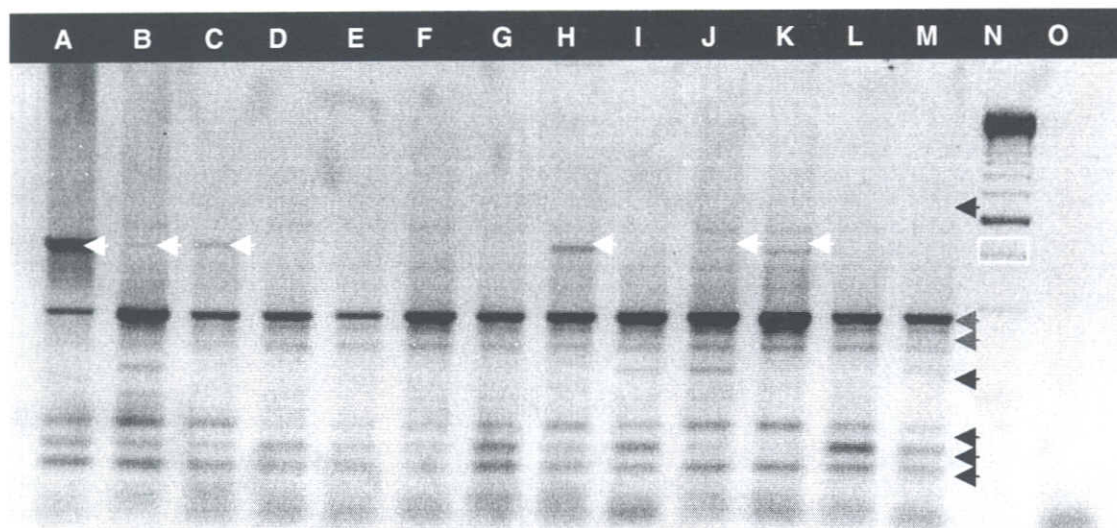
O produto esperado nesta reação, segundo genoma depositado no GenBank com o número de acesso K02120, consiste em um fragmento de 783pb, iniciado-se na posição 4.077 e se estendendo até a posição 4.860, 39 posições a montante do início do gene *env*. Devido a ausência de informação sobre o ponto exato de início de transcrição da Integrase IN, não é possível saber se o produto gerado por esta PCR cobre toda esta região gênica. Entretanto, levando em consideração que esta equivale a aproximadamente ao terço final do gene *pol* e que os iniciadores selecionados amplificam 783pb (32,5% do total de *pol*) de sua porção final, acredita-se que o produto gerado compreenda a maior parte, senão toda, a região codificadora da IN do BLV.

Os DNAs que foram amplificados e posteriormente seqüenciados a partir desta PCR mostraram-se específicos para BLV, após submissão ao programa BlastN, o que atesta a especificidade do produto gerado com tamanho de 783pb. Este dado associado a grande cobertura da região de transcrição da IN, propiciada pelo local de ligação dos iniciadores escolhidos, torna esta PCR apropriada para análise moleculares do BLV em parte do gene *pol*.

Entretanto, durante a execução dos experimentos observou-se uma elevada

frequência de bandas maiores e, principalmente, menores que o tamanho esperado. Estas bandas, embora não tenham sido seqüenciadas, foram consideradas como inespecíficas. A figura 4 mostra o produto de reação da PCR *pol*/BLV, aplicada em 13 amostras do banco de DNA do Retrolab/EV/UFGM.

Analisando os resultados demonstrados na figura 9, é possível observar que as amostras das canaletas D, E e F não produziram bandas específicas. Este resultado era esperado, pois estas amostras também não apresentaram resultado satisfatório na PCR de β -actina bovina. Paradoxalmente, houve exuberante amplificação inespecífica nestas amostras, assim como nas demais. Uma possível explicação para este tipo de amplificação inespecífica seria a existência de fragmentos truncados de genomas de retrovírus inseridos ao longo do genoma celular, um fato bem caracterizado no genoma humano e de outros primatas (Yi et al., 2003). No genoma bovino, Streeck (1982) relata a ocorrência de repetições de seqüências compatíveis com LTR de retrovírus dentro do genoma celular, porém não existem relatos de seqüências de genes *pol* de retrovírus endógenos em genoma bovino.



Legenda da figura 9: Canaletas A, B, C, D, E, F, G, H, I, J, K, L, M: Amplificação das amostras 54vilmaLDPR, 74gessyLDPR, 92touroLDPR, 155CRMS, 156CRMS, 157CRMS, 160CRMS, 011infosCPMG, 141PLMG, 1749PLMG, 1751PLMG, 991PLMG e 977PLMG, respectivamente. Canaleta N: padrão de tamanho molecular de 250pb.

Canaleta O: controle de mix.

Setas brancas: bandas condizentes com o tamanho esperado.

Setas pretas: bandas consideradas inespecíficas, assinaladas na última canaleta de amostras.

Caixa branca: banda de referência no padrão de tamanho, com 750pb

Figura 9: Perfil de migração em gel de agarose das bandas com 783pb, amplificadas por meio da PCR *POL/BLV*, executada em 13 amostras de DNA bovino oriundas do banco de DNA do Retrolab/EV/UFGM. Imagem negativa para facilitar a identificação visual de bandas.

A PCR *pol/BLV* apresentou um sucesso de amplificação de apenas 53% nas 33 amostras analisadas. Um resultado próximo a este pode ser observado também na figura 9, onde seis amostras amplificaram, dentre as 10 esperadas, descontando-se as três amostras discutidas no parágrafo anterior. Este resultado, quando interpretado sob a ótica do diagnóstico, caracteriza uma sensibilidade diagnóstica relativamente baixa. Da mesma forma que para a PCR 5'LTR, a aplicação de um sistema semi-nested ou nested PCR ao produto desta reação possivelmente tenderão a elevar esta sensibilidade, talvez permitindo seu uso mais eficiente na detecção de animais infectados. Entretanto

estas possibilidades não foram alvo de investigação neste trabalho.

Do total de 34 DNAs submetidos a PCR *pol/BLV*, ao final do processo foram obtidas cinco seqüências cujo tamanho médio é de 718pb (91,7% do total esperado), variando de 711 bases (90,8%) a 748 bases (95,5%). Todas as seqüências estão relacionadas e identificadas no anexo 3. Em virtude de dificuldades durante o processo de seqüenciamento, dois outros grupos de DNAs seqüenciados, contendo dois e três DNAs, respectivamente, foram gerados, contendo seqüências truncadas. No primeiro grupo, denominado "truncadas 345", estão as seqüências 922PLMG e rochedoLDPR, ambas apresentando tamanho de 345pb

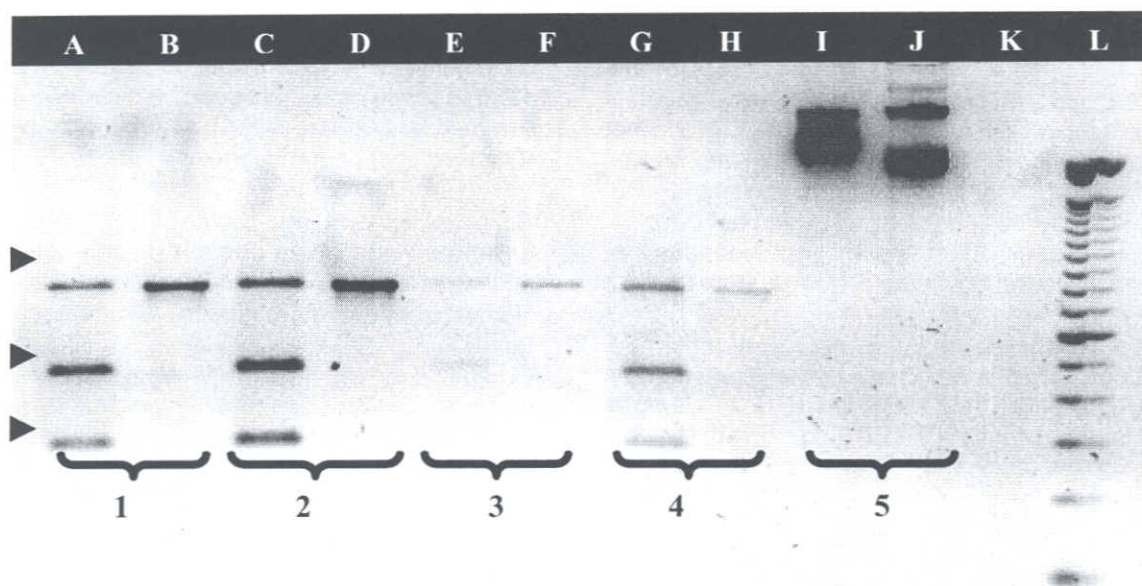
(44% do total esperado). No segundo grupo, denominado "truncadas 230", estão as amostras 20blesjeLDPR, 195veraLDPR e 97blesjeLDPR, apresentando 230 bases (29,4% do total esperado). As seqüências "truncadas 345" estão relacionadas e identificadas no anexo 4. As seqüências "truncadas 230" estão relacionadas e identificadas no anexo 5.

4.5 Análise do Polimorfismo de Comprimento de Fragmentos Restringidos (*Restriction Fragment Length Polymorphism* - RFLP) dos Produtos de PCR *pol* do BLV *In Vitro*.

Conforme demonstrada na figura 8, a PCR *pol*/BLV apresentou o inconveniente problema de geração de muitas bandas inespecíficas, o que acarretou insegurança quanto à especificidade das bandas no tamanho compatível com 783pb. Com o objetivo primário de se certificar que o produto gerado era o esperado, foi aplicado um teste de avaliação do perfil de restrição enzimática no produto de PCR *pol*/BLV. A técnica de RFLP possui ampla aplicação nos campos de epidemiologia molecular, genética médica, produção de organismos geneticamente modificados, diagnóstico clínico, peritagem forense e oncologia. Em termos de diferenciação de genótipos virais, a RFLP consiste numa ferramenta

reconhecidamente útil na avaliação do grau de polimorfismo em retrovírus (Aires et al. 1999), tendo sido aplicado em lentivírus (Holguin e Soriano, 1998) e deltaretrovírus (Gessien et al., 1996; Heneine, 1996).

A investigação de sítios de restrição enzimática nos DNAs poderia revelar algum polimorfismo, útil na análise filogenética. Nesse sentido o resultado da restrição também poderia indicar alguma variabilidade na região IN do vírus BLV, embora para tal seria interessante a aplicação de múltiplas enzimas e a análise dos produtos de digestão em gel de poliacrilamida, o que não foi feito *in vitro*, apenas *in silico*, a partir da informação oferecida pelas seqüências obtidas no seqüenciamento. Para esta restrição foi usada a enzima Xho-I, cujo sítio de restrição foi encontrado em um ponto no fragmento esperado da PCR, na seqüência de referência, K02120. A partir desta análise se esperava a produção de duas bandas visíveis, produto do corte enzimático entre as posições 476 e 477, gerando bandas com tamanhos de 476pb e 307pb. A figura 10 apresenta o resultado da RFLP aplicada no produto purificado de PCR *POL*/BLV, compatível com o tamanho de 783pb, nas amostras 17antjeLDPR, 01linfosCPMG, 96253CPMG, 926PLMG e 991PLMG.



Legenda da figura 10:

Canaletas A, C, E, G, e I, amostras restringidas por Xho-I.

Canaletas B, D, F, H, e J, amostras sem restrição.

Chaves: 1 = 17antjeLDPR; 2 = 01linfosCPMG; 3 = 96253CPMG; 4 = 991PLMG.

5 = plasmídio pBluescript (Stratagene, EUA)

Canaleta K: controle de mix.

Canaleta L: padrão de tamanho molecular de 100pb.

Setas: proximal aos poços = 783pb; intermediária = 476pb; distal = 307pb.

Figura 10: Perfil de migração em gel de agarose de produto de restrição enzimática de DNA: RFLP de confirmação de produto purificado da PCR *pol/BLV*, em amostras do banco de DNA do Retrolab. Imagem negativa para facilitar a identificação visual de bandas.

A figura 10 demonstra que as amostras 17antjeLDPR, 01linfosCPMG, 96253CPMG e 991PLMG apresentaram um perfil de restrição enzimática frente à enzima Xho-I perfeitamente compatível com a restrição *in silico* feita na sequência de referência K02120, produzindo duas bandas visíveis na agarose com os tamanhos esperados. Uma posterior análise da região de corte de Xho-I nas amostras seqüenciadas de IN, com o auxílio da imagem gerada pelo programa MultAlin (amostras 17antjeLDPR,

01linfosCPMG, 991PLMG e 96253CPMG), indicou que, ao menos nestas cinco amostras, as posições alvo do corte desta enzima (seqüência senso = $C^{\nabla}TCGA\ G$ e seqüência anti-senso = $G\ AGCT^{\Delta}C$, segundo informações do fornecedor da enzima, PROMEGA – EUA) são posições totalmente conservadas conforme ilustra a figura 11, não existindo uma tendência de ocorrência de mutações nesta região. Isto justifica a linearidade dos resultados obtidos neste experimento.

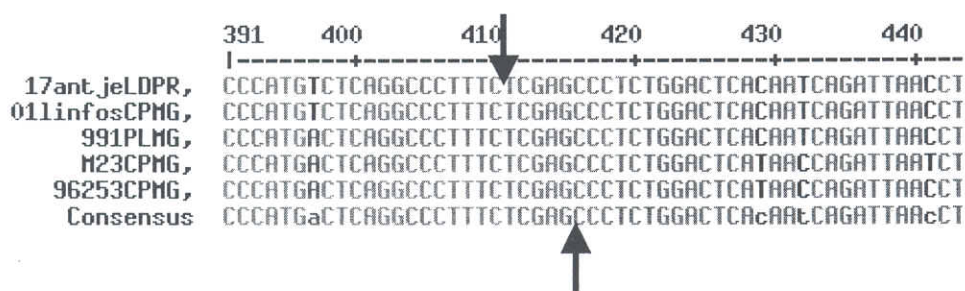


Figura 11: Ilustração da região de corte da enzima Xho-I no genoma de cinco amostras seqüenciadas no presente projeto, dentro da região IN do gene *pol*. As setas indicam as bases imediatamente antes (acima) e após (abaixo) o corte de Xho-I. Ilustração obtida a partir da imagem gerada no programa MultAlin.

4.6 Estudos da Variabilidade Genética do Vírus BLV e Inferências Filogenéticas, A Partir da Região 5'LTR.

Das 51 amostras que amplificaram o fragmento de 582pb da região 5'LTR, 37 foram submetidas ao processo de purificação de bandas com o kit SNAP gel purification (Invitrogen, EUA). O produto DNA desta extração teve sua concentração aferida e ajustada conforme as exigências dos prestadores do serviço de seqüenciamento (BIOAGRO/UFV, Viçosa-MG, para as 13 primeiras seqüências e CENARGEN/EMBRAPA, Brasília-DF, para as restantes nove). A seguir cada amostra foi enviada, acompanhada da quantidade adequada dos respectivos iniciadores senso e anti-senso, congeladas.

Das 37 amostras submetidas foi possível obter o seqüenciamento de 22. O resultado deste processo está explicitado no anexo 2, onde se encontram alinhadas as seqüências na sua forma bruta (sem cortes), por meio do programa MultAlin. As amostras analisadas com sucesso retornaram na forma de arquivos de cromatograma, que foram explorados com o auxílio do programa Chromas e de onde se exportou as seqüências na forma de arquivo de texto (WordPad). Cada amostra de DNA foi seqüenciada nos sentidos senso e anti-senso, de forma a gerar dois arquivos de cromatograma e, portanto, dois de texto. A seguir cada arquivo foi editado para

remoção das extremidades não aproveitáveis, e o arquivo da seqüência anti-senso foi convertido em senso (ação reversa e complementar), com o auxílio do programa Search Launcher. Com as duas seqüências na forma senso para cada DNA, procedeu-se o alinhamento de ambas com o auxílio do programa MultAlin, de forma a permitir a caracterização das ambigüidades e divergências entre elas. Estas foram corrigidas pela edição da seqüência senso, mediante conferência acurada das posições duvidosas no respectivo arquivo do cromatograma. Havendo necessidade, em caso de não esclarecimento, novo alinhamento foi procedido, desta vez acrescentando-se a seqüência de referência (K02120, Sagata et al., 1985b). Desta forma se produziram seqüências com alta fidelidade.

Após o alinhamento das 22 seqüências senso editadas e corrigidas no programa MultAlin, definiu-se um ponto de corte a montante e a jusante em cada cadeia de DNA, de forma a permitir o completo alinhamento da maior parte possível de todas elas. Isto é um pré-requisito do programa de geração das análises filogenéticas, MEGA3, onde todas as amostras devem ter o mesmo tamanho, excetuando-se as possíveis subtrações ou adições naturais do DNA analisado.

Nesta etapa obteve-se um alinhamento do tamanho de 421pb para cada amostra

(tamanho observado no DNA referência), que constituiu os dados que alimentaram as análises posteriores. Em relação à sequência K02120, o melhor ponto de corte consensual a montante localizou-se na posição -118, dentro da região U3, mantendo-se esta última base na sequência. O melhor ponto de corte consensual a jusante situou-se na posição 303, dentro da região U5, mantendo-se esta última base na sequência. Desta forma, as sequências obtidas não corresponderam a porção integral da região 5'LTR do DNA proviral do BLV, sendo possível a análise de 79,4% desta. O segmento -118 a 303 representa 56% de U3, 100% de R e 82,5% de U5. Em relação ao produto esperado na PCR para esta região, houve a possibilidade de análise de 72,5% de seus nucleotídeos.

Com o auxílio do programa ClustalW, incluído dentro do programa MEGA3, as 22 amostras tiveram a porção -118 a 303 de 5'LTR alinhadas, utilizando-se mais uma vez a sequência K02120 como consenso. O produto deste alinhamento encontra-se na figura 12.

As análises obtidas indicam um elevado grau de conservação entre todas as 22 amostras. Foram observadas 394 posições conservadas dentro das 423 analisadas, perfazendo 93,1%. Já as posições variáveis representaram 6,85% do total, 29 em 423 posições. Destas, apenas 17 foram consideradas pelo programa MEGA3 como informativas de parsimônia, sendo empregadas na construção das árvores filogenéticas. A mutação predominante encontrada nestas posições é a substituição, ocorrendo 22 vezes. A transição ocorreu em sete posições, subtrações em quatro e adições em duas, perfazendo um total de 35. A diferença entre o número de posições observadas no alinhamento e aquele fornecido pelo programa MEGA3 se deve ao fato deste último não computar as alterações que ocorrem em apenas uma sequência.

Uma constatação importante se estabeleceu ao se fazer a análise da região R-U5. Dentro desta região, um segmento de 88pb, iniciando-se na posição 220 e terminando na posição 308 (posição 102 a 190 do genoma de referência K02120) concentrou

uma grande frequência de mutações. Neste segmento, que representa apenas 20,8% do total investigado e apenas 16,7% da LTR, foram contabilizadas duas adições, sete substituições, duas subtrações e três transições, perfazendo um total de 14 posições variáveis, ou seja, 40% de todas as posições variáveis observadas (total de 35).

Esta informação é muito relevante, pois poder estar diretamente relacionada com a regulação da transcrição do BLV, especialmente a transcrição na fase independente de Tax, ou seja, aquela que ocorre nos momentos iniciais da replicação na célula, onde o genoma ainda não foi suficientemente transcrito para gerar esta proteína em quantidades suficientes para promover o fenômeno de transativação, característico dos retrovírus de genoma complexo. A região mais variável observada nas amostras brasileiras abriga o núcleo das sequências conhecidas como DAS, sequências ativadoras a jusante (Kiss-Tóth e Unk, 1994). Derse e Casey (1986), utilizando sistemas de clones plasmidiais, observaram o poder de estimulação da transcrição em células transfectadas por clones contendo fragmentos de 5'LTR do BLV e haviam demonstrado que ambas as regiões a jusante e a montante do ponto inicial do RNA viral do BLV (base um de R), quando na sua forma de DNA proviral, continham sequências que atuavam como promotoras da transcrição deste vírus e que ambas podiam atuar de forma independente. Ao estudar a metade distal da região 5'LTR do BLV, Kiss-Tóth e Unk (1994) demonstraram que as DAS são caracterizadas por apresentar duas partes estreitamente correlatas (DAS 1 e 2) e que ocupam sub-regiões semi-sobrepostas dentro da região R da 5'LTR do BLV, compreendendo um fragmento de 64pb que se inicia na posição 142 e avança até a posição 206 na porção médio distal de R. Por meio de sistemas de transcrição transientes em células transfectadas, utilizando diferentes clones mutantes contendo as DAS, estes autores também concluíram que ambas sequências podem estimular a transcrição de forma independente, mas que sua atuação conjunta apresenta efeito sinérgico.

```

[
[
1 11111111112 22222222223 33333333334 44444444445 55555555556 66666666667 77777777778
1234567890 1234567890 1234567890 1234567890 1234567890 1234567890 1234567890 1234567890
k02120BLVCGJap GGCTAGAATC CCCGTACCTC CCCAACTTCC CCTTCCCGA AAAATCCACA CCTGAGCTG CTGACCTCAC CTGCTGATAA
40afileLDPR .....A.....
54vilmaLDPR .....A.....
74gessyLDPR .....G.....
92touroLDPR .....G.....
97blesjeLDPR .....A.....
160S06CRMS .....A.....
3563CPMG .....A.....
1751PLMG .....G.....
991PLMG .....G.....
01anetiLDPR .....G.....
922PLMG .....C.....
96253CPMG .....C.....
9104CPMG .....C.....
23MCPMG .....G.....
16contaLDPR .....A.....
195veraLDPR .....G.....
rochedoLDPR .....G.....
387PLMG .....A.....
440PLMG .....A.....
485PLMG .....A.....
676PLMG .....G.....
701PLMG .....G.....

```

[illegible]

[illegible]

[illegible]

[illegible]

	287		310
[	4444444444	4444444444	444]
[	0000000001	1111111112	222]
[	1234567890	1234567890	123]
k02120BLVCGJap	CTTCGGCGCC	CTCTAGCGGC	CAG
40afileLDPR			...
54vilmaLDPR			...
74gessyLDPR			...
92touroLDPR			...
97blesjeLDPR			...
160S06CRMS			...
3563CPMG			...
1751PLMG		T	...
991PLMG			...
01anetiLDPR			...
922PLMG		T	...
96253CPMG			...
9104CPMG			...
23MCPMG	C	C	...
16contaLDPR			...
195veraLDPR			...
rochedoLDPR			...
387PLMG			...
440PLMG			...
485PLMG			...
676PLMG			...
701PLMG			...

Figura 12: Alinhamento de 423 nucleotídeos de parte da região 5'LTR do BLV das 22 seqüências obtidas de amostras brasileiras e da seqüência de referência K02120. Apenas os nucleotídeos diferentes da seqüência consenso estão apresentados. Os números dispostos verticalmente indicam a posição de cada nucleotídeo na seqüência. Os números dispostos horizontalmente nas extremidades superiores indicam a posição em relação ao genoma K02120.

A presença de uma maior variabilidade na região DAS, encontrada nas amostras brasileiras estudadas, vem de encontro à idéia de que este é um dos prováveis mecanismos de controle negativo da replicação do BLV, diretamente relacionado com o escape do sistema imune do hospedeiro, principalmente pela possível redução na apresentação antigênica associada ao MHC de classe I, a exemplo do que já está descrito para o vírus HIV (Collins e Baltimore, 1999). Possivelmente, esta variabilidade também está relacionada com o tropismo celular, haja vista os elementos ligantes e promotores da transcrição viral serem proteínas celulares que reconhecem as seqüências no DNA proviral, na sua porção 5'LTR, portanto susceptíveis a variações nestas seqüências (Reed-Inderbitzin e Maury, 2003). Utilizando um sistema de infecção competitiva de cultura de células por vários clones contendo diferentes seqüências de 5'LTR do HIV tipo 1, Opijnen et al. (2004) demonstraram que existe uma relação direta entre a seqüência presente e o sucesso de infecção do HIV em uma cultura de células.

Nesse sentido Merezack et al. (2001) demonstraram que pequenas variações dentro de seqüências conhecidas como CREs, ou elementos ligantes ao AMP cíclico, existentes em número de três na região U3 da 5'LTR do BLV, são responsáveis por uma regulação negativa da transcrição deste vírus e, provavelmente, contribuem para o escape do sistema imune e o estabelecimento de infecções persistentes. Nas amostras brasileiras analisadas, apenas uma das três CREs pode ser investigada, a situada mais a jusante na região U3. Situada entre as bases -64 e -36, nas amostras analisadas somente ocorreu uma transição (G→A, -64), permanecendo todo o restante desta CREs totalmente conservado. O fato de ser uma transição provavelmente reduz a importância da mutação dentro do contexto da transcrição viral. Entretanto, seria interessante completar a investigação desta região genômica das amostras de BLV brasileiras, a fim de verificar a ocorrência de variabilidade nas CREs mais proximais, a exemplo do que ocorreu nas seqüências DAS.

Outro elemento em R-U5, relacionado à regulação negativa da transcrição do BLV, é o motivo E-box, que parece mediar o controle da acetilação na região de 5'LTR, especificamente interagindo com outras moléculas que se ligam aos CREs, inibindo a transcrição (Calomme et al., 2004). Na seqüência de referência K02120, existe um motivo E box situado entre as DAS, dentro da região mais variável das amostras brasileiras do BLV. Este motivo, que compreende uma pequena seqüência que se estende da base 171 à base 177, nas amostras brasileiras apresentou-se totalmente conservado em todas elas, também não diferindo da seqüência de referência. Este dado sugere que uma menor tolerância do vírus BLV a mutações neste ponto específico. Uma possível explicação para isso seria a ação reguladora negativa associada às proteínas que reconhecem este motivo (Calomme et al., 2004), que estaria sendo responsável pela inibição da transcrição viral e, conseqüentemente, impedindo que epítomos virais sejam expressos e reconhecidos pelo sistema imune. Na eventual ocorrência de variação nessa seqüência, poderia haver uma dificuldade das proteínas supressoras de transcrição se ligarem, o que resultaria na seqüência de eventos de apresentação antigênica. A conseqüente remoção do clone viral mutante, por parte de células T citotóxicas, resultaria em pressão seletiva a favor dos clones não mutantes no motivo E Box, daí a extrema conservação deste pequeno segmento nas amostras brasileiras.

Com o objetivo de verificar se a variabilidade encontrada na região 5'LTR do BLV, nas amostras analisadas e naquelas depositadas no GenBank, poderia resultar em caracterização de genogrupos, as respectivas seqüências de 422b foram submetidas ao programa MEGA3, para a geração de árvores filogenéticas. Estas foram geradas mediante sistema de geração de árvores filogenéticas Neighbor-Joining (NJ) (Saitou e Nei, 1987), empregando bootstrap de 1000 replicatas e parâmetros de distância evolutiva ajustados pelo método de substituição de nucleotídeos Kimura 2-parâmetros. A figura 12 apresenta o resultado desta análise, levando-se em conta apenas às amostras nacionais.

A árvore gerada apenas com as amostras brasileiras mostra a existência de quatro agrupamentos, sendo o agrupamento 1 representado pelas amostras 991PLMG, 01anetiLDPR, rochedoLDPR e a amostra 9104CPMG. O segundo grupamento gênico é bastante homogêneo, a julgar pelo tamanho equivalentes dos ramos. Neste estão as amostras 40afileLDPR,

97blesjeLDPR, 16contaLDPR, 3563 CPMG, 485PLMG, 54vilmaLDPR, 96253CPMG, 160S03CRMS, 440PLMG, 387PLMG e 922PLMG. As amostras 701PLMG, 74gessyLDPR, 195veraLDPR, 92touroLDPR, 676PLMG e 1751PLMG constituíram um terceiro agrupamento, enquanto que a amostra 23MCPMG constituiu um agrupamento individual.

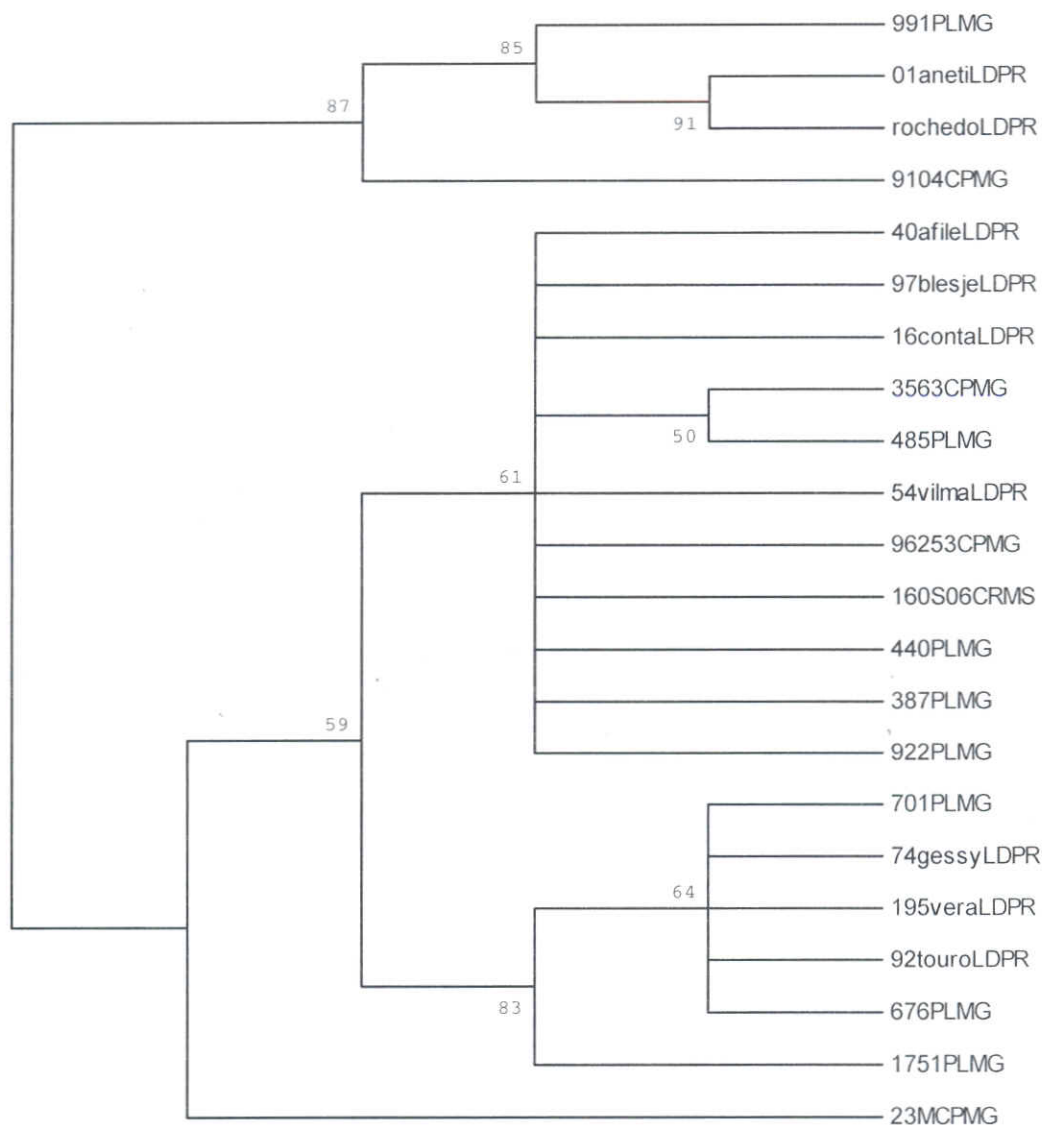


Figura 13: Relações filogenéticas de seqüências de parte da região 5'LTR do vírus BLV, obtidas de DNAs extraídos de bovinos naturalmente infectados em quatro regiões brasileiras distintas: Pedro Leopoldo-MG, Coronel Pacheco-MG, Londrina-PR e Corumbá-MS. Os valores dos "nós" representam a confiabilidade, em porcentagem, dos ramos à direita, resultados de bootstrap em 1000 replicatas.

Os valores de bootstrap abaixo de 75%, observados nos ramos dos agrupamentos quatro, cinco e sete, associado ao grande número de ramos de tamanhos próximos, refletem a grande homogeneidade das amostras brasileiras de BLV, já evidenciadas pelo alinhamento no programa ClustalW. Não foi possível correlacionar a formação de agrupamentos com o local de origem do DNA. Estes dados sugerem que as amostras circulantes do BLV apresentam pouca diferenciação entre si, em relação à variabilidade na região abrangida pela PCR 5'LTR, além de sugerir que diferentes variantes do BLV circulam em regiões diferentes, ao mesmo tempo. Este achado está compatível com o esperado, tendo em vista que existe um significativo trânsito de animais leiteiros entre as diferentes regiões amostradas e que isto tende a disseminar as diferentes variantes virais. É importante destacar que a utilização de uma sequência do vírus HTLV 1 como grupo externo (out group) não alterou, de forma significativa, a organização das árvores geradas para 5'LTR do BLV.

A fim de verificar a possibilidade de aglutinação das amostras brasileiras em relação a alguma das sequências depositadas no GenBank para 5'LTR, uma nova árvore foi gerada correlacionando todas as amostras da figura 13 com aquelas

listadas no quadro 1. A figura 14 ilustra o resultado encontrado.

A observação da segunda árvore gerada mostra que o acréscimo de um agrupamento se deve a não inclusão da sequência K01617BLVLTR3, seqüenciada a partir da amostra viral da linhagem celular FLK, em nenhum dos grupos anteriormente formados pelas amostras brasileiras e as demais do GenBank. Estas, em geral, continuaram apresentando a mesma característica de dispersão e homogenicidade. Um ato de destaque foi a afinidade da amostra 23MCPMG com o isolado argentino AF257515Arg, gerando um agrupamento bem distante dos demais, com comportamento de agrupamento externo. Em relação ao isolado australiano D00647GPEAust, as amostras brasileiras que mais se aproximaram foram 991PLMG e 9104CPMG. Em decorrência do baixo valor de bootstrap do ramo que aglutina estas três amostras, é possível que elas pertençam a um mesmo agrupamento. Outro detalhe interessante foi o cluster formado pelas amostras japonesas K02120BLVCGJap, M12527LTRX1Jap e M19208TRX2Jap, revelando a grande proximidade destes isolados. Possivelmente isto ocorre em função do material de origem da amostra ser o mesmo, já que os autores do depósito das três sequências são os mesmos (Sagata et al., 1985b).

Os valores de bootstrap abaixo de 75%, observados nos ramos dos agrupamentos quatro, cinco e sete, associado ao grande número de ramos de tamanhos próximos, refletem a grande homogeneidade das amostras brasileiras de BLV, já evidenciadas pelo alinhamento no programa ClustalW. Não foi possível correlacionar a formação de agrupamentos com o local de origem do DNA. Estes dados sugerem que as amostras circulantes do BLV apresentam pouca diferenciação entre si, em relação à variabilidade na região abrangida pela PCR 5'LTR, além de sugerir que diferentes variantes do BLV circulam em regiões diferentes, ao mesmo tempo. Este achado está compatível com o esperado, tendo em vista que existe um significativo trânsito de animais leiteiros entre as diferentes regiões amostradas e que isto tende a disseminar as diferentes variantes virais. É importante destacar que a utilização de uma sequência do vírus HTLV 1 como grupo externo (out group) não alterou, de forma significativa, a organização das árvores geradas para 5'LTR do BLV.

A fim de verificar a possibilidade de aglutinação das amostras brasileiras em relação a alguma das sequências depositadas no GenBank para 5'LTR, uma nova árvore foi gerada correlacionando todas as amostras da figura 13 com aquelas

listadas no quadro 1. A figura 14 ilustra o resultado encontrado.

A observação da segunda árvore gerada mostra que o acréscimo de um agrupamento se deve a não inclusão da sequência K01617BLVLTR3, seqüenciada a partir da amostra viral da linhagem celular FLK, em nenhum dos grupos anteriormente formados pelas amostras brasileiras e as demais do GenBank. Estas, em geral, continuaram apresentando a mesma característica de dispersão e homogenicidade. Um ato de destaque foi a afinidade da amostra 23MCPMG com o isolado argentino AF257515Arg, gerando um agrupamento bem distante dos demais, com comportamento de agrupamento externo. Em relação ao isolado australiano D00647GPEAust, as amostras brasileiras que mais se aproximaram foram 991PLMG e 9104CPMG. Em decorrência do baixo valor de bootstrap do ramo que aglutina estas três amostras, é possível que elas pertençam a um mesmo agrupamento. Outro detalhe interessante foi o cluster formado pelas amostras japonesas K02120BLVCGJap, M12527LTRX1Jap e M19208TRX2Jap, revelando a grande proximidade destes isolados. Possivelmente isto ocorre em função do material de origem da amostra ser o mesmo, já que os autores do depósito das três sequências são os mesmos (Sagata et al., 1985b).

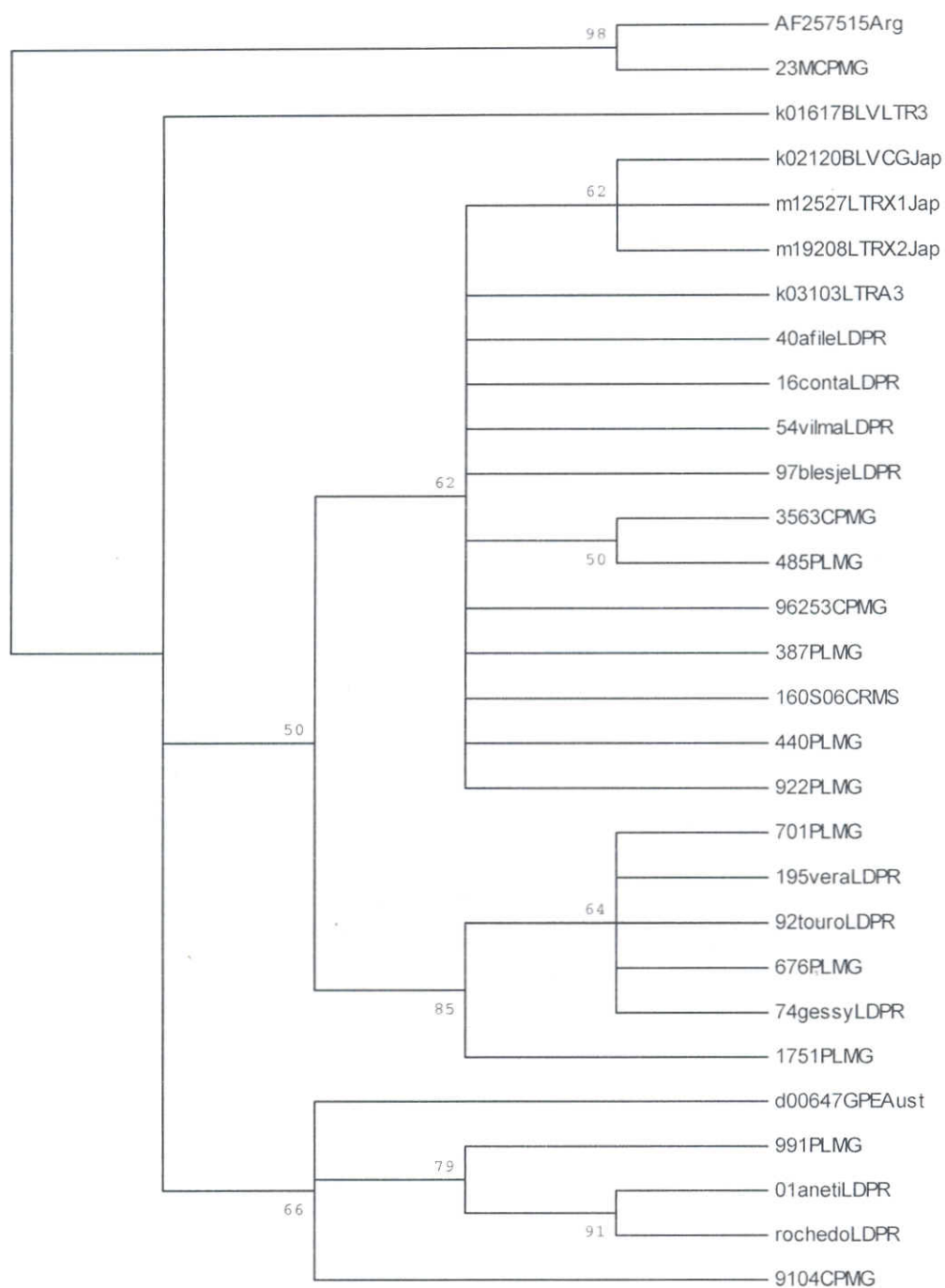


Figura 14: Relações filogenéticas de seqüências de parte da região 5'LTR do vírus BLV, obtidas de DNAs extraídos de bovinos naturalmente infectados em quatro regiões brasileiras distintas: Pedro Leopoldo-MG, Coronel Pacheco-MG, Londrina-PR e Corumbá-MS, e sete seqüências obtidas no GenBank. Os valores dos "nós" representam a confiabilidade, em porcentagem, dos ramos à direita, resultados de bootstrap em 1000 replicatas.

A árvore filogenética presente na figura 14 apresenta cinco agrupamentos formados pela relação de amostras brasileiras e as seqüências disponíveis no GenBank, assim acrescentando mais um agrupamento em relação à árvore gerada apenas com as amostras brasileiras. Os cinco agrupamentos são os seguintes: A) amostra 23MCPMG e AF257515Arg; B) K01617BLVLR3; C) K02120BLVCGJap, M12527LTX1Jap, M19208LTX2Jap, K03103LTRA3, 40afileLDPR, 16contaLDPR, 54vilmaLDPR, 97blesjeLDPR, 3563 CPMG, 485PLMG, 96253CPMG, 160S03CRMS, 440PLMG, 387PLMG e 922PLMG. D) 701PLMG, 195veraLDPR, 92touroLDPR, 676PLMG, 74gessyLDPR e 1751PLMG; E) D00647GPEAust, 991PLMG, 01anetiLDPR, rochedoLDPR e 9104CPMG. Em relação ao local de origem dos vírus seqüenciados, esta árvore sugere a formação de um agrupamento Brasil – Argentina, um agrupamento norte-americano (FLK), um agrupamento Japão – Bélgica – Brasil, um agrupamento Brasil e um agrupamento Brasil – Austrália.

A avaliação das variações genéticas das populações de BLV tem sido feitas empregando-se basicamente o DNA proviral deste vírus, já que sua transcrição é relativamente pouca, quando comparado ao Lentivirus e, portanto, é pequena a quantidade de RNA viral nas amostras obtidas diretamente do hospedeiro. Isso se deve a pressão do sistema imune do bovino, associado a um eficiente mecanismo de inibição da transcrição por parte do vírus (Tajima et al., 2003), o que garante sua permanência no hospedeiro. Este mecanismo de controle da transcrição provavelmente é semelhante ao descrito recentemente para o vírus HTLV, onde complexos regulatórios de expressão, formados pelo reconhecimento dos sítios promotores de transcrição na região 5'LTR são reconhecidos e ligados por diversas proteínas celulares envolvidas com a expressão do genoma da célula. Estas se constituem em sítio de reconhecimento para as proteínas virais transativadoras Tax e

Rex, que não se ligam diretamente ao genoma viral, mas estimulam ou suprimem a atividade de expressão do HTLV (Lemasson et al., 2004). Esta característica leva a multiplicação do BLV no hospedeiro principalmente na forma associada à mitose dos linfócitos B, o que trás como consequência uma maior fidelidade na replicação do material genético viral e consequente menor variabilidade genética.

A análise filogenética da região 5'LTR do vírus do grupo PTLV (Primate T Leukemia Virus) possibilitou a separação de genogrupos associados a região geográfica, porém não em relação ao tipo de hospedeiro, sendo identificados os grupos africano, asiático e cosmopolita (Vandamme et al., 1994). Posteriormente, a análise desta parte do genoma do HTLV tipo II permitiu a identificação de dois padrões, caracterizados pela forma de disseminação. Um grupo é transmitido verticalmente via sexual (do homem para a mulher) e leite materno (da mulher para seu filho), enquanto um segundo grupo é observado em usuários de drogas injetáveis (transmissão pelo sangue) (Salemi et al., 1999). A caracterização de grupos bem definidos, a partir da região 5'LTR, ainda não ocorreu para o BLV. Entretanto, como as regiões mundiais ainda estão pobremente representadas no banco de genomas mundial, GenBank (apenas sete seqüências foram prospectadas pelo programa BlastN, com alinhamento completo com as 422 bases das amostras brasileiras), é possível que isto ocorra no futuro. Para isso, são necessários mais trabalhos de caracterização molecular desta região. Outro dado a ser investigado é a relação entre a formação de agrupamentos, o tipo de manejo do rebanho e os fatores ambientais envolvidos, dados que não estavam disponíveis para o banco de DNA utilizado neste trabalho.

4.7 Análise do Polimorfismo de Comprimento de Fragmentos Restringidos (*Restriction Fragment Length Polymorphism* -RFLP) das seqüências 5'LTR *In Silico*.

As seqüências 5'LTR das amostras brasileiras obtidas, acrescentadas das sete amostras disponíveis no GenBank, foram submetidas a uma pesquisa para presença

dos sítios de restrição enzimática, com o auxílio do programa *WebCutter* (BCM Search Launcher), de forma a se verificar a ocorrência de variações na presença ou ausência de determinados sítios (apenas parâmetro qualitativo), entre as diferentes amostras. A partir do resultado obtido, foi proposta uma chave de classificação de forma a aglutinar as amostras em função do seu perfil de restrição, cujo resultado está ilustrado na figura 15.

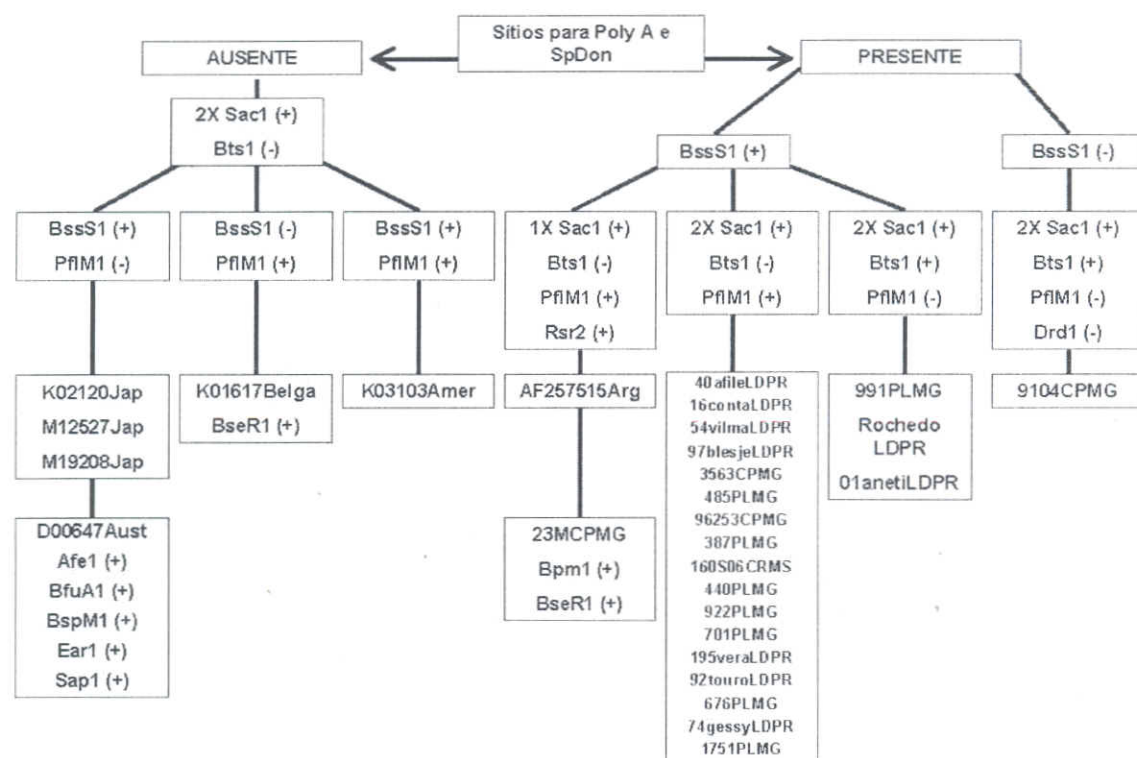


Figura 15: Proposta de diferenciação genética de amostras do BLV, por meio do perfil de restrição enzimática da região 5'LTR, e estabelecimento de correlação geográfica. Os sinais (+) indicam presença do sítio, enquanto que (-) indicam a ausência. Baseado no mapa de restrição obtido no programa *WebCutter* (BCM Search launcher).

A análise da figura 15 informa que a presença dos sítios de restrição enzimática para Poli A e SpDon foram encontradas pelo programa WebCutter apenas nas amostras latino-americanas (22 amostras brasileiras do presente trabalho e a amostra argentina do GenBank, AF257515). Este achado sugere que estes dois sítios podem ser utilizados como marcadores genéticos para amostras do BLV no continente sul-americano, embora mais uma vez a pouca informação disponível no banco de dados genéticos impede que se tenha confiabilidade estatística suficiente para se afirmar isto de forma categórica.

De forma consensual com a árvore filogenética gerada pelo programa MEGA3, a amostra Argentina AF257515Arg se aproximou da amostra brasileira 23MCPMG, formando um grupamento distinto, mas incluído nas amostras sul-americanas. Também de forma consensual com as análises fornecidas pelo programa MEGA3, uma grande parte das amostras brasileiras se mostrou muito homogênea (grupamento de 40afileLDPR até 1751PLMG), apresentando o mesmo perfil de restrição, demonstrando a proximidade genética destas amostras. Ainda em consonância com os dados de filogenia do programa MEGA3, a chave qualitativa do perfil de restrição enzimática apontou a ocorrência de amostras mais discrepantes, representadas pelos DNAs 991PLMG, rochedoLDPR, 01anetiLDPR e 9104CPMG, que formaram um ramo distinto das demais amostras na árvore. Entretanto, na árvore estas amostras se aproximaram da amostra australiana D0046GPEAust, enquanto que pelo perfil de restrição houve substancial diferenciação (discrepância no sítio Bts1, ausente na amostra australiana e presente nas amostras brasileiras, e o grande número de sítios particulares da amostra australiana – Afe1, BfuA1, BspM1, Ear1 e Sap1). Ista informações tendem a reforçar a idéia de que os sítios Poli A e SpDon, em conjunto com outras diferenças, podem definir um padrão de adaptação das amostras circulantes na América do Sul. Por outro lado, tendem a enfatizar o papel da análise

do perfil de restrição enzimática como ferramenta complementar de estabelecimento de inferência filogenética, na investigação do BLV a partir da região 5'LTR.

4.8 Estudos da Variabilidade Genética do Vírus BLV e Inferências Filogenéticas, A Partir da Região *pol*/IN

Todos os procedimentos relativos à obtenção dos consensos de DNA e sua edição, aplicados ao produto de seqüenciamento de 5'LTR do BLV, se aplicam também às análises realizadas na região gênica da Integrase (IN), dentro do gene *pol*. Entretanto, conforme mencionado no item que descreve a PCR para esta região, houve a formação de três conjuntos de DNA em relação ao tamanho do seqüenciamento, ocorrendo o seqüenciamento completo de cinco amostras e o parcial de outras cinco amostras, sendo duas com 345pb e três com 230pb. Todas estas seqüências foram alinhadas com o auxílio do programa MultAlin e estão dispostas, na sua forma bruta, nos anexos 3, 4 e 5.

Após o alinhamento das seqüências senso editadas e corrigidas no programa MultAlin, definiu-se um ponto de corte a montante e a jusante em cada cadeia de DNA, de forma a permitir o completo alinhamento da maior parte possível de todas elas que, conforme explicado anteriormente é um pré-requisito do programa de geração das análises filogenéticas.

Nesta etapa obteve-se dois grupos de alinhamentos, um composto das cinco amostras com 694b e um segundo grupo, composto por cinco seqüências com tamanho de 230pb, ao qual se adicionou os fragmentos correspondentes das outras cinco seqüências maiores, de forma que este grupo analisou 10 DNAs. Em relação à seqüência K02120, os pontos de corte do grupo com 694b, a montante, localizou-se na posição 4.144, mantendo-se esta última base na seqüência. O melhor ponto de corte consensual a jusante situou-se na posição

4.837, mantendo-se esta última base na sequência. Com o auxílio do programa ClustalW, incluído dentro do programa MEGA3, as cinco amostras tiveram a porção 4144 a 4837 alinhadas, utilizando-se mais uma vez a sequência K02120 como consenso. O produto deste alinhamento encontra-se na figura 16.

Em relação à sequência K02120, os pontos de corte do grupo com 230pb, a montante, localizou-se na posição 4.613, mantendo-se esta última base na sequência. O melhor ponto de corte consensual a jusante situou-se na posição 4.837, mantendo-se esta última base na sequência. Portanto, o fragmento de 230pb está contido dentro do fragmento de 694pb, o que permitiu o alinhamento de todas as amostras seqüenciadas no trecho de 230pb. Com o auxílio do programa ClustalW, incluído dentro do programa MEGA3, as 10 amostras tiveram a porção 4.613 a 4837 alinhadas, utilizando-se mais uma vez a sequência K02120 como consenso. O produto deste alinhamento encontra-se na figura 17.

As análises obtidas indicam que a região apresenta-se com tendência a conservação, porém foram notadas alterações em alguns pontos. Para as amostras com 694b, foram observadas 630 posições conservadas em 695 analisadas, correspondendo a 90,6% de conservação. Já as posições variáveis representaram 9,2% do total, 64 em 695 posições analisadas. Destas, apenas 43 foram consideradas pelo programa MEGA3 como informativas de parsimônia, sendo empregadas na construção das árvores filogenéticas. Da mesma forma que para 5'LTR, a mutação predominante encontrada nestas posições é a substituição, ocorrendo 33 vezes. A transição ocorreu em 10 posições, subtração em uma e adição também em uma, perfazendo um total de 45. A diferença entre o número de posições observadas no alinhamento e aquele fornecido pelo programa MEGA3 se deve ao fato deste último não computar os "gaps", espaçamentos oriundos por deleções, que ocorrem em diferentes pontos de diferentes amostras.

Entretanto, esta região apresentou uma variabilidade maior do que a região 5'LTR que apresentou 6,85% de posições variáveis, (29 em 423 posições), enquanto que esta frequência em *pol* foi de 9,2%, segundo as análises do programa MEGA3. Ao analisar a posição da mutação em relação ao "frame" de leitura, dos 45 pontos de mutação, oito ocorreram em nucleotídeos do início ou meio do códon e, portanto, podem caracterizar alteração de aminoácido. Destes oito, quatro são alterações do tipo substituição, com menor impacto na cadeia peptídica traduzida e as demais são mutações do tipo transição. Estas alterações ocorreram nas posições (C→T, 4.232), (G→A, 4.421), (A→T, 4.470), (T→A, 4.470), (T→G, 4.470), (C→T, 4.502), (A→G, 4.504), (C→T, 4.517), (A→T, 4.541), (T→A, 4.694), (T→A, 4.695), (adição de G ou C, 4.817).

Dados de literatura afirmam que a região de codificação da IN no gene *pol* do BLV e do HTLV são úteis em estudos de epidemiologia baseados em técnicas moleculares (Dube et al., 1997). Estes autores analisaram 21 isolados do BLV da América Central e do Norte e encontraram uma variabilidade entre as seqüências de zero a 6,3% entre elas. A principal justificativa para esta considerável homogeneidade está na origem comum do BLV atualmente disseminado no mundo. Este vírus foi transportado para os diversos continentes junto com a difusão do gado europeu nos últimos 500 anos. No presente trabalho encontrou-se uma frequência de posições variáveis um pouco acima dos dados publicados por estes autores da ordem de 9,2%. Embora o índice de 9% seja superior ao publicado anteriormente, este ainda pode ser considerado baixo, quando comparado com outros retrovírus não pertencentes ao gênero *Deltaretrovirus*.

[	111	111	111	111	111	222	222	222	222	222	333	333	333	333	333	444	444	444	455	555	556	]
[	123	456	789	012	345	678	901	234	567	890	123	456	789	012	345	678	901	234	567	890	]	
K02120BLVCGJap	ATG	CGA	ACT	ATT	CAG	AGA	GGG	TGG	GCC	CCG	AAT	CAT	ATT	TGG	CAG	GCC	GAT	ATA	ACC	CAT		
17antjeLDPR	...	...	...	...	...	...	...	...	...	..A	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...		
991PLMG	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...C	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...		
M23CPMG	...	.G	...	...	...	...	...	...	...	..A	.C	...	.C	...	...	...	...	...	...	...		
96253CPMG	...	.G	...	...	...	...	...	...	...	..A	.C	...	.C	...	...	...	...	...	...	...		
O1linfosCPMG	...	...	...	...	...	...	...	...	...	..A	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...		
[	666	666	666	777	777	777	788	888	888	889	999	999	999	000	000	000	011	111	111	111	111	]
[	123	456	789	012	345	678	901	234	567	890	123	456	789	012	345	678	901	234	567	890	]	
K02120BLVCGJap	TAT	AAA	TAC	AAA	CAG	TTC	ACC	TAC	GCT	CTG	CAT	GTG	TTT	GTA	GAT	ACT	TAC	TCT	GGA	GCT		
17antjeLDPR	...	...	...	...	...	...	...	...	...	T..	.C	...	...	...	...	...	...	...	...	...		
991PLMG	...	...	...	...	...	...	...	...	...	T..	.C	...	...	...	...	...	...	...	...	...		
M23CPMG	...	...	...	...	...	...	...	...	...	T..	.C	...	...	...	...	...	...	...	...	...		
96253CPMG	...	...	...	...	...	...	...	...	...	T..	.C	...	...	...	...	...	...	...	...	...		
O1linfosCPMG	...	...	...	...	...	...	...	...	...	T..	.C	...	...	...	...	...	...	...	...	...		
[	111	111	111	111	111	111	111	111	111	111	111	111	111	111	111	111	111	111	111	111	]	
[	222	222	222	333	333	344	444	444	444	445	555	555	555	666	666	666	677	777	777	778	]	
[	123	456	789	012	345	678	901	234	567	890	123	456	789	012	345	678	901	234	567	890	]	
K02120BLVCGJap	ACT	CAT	GCC	TCG	CGC	AAG	CGT	GGG	CTC	ACC	ACT	CAA	ACG	ACC	ATT	GAG	GGC	CTT	CTT	GAG		
17antjeLDPR	...	...	..A	...	...	..A	..A	..A	...	...	...	...	T..	...	...	...	...	...	...	...		
991PLMG	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	T..	...	...	...	...	...	...	...		
M23CPMG	...	...	..A	...	..A	...	..A	...	...	...	...	...	T..	...	..G	...	...	...	...	...		
96253CPMG	...	...	..A	...	..A	...	..A	...	...	...	...	...	T..	...	..G	...	...	...	...	...		
O1linfosCPMG	...	...	..A	...	..A	...	..A	...	...	...	...	...	T..	...	..G	...	...	...	...	...		

[illegible]

[illegible]

