

T636.089 63

L732 v

2002

Patrícia Pinto de Lima



VÍRUS DA ARTRITE ENCEFALITE CAPRINA: ISOLAMENTO E
CARACTERIZAÇÃO PARCIAL DO GENE *gag*.

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Minas Gerais, Escola de Veterinária, como requisito parcial para a obtenção do grau de Mestre em Medicina Veterinária.

Área: Medicina Veterinária Preventiva

Orientador: Maurilio Andrade Rocha

Belo Horizonte
Escola de Veterinária
2002

BIBLIOTECA UNIVERSITÁRIA

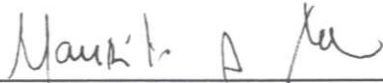
20/01/03

102303-09

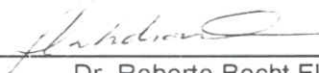
0342 - 07060

L732v 2002	Lima, Patrícia Pinto de, 1974- Vírus da artrite encefalite caprina: isolamento e caracterização parcial do gene <i>gag</i> / Patrícia Pinto de Lima. - Belo Horizonte: UFMG - Escola de Veterinária, 2002. 57p. il. Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Minas Gerais, Escola de Veterinária. 1. Caprino - Doenças - Teses. 2. Artrite-encefalite caprina - Teses. I. Título. CDD - 636.390 89
---------------	---

Dissertação defendida e aprovada em 25 de junho de 2002, pela Comissão Examinadora constituída por:



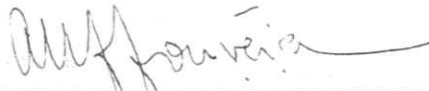
Prof. Dr. Maurilio Andrade Rocha
Orientador



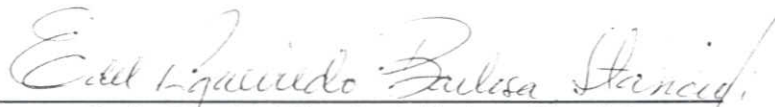
Dr. Roberto Becht Flatshart



Dr. Daniel Stancek



Profa. Dra. Aurora Maria Guimarães Gouveia



Profa. Dra. Edel Figueiredo Barbosa Stancioli

Ao Fernando, meu filho,
Dedico

AGRADECIMENTOS

A Deus.

À mãe pelo apoio incondicional e indispensável para o sucesso desse trabalho, ao meu pai e irmãos, pela confiança e apoio, e ao Fábio, pelo incentivo e força.

Ao Prof. Maurílio, pela orientação, paciência, apoio e credibilidade.

À Prof^a. Aurora, pelos inúmeros ensinamentos transmitidos, pelo apoio e confiança.

À comissão examinadora, pelas inúmeras contribuições dadas.

Ao amigo Marcos Xavier, pelo apoio e incentivo, desde o início do mestrado. Ao estudante de graduação Guilherme, pelo auxílio durante as atividades práticas.

À amiga Creuza, por compartilhar as experiências de laboratório e pelo incentivo constante.

À Doraci, ao Eduardo e ao Leandro pelo auxílio no laboratório.

À Nádia, pelo auxílio na formatação da dissertação, e pela descontração e amizade.

A todos que direta ou indiretamente contribuíram para a realização desse trabalho.

SUMÁRIO

	LISTA DE ABREVIATURAS	13
	RESUMO	15
	ABSTRACT	15
	PREFÁCIO	16
1	INTRODUÇÃO	17
2	LITERATURA CONSULTADA	17
2.1	O Vírus da Artrite-Encefalite Caprina (CAEV)	17
2.1.1	Classificação	17
2.1.2	Partícula Viral e Genoma	18
2.1.2.1	A Proteína CA (p25)	19
2.1.3	Células-Alvo e Replicação	20
2.1.4	Variabilidade Viral Antigênica e Genômica	22
2.2	Caracterização da CAE	25
2.2.1	Histórico	25
2.2.2	Ocorrência	25
2.2.3	Transmissão	26
2.2.4	Prevenção e Controle	26
2.2.5	Diagnóstico Laboratorial	27
2.2.5.1	Imunodifusão em Gel de Agarose (IDGA)	27
2.2.5.2	Isolamento Viral	27
2.2.5.3	Reação em cadeia da polimerase (PCR)	29
3	MATERIAL E MÉTODOS	30
3.1	Espécimens clínicos	30
3.2	IDGA	31
3.3	Células de Membrana Sinovial Caprina (MSC)	31
3.4	Preparo dos Controles Positivo e Negativo	31
3.5	Isolamento Viral Através do Co-Cultivo de Macrófagos com Células de MSC	31
3.5.1	Maturação dos Monócitos em Macrófagos	31
3.5.2	Co-Cultivo de Macrófagos com Células MSC	31
3.6	Extração de DNA das Amostras e dos Controles Positivo e Negativo	32
3.7	PCR	32
3.7.1	Desenho dos Iniciadores	32
3.7.2	Padronização da Técnica e Amplificação	33
3.7.3	Determinação da Sensibilidade da PCR	33
3.7.4	Eletroforese	33
3.8	Seqüenciamento dos Fragmentos Amplificados	33
3.8.1	Análise Filogenética	33
4	RESULTADOS	34
4.1	IDGA	34
4.2	Isolamento Viral	34
4.3	PCR	37
4.4	Seqüenciamento das Amostras	37
4.4.1	Análise Computacional das Seqüências	37

4.4.2	Análise Filogenética	43
5	DISCUSSÃO	45
5.1	Infecção no Rebanho	45
5.2	Isolamento Viral	46
5.3	PCR	47
5.4	Análise das Sequências Obtidas	47
5.4.1	Relação Filogenética entre os Isolados	48
5.5	Perspectivas	49
6	CONCLUSÕES	49
7	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	50

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Etiologia e principais patologias das infecções por lentivírus	18
Tabela 2	Amostras de sangue total coletadas para isolamento viral e alguns dados dos animais	30
Tabela 3	Iniciadores escolhidos para amplificação de parte do gene <i>gag</i> do genoma pró-viral codificante para a proteína do capsídeo viral (CA)	32
Tabela 4	Sequências de LVPR e seus respectivos números de acesso ao GenBank ..	34
Tabela 5	Porcentagem de divergências de nucleotídeos (porção inferior esquerda da matriz) e aminoácidos (porção superior direita da matriz) entre as seqüências BR-UFGM/PL1 (PL1), BR-UFGM/PL2 (PL2) e BR-UFGM/PL3 (PL3), a amostra CAEV-Co (Cork) e as amostras de MVV K1514, SA-OMVV (SAOMV), ZZV1050 (ZZV) e EV1	39

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Representação esquemática dos Lentivirus, mostrando as posições relativas das diversas estruturas e proteínas (Coffin et al., 1997)	19
Figura 2	Representação esquemática do genoma dos Lentivirus. Acima o RNA viral e abaixo o DNA formado após transcrição reversa (adaptado de Coffin et al., 1997).....	19
Figura 3	Região do genoma da amostra CAEV-Co (Saltarelli et al., 1990) que codifica para a proteína Gag do capsídeo viral (CA ou p25). Os nucleotídeos marcados correspondem á região de hibridização dos iniciadores	32
Figura 4	Monocamada de células de MSC em meio MEM com sais de Earle e 5% de SFB, corada com solução de cristal violeta a 0,1%, após 12 dias de cultivo (controle negativo)	35
Figura 5	Monocamada de células de MSC em meio MEM com sais de Earle e 5% de SFB corada com solução de cristal violeta a 0,1% após 12 dias de cultivo (controle positivo).....	35
Figura 6	Isolado BR-UFGM/PL1. Co-cultivo de macrófagos com células de MSC mantido em meio MEM enriquecido com sais de Earle e corado com solução de cristal violeta 0,1% após 45 dias de cultivo	36

Figura 7	Isolado BR-UFGM/PL2. Co-cultivo de macrófagos com células de MSC mantido em meio MEM enriquecido com sais de Earle e corado com solução de cristal violeta 0,1% após 45 dias de cultivo	36
Figura 8	Gel de agarose 1% (p/v) corado com brometo de etídio e visualizado sob luz ultravioleta. A PCR amplificou um fragmento de aproximadamente 600 nt do gene <i>gag</i> do genoma pró-viral. Canaleta 1 (BR-UFGM/PL1), canaleta 2 (BR-UFGM/PL2), canaleta 3 (BR-UFGM/PL3), canaleta 4 (BR-UFGM/PL4), canaleta 5 (BR-UFGM/PL5), canaleta 6 (controle positivo), canaleta 7 (controle negativo) e canaleta 8 (peso molecular 100 bp DNA ladder – Gibco-BRL)	37
Figura 9	Seqüências de nucleotídeos e seqüências de aminoácidos deduzidas representadas no formato FASTA obtidas para cada uma das amostras	38
Figura 10	Alinhamento das seqüências dos isolados BR-UFGM/PL1, BR-UFGM/PL2 e BR-UFGM/PL3 com as amostras de CAEV (CAEV-Co) e MVV (K1514, SA-OMVV, ZZV1050 e EV1). Em A , o alinhamento das seqüências de nucleotídeos, feito de acordo com a seqüência de CAEV-Co posições 979 a 1572 (Saltarelli et al., 1990), com o auxílio do programa Clustal W (Thompson et al., 1994). Em B , o alinhamento das seqüências de aminoácidos. . indica homologia, - indica deleção, em relação ao CAEV-Co, em cinza (aa ⁷³ a aa ⁸⁰) região rica em prolina e glicina, o quadrado (aa ¹³¹ a aa ¹⁵⁰) indica a região do MHR, * aminoácidos mais bem conservados entre diferentes retrovírus, : cisteína, resíduo bem conservado entre diferentes lentivírus	42
Figura 11	Dendograma obtido para seqüências de aminoácidos utilizando o programa Multalin (Corpet, 1988). As amostras BR-UFGM/PL1, BR-UFGM/PL2 e BR-UFGM/PL3 se agruparam claramente com o padrão CAEV-Co	43
Figura 12	Dendograma obtido com o auxílio do programa Multalin (Corpet, 1998) para seqüências de aminoácidos os isolados BR-UFGM/PL1, BR-UFGM/PL2 e BR-UFGM/PL3 com outros isolados brasileiros de CAEV (C18, C47, C767) (Ravazzolo et al., 2001), um isolado francês (CA680) (Valas et al., 1997), uma amostra norueguesa de CAEV (1GA) (Gjerset et al., 2000), um isolado brasileiro de MVV (V27) (Ravazzolo et al., 2001) e os padrões CAEV-Co e MVV (K1514, SAOMVV, EV1, ZZV1050)	44

LISTA DE ABREVIATURAS

aa	Aminoácidos
ATCC	"American Type Culture Collection"
bp	"Base pair"
CA	Proteína do capsídeo viral
CAE	Artrite-Encefalite Caprina Viral
CAEV	Vírus da Artrite-Encefalite Caprina
CAEV-Co	Amostra Cork do Vírus da Artrite-Encefalite Caprina
ECP	Efeito Citopático
<i>env</i>	Gene que codifica para as proteínas do envelope viral
Env	Proteínas codificadas pelo gene <i>env</i>
EV1	Amostra EV1 do MVV
F	Anfotericina B ou Fungizona
<i>gag</i>	Gene que codifica para as proteínas do cerne viral
Gag	Proteínas codificadas pelo gene <i>gag</i>
gp135	Porção de superfície da proteína Env do CAEV
IDGA	Imunodifusão em Gel de Agarose
IN	Integrase
K1514	Amostra K1514 do MVV
LVPR	Lentivírus de Pequenos Ruminates
MA	Proteína da matriz
MEM	Meio Essencial Mínimo
MHR	Região de homologia principal ("major homology region")
MSC	Células de Membrana Sinovial Caprina
MVV	Vírus Maedi-Visna
NC	Proteína do nucleocapsídeo
nt	Nucleotídeos
P/S	Penicilina e Streptomina
p14	Proteína do nucleocapsídeo viral
p17	Proteína da matriz viral
p25	Proteína do capsídeo viral
pb	Pares de bases
PBMC	Leucócitos Sangüíneos Periféricos ("Peripheral Blood Monocytes Cells")
PBS	Solução Salina Fosfatada
PBSI	Sítio de Ligação do Iniciador
PCO	Célula de Plexo Coróide Ovino
PCR	Reação em Cadeia da Polimerase
<i>pol</i>	Gene que codifica para as proteínas de atividade enzimática
Pol	Proteínas codificadas pelo gene <i>pol</i>
PR	Protease
rpm	Rotações por minuto
RT	Transcriptase reversa
SAOMVV	Amostra SAOMVV do MVV
SFB	Soro Fetal Bovino
SU	Porção de superfície da proteína Env
TM	Porção transmembrânica da proteína Env
ZZV1050	Amostra ZZV1050 do MVV

RESUMO

Nesse estudo, um rebanho caprino leiteiro comercial localizado no estado de Minas Gerais foi testado para verificação da presença de infecção pelo vírus da Artrite-Encefalite Caprina (CAEV), através do teste de Imunodifusão em Gel de Agarose (IDGA). Amostras de sangue de 12 animais soropositivos e que não apresentavam sinais clínicos sugestivos de infecção por CAEV foram coletadas para isolamento viral. Para isso, macrófagos derivados de monócitos foram co-cultivados com células de membrana sinovial caprina (MSC), resultando na obtenção de cinco isolados que apresentaram efeito citopático característico do tipo persistente, semelhante ao observado para o CAEV. Uma técnica de PCR foi padronizada para amplificar parte do gene *gag* do genoma pró-viral, codificante para a proteína do capsídeo viral (p25). Todos os cinco isolados foram amplificados através dessa PCR e três destes, denominados BR-UFGM/PL1, BR-UFGM/PL2 e BR-UFGM/PL3, foram seqüenciados diretamente dos seus produtos de PCR. O alinhamento múltiplo das seqüências obtidas com outras seqüências de Lentivírus de Pequenos Ruminantes (LVPR) obtidas no GenBank e o dendograma revelaram que esses novos isolados de CAEV são únicos e distintos das demais amostras de LVPR, possuindo maior identidade de nucleotídeos e aminoácidos entre si e com as amostras de CAEV que com as do vírus Maedi-Visna (MVV).

Palavras chaves: vírus da artrite-encefalite caprina, isolamento, PCR, análise filogenética.

ABSTRACT

In this study, a commercial dairy herd of the Minas Gerais state was tested for Caprine Arthritis-Encephalitis Virus (CAEV) infection by the agar gel immunodiffusion test (AGID) and blood samples from 12 seropositive animals showing no evident clinical signs of disease were taken to attempt virus isolations. For this purpose, macrophages-derived monocytes were co-cultured with caprine goat synovial membrane cells (GSM) resulting in five virus isolations, which presented cytopathic effects of the persistent type, resembling those observed for CAEV. A PCR assay was designed to amplify a portion of the *gag* proviral gene coding for the major core protein (p25). All the five isolates were amplified by this PCR and three isolates named BR-UFGM/PL1, BR-UFGM/PL2 e BR-UFGM/PL3 were sequenced directly from their PCR products. Multiple sequence analysis and the dendogram including other sequences from the GenBank database showed that these newly Brazilian isolates are *unique* and distinct from those of known caprine and ovine lentiviruses, with a higher identity of nucleotide and derived aminoacids to each other and to CAEV than to Maedi-Visna virus (MVV).

Key words: caprine arthritis-encephalitis virus, virus isolations, PCR, phylogenetic analysis.

PREFÁCIO

Novos Tempos, Novas Técnicas

A partir de 1976, importações de caprinos de raças exóticas, procedentes de vários países, buscaram a introdução de potencial genético leiteiro, tendo ocorrido também a efetiva introdução de agentes infecciosos no Brasil pela importação de caprinos sem adequados critérios sanitários, com conseqüente dispersão de doenças infecciosas entre os rebanhos nacionais, dentre elas a CAE - artrite encefalite caprina. O caráter degenerativo crônico da doença, associado às práticas coletivas de manejo, comuns nas criações destinadas à produção de leite, proporcionou sua dispersão pelo País, tornando-se fundamental o estabelecimento de técnicas de diagnóstico e de medidas de controle adequadas.

Com início em 1991, pesquisas vêm sendo desenvolvidas no Laboratório de Virologia Animal do Departamento de Medicina Veterinária Preventiva da Escola de Veterinária da UFMG, voltadas ao diagnóstico e controle da CAE: Assis, 1994 (Tese - Mestrado - DMVP/EV-UFMG), Figueiredo, 1995 (Tese - mestrado - DCC/EV-UFMG), Castro, 1998 (tese - doutorado - DMVP/EV-UFMG), Coelho, 1999 (Tese - Mestrado- DCC/EV-UFMG), Andrioli, 2001 (tese - doutorado - DMVP/EV-UFMG), Pinheiro, 2001 (tese - doutorado - DMVP/EV-UFMG), Yorinori, 2001 (Tese - Mestrado - DMVP/EV-UFMG).

As medidas de controle da CAE baseiam-se no bloqueio da transmissão do vírus da CAE (CAEV) a partir de animais infectados, considerando as vias de infecção, e ainda, fatores como soroconversão tardia, latência viral, latência sorológica, replicação restrita, manejo do rebanho e limitações na disponibilidade comercial de testes mais sensíveis (testes imunoenzimáticos e biomoleculares).

A eliminação do CAEV do plantel é dependente da retirada dos animais infectados, sendo fundamental o diagnóstico precoce da infecção, bem como o monitoramento das medidas sanitárias adotadas. Desta forma, a associação de técnicas virológicas clássicas com modernas técnicas enzimáticas e biomoleculares apresenta-se como importante alternativa para o diagnóstico.

Criado em 1997, o Grupo de Extensão e Pesquisa em Ovinos e Caprinos (GEPOC-NPSA), composto por professores, pesquisadores e técnicos da Escola de Veterinária e ICB da UFMG, Embrapa Caprinos, UFRPE, UECE e Instituto Mineiro de Agropecuária (IMA), vem desenvolvendo pesquisas voltadas à área de sanidade de pequenos ruminantes domésticos.

A presente dissertação compõe parte integrante do projeto "*Transmissão, Diagnóstico e Controle da CAE*", coordenado pelo GEPOC-NPSA e buscou disponibilizar técnicas biomoleculares mais sensíveis, capazes de detectar com segurança, a presença do lentivírus caprino e simultaneamente, caracterizou três novas amostras brasileiras do CAEV. Certamente, os achados aqui apresentados, irão contribuir de forma significativa para o diagnóstico da CAE, bem como com a elaboração do Programa Nacional de Sanidade de Caprinos e Ovinos, que está atualmente sendo implantado em parceria entre o GEPOC-NPSA e Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento.

Prof^ª. Dra. Aurora M. G. Gouveia
Professora da Escola de Veterinária da UFMG
Consultora Embrapa Caprinos
Coordenadora do GEPOC-NPSA

1. INTRODUÇÃO

O vírus da Artrite-Encefalite Caprina (CAEV) é um vírus protótipo do gênero Lentivirus da família Retroviridae. O vírus causa artrite progressiva crônica, pneumonia e mastite em animais adultos e, mais raramente, causa leucoencefalomielite em animais de 2 a 4 meses de idade (Cork et al., 1974; Crawford et al., 1980; Crawford & Adams, 1981). O CAEV causa infecção persistente por se integrar ao genoma celular, possuindo tropismo por células do sistema imune da linhagem dos monócitos/macrófagos (Gorrel et al., 1992).

O CAEV compartilha características genéticas, morfológicas e patológicas com outros lentivírus, incluindo o vírus Maedi-Visna (MVV), o vírus da imunodeficiência bovina (BIV), o vírus da imunodeficiência felina (FIV), o vírus da anemia infecciosa equina (EIAV), o vírus da imunodeficiência símia (SIV) e o vírus da imunodeficiência humana (HIV) (Narayan & Clements, 1989). Frequentemente, CAEV e MVV são denominados de Lentivírus de Pequenos Ruminantes (LVPR), por possuírem características patogênicas, epidemiológicas e organização genômica semelhantes (Banks et al., 1983).

No início da década de 80, importações de caprinos de raças leiteiras exóticas, procedentes de distintos países da Europa (França, Suíça, Alemanha, Holanda, Inglaterra) e América do Norte (Estados Unidos e Canadá) buscaram a introdução de potencial genético leiteiro em animais puros ou de seus cruzamentos com mestiços de raças nativas brasileiras. O CAEV foi introduzido no Brasil através dessas importações, geralmente feitas sem supervisão adequada (Assis & Gouveia, 1994).

Diferentes isolados de LVPR têm sido obtidos e caracterizados em diversos estados brasileiros (Hötzel et al., 1993;

Milczewski et al., 1997; Marchesin et al., 1998; Castro et al., 1999; Ravazzolo et al., 2001). A caracterização molecular de isolados brasileiros de LVPR é importante para evidenciar as propriedades biológicas virais que possam resultar em diferenças de citopatogenicidade tanto *in vivo* quanto *in vitro*, em diferenças na manifestação clínica da doença e para auxiliar no desenvolvimento de métodos diagnósticos mais sensíveis na detecção das amostras presentes no Brasil.

O presente trabalho objetivou a obtenção de isolados brasileiros de lentivírus caprino a partir de animais naturalmente infectados pelo CAEV no Estado de Minas Gerais e a caracterização molecular parcial do gene *gag* desses isolados.

2 LITERATURA CONSULTADA

2.1 O Vírus da Artrite-Encefalite Caprina (CAEV)

2.1.1 Classificação

O CAEV e o MVV, representantes do grupo dos LVPR, pertencem à família Retroviridae, gênero Lentivirus, de acordo com o *Seventh Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses* (Virus Taxonomy, 2000) (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/ICTV>). Lentivírus são retrovírus complexos, não oncogênicos, que infectam mamíferos pertencentes a diversas ordens, incluindo os primatas (homens e diversas espécies de macacos), carnívoros (felídeos) e artiodáctilos (bovinos, pequenos ruminantes e equinos). Os lentivírus causam doença persistente de evolução lenta e caráter inflamatório, degenerativo ou imunossupressor, muitas vezes assintomática (Coffin et al., 1997; Castro, 1998) (Tabela 1). Também são Lentivírus o vírus da Anemia Infecciosa Equina (EIAV) e os vírus da Imunodeficiência Bovina, (BIV), Felina (FIV), Símia (SIV) e Humana (HIV).

Tabela 1. Etiologia e principais patologias das infecções por lentivírus (adaptado de Castro, 1998).

Hospedeiro	Vírus ^a	Doença
Ungulados		
Caprinos e Ovinos	CAEV e MVV	Pneumonia intersticial difusa, encefalomielite, artrite, mamite e emagrecimento.
Bovinos	BIV e JDV	Linfadenopatia e linfocitose. Emagrecimento, febre, anorexia, linfadenopatia e anemia.
Equídeos	EIAV	Pneumonia intersticial difusa, encefalite, febre, emagrecimento e anemia.
Primates		
Macacos	SIV	Imunodeficiência, infecções oportunistas, síndrome neurológica, pneumonia intersticial difusa e artrite.
Homem	HIV	Imunodeficiência, infecções oportunistas, síndrome neurológica, pneumonia intersticial difusa.
Carnívoros		
Felídeos	FIV	Imunodeficiência, infecções oportunistas, síndrome neurológica e emagrecimento.

^aCAEV – vírus da Atrite-Encefalite Caprina, MVV – vírus Maedi-Visna dos ovinos, BIV – vírus da Imunodeficiência dos Bovinos, JDV – *Jembrana disease* vírus, EIAV – vírus da Anemia Infecciosa Equina, SIV – vírus da Imunodeficiência Simia, HIV – vírus da Imunodeficiência Humana, FIV – vírus da Imunodeficiência Felina.

O EIAV foi o primeiro lentivírus a ser identificado (Vallé & Carré, 1904 apud Clements & Zink, 1996). As lentiviroses só foram caracterizadas mais tarde, em 1954, por Sigurdsson, após observações das características epidemiológicas e patológicas de uma doença denominada Maedi-Visna que acometia ovinos. Porém, somente após a descoberta do HIV, causador da Síndrome da Imunodeficiência Humana Adquirida (AIDS), é que os lentivírus ganharam maior importância, passando a ser um dos grupos virais mais bem estudados da atualidade (Clements & Zink, 1996).

2.1.2 Partícula Viral e Genoma

Os Lentivirus são vírus envelopados, esféricos, de aproximadamente 80 a 100 nm de diâmetro. A partícula viral (Figura 1) é composta por um núcleo ou cerne onde se encontram o genoma e as proteínas do nucleocapsídeo (NC), do capsídeo (CA) e da matriz (MA), além das enzimas transcriptase reversa (RT), integrase (IN) e protease (PR), e pelo envelope composto pelas glicoproteínas de superfície (SU) e transmembrana (TM) (Coffin et al., 1997).

O genoma viral (Figura 2) é composto por duas moléculas de RNA senso positivo, não complementares, de aproximadamente 10.000 pares de bases. A extremidade 5' de cada monômero possui uma sequência *cap* e um sítio de ligação do iniciador (PBSI) para a síntese da fita negativa de DNA, durante o processo de retrotranscrição. O iniciador é o t-RNA celular. A extremidade 3' possui um sítio poly(A) e um sítio PPT que serve como iniciador para a síntese da fita de DNA positiva. Além disso, o dímero de RNA possui em suas extremidades 5'e 3', respectivamente, duas regiões não traduzidas compostas por uma sequência curta repetida (R) e uma região única 5 (U5) ou única 3 (U3). O RNA viral, apesar de ser do tipo senso positivo, não é infeccioso quando purificado. Através de transcrição reversa é formada uma molécula de DNA dupla fita intermediária (pró-vírus) que se integra ao genoma celular, determinando um caráter de infecção persistente. O DNA pró-viral difere do RNA por possuir duas sequências longas repetidas nas extremidades 5' e 3', que possuem toda a informação necessária para o início e término da transcrição viral (Gonda, 1994; Coffin, 1996; Castro, 1998).

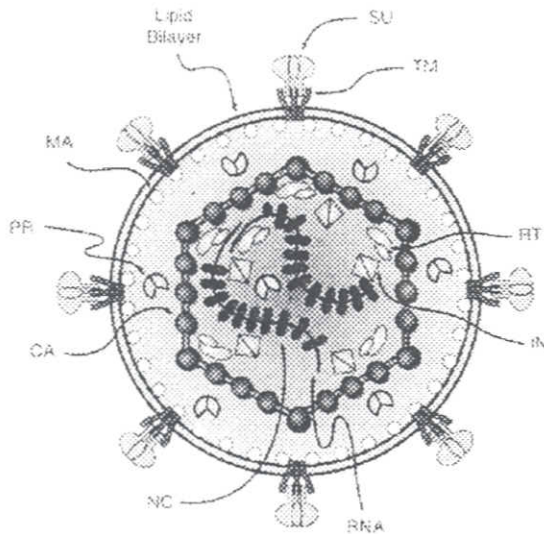


Figura 1. Representação esquemática dos Lentivirus, mostrando as posições relativas das diversas estruturas e proteínas (Coffin et al., 1997).

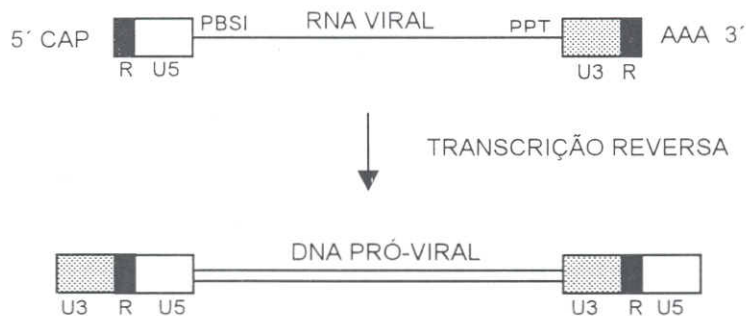


Figura 2: Representação esquemática do genoma dos Lentivirus. Acima o RNA viral e abaixo o DNA formado após transcrição reversa (adaptado de Coffin et al., 1997).

Os Lentivirus possuem três genes estruturais organizados de 5' para 3' (*gag*, *pol* e *env*) e pequenas janelas de leituras abertas (*small ORFs*) entre *pol* e *env* e na porção 3' final. O gene *gag* codifica para uma poliproteína precursora (Pr53-55^{gag}) estrutural interna do vírus que, durante a montagem e maturação da partícula viral, é clivada pela Protease formando as três proteínas que compõem o cerne viral: MA (p16), CA (p24-28) e NC (p14). O gene *pol* codifica para as proteínas de atividade enzimática: a RT e a IN virais, além de uma Protease. O gene *env* codifica para as glicoproteínas do envelope viral: a glicoproteína de superfície (SU) e a

transmembrana (TM). As pequenas janelas de leituras abertas, ou genes acessórios, codificam para proteínas regulatórias (Narayan & Clements, 1996).

2.1.2.1 A proteína CA (p25)

As proteínas derivadas do gene *gag* são sintetizadas como uma poliproteína precursora (Pr53-55^{gag}) que está presente na partícula viral imatura. Durante ou imediatamente após a liberação da partícula viral no meio extracelular, a Protease cliva a Pr55^{gag} produzindo as proteínas MA (p17), CA (p25) e NC (p14) (Saltarelli et al., 1990; Wills & Craven, 1991). Enquanto MA

interage com as membranas virais e com as proteínas Env e NC interage com o RNA viral, o domínio Gag CA estabelece interações Gag-Gag que são essenciais para a oligomerização das proteínas precursoras e montagem das proteínas Gag e Gag-Pol no interior da partícula viral (Mammano et al., 1994).

A clivagem proteolítica da proteína precursora induz à condensação do cerne e maturação da partícula viral: MA mantém-se associada com a face interna do envelope viral, enquanto que CA se condensa para formar uma concha em torno do complexo NC/RNA (Freed, 1998).

As funções exercidas pelas proteínas Gag são similares entre diferentes gêneros de retrovírus, entretanto com pouca similaridade de aminoácidos na seqüência primária, exceto por uma região de 20 aminoácidos altamente conservada entre diversos retrovírus denominada região de homologia principal (MHR), localizada na porção C-terminal da proteína CA. Diferentes mutações no MHR de HIV-1 e BLV (vírus da leucose bovina) bloqueiam a montagem, maturação e a infectividade da partícula viral (Gamble et al., 1997; Mammano et al., 1994.; Willems et al., 1997). No MHR, quatro aminoácidos parecem ser altamente conservados entre diferentes retrovírus: Glutamina (Q), Ácido Glutâmico (E), Arginina (R) e Tirosina (Y)/Fenilalanina (F) (Wills & Craven, 1991). Dois resíduos de cisteína (C180 e C204 de acordo com a seqüência de CAEV-Co publicada no banco de dados Swissprot, número de acesso P33458) também são altamente conservados entre diferentes espécies de lentivírus, incluindo HIV-1, FIV e EIAV (Birkett et al., 1997).

As seqüências de nucleotídeos do gene Gag codificante para CA de EIAV (p26) e HIV (p24) possuem 55% de similaridade, enquanto que a proteína possui 30% de identidade de aminoácidos (Birkett et al., 1997). Os genes *gag* de CAEV e MVV são altamente conservados e possuem mais de 50% de similaridade na seqüência de nucleotídeos (Pyper et al., 1984, 1986). A similaridade em relação aos aminoácidos

entre amostras de MVV e CAEV é de aproximadamente 80% para a proteína Gag (Saltarelli et al., 1990). Esse alto grau de similaridade entre as seqüências de aminoácidos da proteína Gag CA de diversos lentivírus sugere uma possível similaridade na estrutura tridimensional das mesmas (Birkett et al., 1997). Um modelo para a estrutura terciária da proteína Gag p24 de HIV-1 sugere que tanto o domínio N-terminal quanto o C-terminal são constituídos por muitas α -hélices, sendo que a porção C-terminal adota uma conformação globular (Gamble et al., 1997).

A proteína CA é importante para montagem da partícula viral e sua maturação. Ela é composta por dois domínios: a região N-terminal, relacionada à maturação da partícula viral e a região C-terminal, que contribui para as interações Gag-Gag (Freed, 1998).

A proteína CA é considerada um dos antígenos imunodominantes nas infecções por lentivírus. Caprinos infectados por CAEV produzem uma forte resposta imune anti-CAEVp25 nas primeiras semanas de infecção e os anticorpos se mantêm detectáveis por um longo período (de la Concha-Bermejillo et al., 1995). Diversos autores demonstraram a presença de reações cruzadas entre as proteínas Gag de CAEV e MVV. Em 1999, Rosati et al. caracterizaram o epitopo imunodominante responsável pela reação cruzada entre a proteína do capsídeo de CAEV e MVV. Esse epitopo possui uma seqüência de 17 aminoácidos (**LNEEAERWVRQNP**PGNP). Os aminoácidos em negrito são conservados entre o CAEV amostra Cork (CAEV-Co) (Saltarelli et al., 1990), o MVV amostra K1514 (Sonigo et al., 1985) e o MVV amostra EV1 (Sargan et al., 1991).

2.1.3 Células-Alvo e Replicação

Os LVPR infectam, *in vivo*, principalmente as células do sistema monócito/macrófago, se replicam a taxas baixas por um período indefinido e raramente estão presentes como partículas virais livres nos tecidos dos animais subclínicamente infectados (Narayan et al., 1982). Não há evidência de

infecção de linfócitos e imunodeficiência não é uma manifestação típica da doença causada por esses lentivírus (Leroux et al., 1996). Em 2000, Ryan et al., assinalaram a importância das células dendríticas no estágio inicial da infecção pelo MVV.

A replicação viral é dependente da diferenciação (maturação) celular; quanto mais diferenciada é a célula menos restritiva se torna a replicação viral (Narayan et al., 1982; Gendelman et al., 1986). Nesse contexto, os monócitos sanguíneos funcionam como reservatórios virais, já que os mesmos carregam o DNA pró-viral e não são notados pelo sistema imune do hospedeiro (Gonda, 1994).

In vitro, os LVPR infectam culturas primárias de macrófagos (Chebloune et al., 1996a e b), células do plexo coróide ovino (Quérat et al., 1984), células fibroblásticas (Crawford et al., 1980; Narayan et al., 1980), células musculares lisas (Leroux et al., 1995a) e células epiteliais do leite (Mselli-Lakhal et al., 1999), onde se replicam induzindo a formação de células gigantes multinucleadas ou sincícios. Jan et al. (2000) relataram a susceptibilidade das células endoteliais vasculares à infecção pelo CAEV e Lamara et al. (2001) demonstraram a susceptibilidade das células da granulosa à infecção pelo CAEV. De acordo com Chebloune et al. (1996b), o CAEV não se replica produtivamente em células de plexo coróide ovino, diferentemente do MVV.

A replicação viral inicia-se pela adsorção da partícula viral à superfície celular. A interação entre a glicoproteína SU e receptores específicos presentes na membrana citoplasmática resulta na fusão do envelope viral com a membrana celular, determinando a liberação do nucleocapsídeo no citoplasma celular. Pouco se sabe sobre quais são os receptores para os LVPR. Dalziel et al. (1991) e Bruet et al. (2000) sugeriram como prováveis receptores para o MVV alguns polipeptídeos do MHC de classe II, porém, Lyall et al. (2000) excluíram essa molécula como receptor para o MVV e concluíram que estes são protéicos e se encontram

amplamente difundidos em células de diferentes espécies animais, inclusive em células humanas. Em contraste, Mselli-Lakhal et al. (2000) concluíram que a ausência de receptores de membrana é a única barreira que impede a infecção de células humanas pelo CAEV.

A retrotranscrição do RNA viral em DNA pró-viral ocorre dentro do capsídeo viral, no citoplasma celular. O sítio PBSI, presente na extremidade 5' do RNA, serve como ligação do iniciador (t-RNA celular) para início da síntese da fita negativa de DNA. A fita negativa de DNA serve de molde para a síntese da fita positiva. Durante a síntese, as sequências U5 e U3 são duplicadas e orientadas na mesma direção (U3-R-U5) para formar as LTRs, necessárias para a integração do DNA pró-viral no genoma do hospedeiro, mediada pela IN. A integração do DNA pró-viral no genoma celular é um mecanismo fundamental para a persistência dos lentivírus no hospedeiro. Durante infecção, apenas uma pequena parte do DNA pró-viral se integra no genoma celular. Muitas duplas fitas de DNA lineares são encontradas livremente no núcleo das células infectadas (Narayan & Clements, 1996; Coffin et al., 1997).

Após integração, o pró-vírus se utiliza de toda maquinaria celular para transcrição viral em RNAs genômicos e sub-genômicos. A transcrição depende da maturação celular e pode ocorrer em diferentes órgãos e tecidos, incluindo intestino delgado e rins (Zink et al., 1990). Na infecção por LVPR apenas um pequeno número de monócitos são infectados e estes normalmente não expressam proteínas virais, enquanto que os macrófagos teciduais diferenciados possuem níveis muito maiores de RNA viral e também de proteínas virais (Coffin, 1996).

Pelo menos cinco tipos de RNAs sub-genômicos são gerados nas células infectadas. Um simples processamento (*splicing*) remove os genes *gag* e *pol*, produzindo um RNA sub-genômico que serve como RNA mensageiro (RNAm) para a síntese da proteína Env. Vários outros processamentos produzem os RNAm

codificantes para as proteínas de regulação da expressão gênica viral (Coffin, 1996).

A replicação viral é acompanhada de fusão celular e formação de células gigantes multinucleadas, que consiste no principal efeito citopático (ECP) observado em cultivos celulares (Narayan et al., 1980; Klevjer-Anderson & Cheevers, 1981).

2.1.4 Variabilidade Viral Antigênica e Genômica

Os Retrovírus, assim como os demais vírus RNA, possuem altas taxas de mutação. Essas mutações estão relacionadas a erros cometidos pela enzima transcriptase reversa que possui baixa atividade de correção 3' 5' (*proofreading activity*), determinando a ocorrência de mutações pontuais da ordem de aproximadamente uma substituição a cada 10^4 bases. Além disso, o genoma dos Retrovírus está sujeito a altas taxas de rearranjos intragênicos – deleções, duplicações, inversões ou uma combinação desses eventos (Coffin, 1996).

Apesar de serem considerados altamente espécie-específicos, a análise filogenética de diversos Lentivirus indica claramente a existência de uma origem comum para os diversos vírus do gênero. Em vista disso, a possibilidade de infecção cruzada desses vírus entre espécies deve ser considerada. Muitos estudos demonstraram a presença de vírus geneticamente mais semelhantes ao CAEV em ovinos naturalmente infectados (Chebloune et al., 1996a; Leroux et al., 1997) e a presença de vírus geneticamente mais semelhantes ao MVV em caprinos naturalmente infectados (Marchesin et al., 1998; Castro et al., 1999; Rolland et al., 2002). Da mesma forma, existem fortes indícios de que os vírus HIV tipo 1 e tipo 2 que infectam humanos foram resultado do cruzamento de barreira entre espécies entre vírus de macacos e o homem (Mselli-Lakhal et al., 2000).

Os LVPR, assim como os demais lentivírus, possuem alta variabilidade genômica e antigênica, devido a alta frequência de mutações que são acumuladas e favorecem a rápida evolução desse grupo de vírus. Os

genes *gag* e *pol* são considerados os mais conservados, enquanto o gene *env* é altamente heterogêneo. A digestão enzimática e o sequenciamento genético são técnicas que podem ser utilizadas na determinação da variabilidade viral (Marchesin, 1997; Castro, 1998).

O CAEV e o MVV são sorologicamente relacionados e possuem regiões homólogas ao longo de todo genoma, com máxima homologia na região correspondente aos genes *gag* e *pol* e parte do gene *env* e grande divergência encontrada no gene *env* codificante para a proteína de superfície viral (Pyper et al., 1984, 1986).

Quérat et al. (1984) isolaram seis lentivírus de ovinos franceses que apresentavam quadro clínico de pneumonia progressiva e classificou os isolados em dois tipos (I e II), de acordo com a característica observada durante infecção em células de plexo coróide ovino. Os isolados do tipo I mostraram-se altamente líticos, como ocorre com a infecção pelo MVV K1514, enquanto que o isolado do grupo II mostrou-se mais persistente, se comportando da mesma forma que o isolado americano CAEV-Co.

A heterogeneidade viral de nove isolados norte-americanos de lentivírus ovino foi analisada através da digestão enzimática de porções dos genes *gag* e *env* amplificadas por PCR (Rosati et al., 1995a). Esse estudo revelou que as amostras norte-americanas de lentivírus ovino possuíam significativa heterogeneidade com relação à amostra padrão de MVV K1514 e com outros lentivírus ovinos e caprinos norte-americanos. Os mesmos autores amplificaram somente lentivírus de origem ovina, quando utilizaram iniciadores específicos para a região *gag* desenhados a partir da sequência K1514 e amplificaram lentivírus tanto de origem caprina quanto ovina ao utilizarem iniciadores específicos para a região *env*.

As seqüências de aminoácidos codificadas pelos genes *gag* e *pol* de MVV e CAEV possuem, respectivamente, 74,8% e 77,5% de homologia entre si e apenas 60% de homologia é observada entre as seqüências

de aminoácidos codificadas pelo gene *env* dessas duas espécies virais (Saltarelli et al., 1990).

A análise filogenética de diversas seqüências de genes *gag*, *pol* e *env* e de LTR de LVPR obtidas em bancos de dados em junho de 1997, demonstrou que as diferentes amostras podem ser agrupadas em pelo menos seis grupos, sem distinção clara entre amostras de lentivírus derivadas de caprinos e de ovinos. As divergências entre CAEV e MVV foram de 16% para *gag* e *pol*, 22% para *env* e 35% para LTR (Zanoni, 1998). O mesmo autor encontrou forte evidência da possibilidade de transmissão interespecie dos LVPR.

Os LVPR se assemelham morfológica, patogênica e geneticamente, tendo sido relatada a ocorrência de transmissão experimental do MVV para o caprino e do CAEV para o ovino (Banks et al., 1983). Não há relato da ocorrência de infecção cruzada natural de ambos os vírus. Segundo Pasick (1998) os LVPR, apesar de serem considerados espécies virais distintas, devem ser entendidos como quasiespécies virais que possuem diferentes hospedeiros e mecanismos de patogenicidade distintos.

Marchesin et al. (1998) encontraram uma amostra de lentivírus isolada de um caprino no Rio Grande do Sul mais relacionada ao MVV do que ao CAEV, quando as amostras foram analisadas através do perfil de digestão enzimática. Castro et al. (1999) seqüenciaram parte do gene *pol* de amostras brasileiras e parte do gene *tat* de amostras brasileiras e francesas e fizeram a análise filogenética dessas amostras. Concluíram que as amostras provenientes do Estado de Minas Gerais eram mais relacionadas ao CAEV e que uma amostra de Pernambuco era mais relacionada ao MVV. O MVV não tem sido relacionado como causa natural de infecção em caprinos. Esses dados demonstram a heterogeneidade das amostras brasileiras de LVPR.

Zanoni et al. (1992) ao seqüenciarem os fragmentos dos genes *gag* e *pol* amplificados de seis amostras de lentivírus

caprino e ovino de origem holandesa, americana e suíça detectaram heterogeneidade de 38% para o gene *gag* e de 28% para o gene *pol*. Os estudos revelaram que as amostras de lentivírus caprino e ovino estudadas são mais relacionadas entre si e ao CAEV-Co do que à amostra protótipo do MVV. Os mesmos autores não encontraram diferenças significativas entre os lentivírus isolados de ovinos e caprinos.

Rosati et al. (1995b) seqüenciaram parte do gene *env* de uma amostra italiana de CAEV e encontraram 83% de homologia entre este isolado e a amostra CAEV-Co e de 63 a 66% de homologia quando comparado com três amostras de lentivírus ovino (K1514, EV1 e SAOMVV).

Já foram descritos diversos LVPR, sendo a amostra de referência para o CAEV o isolado dos Estados Unidos CAEV-Co (Saltarelli et al., 1990) e as amostras de referência para o MVV, o isolado da Islândia o MVV K1514 (Sonigo et al., 1985), da África do Sul o SA-OMVV (Quérat et al., 1990), e da Escócia o EV-1 (Sargan et al., 1991). A comparação entre essas amostras de diferentes regiões geográficas demonstra que, como ocorre para os demais lentivírus, os LVPR acumulam variações genéticas principalmente no gene *env* codificante para a proteína de superfície viral e nas pequenas janelas de leituras abertas codificantes para as proteínas regulatórias, sendo os genes *gag* e *pol* mais estáveis.

A análise filogenética de seqüências do gene *pol* de lentivírus ovinos franceses isolados de diversos ovinos infectados demonstrou que estes possuíam maior homologia entre si e com o vírus CAEV-Co que com os vírus MVV (Leroux et al., 1995b).

De acordo com Leroux et al., os lentivírus mostram considerável variabilidade genômica e antigênica, o que pode influenciar as propriedades biológicas dos vírions, como persistência viral no hospedeiro, tropismo, taxa de replicação, citopatogenicidade e desenvolvimento de doença. A análise genômica da região *pol*

de diversos isolados de lentivírus obtidos diretamente de macrófagos de ovinos naturalmente infectados demonstrou a presença de pelo menos três grupos genéticos distintos na França. Os mesmos isolados se mostraram mais relacionados ao CAEV-Co que aos padrões de MVV. O mesmo estudo demonstrou que o grau de variação e heterogeneidade entre as amostras francesas é semelhante com o observado para as amostras de lentivírus de primatas (HIV tipo 1, HIV tipo 2 e SIV), sugerindo a ocorrência de mecanismos evolutivos comuns (Leroux et al., 1996).

Leroux et al. (1997) analisaram as seqüências dos genes *pol* e *env* de 21 isolados franceses de lentivírus ovinos e caprinos e agruparam os LVPR franceses em quatro grupos distintos, de acordo com análise filogenética. Os grupos I e III eram formados por isolados de origem ovina e caprina, o grupo II por isolados de origem caprina e pelo padrão CAEV-Co e o grupo IV por isolados de referência de lentivírus ovino (K1514, SAOMVV e EV1).

Análise da seqüência do gene *env* de duas amostras americanas de lentivírus derivados de ovinos demonstrou que estas seqüências eram únicas, possuíam grande homologia entre si e possuíam maior identidade de nucleotídeos e aminoácidos com CAEV do que com MVV (Chebloune et al., 1996a). Trabalho semelhante foi realizado por Karr et al. (1996), que compararam as seqüências obtidas a partir do gene *env* de dois isolados norte-americanos de lentivírus ovino com seqüências conhecidas de isolados de lentivírus caprino e ovino a fim de determinar a relação genética entre o MVV e o CAEV. Ao utilizarem iniciadores específicos para o genoma do MVV 1772 (Braun et al., 1987) não houve amplificação dessas duas amostras pela PCR, enquanto que ao utilizarem iniciadores específicos para o CAEV-Co houve amplificação das duas amostras. Verificou-se que esses dois isolados eram genotipicamente mais semelhantes entre si (homologia de 97,5% na região *env*) e aos lentivírus caprinos norte-americanos (CAEV-Co e CAEV63) (homologia de 85%) do que ao MVV. Os

autores sugeriram que pode ter havido infecção de ovinos com um vírus "CAEV-like".

Valas et al. (1997) compararam as seqüências *gag*, *pol* e *env* de um isolado francês de lentivírus caprino com amostras padrão de CAEV e MVV e concluíram, através de análise filogenética e de mobilidade de heterodúplex, que todas as amostras de CAEV formam um grupo distinto que parece emergir de um grupo muito mais diverso e antigo que é o grupo MVV.

Valas et al. (2000) compararam, através de análise filogenética, a seqüência de nucleotídeos completa correspondente à região codificante para a proteína SU viral de quatro amostras francesas (021, 032, 680 e 786) de CAEV com amostras americanas de CAEV (CAEV-Co, 63 e 1244) e três amostras de MVV (K1514, EV1 e SAOMVV) e concluíram que todas as amostras de CAEV formam um grupo claramente separado do grupo de amostras de MVV e que os isolados franceses formam um subgrupo distinto do subgrupo dos isolados americanos.

Três amostras de lentivírus caprino isoladas de caprinos do estado do Rio Grande do Sul (Hötzel et al., 1993) e uma de lentivírus ovino isolada no estado do Paraná (Milczewski et al., 1997) foram analisadas filogeneticamente com relação aos genes *gag* e *pol*. Para esses dois genes, as amostras brasileiras de lentivírus caprino se agruparam no grupo CAEV e a amostra brasileira de lentivírus ovino se agrupou com as amostras de MVV (Ravazzolo et al., 2001).

Mais recentemente, Rolland et al. (2002) verificaram através de análise filogenética que uma amostra Irlandesa de CAEV está mais relacionada ao MVV e concluíram que não há uma distinção filogenética clara entre esses dois lentivírus que, apesar de infectarem hospedeiros diferentes, devem ser considerados como quasispécies virais únicas.

2.2 Caracterização da CAE

2.2.1 Histórico

A infecção de caprinos por lentivírus foi primeiramente reconhecida por Cork et al. em 1974, após a ocorrência de um surto de leucoencefalomielite em animais de 1 a 4 meses de idade nos Estados Unidos. Estudos epidemiológicos e virológicos revelaram que um mesmo vírus estava relacionado tanto à causa de sinovite e artrite crônica proliferativa em animais adultos quanto à de leucoencefalomielite em animais jovens, tendo o agente sido denominado CAEV (Cork et al., 1974; Clements et al., 1980; Crawford et al., 1980; Narayan et al., 1980; Adams et al., 1984). A epidemia de Artrite-Encefalite Caprina (CAE) que ocorreu nesse período não foi causada pela introdução de um novo vírus e sim pelas mudanças de manejo de rebanho, principalmente a alimentação de filhotes com *pool* de colostro, que resultaram num aumento da disseminação do vírus entre os animais. A partir desse período, a CAE ficou caracterizada como uma doença mundialmente presente (Clements & Zink, 1996).

2.2.2 Ocorrência

A CAE é uma enfermidade crônica, multissistêmica, que acomete caprinos. A enfermidade apresenta sinais clínicos de evolução lenta, incluindo artrite, pneumonia e mastite em animais adultos e leucoencefalite em animais jovens, entre 2 e 4 meses de idade (Cork et al., 1974; Crawford et al., 1980). Uma vez infectados, os animais permanecem portadores permanentes do vírus, e podem ou não desenvolver os sinais clínicos resultantes da doença.

A CAE tem distribuição cosmopolita e ocorre de forma endêmica com alta prevalência em países com produção leiteira intensiva, tais como Canadá, França, Noruega e Estados Unidos (Crawford & Adams, 1981; Adams et al., 1984; Cutlip et al., 1992; Péretz et al., 1994). Adams et al. (1984) demonstraram índices de reagentes positivos ao teste de IDGA mais elevados (65-81%) em amostras provenientes dos

Estados Unidos, Canadá, França, Noruega e Suíça quando comparados com os índices (inferiores a 10%) encontrados em amostras do Reino Unido, México, Quênia, Nova Zelândia e Peru. Os autores testaram 3729 amostras de soro caprino provenientes de 14 países. Crawford & Adams (1981) e East et al. (1997) relataram que a prevalência da CAE nos Estados Unidos é em torno de 65 a 81%. Cutlip et al. (1992) verificaram a presença da CAE em 28 estados americanos, com 73% dos rebanhos afetados.

Em países que importam animais para produção de leite, a prevalência é mínima ou inexistente nos animais nativos e é maior nos animais importados. Daltabuit Test et al. (1999) relatam que no México a prevalência da CAE nos animais importados variou de 17 a 35% em animais importados e que a infecção era inexistente nos animais nativos. No Brasil, a doença foi primeiramente constatada por Moojen et al. (1986) no estado do Rio Grande do Sul. Os autores detectaram quatro (6%) animais soropositivos ao teste de IDGA em 67 caprinos testados pertencentes a uma propriedade composta por alguns animais importados com presença de sinais clínicos de artrite e encefalite. Posteriormente, a CAE foi detectada em vários Estados da Federação, como: Bahia (Fitterman, 1988; Assis & Gouveia, 1994; Melo & Franke, 1997; Gouveia et al., 1998), Ceará (Assis & Gouveia, 1994; Melo & Franke, 1997; Pinheiro et al., 2001), Espírito Santo (Gouveia et al., 1998), Goiás (Gouveia et al., 1998), Maranhão (Alves & Pinheiro, 1997), Minas Gerais (Assis & Gouveia, 1994; Gouveia et al., 1998), Pará (Ramos et al., 1996), Pernambuco (Castro et al., 1994; Saraiva Neto et al., 1994), Piauí (Pinheiro et al., 1996), Rio de Janeiro (Assis & Gouveia, 1994; Cunha & Nascimento, 1995; Gouveia et al., 1998) e São Paulo (Garcia et al., 1992). Cunha & Nascimento (1995) detectaram presença de anticorpos contra CAEV em amostras de soro caprino estocadas desde o início da década de 80. A prevalência da enfermidade é maior nos animais importados, sendo mínima ou inexistente nos animais nativos (Melo & Franke, 1997).

2.2.3 Transmissão

Através da inflamação da glândula mamária, os macrófagos infectados são transferidos para o colostro e o leite e fazem com que os mesmos sejam a fonte mais importante de contaminação por lentivírus para os filhotes (Adams et al., 1983; McGuire et al., 1990; Rowe et al., 1992; Rimstad et al., 1993). Crawford & Adams (1981) demonstraram que filhotes não alimentados com colostro permaneceram soronegativos por pelo menos dois anos, enquanto que aqueles que foram alimentados com colostro se tornaram soropositivos aos dois meses de idade.

Outras rotas de infecção têm sido propostas, como através do contato prolongado entre animais infectados e não infectados (Adams et al., 1983) e através de fômites (materiais cirúrgicos contaminados com sangue de animal infectado, tatuadores ou equipamentos de descorna) (Al-Ani & Westweber, 1984, Rowe & East, 1997). Pode ocorrer também a transmissão por secreções e excreções como fezes, saliva, secreções urogenitais e respiratórias ou no canal obstétrico (Ali, 1987; Guedes et al., 2001).

Rowe et al. (1992) ressaltaram a possibilidade de transmissão sexual do CAEV, após demonstrarem ter havido soroconversão de cabras 140 dias após cruzamento com bodes soropositivos. Mais recentemente, o CAEV foi detectado, pela técnica de PCR, em sêmen de bodes naturalmente infectados, ressaltando a importância de se estabelecer o papel epidemiológico dessa fonte de infecção (Andrioli et al., 1999; Travassos et al., 1999).

East et al. (1987) estudaram a prevalência de animais soropositivos em rebanhos que adotavam como medida de controle da doença a alimentação dos cabritos com colostro ou leite tratados termicamente e demonstraram a ocorrência de soroconversão tardia em alguns cabritos com até seis meses de idade, especialmente se estes eram mantidos juntos com animais adultos positivos no

rebanho. Os autores ressaltaram a importância da transmissão horizontal resultante do contato direto com animais contaminados na manutenção da doença no rebanho.

A possibilidade de transmissão dos LVPR entre espécies foi considerada possível em experimento conduzido por Banks et al. (1983) onde caprinos foram inoculados com MVV. O vírus foi reisolado de três dos seis animais inoculados e foram detectados anticorpos anti-CAEV em dois desses animais. Não há relato da transmissão natural entre espécies.

2.2.4 Prevenção e Controle

O controle desta enfermidade é complexo devido ao seu caráter crônico e ao longo período de incubação (Zink et al., 1990). Como a principal via de transmissão é pelo colostro e leite, o controle da enfermidade nos rebanhos tem se baseado em separar as crias logo após o parto, evitando o contato com a saliva da mãe e ingestão do colostro e leite.

Levando-se em consideração de que qualquer animal positivo presente no rebanho é capaz de transmitir o vírus, independentemente do seu *status* sorológico, Adams et al. (1983) sugeriram as seguintes medidas de prevenção e controle da CAE:

- Remoção imediata dos filhotes após o nascimento, evitando-se o contato entre estes com as secreções da mãe;
- Isolamento dos filhotes em local separado das fêmeas infectadas;
- Fornecimento de colostro tratado termicamente (56°C por uma hora) ou proveniente de cabras não infectadas;
- Teste sorológico de todos os animais a cada seis meses com separação ou remoção dos soropositivos do rebanho.

Embora a manutenção de animais infectados no rebanho represente sérias

perdas econômicas ao produtor, o sacrifício de todos os animais infectados se torna inviável, principalmente se grande parte do rebanho estiver acometido, além de representar grande perda de material genético. Desta forma, têm sido implantados programas de controle da transmissão desta enfermidade, visando a obtenção de crias destes animais enfermos antes de sacrificá-los.

2.2.5 Diagnóstico Laboratorial

Os métodos de diagnóstico laboratorial das lentivirose de pequenos ruminantes mais frequentemente empregados são os sorológicos. Devido ao caráter de infecção persistente, um resultado sorológico positivo demonstra indiretamente a existência de infecção. Os métodos sorológicos mais empregados são a imunodifusão em gel de agarose (IDGA) e o ELISA. Também podem ser utilizadas a imunofluorescência direta e o *immunoblotting*.

A detecção direta da presença dos LVPR pode ser feita através do isolamento viral, da reação em cadeia da polimerase (PCR), da microscopia eletrônica e hibridização *in situ*.

2.2.5.1 Imunodifusão em Gel de Agarose (IDGA)

A IDGA tem sido amplamente utilizada na detecção de anticorpos contra LVPR (Crawford & Adams, 1981, Adams et al., 1984, Adams & Gorhan, 1986, Knowles et al., 1994) e é o teste padrão para CAEV de acordo com a OIE (2000), para o comércio internacional de caprinos.

Os animais infectados apresentam anticorpos contra as glicoproteínas do envelope viral, a gp135 e a gp40, e contra as proteínas do cerne viral, principalmente a proteína CA (p25). De acordo com de la Concha-Bermejillo et al. (1995) a primeira resposta detectada, geralmente na terceira semana de infecção, é principalmente contra a proteína do capsídeo viral e, por volta da quinta semana, são produzidas as respostas contra as demais proteínas.

Johnson et al. (1983) concluíram que a resposta de anticorpos contra gp135 é mais comum que a resposta a p28. Adams & Gorham (1986) testaram soros de caprinos em teste de IDGA frente aos dois antígenos de CAEV (gp135 e p28) e concluíram que o antígeno gp135 detecta um maior número de soros positivos que o antígeno p28 e que alguns soros somente reagiram frente ao antígeno p28.

Knowles et al. (1994) avaliaram o teste de IDGA para detecção de anticorpos anti CAEV utilizando antígenos de origem ovina e caprina e concluíram que o uso de antígeno homólogo aumenta a sensibilidade do teste em pelo menos 35%.

Hanson et al. (1996) acompanharam a expressão de anticorpos ao longo do tempo em caprinos soropositivos naturalmente infectados pelo CAEV, através de testes de IDGA empregados para a detecção tanto da gp135 quanto da p28 virais. Os autores verificaram que os animais testados apresentavam anticorpos tanto para gp135 quanto para p28 virais e que quando os animais reagiam a apenas uma das proteínas essa era predominantemente a gp135, geralmente nos animais mais velhos. Além disso, ocorreu variação da expressão de anticorpos ao longo do tempo, com reações soropositivas e soronegativas ocorrendo de forma intermitente em um mesmo animal.

2.2.5.2 Isolamento Viral

O isolamento dos LVPR é demorado, caro e requer a implantação de cultivos celulares especiais (Knowles, 1997; Wagter et al., 1998). O primeiro isolamento de CAEV foi feito por Crawford et al. (1980) a partir de explante de tecido de membrana sinovial caprina (MSC) de uma cabra que apresentava sinais clínicos de artrite.

O isolamento pode ser feito a partir de animais vivos infectados através de co-cultivo de monócitos/macrófagos obtidos de sangue periférico, leite ou fluido sinovial com células indicadoras (mais comumente MSC e plexo coróide ovino), ou *post mortem* através de explante de diversos tecidos

como pulmões, membrana sinovial, glândulas mamárias e tecidos linfóides (Crawford et al., 1980; Narayan et al., 1980; Dawson, 1983).

O primeiro relato de ECP produzido pelos LVPR foi feito por Sigurdardóttir & Thomar (1964), a partir do isolamento do vírus de pulmões de ovinos pertencentes a um rebanho naturalmente infectado por vírus Maedi. O ECP observado é característico e consiste no aparecimento de células gigantes multinucleadas (sincícios) e de lise celular. O surgimento do ECP é muito variável em tempo e intensidade e pode ser confirmado, por exemplo, através de imunomarcagem das células multinucleadas (Dawson, 1983).

O surgimento de ECP em tentativas de isolamento de lentivírus ocorreu de forma variável para diferentes autores: 60 dias após explante de diversos tecidos (Narayan et al., 1980), 6 meses após o co-cultivo de leucócitos do sangue periférico com MSC (Daltabuit Test et al., 1999), 5 a 18 semanas após o co-cultivo de leucócitos do sangue periférico com células de plexo coróide ovino (Quérat et al., 1984), duas semanas após o cultivo de macrófagos obtidos após maturação de monócitos do sangue periférico de ovinos infectados (Chebloune et al., 1996a), de 1-3 meses após o co-cultivo de leucócitos do sangue periférico com células de MSC ou uma semana após a implantação de explantes de membrana sinovial (Castro et al., 1999).

Narayan et al. (1980) reisolaram o CAEV de um cabrito recém-nascido seis semanas após a inoculação intracerebral de 1 mL de suspensão cerebral de uma cabra apresentando leucoencefalomielite, a partir do explante de diversos tecidos, incluindo cérebro, plexo coróide, baço, timo e linfonodo pré-escapular. Todos os cultivos celulares desenvolveram ECP em até dois meses.

Crawford et al. (1980) não obtiveram sucesso na tentativa de descrever outras células diferentes das de MSC susceptíveis à infecção pelo CAEV, diferentemente do observado por Klevejer-Anderson &

Cheevers (1981) que descreveram a susceptibilidade de cultivos de cérebro, plexo coróide, pulmões e rins para a replicação de CAEV, embora com menor eficiência do que cultivos de MSC.

Quérat et al. (1984) dividiram os LVPR em dois grupos, de acordo com as características apresentadas em cultivo celular. O primeiro grupo era composto por vírus que possuíam comportamento lítico em cultivo celular e o segundo grupo apresentava características de infecção persistente em cultivo.

Em 1993, Hötzel et al. isolaram o CAEV no Brasil a partir do explante de tecido de MSC de um animal que apresentava artrite e era soropositivo para o CAEV. Os autores relataram a presença de ECP característico da infecção por lentivírus 14 dias após a implantação dos cultivos primários e entre 8 a 90 dias após a inoculação de células de MSC e musculares fetais. O MVV foi isolado pela primeira vez no Brasil por Milczewski et al. (1997) a partir de um ovino com sete anos de idade naturalmente infectado e que apresentava sinais clínicos sugestivos de infecção por lentivírus e anticorpos contra MVV. Castro (1998) isolou amostras brasileiras de LVPR a partir de caprinos pertencentes a rebanhos comerciais dos estados de Minas Gerais e Pernambuco, através do co-cultivo de leucócitos do sangue periférico com células de MSC e a partir de explante de tecido de MSC.

Chebloune et al. (1996b) observaram um padrão restritivo de replicação de isolados de MVV mesmo após a maturação dos monócitos obtidos de ovinos infectados em macrófagos. Os autores não observaram nenhum ECP no cultivo de macrófagos e não observaram nenhuma partícula viral à microscopia eletrônica, embora tenham detectado, através da Reação em Cadeia da Polimerase (PCR), a presença de DNA pró-viral nessas células. Da mesma maneira, Russo et al. (1997) não tiveram sucesso na tentativa de isolamento viral a partir de co-cultivo de células do leite de animais naturalmente infectados com células de MSC, embora tenha sido

detectado o DNA pró-viral, através da PCR, nessas células.

Chebloune et al. (1996a) relataram a ocorrência de um padrão restritivo de replicação do CAEV em cultivo de células de plexo coróide ovino (PCO). Tanto o CAEV quanto o MVV, segundo esses autores, replicaram produtivamente em macrófagos e cultivos de células MSC, mas somente o MVV produziu ECP característico em células de PCO.

O ECP característico de infecção por lentivírus foi observado seis meses após o isolamento do agente a partir de co-cultivo de leucócitos do sangue periférico com células MSC de dois animais soropositivos para o CAEV em teste de IDGA e que apresentavam sinais clínicos da doença (Daltabuit Test et al., 1999). Os autores re-isolaram o vírus após a inoculação do sobrenadante de cultivo dos isolados em duas cabras soronegativas para o CAEV.

Narayan et al. (1983) examinaram repetidas vezes o sangue periférico de duas cabras infectadas pelo CAEV e demonstraram que uma das cabras mantinha uma taxa constante de apenas 3% dos monócitos periféricos infectados por CAEV, ou seja, apenas um em cada $2,2 \times 10^5$ leucócitos sanguíneos periféricos (PBMC) estava infectado pelo CAEV. A outra cabra examinada mantinha uma taxa de 8% dos monócitos periféricos infectados. Em outro experimento, Ellis (1990) encontrou que o número mínimo de PBMC de cabras infectadas pelo CAEV e clinicamente doentes necessário para o isolamento do agente variou de 10^5 a 5×10^7 , sem relação entre nível de anticorpos anti-p28 ou anti-gp135 e taxa de infecção dos PBMC. O mesmo autor verificou que a maior proporção de PBMC infectado encontrada foi de um em cada 2×10^4 e sugeriu haver a necessidade de pelo menos 5×10^7 PBMC nas tentativas de isolamento viral a partir do co-cultivo de monócitos com células indicadoras.

Andrioli (2001) isolou quatro amostras de lentivírus caprino a partir de sêmen lavado e não lavado obtidos de bodes naturalmente infectados pelo CAEV, após 63 dias da inoculação do sêmen (previamente tratado com antibióticos e antifúngicos e diluído em MEM) em monocamada subconfluente de MSC. A mesma autora não isolou o CAEV a partir de amostras de embrião lavado e não lavado obtidas de cabras naturalmente infectadas pelo CAEV e isolou amostras de CAEV a partir de amostras de fluido uterino.

2.2.5.3 Reação em Cadeia da Polimerase (PCR)

A PCR consiste na amplificação *in vitro* de segmentos de DNA. A PCR é uma técnica rápida, sensível e específica, podendo ser utilizada para a detecção de ácidos nucleicos virais. A PCR é útil para a detecção das lentiviroses, pois pode detectar o vírus nos animais sem a necessidade da verificação de sintomatologia clínica ou soroconversão (Rimstad et al., 1993; Clavijo & Thorsen, 1996).

Brodie et al. (1993) utilizaram a PCR com iniciadores específicos para LTR e *pol* para detecção de DNA pró-viral em ovelhas infectadas e concluíram que a PCR pode ser utilizada para detecção de infecção precoce por lentivírus, mesmo antes de se detectar a presença de anticorpos nesses animais.

Zanoni et al. (1990) utilizaram a PCR para demonstrar a presença de DNA pró-viral de LVPR em cultivos celulares. O DNA pró-viral foi detectado um dia após a infecção dos cultivos celulares e os autores estimaram que a PCR foi capaz de detectar uma célula contendo o DNA pró-viral em 10^6 células. Barlough et al. (1994) observaram que a presença de 30 a 240 células infectadas em cada 3000 monócitos eram suficientes para obtenção de resultado positivo através de PCR-*nested* desenvolvida para amplificação de parte da região *gag* do genoma pró-viral.

Zanoni et al. (1992) utilizaram a PCR para a detecção de seis diferentes isolados de CAEV e MVV, originados da Holanda, Estados Unidos e Suíça. Todos os isolados foram amplificados com iniciadores específicos para LTR da amostra K1514, somente um isolado suíço de MVV (amostra OLV) não foi amplificado quando foram utilizados iniciadores específicos para região *gag* do MVV K1514 e apenas um isolado de MVV e dois de CAEV foram detectados quando foram utilizados iniciadores específicos para a região *pol* do CAEV.

Reddy et al. (1993) utilizaram a PCR para detecção de DNA pró-viral de CAEV a partir de leucócitos obtidos de sangue periférico, células do líquido sinovial e células do leite, utilizando iniciadores e sondas desenhadas a partir da sequência publicada de CAEV-Co (Saltarelli et al., 1990). Dos animais soropositivos para CAEV através de teste de IDGA, somente dois foram considerados negativos pela PCR e três animais soronegativos ao teste de IDGA tiveram resultados positivos pela PCR.

De la Concha-Bermejillo et al. (1996), Travassos et al. (1999) e Andrioli (2000) indicaram a presença de DNA pró-viral de LVPR no sêmen, após amplificação por PCR.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Espécimens Clínicos

O rebanho utilizado no presente estudo, localizado em Minas Gerais, é composto de caprinos das raças Saanen, Toggenburg e Parda Alpina, com presença de alguns animais puros de origem importada. Nenhum animal apresentava sinais clínicos evidentes de infecção pelo CAEV, no momento do estudo.

Foram colhidas 160 amostras de sangue através da venipuntura da jugular utilizando tubos contendo vácuo (Becton Dickinson Vacutainer Systems, 5mL). O sangue foi centrifugado a 1500rpm por 10min para obtenção de soro para pesquisa de anticorpos anti-CAEV.

Dos 160 animais testados foram escolhidos 12 animais soropositivos para o isolamento viral. Foram colhidas amostras de sangue total desses 12 animais (Tabela 2), através da venipuntura da jugular utilizando tubos contendo vácuo e anticoagulante (Becton Dickinson Vacutainer Systems, Sodium Heparin, 10mL).

Tabela 2. Amostras de sangue total coletadas para isolamento viral e dados dos animais.

Amostra	Dados dos animais:			
	Sexo	Idade (meses)	Raça	Origem ^a
1	F	60	Saanen	PO
2	F	10	Parda Alpina	-
3	F	67	Saanen	-
4	M	18	Parda Alpina	PO
5	F	68	Toggenburg	-
6	F	78	Parda Alpina	PO
7	F	31	Saanen	PO
8	F	43	Toggenburg	-
9	F	31	Toggenburg	-
10	F	63	Saanen	PO
11	F	161	Toggenburg	-
12	M	95	Parda Alpina	POI

- Dados não coletados.

^a POI nascido no exterior, PO nascido no Brasil, filho de pais importados.

3.2 IDGA

Para a verificação da presença de anticorpos anti-CAEV, os 160 soros obtidos foram submetidos à microtécnica de IDGA (Gouveia, 1994) em agarose a 0,9% em tampão fosfato, utilizando 30 μ L de soro/antígeno, com a leitura realizada 24-48 horas após, com luz indireta sobre fundo escuro, sendo considerada definitiva a última leitura. Os soros foram testados frente ao antígeno comercial (Veterinary Diagnostic, Inc., USA).

3.3 Células de Membrana Sinovial Caprina (MSC)

As células MSC foram obtidas através do explante de tecido de membrana sinovial caprina de um cabrito jovem soronegativo para LVPR em teste de IDGA, filho de cabra também soronegativa. Os estoques celulares criopreservados em nitrogênio líquido foram descongelados e utilizados neste experimento em baixas passagens (até 15, no máximo), em Meio Essencial Mínimo com sais de Earle, L-glutamina e acrescido de 2,2g/L de bicarbonato de sódio e 25mM de Hepes (MEM), com 10% de soro fetal bovino (SFB).

3.4 Preparo dos Controles Positivo e Negativo

Os controles positivo e negativo foram preparados a partir de monocamadas de células de MSC inoculadas ou não com a amostra de LVPR de referência (ATCC VR-905 CAEV 75-G63 cloned lot LW91-10).

O controle positivo foi obtido através da inoculação do vírus de referência em uma garrafa de 25cm² de área (A25) com 48 horas de cultivo de MSC com concentração inicial de 30.000 células por cm². Foi inoculado 1mL da suspensão viral, contendo 200 Unidades Formadoras de Sincícios / mL em meio MEM com 2% de Penicilina/Estreptomicina (P/S)¹ e 1% de Anfotericina B (F)². Após uma hora de adsorção à 37°C, foi acrescentado

¹ Solução estoque: 200 UI de Penicilina / mL e 200 μ g de Estreptomicina / mL

² Solução estoque: 2,5 μ g de Anfotericina B / mL

5mL de meio MEM com 2% de P/S, 1% de F e 5% de SFB, para manutenção celular. A garrafa foi observada freqüentemente ao microscópio óptico para a verificação do ECP característico (formação de células gigantes ou sincícios), durante 12 dias. Para o controle negativo foi utilizado o mesmo procedimento acima, porém o inóculo consistiu de um mL de meio MEM com 2% de P/S e 1% de F, sem a adição de vírus. (Castro, 1998).

3.5 Isolamento Viral Através do Co-Cultivo de Leucócitos com MSC

3.5.1 Maturação dos Monócitos em Macrófagos

O sangue foi centrifugado a 2000rpm por 20min em centrífuga clínica e os leucócitos foram retirados, com auxílio de micropipeta, e transferidos para um tubo de centrifuga de 15mL com tampa. Foi adicionado 10mL de solução de cloreto de amônio a 0,84% em água bidestilada estéril resfriada, para lise dos eritrócitos. Após agitação vigorosa (vórtex) os leucócitos foram sedimentados através de centrifugação a 2000rpm por 10min. O sobrenadante foi descartado e foi acrescentado 10mL de solução salina tamponada (PBS) estéril resfriada para lavagem. Após agitação vigorosa (vórtex), os leucócitos foram sedimentados através de centrifugação a 2000rpm por 10min. Foram feitas mais duas lavagens com solução de PBS. Após as lavagens com PBS, os leucócitos foram ressuspensos em meio RPMI (com L-glutamina, 2 g/ L de bicarbonato de sódio e 25mM de Hepes) adicionado de 2% de P/S e 10% de SFB e colocados em garrafas A25 e em placas de seis poços. Após 24 horas de cultivo à 37°C e 5% de CO₂, o meio foi completamente trocado e os leucócitos foram mantidos por uma semana em estufa a 37°C para maturação dos monócitos em macrófagos (Chebloune et al., 1996a).

3.5.2 Co-Cultivo de Macrófagos com MSC

Após uma semana de incubação foram acrescentadas células de MSC na concentração de 30.000 células/cm² em meio MEM com 2% de P/S, 1% de F e 5%

de SFB (meio de manutenção celular). As garrafas e placas foram observadas freqüentemente ao microscópio óptico quanto à presença de ECP característico de infecção por lentivírus caprino (presença de sincícios) e, a cada 15 dias, foram feitas coletas dos sobrenadantes e as monocamadas de células foram tripsinizadas, sendo as garrafas e placas acrescidas de células de MSC e de meio de manutenção celular (Castro, 1998). Ao final de 45 dias, as placas de seis poços contendo as amostras e os controles positivo e negativo foram coradas com solução de cristal violeta a 0,1%, para melhor visualização do ECP. As mesmas amostras e os controles das garrafas tiveram seus sobrenadantes coletados e estocados (-80°C) e foram tripsinizadas para se realizar a extração de DNA.

3.6 Extração de DNA das Amostras e dos Controles Positivo e Negativo

Para a extração do DNA, as monocamadas de células foram lavadas por duas vezes com solução de PBS e foram tripsinizadas, suspensas em 10mL de solução de PBS e

centrifugadas a 2000xg por 10min (Centrífuga modelo B4i, Jouan). O sobrenadante foi descartado e o sedimento utilizado para a extração de DNA através do kit de extração *GFX™ Genomic Blood DNA Purification Kit* (Pharmacia), segundo instruções do fabricante.

3.7 PCR

3.7.1 Desenho dos Iniciadores

Os iniciadores foram desenhados baseando-se na seqüência publicada de CAEV-Co (Saltarelli et al., 1990) obtida no GenBank (número de acesso M33677) (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?CMD=search&DB=nucleotide>), com o auxílio dos programas Blastn (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast>), Oligo® e OligoTech (Versão 1.0) (<http://www.oligoetec.com/OLIGOTECH.HTM>), com o objetivo de se amplificar um fragmento de 630pb da região *gag* do genoma pró-viral, correspondente à proteína do capsídeo viral (CA) (Figura 3). Os iniciadores escolhidos, CAEV1 e CAEV2, estão representados na Tabela 3.

941	CCAATAGTAG	TGCAAGCAGC	AGGAGGGAGA	AGCTGGAAAG	CAGTAGATTC	TGTAATGTTC
1001	CAGCAACTGC	AAACAGTAGC	AATGCAGCAT	GGCCTCGTGT	CTGAGGACTT	TGAAAGGCAG
1061	TTGGCATATT	ATGCTACTAC	CTGGACAAGT	AAAGACATAC	TAGAAGTATT	GGCCATGATG
1121	CCTGGAAATA	GAGCTCAAAA	GGAGTTAATT	CAAGGGAAAT	TAAATGAAGA	AGCAGAAAGG
1181	TGGAGAAGGA	ATAATCCACC	ACCTCCAGCA	GGAGGAGGAT	TAACAGTGGG	TCAAATTATG
1241	GGGGTAGGAC	AAACAAATCA	AGCAGCAGCA	CAAGCTAACA	TGGATCAGGC	AAGGCAAATA
1301	TGCCTGCAAT	GGGTAATAAA	TGCATTAAGA	GCAGTAAGAC	ATATGGCGCA	CAGGCCAGGG
1361	AATCCAATGC	TAGTAAAGCA	AAAAACGAAT	GAGCCATATG	AAGATTTTGC	AGCAAGACTG
1421	CTAGAAGCAA	TAGATGCAGA	GCCAGTTACA	CAGCCTATAA	AAGATTATCT	AAAGCTAACA
1481	CTATCTTATA	CAAATGCATC	AGCAGATTGT	CAGAAGCAAA	TGGATAGAAC	ACTAGGACAA
1541	AGAGTACAAC	AAGCTAGTGT	AGAAGAAAAA	ATGCAAGCAT	GTAGAGATGT	GGGATCAGAA
1061	GGGTTCAAAA	TGCA				

Figura 3: Região do genoma da amostra CAEV-Co (Saltarelli et al., 1990) que codifica para a proteína Gag do capsídeo viral (CA ou p25). Os nucleotídeos em negrito correspondem à região de hibridização dos iniciadores.

Tabela 3. Iniciadores escolhidos para a amplificação de parte do gene *gag* codificante para a proteína CA do genoma pró-viral.

Iniciador	Seqüência de Bases	Localização ^a
CAEV1 (<i>sense</i>)	GGA GGG AGA AGC TGG AA	962-978
CAEV2 (<i>antisense</i>)	CAC ATC TCT ACA TGC TTG CA	1591-1571

^a CAEV-co (Saltarelli et al., 1990)

3.7.2. Padronização da Técnica e Amplificação

As reações foram realizadas em volume total de 30µL contendo 10mM de Tris-HCl (pH 8,0), 50mM de KCl, 2,0mM de MgCl₂, 200µM de cada dNTP (dATP, dGTP, dCTP, dTTP), 20pmoles de cada iniciador, 1,0 U Taq DNA polimerase e 1µg de DNA. Uma gota de óleo mineral foi colocada em cada tubo.

Para a amplificação, o termociclador (PTC-100, MJ Research, Inc., USA) foi programado para executar um passo inicial a 94°C por 5min e 35 ciclos de desnaturação a 94°C por 1min, hibridização (foram testadas diferentes temperaturas, 57 a 60°C) por 1min e extensão a 72°C por 1min. Após os ciclos, as amostras foram submetidas à 72°C por 8min e a uma temperatura final de 4°C por 10min.

3.7.3 Determinação da Sensibilidade da PCR

Após padronizadas as condições da PCR, o controle positivo contendo 1µg de DNA (dosado em espectrofotômetro UV160, em comprimento de onda de 260nm) foi diluído (em água bidestilada estéril) em diluições decimais de 10⁻¹ a 10⁻⁶ e amplificado, com o objetivo de se calcular a quantidade mínima de DNA detectável pela PCR.

3.7.4 Eletroforese

Para leitura dos resultados, foi realizada eletroforese em gel de agarose 1% (p/v) em tampão TAE 1X (20,3mM de KH₂PO₄, 10,4M de Tris-acetato e 10mM de EDTA, pH 8,0) corado com brometo de etídio (0,5µg/mL, adicionado ao gel). A corrida foi realizada em sistema de eletroforese horizontal a 120V por 40min e foram aplicados 10µL de produto amplificado por canaleta e uma canaleta para o marcador de peso molecular (100bp DNA Ladder, Gibco BRL). As bandas foram visualizadas através da incidência de luz ultravioleta (320nm) e o gel foi fotografado com o auxílio do equipamento Image Master™ VDS (Pharmacia).

3.8 Seqüenciamento dos Fragmentos Amplificados

As amostras foram amplificadas por PCR e purificadas após eletroforese em gel de agarose de baixo ponto de fusão ("Low Melting Point") 1% (p/v) em tampão TAE 1X corado com brometo de etídio (5µg/mL, adicionado ao gel). A corrida foi realizada em sistema de eletroforese horizontal a 120V por 40min, com aplicação de 60µL de DNA amplificado por canaleta. O gel foi rapidamente visualizado sob luz ultravioleta para verificação e excisão das bandas de DNA. As bandas foram purificadas através do kit de extração WIZARD® PCR Preps (Promega), conforme instruções do fabricante.

As amostras purificadas foram enviadas para o Laboratório de Pesquisa e Análise de Fragmentos de DNA (Bioagro)*, para seqüenciamento.

As seqüências obtidas foram editadas com o auxílio do programa Chromas (versão gratuita 1.45) (Technelysium Pty, Ltd) (<http://www.technelysium.com.au/chromas.html>) e foram alinhadas com o auxílio do programa Clustal W versão 1.8 DOS (Thompson et al., 1994) (<http://www.csc.fi/molbio/progs/clustalw/>), para obtenção de uma seqüência consenso. As seqüências editadas foram analisadas para a determinação de similaridades em relação aos nucleotídeos e aos aminoácidos com as amostras de LVPR, utilizando-se os programas Blastn e Blastx, frente aos bancos de dados *nr* (GenBank + EMBL + DDBJ + PDB *sequences*) (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast>).

3.8.1 Análise Filogenética

As seqüências de nucleotídeos obtidas e as seqüências deduzidas de aminoácidos foram alinhadas com o auxílio dos programas Multalin (Corpet, 1998) (<http://prodes.toulouse.inra.fr/multalin>) e Clustal W versão 1.8 DOS (Thompson et al., 1994) com os padrões de CAEV (CAEV-Co) e MVV (K1514, ZZV1050, SA-OMVV e EV1) e os graus de homologia/divergência entre as amostras foram calculados e expressos em porcentagem.

* Campus Universidade Federal de Viçosa 36570-000, Viçosa – Minas Gerais

O dendograma foi construído com o auxílio do programa Multalin (Corpet, 1998), para se determinar os agrupamentos das seqüências e a relação genética entre as

mesmas. Os isolados utilizados para comparação e seus respectivos números de acesso ao GenBank estão descritos na Tabela 4.

Tabela 4. Seqüências de LVPR e seus respectivos números de acesso ao GenBank.

LVPR	Isolado e Origem	Número de Acesso	Referência
CAEV	CAEV-Co ^a (Estados Unidos)	M33677	Saltarelli et al., 1990
	CA680 (França)	AF015181	Valas et al., 1997
	1GA (Noruega)	AF322109	Gjerset et al., 2000
	C18 (Brasil)	AJ305040	Ravazzolo et al., 2001
	C767 (Brasil)	AJ305041	Ravazzolo et al., 2001
	C47 (Brasil)	AJ305042	Ravazzolo et al., 2001
MVV	K1514 (Islândia)	M10608	Sonigo et al., 1985
	SA-OMVV (África do Sul)	M34193	Querat et al., 1990
	ZZV1050 (Holanda)	X54379	Zanoni et al., 1991
	EV1 (Escócia)	S51392	Sargan et al., 1991
	V27 (Brasil)	AJ305039	Ravazzolo et al., 2001

^a A seqüência de nucleotídeos corresponde à região do gene *gag* codificante para a proteína do capsídeo (CA) viral, posições entre 979 e 1572.

4 RESULTADOS

4.1 IDGA

Dos 160 soros testados, 32 (20%) foram positivos. Dos seis machos testados, quatro foram positivos. Não foram observados sinais clínicos compatíveis com infecção por CAEV em nenhum dos animais examinados.

4.2 Isolamento Viral

Das doze amostras pesquisadas, cinco (3, 4, 6, 8 e 10, descritas na Tabela 2)

apresentaram ECP característico de infecção por LVPR após 45 dias de co-cultivo de macrófagos com células de MSC, sendo nomeadas BR-UFGM/PL1, BR-UFGM/PL2, BR-UFGM/PL3, BR-UFGM/PL4, BR-UFGM/PL5 (Figuras 4 a 7, incluídos os controles positivo e negativo).

O ECP caracterizou-se pela presença de inúmeros sincícios, que surgiram entre três a cinco dias após inoculação dos isolados em MSC com 24 horas de cultivo.

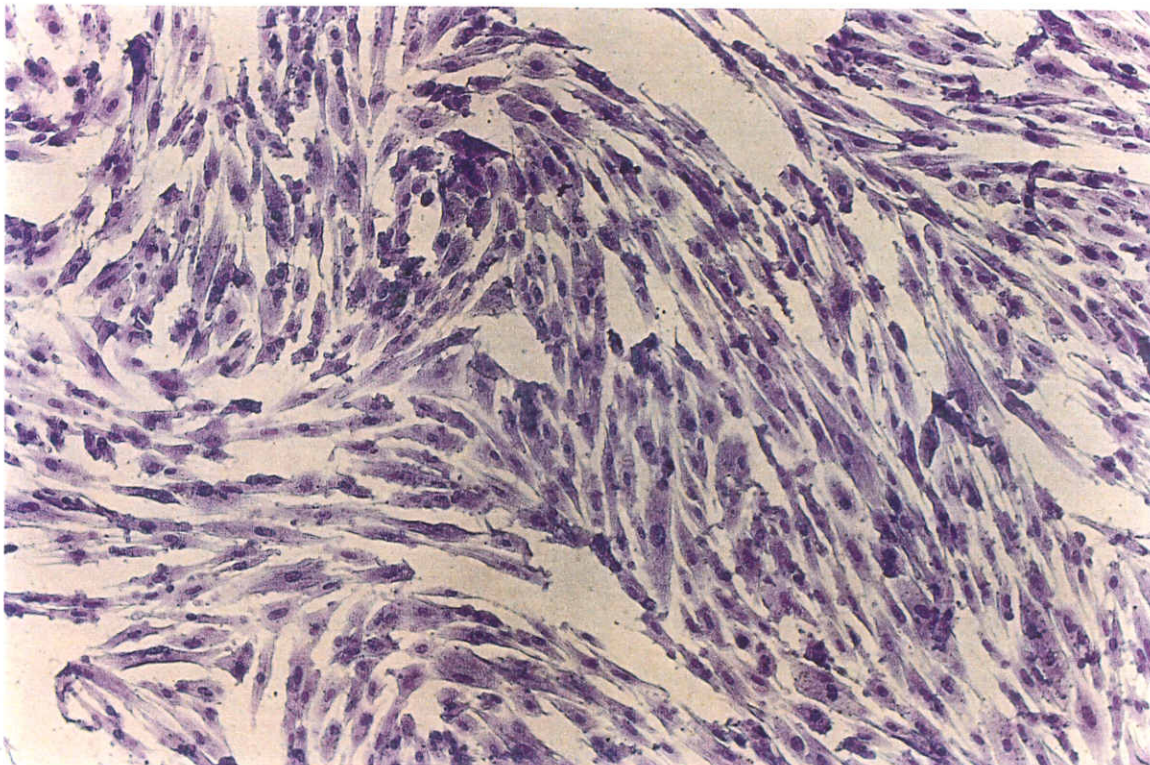


Figura 4. Monocamada de células de MSC em meio MEM com sais de Earle e 5% de SFB, corada com solução de cristal violeta a 0,1%, após 12 dias de cultivo (controle negativo).

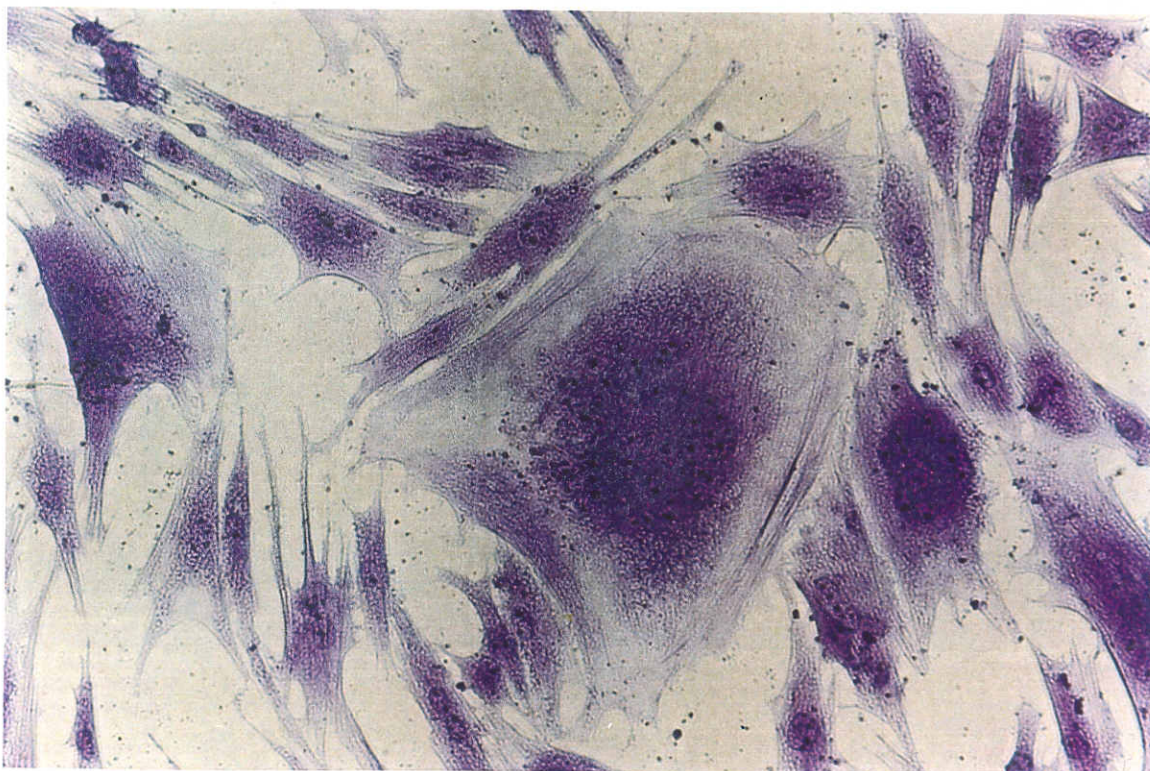


Figura 5. Monocamada de células de MSC inoculada com CAEV de referência e mantida em meio MEM com sais de Earle e 5% de SFB, corada com solução de cristal violeta a 0,1% após 12 dias de cultivo (controle positivo).

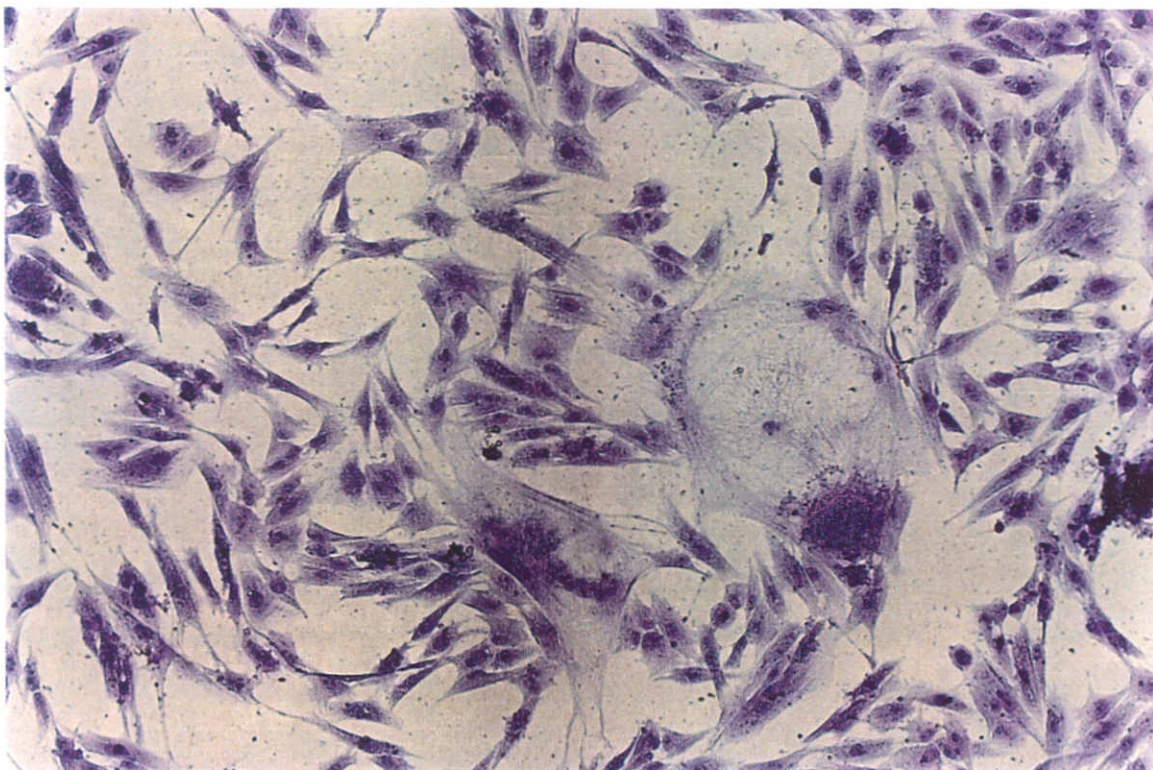


Figura 6. Isolado BR-UFMG/PL1. Co-cultivo de macrófagos com células de MSC mantido em meio MEM enriquecido com sais de Earle e corado com solução de cristal violeta 0,1% após 45 dias de cultivo.

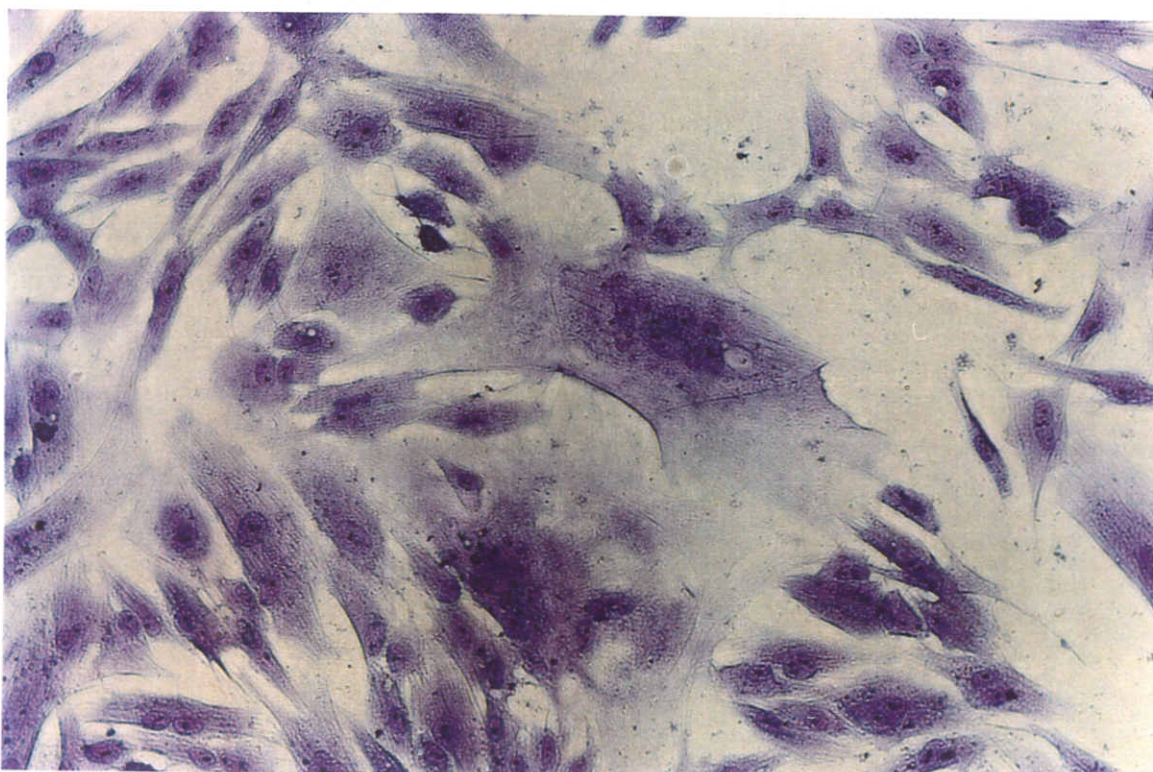


Figura 7. Isolado BR-UFMG/PL2. Co-cultivo de macrófagos com células de MSC mantido em meio MEM enriquecido com sais de Earle e corado com solução de cristal violeta 0,1% após 45 dias de cultivo.

4.3 PCR

A PCR foi padronizada com uma temperatura de hibridização dos iniciadores de 60°C. Os reagentes e os ciclos de amplificação foram mantidos conforme descrito anteriormente (item 3.7.2).

Após amplificação por PCR das diversas diluições do controle positivo, verificou-se a

presença de banda de DNA do tamanho esperado até a diluição de 10⁻⁴, o equivalente a 100pg de DNA.

Todas as amostras positivas ao isolamento foram amplificadas pela PCR utilizando os iniciadores CAEV1 e CAEV2, resultando em um fragmento de aproximadamente 600pb (Figura 8). As sete amostras negativas ao isolamento também foram negativas à PCR.

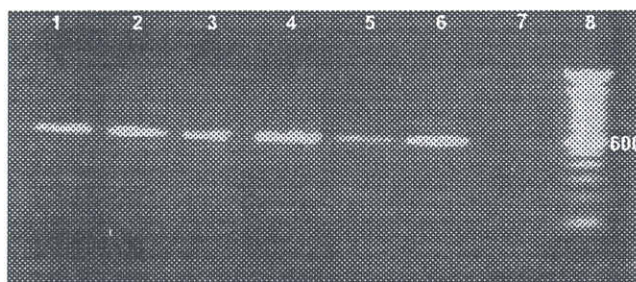


Figura 8. Gel de agarose 1% (p/v) corado com brometo de etídio e visualizado sob luz ultravioleta. A PCR amplificou um fragmento de aproximadamente 600 nt do gene *gag* do genoma pró-viral. Canaleta 1 (BR-UFMG/PL1), canaleta 2 (BR-UFMG/PL2), canaleta 3 (BR-UFMG/PL3), canaleta 4 (BR-UFMG/PL4), canaleta 5 (BR-UFMG/PL5), canaleta 6 (controle positivo), canaleta 7 (controle negativo) e canaleta 8 (peso molecular 100 bp DNA ladder – Gibco-BRL).

4.4 Seqüenciamento das Amostras

Todos os cinco isolados obtidos foram seqüenciados, a partir do produto de PCR purificado. Para o isolado BR-UFMG/PL1, foram obtidas duas seqüências, uma utilizando-se o iniciador CAEV1 e a outra utilizando-se o iniciador CAEV2. Para os isolados BR-UFMG/PL2 e BR-UFMG/PL3 foram obtidas três seqüências de cada um, sendo uma com o iniciador CAEV1 e duas com o CAEV2. E para os isolados BR-UFMG/PL4 e BR-UFMG/PL5 só foi possível a obtenção de apenas uma seqüência de cada um, portanto estes foram excluídos das análises posteriores. Após serem analisados para a determinação de similaridades em relação aos nucleotídeos e aos aminoácidos com as amostras de LVPR já depositadas no GenBank, verificou-se

que estes possuíam, em média, 91% de homologia com a seqüência CAEV-Co.

4.4.1 Análise Computacional das Seqüências

As seqüências consenso obtidas para os isolados BR-UFMG/PL1, BR-UFMG/PL2 e BR-UFMG/PL3 foram alinhadas separadamente com o padrão CAEV-Co (Saltarelli et al., 1990) para retirada das regiões correspondentes aos iniciadores, resultando em uma seqüência de 593 nucleotídeos codificante para a proteína do capsídeo viral (CA), correspondente aos aminoácidos 150 a 347 em relação ao padrão CAEV-Co obtido no banco de dados Swissprot (número de acesso P33458), faltando os três aminoácidos iniciais e os 12 finais da proteína (Figura 9).


```

>BR-UFGM/PL1
TGCCGTAGACTCTGTGATGTTCCACCAGCTGCATACAGTAGCAATGCCGCATGGCCTCGTGTCTGAGGAC
TTTGAAAGGCAGTTGGCATATTATGCTACTACCTGGACAAGTAAAGATATACTGGAAGTATTGGCCATGA
TGCCTGGGAATAGAGCTCAAAAAGAATTAATTC AAGGAAAATTAATGAAGAAGCAGAAAAGGTGGAGAAG
GAATAATCCACCACCTCAAGCAGGCGGAGGATTAACAGTGGATCAAATTATGGGGGTAGGACAAACAAAT
CAAGCAGCTGCACAAGCTAACATGGATCAGGCAAGACAAATATGCCTGCAATGGGTAATATCAGCCTTAA
GAGCAGTGAGACATATGTCTCATAAACCAGGGAATCCGCTGCTAGTAAAGCAAAAAACAAATGAGTCATA
TGAAGATTTTGCAGCTAGACTGCTAGAAGCAATAGATCCAGCCCCAGTAGCACATCCTATAAAAGATTAT
TTAAAGTTAACACTATCTTATACGAATGCATCATCAGATTGTCAAAGCAAATGGGTAGAATGCTAGGAT
CGAGAGTCCATCAAGCCAGTGTGGGCCAAAAAA

>BR-UFGM/PL1
AVDSVMFHQLHTVAMPHGLVSEDFERQLAYYATTWTSKDI LEVLAMMPGNRAQKELIQGKLNEEAERWRR
NNPPPQAGGGLTVDQIMGVGQTNQAAAQANMDQARQICLQWVI SALRAVRHMSHKPGNPLLVKQKTNESY
EDFAARLLEAIDPAPVAHPIKDYLKLTLSYTNASSDCQKQMRMLGSRVHQASVQK

>BR-UFGM/PL2
AGCAGTAGATTCTGTAATGTTCCAGCAACTGCAAACAGTAGCAATGCAGCATGGACTCGTGTATGAAGAC
TTTGAAAGGCTGTCCGCATATTATGCTACTACCTGGACAAGTAAAGATATACTGGAAGTATTGGCCATGA
TGCCTGGGAATAGAGCTCAAAAAGAATTAATTC AAGGAAAATTAATGAAGAAGCAGAAAAGGTGGAGAAG
GAATAATCCACCACCTCAAGCAGGCGGAGGATTAACAGTGGATCAAATTATGGGGGTAGGACAAACAAAT
CAAGCAGCTGCACAAGCTAACATGGATCAGGCAAGACAAATATGCCTGCAATGGGTAATATCAGCCTTAA
GAGCAGTGAGACATATGTCTCATAAACCAGGGAATCCGCTGCTAGTAAAGCAAAAAACAAATGAGTCATA
TGAAGATTTTGCAGCAAGACTGCTAGAAGCAATAGATGCAGAGCCAGTAGCACATCCTATAAAAGAATAC
TTAAAGTTAACACTATCTTATACGAATGCATCATCAGATTGTCAAAGCAAATGGATAGAATGCTGGAAT
CAAGAGTACAACAAGCTAGTGTAGAACAAAAAA

>BR-UFGM/PL2
AVDSVMFQQLQTVAMQHGLVYEDFERLSAYYATTWTSKDI LEVLAMMPGNRAQKELIQGKLNEEAERWRR
NNPPPQAGGGLTVDQIMGVGQTNQAAAQANMDQARQICLQWVI SALRAVRHMSHKPGNPLLVKQKTNESY
EDFAARLLEAIDAEFVAHPIKEYLKLTLSYTNASSDCQKQMDRMLERSVQQASVEQK

>BR-UFGM/PL3
AGCCGTAGATTCTGTAATGTTCCAGCAGCTGCAAACAGTAGCAATGCAGCATGGCCTCGTGTGAGAGGAC
TTTGAAAGGCTTCCAGCATATCATGCTACTACCTGGGCAAGTAAAGATATCTTAGAAGTACTGGCCATGA
TGCCTGGAAATAGAGCTCAAAAAGAGTTAATTC AAGGAAAATTAATGAAGAAGCAGAGAGGTGGAGAAG
GAATAATCCACCACCTCCAGCAGGAGGAGGGTTAACAGTGGATCAAATTATGGGAGTAGGACAAACAAAT
CAGGCAGCGGCACAAGCAAACATGGATCAGGCAAGACAAATATGCCTACAATGGGTGATATCAGCACTAA
GAGCAGTAAGGCATATGGCTCACAAAGCCAGGGAATCCAATGTTAGTAAAGCAAAAAGCAAATGAGCCATA
TGAAGAATTTGCAGCAAGGCTGCTGGAAGCAATAGATGCCGAGCCAGTTAATCAGCCCATAAAAGAATAT
CTAAAATAACGTTGTCTTATACGAATGCATCCTCAGATTGTGAGAAGCAAATGGATAGAACACTAGGAC
AAAGAGTCAAACAAGCTAGTGTAGAACAAAAAA

>BR-UFGM/PL3
AVDSVMFQQLQTVAMQHGLVSEDFERLPAYHATTWASKDI LEVLAMMPGNRAQKELIQGKLNEEAERWRR
NNPPPQAGGGLTVDQIMGVGQTNQAAAQANMDQARQICLQWVI SALRAVRHMAHKPGNPLLVKQKANEPY
EEFAARLLEAIDAEFVNQPIKEYLKLTLSYTNASSDCQKQMDRTLGRVQKASVEQK

```

Figura 9. Sequências de nucleotídeos e sequências de aminoácidos deduzidas representadas no formato FASTA, obtidas para cada uma das amostras.

As divergências de nucleotídeos e aminoácidos entre as seqüências de CAEV e MVV foram calculadas com o auxílio do programa Clustal W versão 1.8 e foram representadas na Tabela 5.

As seqüências de nucleotídeos de BR-UFGM/PL1, BR-UFGM/PL2 e BR-UFGM/PL3 apresentaram, respectivamente, 10, 8 e 9% de divergência com relação ao

CAEV-Co e de 21 a 26% de divergência com relação ao padrões de MVV (K1514, SA-OMVV, ZZV1050 e EV1), similares às divergências encontradas entre o CAEV-Co (de 21 a 23%) e as amostras de MVV. Em relação aos aminoácidos, as seqüências BR-UFGM/PL1, BR-UFGM/PL2 e BR-UFGM/PL3 apresentaram 10, 9 e 7% de divergência em relação ao CAEV-Co.

Tabela 5. Porcentagem de divergências de nucleotídeos (porção inferior esquerda da matriz) e aminoácidos (porção superior direita da matriz) entre as seqüências BR-UFGM/PL1 (PL1), BR-UFGM/PL2 (PL2) e BR-UFGM/PL3 (PL3), a amostra CAEV-Co (Cork) e as amostras de MVV K1514, SA-OMVV (SAOMV), ZZV1050 (ZZV) e EV1.^a

LVPR	Isolado	Distâncias com:							
		Cork	PL1	PL2	PL3	K1514	SAOMV	ZZV	EV1
CAEV	Cork	-	11	9	7	12	14	14	15
	PL1	10	-	7	12	18	19	20	20
	PL2	8	5	-	9	16	17	17	18
	PL3	9	14	12	-	16	18	16	19
MVV	K1514	22	23	22	23	-	5	6	8
	SAOMV	21	23	22	23	16	-	9	9
	ZZV	21	22	21	23	16	15	-	11
	EV1	23	26	24	26	17	15	15	-

^a As diferenças foram calculadas através da comparação dois a dois entre os isolados. As seqüências comparadas correspondem ao gene *gag* codificante para a proteína do capsídeo viral (p25) – posições entre 979 e 1572 da amostra CAEV-Co (Saltarelli et al., 1990). O alinhamento das seqüências foi obtido através do programa Clustal W versão 1.8.

A Figura 10 mostra o alinhamento das seqüências de nucleotídeos e de aminoácidos com a amostra padrão CAEV-Co e com as amostras padrão de MVV

(K1514, ZZV1050, SA-OMVV e EV1), feito com o auxílio do programa Multalin (Corpet, 1998).

A

	10	20	30	40	50	60
CAEV-Co	-AGCAGTAGATTCTGTAATGTTCCAGCAACTGCAAACAGTAGCAATGCAGCATGGCCTCG					
BR-UFGM/PL1	-T..C.....C..T..G.....C..G.....T.....C.....					
BR-UFGM/PL2	-.....T.....A....					
BR-UFGM/PL3	-...C.....T.....G.....					
K1514	-G..G.....G..A..G.C.....G.....A..T.					
ZZV1050	-G..G.....C..A..TG.C.....A..G.....AT.....C.....A..T.					
SAOMVV	-...G.....G..A..G.CA.....G.....A..T.					
EV1	AG..G.....A..G.C.....T.....T..G..T.....C..T.					

	70	80	90	100	110	120
CAEV-Co	TGTCTGAGGACTTTGAAAGGCAGTTGGCATATTATGCTACTACCTGGACAAGTAAAGACA					
BR-UFGM/PL1T.					
BR-UFGM/PL2	...A..A.....T..C.....T.					
BR-UFGM/PL3	...A.....TTCCA.....C.....G.....T.					
K1514	...C.....T.....G.....A.....T.....T.					
ZZV1050	...C.....T.....G..A..G.A.....C.....A.....T.					
SAOMVV	...C.....T.....A..A..A.....C.....A.....C.....T.					
EV1	...C.....T.....A..C.....A.....C..G..T.					

	130	140	150	160	170	180
CAEV-Co	TACTAGAAGTATTGGCCATGATGCCTGGAAATAGAGCTCAAAGGAGTTAATTCAAGGGA					
BR-UFGM/PL1	...G.....G.....A..A.....A.					
BR-UFGM/PL2	...G.....G.....A..A.....A.					
BR-UFGM/PL3	.CT.....C.....A.....					
K1514	.T.....T.....G.....A..G.....A.....A.					
ZZV1050	.T.....T.....GT.C.....A..A.....A..G..A.					
SAOMVV	.T.....C.A.....G..G.....A.....A..G.....					
EV1	.T.....G..C.....A..G..A..C.G.....G..A.					

	190	200	210	220	230	240
CAEV-Co	AATTAATGAAGAAGCAGAAAGGTGGAGAAGGAATAATCCACCACCTCCAGCAGGAGGAG					
BR-UFGM/PL1A.G.....C....					
BR-UFGM/PL2A.G.....C....					
BR-UFGM/PL3G.....AG.....					
K1514GT..AC.A.....CGGG..GAAT.TCC---					
ZZV1050G.....GT...C.G.....GGGC...AAT.TCC---					
SAOMVVG.....GT...C.G.....C...GGG...AAT.TCC---					
EV1A...GT...C.G.....G...GGG...AAT.TCC---					

	250	260	270	280	290	300
CAEV-Co	GATTAACAGTGGATCAAATTATGGGGGTAGGACAAACAAATCAAGCAGCAGCACAAGCTA					
BR-UFGM/PL1T.....					
BR-UFGM/PL2T.....					
BR-UFGM/PL3A.....G.....G.....A.					
K1514	---.C..G.....A.....A..G.....C.....GCAG..T.T....C.					
ZZV1050	---.T.....C.....CA...T...G....					
SAOMVV	---.T..T.....G.....A..C.....CAG...T.G.....					
EV1	---.C..G.....C.....A.....CAG...T...G....					

(continua)

	310	320	330	340	350	360
CAEV-Co	ACATGGATCAGGCAAGGCAAATATGCCTGCAATGGGTAATAAATGCATTAAGAGCAGTAA					
BR-UFGM/PL1A.....TCA..C.....G.					
BR-UFGM/PL2A.....TCA..C.....G.					
BR-UFGM/PL3A.....A.....G..TCA..C.....G.					
K1514	.T.....A..G.....G.....CA..G.....T...G.					
ZZV1050	.T.....A..G..A...T..T.....CA..C.....GT.T...					
SAOMVV	.T.....A..GC.T..T...G.....CA..C..G...T.....					
EV1	.T.....ACG...G..C.G...T...G....C...CA..C..G....G....					

	370	380	390	400	410	420
CAEV-Co	GACATATGGCGCACAGGCCAGGGAATCCAATGCTAGTAAAGCAAAAAACGAATGAGCCAT					
BR-UFGM/PL1T.T..T.AA.....GC.....A.....T...					
BR-UFGM/PL2T.T..T.AA.....GC.....A.....T...					
BR-UFGM/PL3	.G.....T...A.....T.....G.A.....C...					
K1514	.G.....T.A..T..A...A..C..T..T...G...G..G.AT.C...AGT.					
ZZV1050T...T..A..G.....G.....GG.T.....AAC.					
SAOMVVT.A...A...A...T...GA...A...G.AT.G...AAGT.					
EV1	.G.....T...T.....T..C.....G.....G..G.AT.C...AGT.					

	430	440	450	460	470	480
CAEV-Co	ATGAAGATTTTGCAGCAAGACTGCTAGAAAGCAATAGATGCAGAGCCAGTTACACAGCCTA					
BR-UFGM/PL1T.....C...CC....AG...T...					
BR-UFGM/PL2AG...T...					
BR-UFGM/PL3A.....G.....G.....C.....AT...C.					
K1514C..CAT...TC.C..A...G..T..T...G..A...G..GG.C...					
ZZV1050G..CAT.....GT.A.....T.....A.....G.T...					
SAOMVVAT.....T.....T..A...A..C..C..GG.T...					
EV1CAT...G..GT...G.....T.....A...C..CG.C...					

	490	500	510	520	530	540
CAEV-Co	TAAAAGATTATCTAAAGCTAACACTATCTTATACAAATGCATCAGCAGATTGTCAGAAGC					
BR-UFGM/PL1T.....T.....G.....T.AT.....A...					
BR-UFGM/PL2A..CT....T.....G.....T.AT.....A...					
BR-UFGM/PL3A.....A.....GT.G.....G.....T.CT.....					
K1514ACA..TT...AG...T.G..A.....TAGCA...C...A...					
ZZV1050	.T...ACA..TT...AG.G..T..G..A..C.....TAGTA...C...A..A.					
SAOMVVACA..TT...AG...T..G..G.TC.....TAGCA.....A..A.					
EV1GACA..TT.C..AAGTGA CTCTG.A..C..G....TAGTA.....A...					

	550	560	570	580	590
CAEV-Co	AAATGGATAGAACACTAGGACAAAGAGTACAACAAGCTAGTGTAGAAGAAAAA				
BR-UFGM/PL1G.....TG.....TCG....C..T.....C.....G.GCC.....				
BR-UFGM/PL2TG..G.A.TC.....C.....				
BR-UFGM/PL3C.....C.....CA.....C.....				
K1514	.G.....G.C.T.G..GACG..G..T.....A.CG.....G.				
ZZV1050T.T.G..GA.C..G..T...G..A.CA...G..G...				
SAOMVVC...GTGT...GAC...C...G..ATCA.....				
EV1C...GTCT.G...A.T..G..C...G..ATCA.....G.G.-				

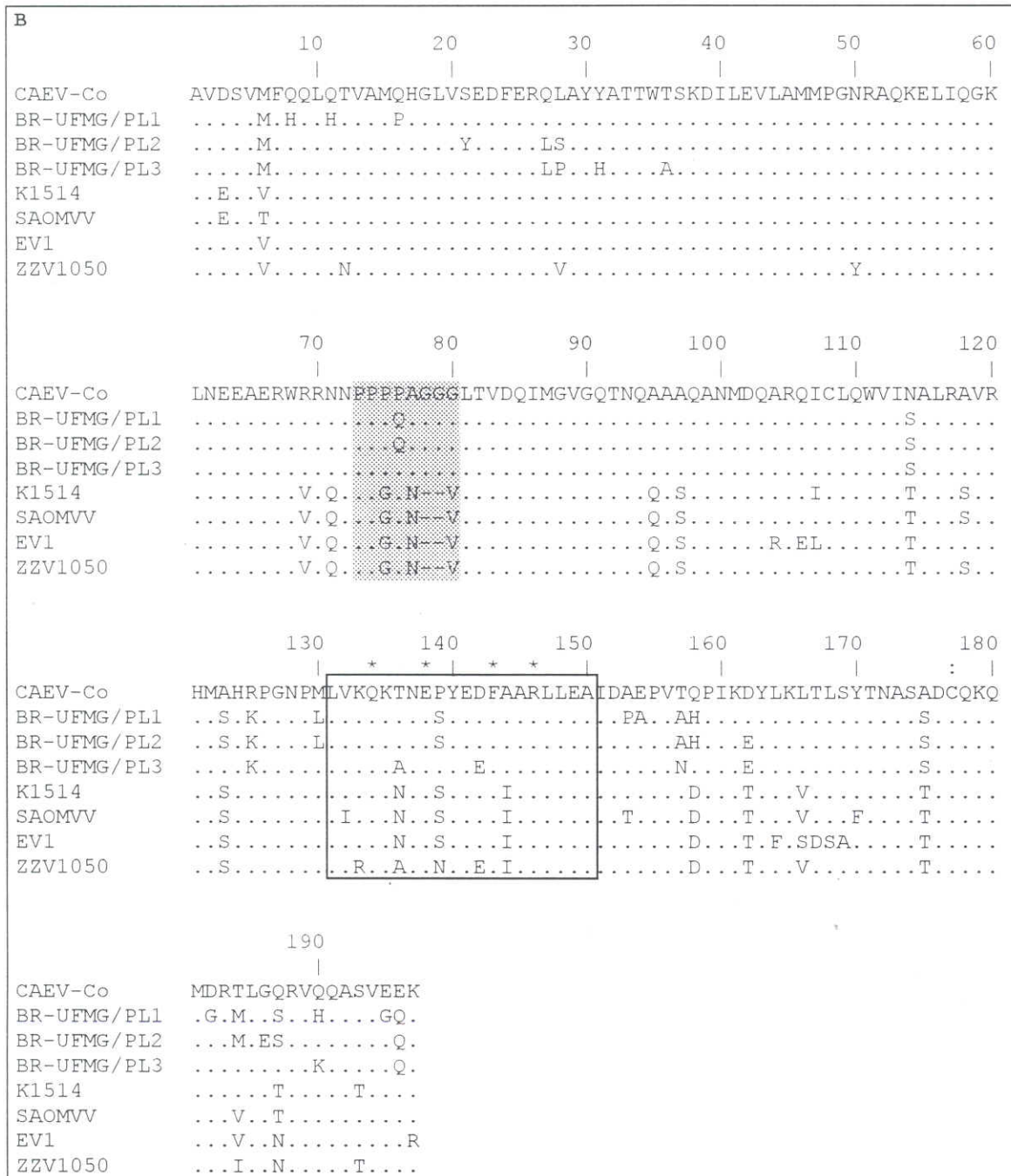


Figura 10. Alinhamento das seqüências dos isolados BR-UFGM/PL1, BR-UFGM/PL2 e BR-UFGM/PL3 com as amostras de CAEV (CAEV-Co) e MVV (K1514, SA-OMVV, ZZV1050 e EV1). Em A, o alinhamento das seqüências de nucleotídeos, feito de acordo com a seqüência de CAEV-Co posições 979 a 1572 (Saltarelli et al., 1990), com o auxílio do programa Clustal W (Thompson et al., 1994). Em B, o alinhamento das seqüências de aminoácidos. . indica homologia, - indica deleção em relação ao CAEV-Co, em cinza (aa⁷³ a aa⁸⁰) região rica em prolina e glicina, o quadrado (aa¹³¹ a aa¹⁵⁰) indica a região do MHR, * aminoácidos mais bem conservados entre diferentes retrovírus, : cisteína, resíduo bem conservado entre diferentes lentivírus.

Com relação as proteínas, foram observadas 20, 17 e 13 substituições nos isolados BR-UFGM/PL1, BR-UFGM/PL2 e BR-UFGM/PL3, respectivamente, quando cada um foi comparado com a amostra padrão CAEV-Co (Saltarelli et al., 1990). A maioria dessas substituições foram conservativas e mais freqüentes na porção C-terminal da proteína. A cisteína C¹⁷⁷, considerada altamente conservada entre diversas amostras de lentivírus, também se mostrou conservada nesses isolados brasileiros.

Os isolados BR-UFGM/PL1 e BR-UFGM/PL2 apresentaram uma substituição (P⁷⁶→Q) na região rica em prolina e glicina (aa⁷³ a aa⁸⁰ da Figura 12) e uma (P¹³⁹→S) na região do MHR (aa¹³¹ a aa¹⁵⁰). O isolado BR-UFGM/PL3 apresentou duas substituições (T¹³⁶→A e D¹⁴²→E) na região do MHR. Dentro do MHR, os aminoácidos Q¹³⁴, E¹³⁸, F¹⁴³ e R¹⁴⁶, considerados bastante conservados entre diversos lentivírus, se mantiveram conservados.

Os isolados BR-UFGM/PL1, BR-UFGM/PL2 e BR-UFGM/PL3 apresentaram a mesma substituição para o aa¹¹⁴ (N→S), para o aa¹²⁵ (R→K), para o aa¹⁷⁵ (A→S) e para o aa¹⁹⁶ (E→Q).

4.4.2 Análise Filogenética

Através do dendograma construído pelo programa Multalin (Corpet, 1998) a partir do alinhamento das seqüências de aminoácidos dos isolados BR-UFGM/PL1, BR-UFGM/PL2 e BR-UFGM/PL3 com as amostras padrão de CAEV (CAEV-Co) e MVV (K1514, SAOMVV, ZZV1050 e EV1), verificou-se a formação de dois grupos: um representado por amostras de MVV e outro por amostras de CAEV. Os isolados BR-UFGM/PL1, BR-UFGM/PL2 e BR-UFGM/PL3 se agruparam claramente com a amostra padrão CAEV-Co, formando um subgrupo dentro do grupo de CAEV (Figuras 11 e 12).

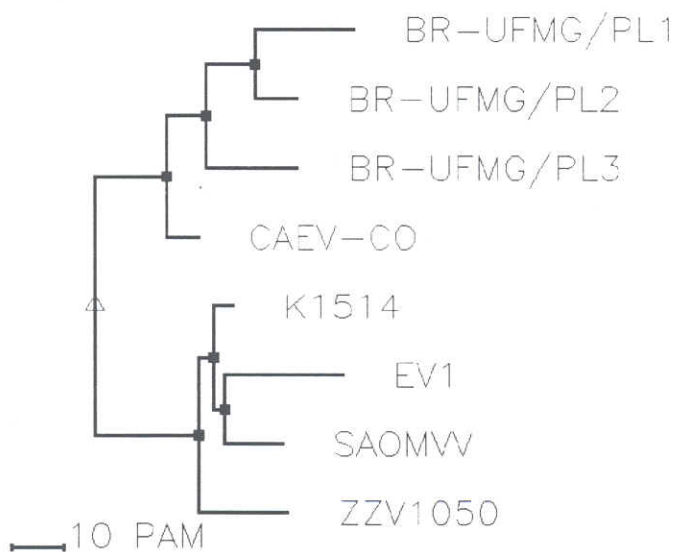


Figura 11. Dendograma obtido para seqüências de aminoácidos utilizando o programa Multalin (Corpet, 1988). As amostras BR-UFGM/PL1, BR-UFGM/PL2 e BR-UFGM/PL3 se agruparam claramente com o padrão CAEV-Co.

A fim de se obter uma melhor avaliação do agrupamento dos isolados brasileiros dentro do grupo CAEV, foi construído um dendograma incluindo outros isolados brasileiros de lentivírus caprino (C18, C47 e C767) (Ravazzolo et al., 2001), um isolado francês de lentivírus caprino (CA680) (Valas

et al., 1997), uma amostra norueguesa de lentivírus caprino (1GA) (Gjerset et al., 2000) e um isolado brasileiro de lentivírus ovino (V27) (Ravazzolo et al., 2001), além da amostra padrão CAEV-Co e das amostras padrão de MVV (Figura 12).

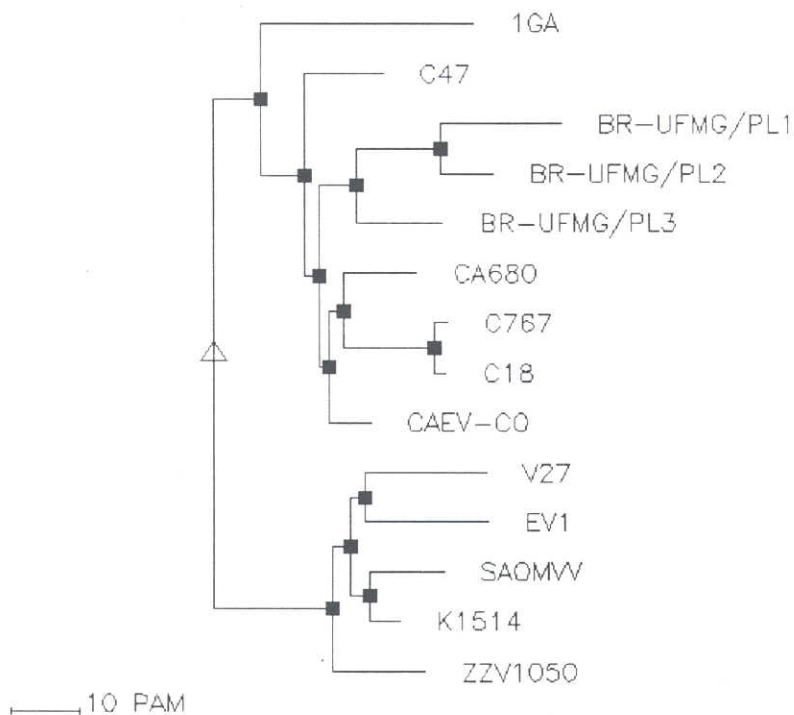


Figura 12. Dendograma obtido com o auxílio do programa Multalin (Corpet, 1998) para seqüências de aminoácidos os isolados BR-UFGM/PL1, BR-UFGM/PL2 e BR-UFGM/PL3 com outros isolados brasileiros de CAEV (C18, C47, C767) (Ravazzolo et al., 2001), um isolado francês (CA680) (Valas et al., 1997), uma amostra norueguesa de CAEV (1GA) (Gjerset et al., 2000), um isolado brasileiro de MVV (V27) (Ravazzolo et al., 2001) e os padrões CAEV-Co e MVV (K1514, SAOMV, EV1, ZZV1050).

As seqüências foram depositadas no GenBank (www.ncbi.nlm.nih.gov/Genbank) e receberam os seguintes números de

acesso: AY081139 (BR-UFGM/PL1), AY101347 (BR-UFGM/PL2) e AY101348 (BR-UFGM/PL3).

5 DISCUSSÃO

5.1 Infecção no Rebanho

O teste de IDGA indicou que o rebanho estudado se encontra infectado pelo CAEV. Dos 160 soros testados, 32 (20%) foram positivos. Foram encontrados animais positivos a partir de 10 meses de idade e dos seis machos da propriedade, quatro (66,7%) foram positivos. O teste de IDGA foi escolhido por ser simples, prático e de baixo custo e por ser rotineiramente empregado na EV-UFGM como teste diagnóstico.

A prevalência encontrada está de acordo com os estudos sorológicos feitos anteriormente no país, onde ficou demonstrada que a CAE está presente em vários estados brasileiros, principalmente nos rebanhos constituídos por raças exóticas e seus descendentes (Assis & Gouveia, 1994, Cunha & Nascimento, 1995, Fiterman, 1988) sendo mínima nos rebanhos nativos (Melo & Franke, 1997). Porém, no diagnóstico sorológico das lentiviroses, deve-se considerar uma série de fatores que podem influenciar a sensibilidade do teste utilizado, como o emprego de antígeno homólogo ou heterólogo, o tipo de antígeno empregado (p25-28 ou gp135), além da possibilidade da ocorrência de soroconversão tardia e a variação no título de anticorpos detectáveis ao longo da vida do animal. Testes repetidos são necessários para verificação do verdadeiro *status* sorológico dos animais negativos.

O antígeno empregado nesse estudo foi produzido a partir de cultivos celulares infectados com amostra de lentivírus ovino (OPPV) e contém tanto a proteína p27 quanto a glicoproteína gp135 virais juntamente com os soros reagentes padrões para cada uma delas. Devido à reação cruzada entre as proteínas de CAEV e de MVV, o *kit* é recomendado para a detecção tanto de caprinos quanto de ovinos infectados (Cutlip et al., 1997; Gogolewski et al., 1985). Entretanto, Knowles et al. (1994) verificaram que o emprego de antígeno homólogo aumentou a sensibilidade do teste de IDGA em pelo menos 35%. O

antígeno empregado nesse estudo foi utilizado apenas com o soro padrão reagente para a gp135, pois apesar de alguns animais reagirem apenas contra a p27, antígenos utilizando a gp135 são capazes de detectar um número maior de animais infectados (Adams & Goham, 1986).

Algumas práticas de manejo favorecem a manutenção e a disseminação do CAEV no rebanho, como por exemplo, o aleitamento materno, a não separação das crias ao nascimento, o aleitamento artificial com a administração de *pool* de colostro não tratado termicamente, o adensamento populacional com contato prolongado entre os animais positivos, equipamentos como tatuadores e ordenhadeira mecânica, possivelmente a monta natural, entre outros. No rebanho estudado, os animais são criados no sistema confinado, com alta densidade de animais por baia, com aquisição elevada de animais de outras propriedades. Para a retirada do leite é utilizado sistema de ordenhadeira mecânica e a maior parte das cobrições são feitas em sistema de monta natural. Os filhotes são separados de suas mães ao nascer e recebem *pool* de colostro tratado termicamente. Sabe-se que essa prática, apesar de reduzir as contaminações feitas pela principal via de transmissão pelo CAEV, não é o suficiente para impedir a disseminação do vírus pelo rebanho.

Não foram encontrados sinais clínicos compatíveis com infecção por CAEV em nenhum dos animais do rebanho. Situação semelhante foi encontrada por Castro (1998). O autor concluiu que a ausência de sinais clínicos pode indicar a presença de amostras virais pouco indutoras de lesões ou o uso de práticas de manejo que minimizaram a incidência de alterações clinicamente detectáveis.

O teste realizado nessa propriedade foi satisfatório para determinar os animais positivos para que a etapa de isolamento viral proposta no presente estudo pudesse ser realizada.

5.2 Isolamento Viral

O isolamento de lentivírus é bastante trabalhoso, demorado e muitas vezes não é bem sucedido, devido entre outros fatores, ao caráter de replicação restritivo *in vivo* ou *in vitro* observado para algumas amostras virais. Além disso, diferentes autores assinalaram tempos variados para o surgimento de ECP em tentativas de isolamento de vírus através do co-cultivo de monócitos de sangue periférico com células indicadoras: após 5 a 18 semanas (Quérat et al., 1994), após 6 meses (Databuit Test et al., 1999), de 1-3 meses (Castro et al., 1999), duas semanas (tempo de maturação de macrófagos) (Chebloune et al., 1996a) e Ellis (1990) demonstrou haver a necessidade de pelo menos 5×10^7 PBMC para o isolamento de LVPR a partir do co-cultivo de monócitos com células de MSC. Chebloune et al. (1996a) verificaram a presença de DNA pró-viral em macrófagos derivados de monócitos sanguíneos periféricos mas não detectaram nem partículas virais nem proteínas virais em tentativas de isolamento viral, sugerindo que algumas amostras virais mantêm um padrão restritivo de replicação mesmo após a maturação dos monócitos em macrófagos.

Foram feitas tentativas anteriores de isolamento viral através de protocolo de co-cultivo de PBMC com células de MSC, utilizando sangue dos mesmos animais. O co-cultivo foi mantido por sete semanas após três passagens com acréscimo de células de MSC e nenhum ECP foi observado ao microscópio ótico. De acordo com Chebloune et al. (1996a), Gendelman et al. (1986) e Narayan et al. (1982), grandes quantidades de partículas virais são produzidas somente após a maturação dos monócitos sanguíneos em macrófagos. Baseando-se nesses autores, foi incluída uma etapa inicial de maturação dos monócitos em macrófagos no protocolo de co-cultivo, com o objetivo de se aumentar a sensibilidade da técnica, o que foi observado quando foram obtidos cinco isolamentos virais (42% das amostras testadas) contra nenhum obtido inicialmente. Os dados estão condizentes com Chebloune et al. (1996a) que obtiveram

14 (56%) isolamentos com amostras obtidas de ovinos infectados.

ECP compatível com infecção *in vitro* por lentivírus foi verificado em cinco amostras, após 45 dias de co-cultivo de macrófagos com células de MSC. O ECP caracterizou-se pelo aparecimento de inúmeras células gigantes multinucleadas (sincícios) e lise celular moderada e surgiu de três a cinco dias após inoculação dos isolados em células de MSC. O ECP foi muito similar para as cinco amostras, exceto que a amostra três apresentou menos lise celular. Em outras sete amostras não foram verificados nenhum ECP característico de infecção por LVPR.

Narayan et al. (1980) estudaram o comportamento *in vitro* de isolados de MVV e CAEV em células de MSC e plexo coróide ovino (PCO). Tanto o cultivo de MSC quanto o de PCO foram susceptíveis ao MVV e desenvolveram rápido ECP caracterizado por degeneração completa das células, enquanto o CAEV apresentou características de infecção persistente em células de MSC e nenhum ECP em células de PCO. O mesmo foi observado por Quérat et al. (1984); alguns isolados de MVV apresentaram ciclo bastante lítico em cultivo de células de plexo coróide ovino e foram classificados como tipo I, enquanto o isolado de CAEV, apresentou ciclo de infecção persistente, com presença de pouca lise celular, tendo sido classificado como tipo II.

Marchesin (1997) observou diferenças no comportamento *in vitro* de cinco isolados brasileiros de CAEV. Todos apresentaram formação de sincícios em intervalo de tempo variável, porém um dos isolados apresentou ECP mais intenso, com maior número de sincícios observados em menor intervalo de tempo e alta destruição do tapete celular, enquanto os demais isolados apresentaram ECP mais discretos, com menor lise do tapete celular. Castro (1998) também observou diferenças entre os isolados brasileiros de LVPR; alguns isolados de origem caprina produziram infecção persistente em cultivo de células de MSC enquanto outros foram mais líticos.

Os isolados BR-UFGM/PL1, BR-UFGM/PL2, BR-UFGM/PL3, BR-UFGM/PL4 e BR-UFGM/PL5 apresentaram características semelhantes ao CAEV, apresentando ciclo de replicação mais persistente *in vitro*. As diferenças observadas entre o comportamento *in vitro* de diversos isolados de LVPR indicam uma possível variabilidade genética entre os isolados.

5.3 PCR

O ponto crítico para a padronização dessa PCR foi a temperatura de hibridização dos iniciadores. Inicialmente, a PCR foi testada com uma temperatura de 57°C para a hibridização dos iniciadores e verificou-se a presença de uma banda fraca no tamanho esperado (± 600 pb) para o controle positivo, além de inúmeras bandas inespecíficas, após eletroforese. A temperatura de hibridização foi elevada gradativamente para 58°C, 59°C e finalmente 60°C, quando foi verificada uma banda forte sem observação de bandas inespecíficas. Em todos os casos não foram visualizadas bandas de DNA no controle negativo (células de MSC não infectadas) ou no controle de reagentes (H₂O bidestilada autoclavada, livre de DNase).

Foi verificado que essa PCR foi capaz de detectar um mínimo de 100 pg de DNA. Tendo em vista que uma célula diplóide possui aproximadamente 6,6 pg de DNA (Clavijo & Thorsen, 1996), a PCR desenvolvida foi capaz de detectar o DNA pró-viral presente em um mínimo de 15 células infectadas *in vitro*.

Todos os isolados obtidos foram amplificados pela PCR, gerando um fragmento de aproximadamente 600pb, demonstrando que a PCR desenvolvida neste experimento foi satisfatória para a detecção das amostras virais isoladas. Todas as amostras consideradas negativas ao isolamento também foram negativas à PCR.

Em contraste, não houve amplificação de DNA pró-viral de amostras de PBMC obtidas dos 12 animais soropositivos ao teste de IDGA utilizados para o isolamento

viral (dados não mostrados). Vários outros pesquisadores (Brodie et al., 1992, Barlough et al., 1994, Russo et al., 1997) também verificaram que a PCR padronizada por eles para detecção de amostras de LVPR não eram aplicáveis na rotina de diagnóstico. Clavijo & Thorsen (1996) encontraram valores semelhantes de sensibilidade da PCR e sugeriram que esta pode ser aumentada se ela for realizada com DNA extraído de macrófagos, após o cultivo celular de PBMC com indução de maturação. Esse procedimento além de diminuir o "background" produzido pela presença de células não infectadas (linfócitos) permite um aumento da produção de DNA pró-viral, já que apenas uma pequena proporção dos monócitos sanguíneos é infectada.

5.4 Análise das Sequências Obtidas

As análises das seqüências *gag* de BR-UFGM/PL1, BR-UFGM/PL2 e BR-UFGM/PL3 revelaram que esses novos isolados brasileiros são únicos e distintos do padrão CAEV-Co e dos padrões de MVV (K1514, SA-OMVV, ZZV1050 e EV1). A divergência média entre as seqüências Gag de CAEV e MVV foi de 16,8%, enquanto que as divergências intra-grupos foram de 9% para o CAEV e 8% para o MVV. Os dados estão de acordo com os encontrados por Saltarelli et al. (1990) que encontraram grau de divergência entre a proteína Gag de CAEV e MVV de 25%.

As seqüências obtidas mantiveram a mesma proporção de bases observadas para os lentivírus, com maior predominância de A e menor predominância de T. A maioria das substituições observadas na seqüência de nucleotídeos foram silenciosas, com predominância de transições A \leftrightarrow G. O mesmo tipo de predominância de transições A \leftrightarrow G tem sido descrito para o HIV-1 (Fitzgibbon et al., 1993). Com relação aos aminoácidos, a maioria das mutações foram conservativas e observadas na porção C-terminal da proteína (aa¹⁰⁶ a aa¹⁹⁷ da Figura 10).

A porção C-terminal da proteína Gag dos diversos gêneros de retrovírus tem sido descrita como mais bem conservada que a porção N-terminal, e contém uma região denominada região de homologia principal (MHR), com significativa homologia entre diferentes retrovírus (Wills & Craven, 1991). A região MHR dos isolados obtidos nesse estudo se mostrou menos conservada, porém as mutações observadas foram conservativas e os aminoácidos Q¹³⁴, E¹³⁸, F¹⁴³ e R¹⁴⁶, considerados conservados entre diferentes lentivírus, também se mantiveram conservados.

Segundo Freed (1998), a porção C-terminal da proteína Gag CA provavelmente está envolvida em interações Gag-Gag e é crucial para montagem viral. Entretanto, Valas et al. (1997) e Ravazzolo et al. (2001) também observaram nas seqüências de aminoácidos deduzidas de isolados seqüenciados de LVPR maior taxa de mutação na porção C-terminal da proteína Gag CA que na porção N-terminal, sugerindo que possivelmente essa é uma característica única dos LVPR.

5.4.1 Relação Filogenética entre os Isolados

Existem apenas duas seqüências completas de CAEV publicadas no GenBank, a amostra considerada padrão CAEV-Co (Saltarelli et al., 1990) e uma amostra norueguesa 1GA (Gjerset et al., 2000), além de poucas seqüências parciais do gene *gag*. Para o MVV, existem apenas três seqüências completas, os padrões K1514, SA-OMVV e EV1 e algumas seqüências parciais do gene *gag*. Dessa forma, o isolamento e caracterização de novas amostras virais provenientes de regiões geográficas distintas possibilita uma melhor verificação da heterogeneidade genética entre os LVPR, importante tanto nos estudos epidemiológicos relacionados à transmissão intra e interespecíficas dos vírus, quanto para esclarecer a origem e a evolução desse grupo viral. A maioria dos estudos filogenéticos dos LVPR foram baseados nos genes *pol*, *env* e *gag*, com poucos estudos comparando os genes

regulatórios (Castro et al., 1999) e a região LTR (Zanoni et al., 1998).

A fim de se obter informações sobre a relação filogenética entre esses três novos isolados brasileiros de CAEV com seqüências previamente publicadas no GenBank de CAEV e MVV, foi construído um dendograma a partir da seqüência de 197 aa, dentre os 212 aa da proteína Gag CA (p25). Os isolados obtidos formaram um subgrupo no grupo CAEV, claramente separado do grupo formando pelas amostras de MVV. Relação filogenética similar, com clara distinção entre amostras de LVPR originadas de caprinos e ovinos, foi encontrada por Ravazzolo et al. (2001) ao compararem seqüências do gene *gag* de amostras brasileiras de LVPR isoladas no Rio Grande do Sul com amostras de referência de CAEV e MVV. Em contraste, Rolland et al. (2002) verificaram que uma amostra irlandesa de CAEV se agrupava com as amostras de MVV em um grupo claramente separado do grupo CAEV, ao analisarem os genes *gag*, *pol* e *env*.

Quando as amostras obtidas por Ravazzolo et al. (2001) foram incluídas na construção do dendograma, não houve a formação de um subgrupo homogêneo de amostras brasileiras. Quérat et al. (1990) e Sargan et al. (1991) relataram que as amostras K1514, SA-OMVV e EV1, embora tenham sido isoladas de países diferentes, possuem uma origem comum (possivelmente a Alemanha), e sempre se agrupam juntas nas análises filogenéticas. No Brasil, foram importados caprinos de diferentes regiões da Europa e América do Norte, o que possibilita a ocorrência de amostras virais de diferentes origens, justificando a não formação de um grupo homogêneo de amostras brasileiras.

Os LVPR, CAEV e MVV, embora sejam genética e antigenicamente relacionados, são classificados como quasispécies virais distintas. Entretanto, diferentes autores têm demonstrado que algumas amostras de lentivírus ovino isoladas de animais naturalmente infectados proveniente de diversas regiões geográficas são mais semelhantes ao CAEV (Chebloune et al.,

1996a, Karr et al., 1996, Leroux et al., 1995b, Zanoni et al., 1992) e algumas amostras de lentivírus caprino se assemelham mais ao MVV (Castro et al., 1999, Rolland et al., 2002), sugerindo a possível ocorrência de infecção cruzada entre espécies nas duas direções. Assim, os estudos filogenéticos realizados com amostras de LVPR têm indicado que esses vírus devem ser considerados como quasiespécies virais únicas que têm a capacidade de infectar tanto ovinos quanto caprinos.

As características observadas em cultivo celular e a caracterização do gene *gag* dos isolados obtidos nesse estudo indicam que os mesmos se assemelham mais ao CAEV que ao MVV.

5.5 Perspectivas

Os isolados obtidos nesse estudo estão estocados e poderão ser utilizados em estudos posteriores, como: a caracterização do ECP em diferentes sistemas *in vitro* e a caracterização de outras regiões gênicas ou até mesmo do genoma completo dos isolados, muito importantes para se esclarecer a complexa diversidade entre os diferentes LVPR.

Os kits de IDGA para diagnóstico da CAE disponíveis no mercado são importados e produzidos a partir de MVV. Por outro lado, a tecnologia do DNA recombinante permite a produção de grande quantidade de antígeno altamente purificado que pode ser produzido a partir de qualquer amostra viral, independentemente do seu efeito em cultivo celular. Dessa forma, os isolados obtidos podem ser utilizados para produção de antígeno recombinante para utilização em testes diagnósticos mais adequados à realidade brasileira, dispensando, no futuro, a importação de kits para tal finalidade.

A adaptação da técnica de PCR padronizada nesse estudo para utilização em fins diagnósticos, poderá ser útil para utilização em propriedades que possuem um programa de controle e erradicação da CAE.

6 CONCLUSÕES

- O capril estudado apresentava grande número de animais soropositivos para CAE, demonstrando que a infecção estava presente no rebanho no momento do estudo, apesar de não se ter verificado sintomatologia clínica.
- Este trabalho resultou na obtenção de cinco novos isolados brasileiros de LVPR, a partir de leucócitos do sangue periférico de animais naturalmente infectados pelo CAEV.
- A PCR padronizada para amplificação de parte do gene *gag* do genoma pró-viral foi utilizada com sucesso na amplificação da amostra padrão e dos isolados em cultivo celular.
- A aplicação, nesse estudo, das técnicas de IDGA, isolamento viral e PCR, culminou na geração de três novas seqüências parciais do gene *gag* de CAEV, a partir de isolados brasileiros. As seqüências se encontram disponíveis no GenBank.
- O alinhamento das seqüências obtidas nesse estudo com outras amostras de CAEV e MVV depositadas no GenBank, assim como as árvores filogenéticas construídas demonstraram que as amostras isoladas são únicas, distintas e mais relacionadas entre si e com as amostras de CAEV que com as amostras de MVV.
- Esse trabalho possibilita a continuidade dos estudos de caracterização molecular de amostras de LVPR e de análise filogenética.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ADAMS, D.S.; KLEVJER-ANDERSON, P.R. CARLSON, J. L.; McGUIRE, T. C.; GOHAN, J. R. Transmission and control of caprine arthritis-encephalitis virus. *American Journal of Veterinary Research*, n.44, v.9, p.1670-1675, 1983.
- ADAMS, D.S.; OLIVER, R. E.; AMEGHINO, E.; DEMARTINI, J. C. HOUWERS, D.F.; WAGHELA, S.; GORHAM, J. T.; HYYLSETH, B.; DAWSON, M.; VERWOERO, M.; TRIGO, F.J. McGUIRE, T. C. Global survey of serological evidence of caprine arthritis-encephalitis virus infection. *The Veterinary Record*, v.115, n.19, p.493-495, 1984.
- ADAMS, D. S., GORHAM, J. R. The gp135 of caprine arthritis-encephalitis virus affords greater sensitivity than the p28 in immunodiffusion serology. *Research in Veterinary Sciences*, v. 40, p. 157-160, 1986.
- AL-ANI, F. K., WESTWEBER, J. G. E. Caprine arthritis-encephalitis syndrome (CAE): a review. *Veterinary Research Communications*, v.8, n.4, p.243-245, 1984.
- ALI, O. A. Caprine arthritis-encephalitis related changes in the uterus of a goat. *The Veterinary Record*, v.8, p. 131-132, 1987.
- ALVES, F. S. F.; PINHEIRO, R. R. Presença da Artrite Encefalite Caprina a Vírus (CAEV) no Estado do Maranhão. In: *CONGRESSO BRASILEIRO DE MEDICINA VETERINÁRIA*, 25, 1997, Gramado: Sociedade de Veterinária do Rio Grande do Sul, 1997, p. MVP008.
- ANDRIOLI, A. Vírus da artrite e encefalite caprina: PCR e isolamento viral em amostras de sêmen, fluido uterino e embriões. Belo Horizonte: EV-UFMG, 2001, 68p. Tese (Doutorado).
- ANDRIOLI, A.; GOUVEIA, A. M. G.; PINHEIRO, R. R.; ROCHA, M. A.; MARTINS A.; SANTOS, O. Detecção do DNA pró-viral do lentivírus caprino em sêmen de bodes naturalmente infectados. *Revista Brasileira de Reprodução Animal*, v. 23, n. 3, p. 420-421, 1999.
- ASSIS, A.P.M.; GOUVEIA, A.M. Evidência sorológica de lentivírus (Maedi Visna/Artrite Encefalite Caprina) em rebanhos nos estados de Minas Gerais, Rio de Janeiro, Bahia, Ceará. In: *CONGRESSO BRASILEIRO DE MEDICINA VETERINÁRIA*, 23, Recife, Sociedade Brasileira de Medicina Veterinária, p.104, 1994.
- BANKS, K. L.; ADAMS, D. S.; MCGUIRE, T. C.; CARLSON, J. Experimental infection of sheep by caprine arthritis-encephalitis virus and goats by progressive pneumonia virus. *American Journal of Veterinary Research*, v. 44, p. 2037-2311, 1983.
- BARLOUGH, J.; EAST, N.; ROWE, J. D.; van HOOSEAR, K.; DEROCK, E.; BIGORNIA, L.; RIMSTAD, E.; van HOOSEAR, K. Double-nested polymerase chain reaction for detection of caprine arthritis-encephalitis virus proviral DNA in blood, milk, and tissues of infected goats. *Journal of Virological Methods*, v. 50, p.101-114, 1994.
- BIRKETT, A. J.; YÉLAMOS, B.; RODRÍGUEZ-CRESPO, I.; GAVILANES, F.; PETERSON, D. L. Cloning, expression, purification and characterization of the major core protein (p26) from equine infectious anemia virus. *Biochimica et Biophysica Acta*, n. 1339, p. 62-72, 1997.
- BRAUN, M. J.; CLEMENTS, J. E.; GONDA, M. A. The visna virus genome: evidence for a hypervariable site in the env gene and sequence homology among lentivirus envelope proteins. *Journal of Virology*, v. 61, p. 4046-4054, 1987.
- BRODIE, S. J.; PEARSON, J. D.; SNOWDER, G. D.; DeMARTINI, J. C. Host-virus interactions as defined by amplification of viral DNA and serology in lentivirus-infected sheep. *Archives of Virology*, v. 130, p. 413-428, 1993.
- BRUET, L.; BARBER, S. A.; CLEMENTS, J. Characterization of a membrane-associated protein implicated in visna virus binding and infection. *Virology*, v. 271, p. 132-141, 2000.

- CASTRO, R. S. Lentivírus de pequenos ruminantes: ensaios imunoenzimáticos, perfil sorológico e inferências filogenéticas. Belo Horizonte: EV-UFMG, 1998. 132p. Tese (Doutorado).
- CASTRO, R. S.; GREENLAND, T.; LEITE, R. C.; GOUVEIA, A. M. G.; MORNEX, J.; CORDIER, G. Conserved sequence motifs involving the *tat* reading frame of Brazilian caprine lentiviruses indicate affiliations to both caprine arthritis-encephalitis virus and visna-maedi virus. *Journal of General Virology*, v. 80, p. 1583-1589, 1999.
- CASTRO, R. S.; NASCIMENTO, S. A.; ABREU, S. R. O. Evidência sorológica de infecção pelo vírus da artrite-encefalite caprina em caprinos leiteiros do estado de Pernambuco. *Arquivos Brasileiros de Medicina Veterinária e Zootecnia*, v. 46, n. 5 p. 571-572, 1994.
- CHEBLOUNE, Y.; KARR, B.; SHEFFER, D.; LEUNG, K.; NARAYAN, O. Variations in lentiviral gene expression in monocyte-derived macrophages from naturally infected sheep. *Journal of General Virology*, v. 77, p. 2037-2051, 1996a.
- CHEBLOUNE, Y.; SHEFFER, D.; KARR, B.; STEPHENS, E.; NARAYAN, O. Restrictive type of replication of ovine/caprino lentiviruses in ovine fibroblast cell cultures. *Virology*, v. 222, p. 21-30, 1996b.
- CLAVIJO, A.; THORSEN, J. Application of polymerase chain reaction for the diagnosis of caprine arthritis-encephalitis. *Small Ruminant Research*, v. 22, p. 69-77, 1996.
- CLEMENTS, J. E.; NARAYAN, O.; CORK, L. C. Biochemical characterization of the virus causing leukoencephalitis and arthritis in goats. *Journal of General Virology*, v. 50, p.423-427, 1980.
- CLEMENTS, J. E.; ZINK, C. Molecular biology and pathogenesis of animal lentivirus infections. *Clinical Microbiology Reviews*, v. 9, n.1, p. 100-117, 1996.
- COFFIN, J. M. Retroviridae: the virus and their replication. In: KNIPE, D. M; HOWLEY, P. M. et al. (Ed.). *Fields Virology*, 4 ed., 1996, cap. 6, p. 1767-1847.
- COFFIN, J. M.; HUGHES, S. H.; VARMUS, H. E. (Ed) *Retroviruses: at the National Center for Biotechnology Information*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1997. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books> Acesso em: 20/03/2000.
- CORK, L.C.; HADLOW, W. J.; CRAWFORD, T. B.; GORHAN, J. R.; PIPER, R. C. Infectious leukoencephalomyelitis of young goats. *Journal of Infectious Diseases*, v.129, n.2, p.134-141, 1974.
- CORPET, F. Multiple sequence alignment with hierarchical clustering. *Nucleic Acids Research*, v. 16, n. 22, p. 10881-10890, 1998.
- CRAWFORD, T. B., ADAMS, D. S. Caprine arthritis-encephalitis: clinical features and presence of antibody in selected populations. *Journal of American Veterinary Medical Association*, v. 178, p. 713-719, 1981.
- CRAWFORD, T. B.; ADAMS, D. S.; CHEEVERS, W. P.; CORK, L. C. Chronic arthritis in goats caused by a retrovirus. *Science*, v. 207, p. 997-999, 1980.
- CUNHA, R. G.; NASCIMENTO, M. D. Ocorrência de anticorpos para o vírus da artrite-encefalite caprina em soros de caprinos do estado do Rio de Janeiro. *Revista Brasileira de Medicina Veterinária*, v. 17, n. 2, p. 72-75, 1995.
- CUTLIP, R. C., JACKSON, T. A.; LAIRD, G. A. Immunodiffusion test for ovine progressive pneumonia. *American Journal of Veterinary Research*, v. 38, n. 7, p. 1081-1084, 1997.
- CUTLIP, R.C.; LEHMKUHL, H.D.; SACKS, J. M.; WEAVER, A.L. Prevalence of antibody to caprine arthritis-encephalitis virus goats in the United States. *Journal of American Veterinary Medical Association*, v. 200, n. 6, p. 802-805, 1992.

DALTAUIT TEST, M.; de la CONCHA-BERMEJILLO, A.; ESPINOSA, L. E. L.; LOZA RUBIO, E.; AGUILAR SETIÉN, A. Isolation of caprine arthritis-encephalitis virus from goats in Mexico. *Canadian Journal of Veterinary Research*, v. 63, p. 212-215, 1999.

DALZIEL, R. G.; HOPKINS, J.; WATT, N. J.; DUTIA, B. M.; CLARKE, H. A.; MCCONNELL, I. Identification of a putative cellular receptor for the lentivirus visna virus. *Journal of General Virology*, v. 72, p. 1905-1911, 1991.

De la CONCHA-BERMEJILLO, A.; BRODIE, S. J.; MAGNUS-CORRAL, S.; BOWEN, R. A.; DeMARTINI, J. C. Pathologic and serological responses of isogenic twin lambs to phenotypically distinct lentiviruses. *AIDS Research and Human Retroviruses*, v. 8, n. 2, p. 116-123, 1995.

De la CONCHA-BERMEJILLO, A.; MAGNUS-CORRAL, S.; BRODIE, S. J.; DEMARTINI, J. C. Veneral shedding of ovine lentivirus in infected rams. *American Journal of Veterinary Research*, v. 57, p. 684-688, 1996.

DAWSON, M. Caprine Arthritis-Encephalitis and Maedi-Visna: complex diseases syndromes associated with lentivirus infections of goats and sheep. *Goat Veterinary Society Journal*, v. 4, n. 2, p. 25-28, 1983.

EAST, N. E.; ROWE, J. D.; MADEWELL, B. R.; FLOYD, K. Serologic prevalence of caprine arthritis-encephalitis virus in California goat dairies. *Journal of American Veterinary Medical Association*, v. 190, n. 2, p. 182-186, 1987.

ELLIS, T. M. Blood leukocyte infection rates in caprine arthritis-encephalitis virus-infected goats. *Australian Veterinary Journal*, v. 67, n. 8, p. 302-303, 1990.

FITERMAN, I. R. Constatação do complexo artrite-encefalite em um plantel de caprinos no estado da Bahia. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE MEDICINA VETERINÁRIA, 21, 1988, Salvador. *Anais...*, Salvador: Sociedade Baiana de Medicina Veterinária, 1988, p. 91.

FITZGIBBON, J. E.; MAZAR, S.; DUBIN, D. A new type of GA hypermutation affecting human immunodeficiency virus. *AIDS Research and Human Retroviruses*, v. 9, p. 833-938, 1993.

FREED, E. O. HIV-1 Gag proteins: diverse functions in the virus life cycle. *Virology*, v. 251, p. 1-15, 1998.

GAMBLE, T. R.; YOO, S.; VAJDOS, F. F.; von SCHWEDLER, U. K.; WORTHYLAKE, D. K.; WANG, H.; McCUTCHEON, J. P.; SUNDQUIST, W. I. HILL, C. P. Structure of the carboxyl-terminal dimerization domain of the HIV-1 capsid protein. *Science*, v. 278, p. 849-853, 1997.

GARCIA, M.; GALHARDO, M.; ARAÚJO, W. P.; D'ANGELINO, J. L.; BASTOS, P. S.; ROSSINI, A. J. Caprine Arthritis-Encephalitis (CAE): occurrence of positive sera in goats raised in Brazil. *Tropical Animal Health Production*, v. 24, n. 3, p. 164, 1992.

GENDELMAN, H. E.; NARAYAN, O.; KENNEDY-STOSKOPF, S.; KENNEDY, P. G. E.; GHOTBI, Z.; CLEMENTS, J. E.; STANLEY, J.; PEZESHKPOUR, G. Tropism of sheep lentiviruses for monocytes: susceptibility to infection and virus gene expression increase during maturation of monocytes to macrophages. *Journal of Virology*, v. 58, n.1, p. 67-74, 1986.

GJERSET, B. J.; STORSET, A. K.; RIMSTAD, E. *Direct Submission to GenBank*, nov., n. AF32109, 2000. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>. Acesso em: 20/03/2001.

GOGOLEWSKI, R. P.; ADAMS, D. S.; McGUIRE, T. C.; BANKS, K. L.; CHEEVERS W. P. Antigenic cross-reactivity between caprine arthritis-encephalitis, visna and progressive pneumonia viruses involves all virion-associated proteins and glycoproteins. *Journal of General Virology*, v. 66, p. 1233-1240, 1985.

GONDA, M. A. Molecular biology and virus-host interactions of lentiviruses. *Annals of the New York Academy of Sciences*, v. 724, p. 22-42, 1994.

- GORREL, M. D.; BRANDON, M. R.; SHEFFER, D.; ADAMS, R. J.; NARAYAN, O. Ovine lentivirus is macrophagetropic and does not replicate productively in T lymphocytes. *Journal of Virology*, v. 66, p. 2679-2688, 1992.
- GOUVEIA, A. M. Padronização de microtécnica de imunodifusão em gel de agarose para diagnóstico de lentivírus Pneumonia Progressiva Ovina (OPP) - Maedi-Visna (MVV) - Artrite Encefalite Caprina (CAEV). Sobral, 1994. 4p. (mimeografado).
- GOUVEIA, A. M. G.; COURA, M. A.; BRANDÃO, H. M.; et al. Distribuição sorológica do lentivírus caprino em amostragem por demanda. In: ENCONTRO DE PESQUISA DA ESCOLA DE VETERINÁRIA – UFMG, 16, Belo Horizonte, 1998. *Anais...*, Belo Horizonte: UFMG, 1998, p. 116. Resumo.
- GUEDES, M. I. M. C.; SOUZA, J. C. A.; GOUVEIA, A. M. G. Infecção experimental em cabritos pelo vírus da artrite encefalite. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*, v. 53, n. 1, p. ISSN 0102-0935, 2001.
- HANSON, J.; HYDBRING, E.; OLSSON, K. A long term study of goats naturally infected with caprine arthritis-encephalitis virus. *Acta Veterinaria Scandinavica*, v. 37, n. 1, p. 31-39, 1996.
- HÖTZEL, I.; BASTOS, S. E.; RAVAZOLLO, A. P.; MOOJEN, V. Caprine arthritis-encephalitis virus: isolation and identification in Rio Grande do Sul, Brazil. *Brazilian Journal Medical Biological Research*, v. 26, p. 1175-1179, 1993.
- JAN, C. L.; GREENLAND, T.; GOUNEL, F.; BALLEYDIER, S.; MORNEX, J. F. Activation of small ruminant aortic endothelial cells after in vitro infection by caprine arthritis encephalitis virus. *Research in Veterinary Sciences*, v. 69, n. 3, p. 225-231, 2000.
- JOHNSON, G. C.; BARBET, A. F.; KLEVJER-ANDERSON, P.; McGUIRE, T.C. Preferential immune response to virion surface glycoproteins by Caprine Arthritis-Encephalitis Virus-infected goats. *Infection and Immunity*, v. 41, n. 2, p. 657-665, 1983.
- KARR, B. M.; CHEBLOUNE, Y.; LEUNG, K.; NARAYAN, O. Genetic characterization of two phenotypically distinct North American ovine lentiviruses and their possible origin from caprine arthritis-encephalitis virus. *Virology*, v. 225, p. 1-10, 1996.
- KLEVJER-ANDERSON, P.; CHEEVERS, W. P. Characterization of the infection of caprine synovial membrane cells by the retrovirus caprine arthritis-encephalitis virus. *Virology*, v. 110, p. 113-119, 1981.
- KNOWLES, J. R. Laboratory diagnostic tests for retrovirus infections of small ruminants. *The Veterinary Clinics of North America Food Animal Practice*, v. 13, n.1, p. 1-11, 1997.
- KNOWLES J. R.; EVERMANN, J. F.; SHROPSHIRE, C.; VANDERSCHALIE, J.; BRADWAY, D.; GEZON, H. M.; CHEEVERS, W. P. Evaluation of Agar Gel Immunodiffusion Serology using Caprine and Ovine Lentiviral Antigens for detection of antibody to Caprine Arthritis-Encephalitis Virus. *Journal of Clinical Microbiology*, v. 32, n. 1, p. 243-245, 1994.
- LAMARA, A.; FIENI, F.; MSELLI-LAKHAL, L.; TAINURIER, D.; CHEBLOUNE, Y. Efficient replication of caprine arthritis-encephalitis virus in goat granulosa cells. *Virus Research*, v. 79, p. 165-172, 2001.
- LEROUX, C.; CHASTANG, J.; GREENLAND, T.; MORNEX, J. F. Genomic heterogeneity of small ruminant lentiviruses: existence of heterogeneous populations in sheep and of the same lentiviral genotypes in sheep and goats. *Archives of Virology*, n.142, p.1125-1137, 1997.

- LEROUX, C.; CORDIER, G.; MERCIER, I. CHASTANG, J.; LYON, M.; QUERAT, G.; GREENLAND, T.; VIGNE, R.; MORNEX, J. F. Ovine aortic smooth muscle cells allow the replication of visna-maedi virus in vitro. *Archives of Virology*, v.140, p. 1-11, 1995.
- LEROUX, C.; GREENLAND, T.; MORNEX, J. F. Molecular characterization of field isolates of lentiviruses of small ruminants. *AIDS Research and Human Retroviruses*, v.12, n.5, p.427-429, 1996.
- LEROUX, C.; VUILLERMOZ, S.; MORNEX, J.; GREENLAND, T. Genomic heterogeneity of ovine lentiviruses obtained from bronchoalveolar cells of infected sheep from France. *Journal of General Virology*, v. 76, p. 1553-1537, 1995.
- LYALL, J. W.; SOLANKY, N.; TILEY, L. S. Restricted species tropism of maedi-visna virus strain EV-1 is not due to limited receptor distribution. *Journal of General Virology*, v. 81, p. 2919-2927, 2000.
- MAMMANO, F.; OHAGEN, A.; HOGLUND, S.; GOTTLINGER, H. G. Role of the major homology region of human immunodeficiency virus type I in virion morphogenesis. *Journal of Virology*, v. 68, p. 4927-4936, 1994.
- MARCHESIN, D. M. Caracterização molecular de parte do gene *gag* dos lentivírus artrite-encefalite caprina (CAEV) e maedi-visna dos ovinos (MVV), isolados de animais naturalmente infectados do Rio Grande do Sul, Brasil. Porto Alegre: Faculdade de Veterinária: UFRGS, 1997. 111p. Dissertação (Mestrado).
- MARCHESIN, D. M.; MOOJEN, V.; RAVAZZOLO, A. P. Caracterização molecular parcial do gene *gag* de amostras do vírus da artrite-encefalite caprina (CAEV) isoladas de animais naturalmente infectados no Rio Grande do Sul, Brasil. *Pesquisa Veterinária Brasileira*, v. 18, n. 3-4, 1998.
- McGUIRE, T. C.; O'ROURKE, K. I.; KNOWLES, D. P.; CHEEVERS, W. P. Caprine arthritis encephalitis lentivirus transmission and disease. *Currents Topics in Microbiology*, v. 160, p. 61-75, 1990.
- MELO, A. C. M.; FRANKE, C. R. Soroprevalência da infecção pelo vírus da artrite-encefalite caprina (CAEV) no rebanho de caprinos leiteiros da região de grande Fortaleza, Ceará, Brasil. *Ciência Rural*, v. 27, n. 1, p. 113-117, 1997.
- MILCZEWSKI, V., SOTOMAIOR, C., REISCHAK, D., VON GROLL, A. Relato do primeiro isolamento do vírus Maedi-Visna no estado do Paraná. In CONGRESSO BRASILEIRO DE MEDICINA VETERINÁRIA, 25, Gramado, 1997. *Anais...*, Gramado, p.179, 1997. Resumo.
- MOOJEN, V.; SOARES, H. C.; RAVAZZOLO, A. P.; DAL PIZZOL, M.; GOMES, M. Evidência de infecção pelo Lentivirus (Maedi-Visna/Artrite-Encefalite Caprina) em caprinos no Rio Grande do Sul, Brasil. *Arquivos da Faculdade de Veterinária da UFRGS*. v. 14, p. 77-78, 1986.
- MSELLI-LAKHAL, L.; GUIGUEN, F.; FORNAZERO, C.; JIAN, D.; FAVIER, C.; DURAND, J.; GREZEL, D.; BALLEYDIER, S.; MORNEX, J. F.; CHEBLOUNE, Y. Goat milk epithelial cells are highly permissive to CAEV infection in vitro. *Virology*, v. 259, p. 67-73, 1999.
- MSELLI-LAKHAL, L.; FAVIER, C.; LEUNG, K.; GUIGUEN, F.; GREZEL, D.; MIOSSEC, P.; MORNEX, J.; NARAYAN, O.; QUERAT, G.; CHEBLOUNE, Y. Lack of functional receptor is the only barrier that prevents caprine arthritis-encephalitis virus from infecting human cells. *Journal of Virology*, v. 74, n. 18, p. 8343-8348, 2000.
- NARAYAN, O.; CLEMENTS, J. E. Biology and pathogenesis of lentiviruses. *Journal of General Virology*, v. 70, p. 1617-1639, 1989.
- NARAYAN, O.; CLEMENTS, J. E. Lentiviruses. In KNIPE, D. M.; HOWLEY, P. M. et al. (Ed.). *Fields Virology*, 4 ed. 1996, cap. 5, p. 1571-1589.
- NARAYAN, O.; KENNEDY-STOSKOPF, S.; SHEFFER, D.; GRIFFIN, D. E.; CLEMENTS, J. E. Activation of caprine arthritis-encephalitis virus expression during maturation of monocytes to macrophages. *Infection and Immunity*, v. 41, n. 1, p. 67-73, 1983.

- NARAYAN, O.; CLEMENTS, J.E.; STRANDBERG, J.D.; CORK, L.C.; GRIFFIN, D.E. Biological characterization of the virus causing leukoencephalitis and arthritis in goats. *Journal of General Virology*, v.50, n.1, p. 69-79, 1980.
- NARAYAN, O.; WOLINSKY, J. S.; CLEMENTS, J. E.; STRANDBERG, J. D., GRIFFIN, D. E.; CORK, L. C. Slow virus replication: the role of macrophages in the persistence and expression of visna viruses of sheep and goats. *Journal of General Virology*, v. 59, p. 345-356, 1982.
- OIE, Office Internacional des Epizooties. *Manual of standards for diagnostic tests and vaccines 2000*. OIE/World Organization for Animal Health, 4 ed., 2000. Disponível em: <http://www.oie.int>. Acesso em: 20/03/2000. Versão para web.
- PASICK, J. Maedi-visna virus and caprine arthritis-encephalitis virus: distinct species or quasispecies and its implications for laboratory diagnosis. *Canadian Journal of Veterinary Research*, v. 62, p. 241-244, 1998.
- PINHEIRO, R. R.; ALVES, F. S. F.; GIRÃO, E. S.; et al.. Presença da Artrite-Encefalite Caprina a Vírus (CAEV), em Teresina – Piauí. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE MEDICINA VETERINÁRIA, 24, 1996, Goiânia-GO. *Anais...*, Goiânia:1996, p. 161. Resumo.
- PINHEIRO, R. R.; GOUVEIA, A. M. G.; ALVES, F. S. F. Prevalência da infecção pelo vírus da artrite encefalite caprina no Estado do Ceará – Brasil. *Ciência Rural*, v. 31, n. 3, p. 2001.
- PÉRETZ, G.; BUGNARD, F.; CALAVAS, D. Study of a prevention programme for caprine arthritis-encephalitis. *Veterinary Research*, v. 25, p. 322-326, 1994.
- PYPER, J. M.; CLEMENTS, J. E.; GONDA, M. A.; NARAYAN, O. Sequence homology between cloned caprine arthritis-encephalitis virus and visna virus, two neurotropic lentiviruses. *Journal of Virology*, v. 58, n. 2, p. 665-670, 1986.
- PYPER, J. M.; CLEMENTS, J. E.; MOLINEAUX, S. M.; NARAYAN, O. Genetic variation among lentiviruses: homology between visna virus and caprine arthritis-encephalitis virus is confined to the 5' gag-pol region and a small portion of the env gene. *Journal of Virology*, v. 51, n. 3, p. 713-721, 1984.
- QUÉRAT, G.; AUDOLY, G.; SONIGO, P.; VIGNE, R. Nucleotide sequence analysis of SA-OMVV, a Visna-Related Ovine Lentivirus: phylogenetic history of lentiviruses. *Virology*, v.175, p.434-447, 1990.
- QUÉRAT, G.; VÉRONIQUE, B.; SAUZE, N.; FILIPPI, P.; VIGNE, R.; RUSSO, P.; VITU, C. Highly lytic and persistent lentiviruses naturally present in sheep with progressive pneumonia are genetically distinct. *Journal of Virology*, v. 52, n. 2, p. 672-679, 1994.
- RAMOS, O. S.; SILVA, A. C. S.; MONTENEGRO, A. J. D. et al.. Anticorpos para o vírus da artrite encefálica no município de Castanhal – Pará. *Boletim PCAP*, v. 25, p. 107-111, 1996.
- RAVAZOLLO, A. P.; REISCHAK, D.; PETERHANS, E.; ZANONI, R. Phylogenetic analysis of small ruminant lentiviruses from southern Brazil. *Virus Research*, v. 79, p. 117-123, 2001.
- REDDY, P. G.; SAPP, W. J.; HENEINE, W. Detection of caprine arthritis-encephalitis virus by polimerase chain reaction. *Journal of Clinical Microbiology*, v. 31, n. 11, p. 3042-3043, 1993.
- RIMSTAD, E.; EAST, N. E.; TORTEN, M.; HIGGINS, J.; DeROCH, E.; PEDERSEN, N. C. Delayed seroconversion following naturally acquired caprine arthritis-encephalitis virus infection in goats. *American Journal of Veterinary Research*, v. 54, n. 11, p. 1858-1862, 1993.
- ROLLAND, M.; MOONEY, J.; VALAS, S.; PERRIN, G.; MAMOUN, R. Z. Characterization of an Irish caprine lentivirus strain – SRLV phylogeny revisited. *Virus Research*, v. 85, p. 29-39, 2002.

- ROSATI, S.; KWANG, J.; KEEN, J. E. Genome analysis of North American small ruminant lentiviruses by PCR and restriction enzyme analysis. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigations*, n. 7, p. 437-443, 1995a.
- ROSATI, S.; PITTAU, M.; TOLARI, F.; ERRE, G.; KWANG, J. Genetic and antigenic characterization of caev (caprine arthritis-encephalitis virus) recombinant transmembrane protein. *Veterinary Microbiology*, v. 45, p. 363-370, 1995b.
- ROSATI, S.; MANNELLI, A.; MERLO, T.; PONTI, N. Characterization of the immunodominant cross-reacting epitope of visna maedi and caprine arthritis-encephalitis virus capsid antigen. *Virus Research*, v. 61, p. 177-183, 1999.
- ROWE, J. D.; EAST, N. E. Risk factors for transmission and methods for control of Caprine Arthritis-Encephalitis Virus infection. *The Veterinary Clinics of North America Food Animal Practice*, v. 13, n. 1, p. 35-53, 1997.
- ROWE, J. D.; EAST, N.E.; THURMOND, M.C. Cohort study of natural transmission and two methods for control of caprine arthritis-encephalitis virus infection in goats on a California dairy. *American Journal of Veterinary Research*, v. 53, n. 12, p. 2386-2395, 1992.
- RUSSO, P.; VITU, C.; BOURGOGNE, A.; VIGNONI, G.; ABADIE, V. D.; PÉPIN, M. Caprine arthritis-encephalitis virus: detection of proviral DNA in lactoserum cells. *The Veterinary Record*, v. 140, p. 483-484, 1997.
- SALTARELLI, M.; QUERAT, G.; KONINGS, D. A. M.; VIGNE, R.; CLEMENTS, J. Nucleotide sequence and transcriptional analysis of molecular clones of CAEV which generate infectious virus. *Virology*, n. 179, p.347-364, 1990.
- SARAIVA NETO, A. O.; BIRGEL, E. H.; CASTRO, R. S. AEC soroprevalência em Pernambuco. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE MEDICINA VETERINÁRIA, 23, Recife, Sociedade Brasileira de Medicina Veterinária, p.100, 1994.
- SARGAN, D. R.; BENNET, J. D.; COUSENS, C. ROY, D. J. BLACKLAWS, B. A.; DALZIEL, R. G.; WATT, N. J.; McCONNELL, I. Nucleotide sequence of EV1, a British isolate of maedi-visna virus. *Journal of General Virology*, v. 72, p. 1893-1903, 1991.
- SIGURDARDÓTTIR, B.; THOMAR, H. Isolation of a viral agent from the lungs of sheep affected with maedi. *The Journal of Infectious Diseases*, v. 144, n. 1, p. 55-60, 1964.
- SIGURDSSON, B. Maedi, a slow progressive pneumonia of sheep: an epizootiological and pathologic study. *British Veterinary Journal*, v. 110, p. 255-270, 1954.
- SONIGO, P.; ALIZON, M.; STASKUS, K.; KLATZMANN, D.; COLE, S.; DANOS, O.; RETZEL, E.; TIOLLAIS, P.; HAASE, A.; WAIN-HOBSON, S. Nucleotide sequence of the visna lentivirus: relationship to the AIDS virus. *Cell*, v.42, p.369-382, 1985.
- THOMPSON, J. D., HIGGINS, D. G.; GIBSON, T. J. Clustal W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, positions-specific gag penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Research*, v. 22, p. 4673-4680, 1994.
- TRAVASSOS, C. E.; BENOIT, C.; VALAS, S.; da SILVA, A. G.; PERRIN, G. Caprine arthritis-encephalitis virus' in semen of naturally infected bucks. *Small Ruminant Research*, v. 32, p. 101-106, 1999.
- VALAS, S.; BENOIT, C.; BAUDRY, C.; PERRIN, G.; MAMOUN, R. Z. Variability and immunogenicity of caprine arthritis-encephalitis virus surface glycoprotein. *Journal of Virology*, v. 74, n. 13, p. 6178-6185, 2000.
- VALAS, S.; BENOIT, C.; GUIONAUD, C.; PERRIN, G.; MAMOUN, R. Z. North American and French caprine arthritis-encephalitis viruses emerge from ovine maedi-visna viruses. *Virology*, v. 237, p. 307-318, 1997.

VIRUS TAXONOMY: The Classification and Nomenclature of Viruses. *The Seventh Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses*. van REGENMORTEL, M. H. V.; FAUQUET, C. M.; BISHOP, D. H. L.; et al. (Ed.). Virus Taxonomy, VIIIth Report of the ICTV. Academic Press, 1167p, 2000. Disponivel em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/ICTV>. Acesso em: 20/03/2002.

WAGTER, L. H. A.; JANSEN, A.; BLEUMINK-PLUYM, N. M. C.; LENSTRA, J. A.; HOUWERS, D. J. PCR detection of lentiviral *gag* segment DNA in the white blood cells of sheep and goats. *Veterinary Research Communications*, v. 22, p. 355-362, 1998.

WILLEMS, L.; KERKHOFS, P.; ATTENELLE, L.; BURMY, A.; PORTETELLE, D.; KETTMANN, R. The major homology region of bovine leukaemia virus P24^{gag} is required for virus infectivity in vivo. *Journal of General Virology*, v. 78, p. 637-640, 1997.

WILLS, J. W.; CRAVEN, R. C. Form, function and use of retroviral Gag proteins. *Journal of the Acquired Immuno Deficiency Syndrome*, v. 5, p. 639-654, 1991.

ZANONI, R. G. Phylogenetic analysis of small ruminant lentiviruses. *Journal of General Virology*, v. 79, p. 1951-1961, 1998.

ZANONI, R. G.; NAUTA, I. M.; KUHNERT, P.; PAULI, U.; POHL, B.; PETERHANS, E. Genomic heterogeneity of small ruminant lentiviruses detected by PCR. *Veterinary Microbiology*, n. 33, p.341-351, 1992.

ZANONI, R. G.; NAUTA, I. M.; PAULI, U.; PETERHANS, E. Expression in *Escherichia coli* and sequencing of the coding region for the capsid protein of Dutch maedi-visna virus strain ZZV 1050: application of recombinant protein in Enzyme-Linked Immunosorbent Assay for the detection of caprine and ovine lentiviruses. *Journal of Clinical Microbiology*, v. 29, n. 7, p. 1290-1294, 1991.

ZANONI, R.; PAULI, U.; PETERHANS, E. Detection of caprine arthritis-encephalitis and maedi-visna viruses using the polymerase chain reaction. *Experientia*, v. 46, p.316-319, 1990.

ZINK, M. C.; YAGER, J. A.; MYERS, J. P. Pathogenesis of caprine arthritis encephalitis virus: celular localization of viral transcripts in tissues of infected goats. *American Journal of Pathology*, v.136, n.4, p.843-854, 1990.