

**UNIVERSIDADE ESTADUAL DO CEARÁ
PRÓ-REITORIA DE PÓS-GRADUAÇÃO E PESQUISA
FACULDADE DE VETERINÁRIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS**

TÂNIA VALESKA MEDEIROS DANTAS

**PROTEÍNA RECOMBINANTE DO VÍRUS DA ARTRITE ENCEFALITE
CAPRINA COM POTENCIAL ANTIGÊNICO**

FORTALEZA – CEARÁ

2009

Livros Grátis

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

TÂNIA VALESKA MEDEIROS DANTAS

PROTEÍNA RECOMBINANTE DO VÍRUS DA ARTRITE ENCEFALITE
CAPRINA COM POTENCIAL ANTIGÊNICO

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias da Faculdade de Veterinária da Universidade Estadual do Ceará, como requisito parcial para a obtenção do grau de Doutor em Ciências Veterinárias.

Área de Concentração: Reprodução e Sanidade Animal.

Linha de Pesquisa: Reprodução e sanidade de pequenos ruminantes.

Orientadora: Profa. Dra. Maria Fátima da Silva Teixeira

FORTALEZA-CEARÁ

2009

D192p Dantas, Tânia Valeska Medeiros Dantas
Proteína Recombinante do vírus da Artrite Encefalite
Caprina com potencial antigênico /Tânia Valeska Medeiros
Dantas._Fortaleza, 2009.
120p. ; Il.
Orientadora: Profa Dra. Maria Fátima da Silva Teixeira
Tese (Doutorado em Ciências Veterinárias)-
Universidade Estadual do Ceará, Faculdade de Veterinária.
1 Lentivírus. 2.Expressão p28. 3. Antigenicidade. 4.
Clonagem. 5. *Western blot*. I. Universidade Estadual do
Ceará, Faculdade de Veterinária.

CDD:636.089

TÂNIA VALESKA MEDEIROS DANTAS

PROTEÍNA RECOMBINANTE DO VÍRUS DA ARTRITE ENCEFALITE
CAPRINA COM POTENCIAL ANTIGÊNICO

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias da Faculdade de Veterinária da Universidade Estadual do Ceará como requisito parcial para a obtenção do grau de Doutor em Ciências Veterinárias.

Aprovada em: 11 de Dezembro de 2009

BANCA EXAMINADORA

Profa. Dra. Maria Fátima da Silva Teixeira

Orientadora – UECE

Prof. Dr. Marcos Fabio Gadelha Rocha
Examinador-UECE

Prof. Dr. Raymundo Rizaldo Pinheiro
Examinador-EMBRAPA

Prof. Dr. João Paulo Matos Santos Lima
Examinador-UFRN

Profa. Dra. Suzana A. Costa de Araújo
Examinadora-UFPB

Para Keillak Dantas, minha mãe, grande amiga, minha vida, incentivadora dos meus sonhos. Obrigada pela minha vida, compreensão, convivência, incentivo, torcida e ajuda nas tomadas de decisões, nos momentos mais difíceis desta jornada, e por compartilhar cada conquista da minha vida; principalmente por me ensinar a recomeçar e sempre dar a “volta por cima”. DEDICO.

AGRADECIMENTOS

À Universidade Estadual do Ceará e ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias (PPGCV), por propiciarem a realização deste trabalho.

À CAPES pelo apoio financeiro concedido, em forma de bolsa, a qual sem dúvida, foi imprescindível para a realização desta pesquisa.

Ao FUNDECI/BNB, pelo apoio financeiro concedido ao projeto, que foi fundamental para sua execução.

Ao Laboratório de Virologia da UECE, pela execução deste projeto.

Ao Núcleo de Biotecnologia de Sobral – NUBIS, em especial ao Laboratório de Genética Molecular, por fornecer toda sua estrutura física e pessoal, contribuindo de forma incondicional para realização deste trabalho.

À Universidade Estadual Vale do Acaraú, pela minha estada no NUBIS.

Ao Laboratório de Virologia vegetal da UFC, pelo apoio.

Ao Laboratório de Moléculas biologicamente ativas da UFC, pela ajuda em algumas eletroforeses, bem como na expressão e purificação da proteína, principalmente Raquel, Sâmia e João Batista, que me ajudaram, e ao Prof Dr. Benildo de Sousa Cavada pela permissão de uso dos seus reagentes e estrutura do seu laboratório.

À EMBRAPA – CNPC, por me auxiliar, fornecendo sua estrutura física e laboratorial para execução de algumas técnicas.

A **DEUS**, por por eu existir e nunca me deixar desistir.

À minha mãe, Keillak Dantas, pelo incentivo, dedicação e amor que me presta dia a dia e por me mostrar que todos os momentos, por piores que sejam, sempre nos trazem algo de bom.

A Manu, por todo seu amor, compreensão, carinho e atenção. AMO-TE.

Aos meus irmãos, Ketheleen e Diego, por serem meus melhores amigos e companheiros.

Aos meus avôs, Auta e Oliveira Dantas e a toda minha família, por terem sempre torcido por mim, especialmente a tia Fátima Dantas, e ao meu primo Rivelino.

Aos meus irmãos de coração e grandes amigos, Suzana e Eudmar, por todo o apoio profissional e principalmente pessoal. Vocês serão sempre parte de mim. Obrigada.

Ao André Gurgel Passos, aquele que me socorreu em todas as horas como um pai que esta sempre ali para ajudar. Obrigada.

À Prof.a. Dr.a. Maria Fátima da Silva Teixeira, que, além de orientadora, foi uma grande amiga e mãe. Obrigada por me oferecer a oportunidade de desenvolvimento acadêmico.

Agradeço por me haver mostrado que o sucesso e o sabor da vitória são resultados de esforços próprios. Valeram o aprendizado, a convivência e a liberdade para buscar soluções.

Ao prof. Msc. Rodrigo Maranguape, por ter me acolhido, me aguentado (pois perturbei muito) e agraciado com sua confiança, convivência, amizade e seus ensinamentos inigualáveis em Biologia Molecular. Não sei nem como agradecer todo o seu esforço em me ajudar e lutar por esta tese. Preciso, no entanto, pelo menos falar o meu muito obrigada pelo apoio e, sem dúvida pela contribuição imensurável à realização deste trabalho.

Ao Dr Rizaldo Pinheiro, um verdadeiro pai, sempre ali a me socorrer. Meus agradecimentos a você são infinitos.

Aos amigos do Laboratório de Genética Molecular do NUBIS, Monalysa, João Garcia, Antônio, Gleiciane de Queiroz (meu braço direito- na elaboração da tese), Isana, Anderson, Daniel, Simone, Tatiana, Auxiliadora, Cleane, Francisco, Jackson, Cintia, Nagila, muito obrigada pela acolhida. E quero falar que o que mais valeu foi a amizade de vocês, que fica para sempre.

A Apoliana e Roberta, pela realização de minhas SDS-PAGE e *Western-Blot*; vocês foram fundamentais. Um enorme muito obrigada.

Um agradecimento especial a Gleiciane, que agora é uma grande amiga, pela sua grande ajuda. À grande amiga Valeska Shelda (Xará) pelo convívio, preciosas sugestões e comentários.

A minha família LABOVIR: Valeska (Xará), Aracely, Edmara, Suzana, Aryana, Neilson, Richard, Marcílio, Arturo, Jean Berg, Aline, Mariana, Gabrielle, Alfredo, Esmail, D`Avila (minha substituta, a “chefinha”), Junior Junior, Carlos e a todos que passaram pelo nosso laboratório, pelo apoio, incentivo, convívio. Obrigada por tornarem a caminhada menos árdua. Agradeço também a Cinthia e Igor, meus filhos de coração e de laboratório, pela ajuda e momentos agradáveis.

Aos meus colegas e amigos de turma, de laboratório e de vida: Micheline, Sthênia, Viviane, Aracely, Lorena, Adriana, Roberta, Lenadro pela amizade e convívio.

Aos professores e funcionários do Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias da UECE, pela contribuição para o meu crescimento profissional, e em especial, às secretárias Adriana e Cristina pela presteza, atenção e carinho.

Um agradecimento especial ao Prof Dr.Marcos Fábio, pelo carinho e confiança que teve por mim durante todos esses anos.

A todos aqueles que, mesmo à distância, direta ou indiretamente, contribuíram para a realização deste trabalho, meus sinceros agradecimentos.

"A História tem demonstrado que os mais notáveis vencedores normalmente encontraram obstáculos dolorosos antes de triunfarem. Eles venceram porque se recusaram a se tornarem desencorajados por suas derrotas."

--B. C. Forbes

RESUMO

Em primeiro lugar procede a um levantamento dos principais estudos sobre proteínas recombinantes e experimentos de vacinas contra o CAEV e outros lentivírus. Secundariamente visa a produzir uma proteína recombinante do vírus da artrite encefalite caprina com potencial antigênico para ser utilizado como antígeno em testes diagnósticos sorológicos em sistema de expressão bacteriana e em plasmídeo, No tocante ao primeiro objetivo, foi realizada uma revisão de literatura das pesquisas nos últimos dez anos (1998-2008) referente às vacinas contra lentivírus animal. No que concerne à produção da proteína recombinante do CAEV, foi realizada uma análise do gene do CAEV para determinar qual a região do gene *gag* codificava para a p28 do vírus. A região considerada foi dos nucleotídeos 971-1606 do CAEV Cork. Os oligos foram desenhados desde o início e final da sequência (20 e 21pb). Foi realizada a ligação do gene da p28 do *gag* em plasmídeo pUC19 e depois uma subclonagem em pET32b. Realizaram-se o sequenciamento de ambas as construções e a purificação por cromatografia de afinidade. Procedeu-se à PCR de colônia e à extração de plasmídeos por lise alcalina. A melhor condição de expressão da proteína recombinante foi testada a 37°C e temperatura ambiente, utilizando como indutor o isopropil β-D-1-thiogalactopiranosidase (IPTG) nas concentrações de 0,5, 1 e 3mM. Para verificar o resultado da expressão, as proteínas foram analisadas pela eletroforese em gel de poliacrilamida. Para avaliar o seu potencial antigênico, foi efetuado o *western blot*, utilizando como antígeno a proteína recombinante, e como anticorpo primário o soro de animal soropositivo. O sequenciamento confirmou a correta inserção do fragmento do gene da p28 nos dois plasmídeos, os quais apresentaram uma banda de 636 pb após a PCR na eletroforese em gel de agarose. A bactéria *E. coli* expressou a proteína em diversas condições. A 37°C a bactéria expressou a proteína em menores intensidades e na concentração a 0,5 mM de IPTG, não houve expressão. A temperatura ambiente, em todas as concentrações, a proteína foi expressa, sendo que a 1 mM de IPTG apresentou maior intensidade. Com base nos resultados, considerou-se a melhor condição de expressão da proteína p28 recombinante em *E.coli* BL21 o tratamento de 1 mM de IPTG a temperatura ambiente. Ao analisar o potencial antigênico da proteína recombinante no *western blot*, essa reagiu com o soro positivo, apresentando forte banda característica de peso molecular 28 kDa. Conclui-se que houve a produção da proteína p28 do CAEV recombinante pela bactéria e essa apresenta um potencial antigênico que provavelmente poderá ser utilizado como antígeno em testes diagnósticos.

Palavras -chaves: Lentivírus. Expressão de p28. Clonagem. *Western Blot*.Antigenicidade

ABSTRACT

The present study had two objectives, first to survey the main studies on recombinant proteins and vaccine experiments against CAEV and other lentivirus and second, to produce a recombinant protein from the Caprine Arthritis Encephalitis virus with antigenic potential for use as antigen in serological diagnoses in a bacterial and plasmid expression system. Regarding the first objective the research of the last ten years (1998-2008) was revised in the literature regarding vaccines against animal lentivirus. Regarding the production of CAEV recombinant protein, the CAEV gene was analyzed to determine which region of the gag gene codified for the virus p28. The region considered was of the 971-1606 nucleotide of the CAEV Cork deposited in the gene bank. The primers were designed from the start of the sequence (20bp) and the end of the sequence (21bp). The p 28 gene was linked to the gag in pUC19 plasmid and then subcloned in pET32b. Both the constructions were sequenced and purified by affinity chromatography. PCR was performed on the colony and the plasmids extracted by alkaline lysis. The best expression condition of the recombinant protein was tested at 37°C and room temperature, using isopropyl β -D-1-thiogalactopyranoside (IPTG) as inducer at the concentrations of 0.5, 1 and 3 mM. To verify the result of the expression, the proteins were analyzed by electrophoresis in polyacrylamide gel. Western blot was performed to assess their antigenic potential using the recombinant protein as antigen and the serum from a proven positive animal as primary antibody. Sequencing confirmed the correct insertion of the p28 gene fragment in the two plasmids, which presented a band of 636 bp after PCR in electrophoresis in agarose gel. The *E. coli* bacteria expressed the protein under various conditions. At 37°C the bacteria expressed the protein at lower intensities and there was no expression at the 0.5 mM IPTG concentration. The protein was expressed at room temperature at all the concentrations and at 1 mM IPTG the protein presented greater intensity. Based on the results the treatment of 1 mM IPTG and room temperature was considered the best expression condition of the p28 recombinant protein in *E. coli* BL21. When analysing the antigenic potential of the recombinant protein in western blot it reacted with the positive goat serum and presented a strong band characteristic of 28 kDa molecular weight. It was concluded that the CAEV p28 recombinant protein was produced by the bacteria and it presented an antigenic potential that could probably be used as antigen in diagnostic tests.

Key words: Lentivirus. p28 expression. Cloning. Western blot. Antigenicity

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Representação esquemática do CAEV.....	22
Figura 2. Representação esquemática da estrutura gênica do provírus de CAEV. LTR – <i>long terminal repeat</i>	22
Figura 3. Representação do mapa do plasmídeo pET 32a.....	35
Figure 4. Mapa do plasmídeo pUC18/19.....	36
Figura 5. Mapa do vetor pGEM-T easy.....	37
Figura 6. Descrição dos componentes do hospedeiro para clonagem.....	39
Figura 7. Descrição dos componentes do hospedeiro para expressão	40
 Capítulo II.....	 33
Figura 1. Polyacrylamide gel electrophoresis (12,5%) showing the expression induction p28 CAEV by room temperature and 37°C.....	89
Figura 2 p28 protein expression by IPTG at room temperature. Immunoblotting analysis.	90

LISTA DE TABELAS E QUADROS**TABELAS**

Capítulo I.

Tabela 1. Fases de desenvolvimento para produção de vacina.....74

QUADROS

Capítulo I.

Quadro 1. Testes experimentais de vacinas para FIV.....75

Quadro 2. Testes experimentais de vacinas para SIV.....76

...

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

- % - Percentagem
- Ac- anticorpo
- Ag- antígeno
- AIDS- Síndrome da imunodeficiência humana
- AIE- anemia infecciosa eqüina
- AIEV – Vírus da anemia infecciosa eqüina
- BAC- Cromossomos artificiais de bactérias
- BIV - Vírus da imunodeficiência bovina
- BNB- Banco do Nordeste
- CA – Capsídeo
- CAE – artrite encefalite caprina
- CAEV – Vírus da artrite encefalite caprina
- CAEV_{Co} CAEV_{co} – Cepa CAEV Cork
- CAPES- Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior
- CEUA- Comitê de Ética para Uso de Animais
- CNPC- Centro Nacional de Pesquisa Caprinos e Ovinos da EMBRAPA
- CPE- efeito citopático
- CPMV- Vírus mosaico do caupi
- CpSMV- Vírus mosaico severo do caupi
- DAB- diaminobenzidine
- DNA – Ácido desoxirribonucléico
- ELISA – Ensaio imunoenzimático ligado a enzima Enzyme Linked Immunosorbent Assay
- Embrapa - Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária
- env* – Gene que codifica as proteínas do envelope viral
- EUA- Estados Unidos da América
- FIV – Vírus da Imunodeficiência Felina
- Fiv_{pet}- Vírus da Imunodeficiência Felina cepa petaluma
- FUNDECI- Fundo de Desenvolvimento Científico e Tecnológico.
- g- gravidade
- gag* - Gene que codifica as proteínas internas do vírus
- gp – Glicoproteína

h- hora
H₂O₂- Peróxido de hidrogênio
HAstV- Astrovírus humano
HCl- Ácido Clorídrico
HIV - Vírus da Imunodeficiência humana
HTLV- Vírus linfotrófico de células T humana
IBGE- Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
IDGA - Imunodifusão em Gel de Agarose
IgG- Imunoglobulina G
IN – integrase
IPTG- Isopropil β-D-1-thiogalactopiranosidase
JD- Doença de Jembrana
JDV - Vírus da Doença de Jembrana
kb- kilobase
kDa – Kilodaltons
LABOVIR- Laboratório de Virologia
LB- Luria Bertani meio de cultura
LTR – Sequências longas repetidas
LVPR – Lentivírus de Pequenos Ruminantes
MA – Matriz
mA --miliampers
MAPA- Ministério da Agricultura do Brasil
MCS- Sítio de clonagem múltipla
MERCOSUL- Mercado comum do Sul
mg- miligrama
Mg²⁺ - Magnésio
MHC – II- complexo principal de histocompatibilidade classe II
MHC- complexo principal de histocompatibilidade
MHC- I- complexo principal de histocompatibilidade classe I
min- minuto
ml -- Mililitro
mM- Milimolar
MN- membrana de nitrocelulose
MSC – Membrana Sinovial Caprina

MV - Maedi-Visna
MVV - Vírus da Maedi-Visna
NC – Nucleocapsídeo
nm – Nanômetro
NUBIS- Núcleo de Biotecnologia de Sobral
°C – Graus Celsius
OIE – Organização Mundial de Saúde animal
ORF- open reading frame
pb- pares de base
PBS- Tampão fosfato salino
PCR - Reação em Cadeia de Polimerase
pH- potencial hidrogeniônico
pol - Gene que codifica as enzimas virais
PPGCV- Programa de Pós graduação em Ciências Veterinárias
RBS- sítio de ligação de leveduras
rev - Gene de regulação viral
RNA – Ácido rRibonucléico
RNAm- Ácido Rribonucléico mensageiro
SDS- PAGE- Eletroforese em gel de poliacrilamida em sulfato de sódio duodecil (*sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis*)
SHIV-vírus quimérico da imunodeficiência humana e símia
SIV - Vírus da imunodeficiência símia
SU – Glicoproteína de superfície
tat - Gene de regulação viral
TCID- Dose inoculadora em cultura de tecido
TM – Glicoproteína transmembrânica
TR – Transcriptase reversa
UECE – Universidade Estadual do Ceará
UFC- Universidade Federal do Ceará
UFERSA- Universidade Federal Rural do Semi Árido
UFPB- Universidade Federal da Paraíba
USDA- Departamento de Agricultura dos Estados Unidos (*United States Department of Agriculture*)
UVA- Universidade Estadual do Vale do Acaraú

vif - Gene de regulação viral

WMV- Vírus mosaico da melancia

YAC- cromossomos artificiais de levedura

μl — Microlitro

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	19
2 REVISÃO DE LITERATURA.....	21
2.1 Vírus da Artrite Encefalite Caprina.....	21
2.1.1 Classificação.....	21
2.1.2 Morfologia e estrutura gênica.....	21
2.1.3. Replicação.....	23
2.1.4 Infectividade celular.....	23
2.1.5 Heterogeneidade genética.....	24
2.1.6 Antigenicidade.....	24
2.1.7 Resposta Imune.....	24
2.1.8 Epidemiologia.....	27
2.1.9 Sinais clínicos.....	28
2.1.10 Diagnóstico Clínico.....	28
2.1.11 Diagnóstico Laboratorial.....	28
2.1.11.1 Isolamento viral.....	29
2.1.11.2 Reação em cadeia de Polimerase (PCR).....	29
2.1.11.3 Imunodifusão em Gel de Agarose (IDGA).....	30
2.1.11.4 Ensaio Imunoenzimático (ELISA) indireto.....	30
2. 1.11.5 Western blot ou imunoblotting.....	31
2.1.12 Prevenção e Controle.....	31
2.2 Proteína p28.....	32
2.3 Tecnologia do DNA recombinante.....	33

2.3.1 Vetores.....	34
2.3.2 Hospedeiros.....	37
3 JUSTIFICATIVA.....	41
4 HIPOTESE CIENTIFICA.....	43
5 OBJETIVOS.....	44
5.1 OBJETIVOS GERAIS.....	44
5.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	44
6 CAPÍTULO I.....	45
7 CAPITULO II.....	77
8 CONCLUSÕES.GERAIS.....	91
9 PERSPECTIVAS.....	92
10 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	93
ANEXOS.....	113
ANEXO 1- DECLARAÇÃO DO COMITÊ DE ÉTICA.....	114
ANEXO 2 DECLARAÇÃO DO CORRETOR ORTOGRÁFICO.....	115
ANEXO 3 COMPROVANTE DE ACEITE DO CAPITULO I.....	118
ANEXO 4 COMPROVANTE DE ENVIO DO CAPITULO II.....	119
ANEXO 5 DECLARAÇÃO DO REVISOR DE INGLÊS.....	120

1 INTRODUÇÃO

O Nordeste brasileiro, atualmente, detém 91,36% do rebanho caprino nacional, composto por 8,6 milhões de animais (IBGE, 2008). Apesar deste efetivo expressivo, a produção de caprinos nesta região é limitada por inúmeras falhas no manejo alimentar, reprodutivo e sanitário, além de faltar escrituração zootécnica e haver diagnóstico tardio de diversas doenças, cuja maioria não é controlada de maneira apropriada. A demora no diagnóstico dessas enfermidades geralmente induz ao comprometimento do desempenho produtivo do rebanho, além de acarretar perdas econômicas significativas para os caprinocultores, tais como diminuição da produção láctea e do período de lactação, bem como da perda de peso ocasionada pela dificuldade de locomoção, redução do peso ao nascer e da taxa de crescimento e morte (PINHEIRO et al., 2003).

Dentre essas enfermidades que comprometem o desempenho produtivo e reprodutivo, pode-se destacar a artrite-encefalite caprina (do inglês CAE - *Caprine Arthritis-Encephalitis*), uma infecção viral multissistêmica, incurável, de caráter crônico – debilitante e específica de caprinos, que afeta articulações, glândula mamária, pulmões e, em animais jovens, o sistema nervoso central. A CAE é causada por um retrovírus pertencente à família *Retroviridae*, subfamília *Lentivirinae*, gênero *Lentivirus* e acomete caprinos de todas as raças, idades e sexos (CORK et al., 1974). Foi reconhecida clinicamente, pela primeira vez, na Suíça, em 1959, (STÜNZI et al., 1964), sendo que os principais sintomas clínicos são: artrite, encefalite, pneumonia e mastite. A sintomatologia nervosa, ou seja, a encefalite, ocorre em cabritos, o que leva a quadros de ataxia secundária e paresia. A articular é a mais comum e se manifesta essencialmente nos adultos (RUSSO, 1984), bem como a forma pulmonar e mamária. Muitos animais infectados não apresentam sintomatologia clínica, porém permanecem soropositivos durante toda a sua existência (CUTLIP et al., 1992).

Não existe tratamento nem vacina para a CAE e a única forma de evitar sua transmissão é estabelecer medidas de controle e prevenção da doença. A maneira mais efetiva de controlar a infecção consiste em se proceder à remoção dos animais infectados e interromper a difusão do agente. As medidas sanitárias adotadas para o controle e a erradicação da infecção pelo CAEV estão diretamente relacionadas com o tamanho, o tipo de exploração, o manejo e o grau de infecção dos rebanhos. Ademais, incluem medidas, como aplicação de testes sorológicos sensíveis e específicos a serem realizados semestralmente em todos os caprinos, entre outras.

O principal teste diagnóstico da CAE é a imunodifusão em gel de agarose (IDGA) recomendado pela Organização Mundial de Saúde Animal (OIE), que apresenta elevada especificidade, identificando os animais realmente positivos, porém apresenta muitos resultados falso negativos, principalmente em início de infecção. Essa baixa sensibilidade decorre dos tipos de antígenos utilizados nesse teste, os quais, na maioria dos casos, são de vírus completo.

Essa técnica se fundamenta na difusão do anticorpo (Ac) e do antígeno (Ag) em uma base semissólida contendo gel de ágar e eletrólitos. Quando o Ac e o Ag se encontram em concentrações equivalentes, interagem e precipitam, formando imunocomplexos estáveis que podem ser visualizados como bandas de precipitação (ROITT et al., 1998). Esse teste apresenta como desvantagem o fato de só detectar altos níveis de imunoglobulinas nos indivíduos, o que promove a permanência de falso negativos no rebanho caprino (TIGRE et al., 2006; ANDRIOLI et al., 2006c). Além disto, a detecção pelo anticorpo depende do antígeno utilizado (KNOWLES JÚNIOR et al., 1994).

Um resultado negativo no IDGA não descarta uma possível infecção, pois pode ocorrer uma demora significativa entre a infecção e a produção de anticorpos, como também pode acontecer que em alguns caprinos acometidos exista expressão insuficiente do vírus para ocasionar uma resposta humoral (MCGUIRE et al., 1990; HANSON et al., 1996).

O CAEV apresenta um estrutura genômica composta pelos genes estruturais *gag*, *pol* e *env*, e pelos genes acessórios *tat*, *rev* e *vif*. Os genes estruturais são responsáveis pela produção de proteínas da matriz e do capsídeo (*gag*), das enzimas (*pol*) e das glicoproteínas do envelope (*env*).

As principais proteínas estruturais do CAEV consistem dos componentes internos p28, p19 e p16 e da glicoproteína de superfície, a gp135. Todas são antigenicamente relacionadas com as proteínas estruturais análogas da Maedi-Visna (GOGOLEWSKI et al., 1985). Em sua maioria, os animais, quando infectados, fazem anticorpos para o polipeptídeo p28 e esses anticorpos são usados para o diagnóstico sorológico da patologia.

Com base na premissa que a p28 é a principal proteína para a qual os animais produzem anticorpos, é que se busca produzir essa proteína recombinante, na tentativa de aumentar a sensibilidade e especificidade dos testes diagnósticos sorológicos, bem como futuramente testá-la com uma possível vacina. Este trabalho é parte de projeto aprovado pelo Banco do Nordeste (BNB) Produção de Vacina Quimérica contra Lentivírus de Pequenos Ruminantes- assentido também pelo Comitê de Ética para o Uso de Animais (CEUA) da Universidade Estadual do Ceará (UECE) (Anexo 1).

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Vírus da artrite encefalite caprina

2.1.1 Classificação

O CAEV é um vírus RNA pertencente à família *Retroviridae* e subfamília *Lentivirinae* a qual alberga o gênero *Lentivirus*, do qual fazem parte, além do CAEV, o Maedi-Visna vírus (MVV), os vírus das imunodeficiências felina (FIV), bovina (BIV), símia (SIV) e humana (HIV-1, HIV-2), o vírus da anemia infecciosa equina (AIEV) (HAASE, 1986; CLEMENTS; PAYNE, 1994) e o vírus da doença de jembrana (JDV) (BURKALA et al., 1998).

O CAEV replica-se lentamente, produzindo sincícios e lise em culturas primárias de células de membrana sinovial de caprinos (MSC). Esse é alvo de variação antigênica e induz pouca ou inexpressiva produção de anticorpos neutralizantes pelo hospedeiro. O protótipo é o vírus CAEV cepa Cork (ZINK; JONHSON, 1994).

2.1.2 Morfologia e estrutura gênica

O CAEV, como os demais lentivírus, são partículas esféricas, envelopadas com aproximadamente 100 nm de diâmetro, núcleo cônico e denso, no qual estão inseridas moléculas idênticas de RNA fita simples, uma molécula de transcriptase reversa dependente de Mg^{2+} e proteínas do nucleocapsídeo (GONDA et al., 1986). O envelope está associado covalentemente com as glicoproteínas transmembranárias (TM) e de superfície (SU). Outra estrutura presente na partícula viral é a matriz que está situada entre o capsídeo e o envelope (PEPIN et al., 1998). (Figura 1).

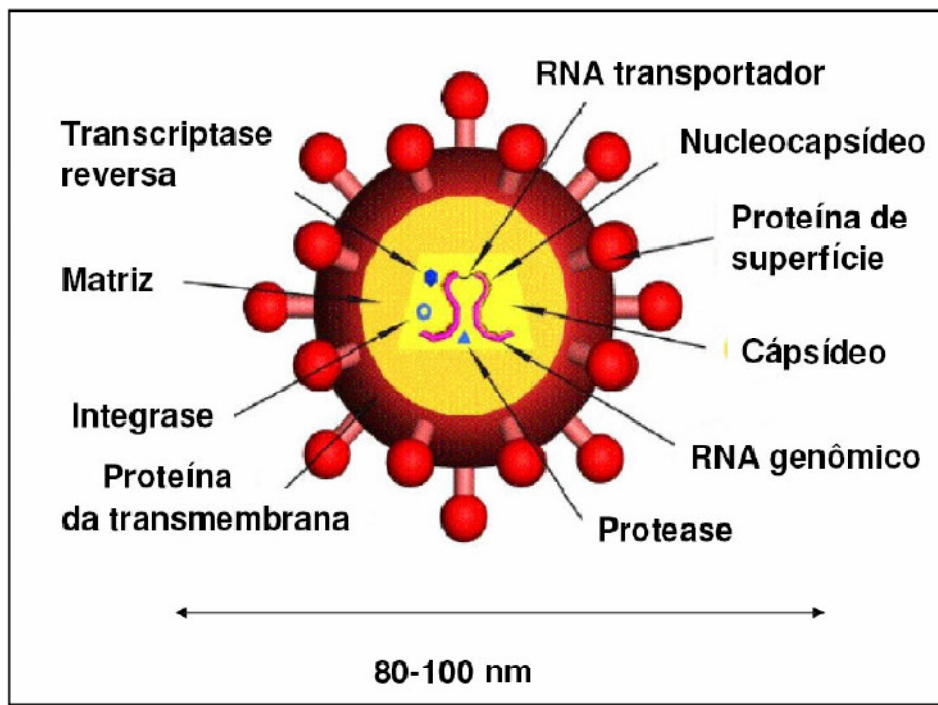


FIGURA 1 - Representação esquemática do CAEV (BORDERÍAS, 2004).

O envelope viral é constituído pelo produto do gene *env*, o qual codifica glicoproteínas (gp) de superfície e transmembranar, que, por sua vez, atuam na penetração do vírus na célula. O núcleo é constituído por produtos do gene *gag*, que originam as proteínas do nucleocapsídeo e matriz, enquanto o gene *pol* é responsável pela síntese de proteínas com funções enzimáticas envolvidas no processo de replicação viral, como as proteases, transcriptase reversa e integrase (JOAG; STEPHENS; NARAYAN, 1996). (Figura 2).

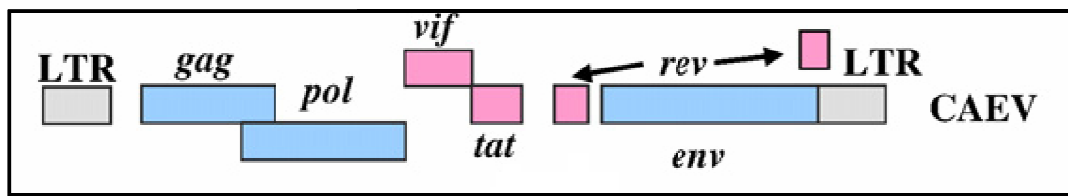


FIGURA 2 - Representação esquemática da estrutura gênica do provírus de CAEV. LTR – *long terminal repeat*. Adaptado de Bouzar et al. (2003).

Os genes *vif*, *tat* e *rev* codificam as proteínas regulatórias Vif, Tat e Rev, respectivamente. A proteína Vif está associada à infectividade viral e ao controle da produção

das partículas virais infecciosas, ao passo que as proteínas Tat e Rev abrangem a regulação da expressão viral (CLEMENTS; PAYNE, 1994).

Os genes *gag* e *pol* mostram-se os mais conservados, enquanto o gene *env* é heterogêneo, em razão mutações pontuais estabelecidas durante a replicação dos ácidos nucleicos dos retrovírus. As proteínas de regulação estão ausentes da partícula viral e somente são traduzidas durante a replicação viral (NARAYAN; CLEMENTS, 1989).

2.1.3 Replicação

O ciclo de replicação do CAEV pode ser dividido em duas etapas principais: infecção e expressão. A fase de infecção dá origem ao provírus e a fase de expressão resulta na produção do RNA viral e formação de vírions (GONDA, 1994). O ciclo de replicação do CAEV consiste, resumidamente, na ligação do vírus pelas glicoproteínas do seu envelope aos receptores da superfície celular; fusão do envelope a membrana celular; liberação do RNA viral no citoplasma da célula, onde é transcrito em DNA por ação enzimática da transcriptase reversa; trânsito do DNA pró-viral para o núcleo da célula parasitada; integração desse DNA em sítios, mais ou menos aleatórios, do DNA celular por meio da enzima integrase, para a formação do provírus; síntese do RNA viral pela RNA polimerase II celular, utilizando o provírus como molde; transcrição do genoma em RNA-mensageiros (RNAm); síntese das proteínas virais; montagem; construção do capsídeo e brotamento do vírus (COFFIN, 1996; PERTURSON; ANDRÉSDÓTIR; ANDRÉSSON, 1992).

O provírus, uma vez integrado, é estável, não existindo evidência de qualquer mecanismo para remoção dos provírus do DNA celular, transposição direta dele para outro sítio ou replicação independente (COFFIN, 1996). A integração do DNA proviral ao DNA celular não é essencial à replicação dos lentivírus, mas é fundamental para a persistência da infecção (HAASE, 1986).

2.1.4 Infectividade celular

O CAEV *in vivo* replica-se em células do sistema monocítico-fagocitário, sendo os macrófagos preferencialmente infectados (NARAYAN; CLEMENTS, 1989; BRODIE; PEARSON; ZINK, 1995). Tem-se observado a infecção não produtiva em linfócitos (ZINK; JOHNSON, 1994), bem como a presença do RNA viral em células endoteliais, epiteliais, fibroblásticas e do plexo coróide (ZINK; YAGER; MYERS, 1990; BRODIE; PEARSON; ZINK, 1995; TEIXEIRA et al., 1997).

2.1.5 Heterogeneidade Genética

Os lentivírus apresentam elevada taxa de mutação, alcançando valores de 0,5 a 1 genoma por ciclo de replicação, que é acumulado e auxilia a rápida evolução desse grupo de vírus (CASTRO, 1998). Coffin (1996) e Preston; Dougherty (1996) relataram que essas mutações decorrem, geralmente, de erros nas polimerizações durante o ciclo de replicação lentiviral, mediante substituições de bases, arranjo genético, recombinação e hipermutações. A principal responsável pela ocorrência de erros é a transcriptase reversa (TR) que, ao contrário das polimerases celulares, apresenta baixa fidelidade, graças, à ausência da ação 3' – 5' exonuclease necessária às correções de erros surgidos durante a polimerização celular.

De acordo com a nomenclatura proposta recentemente, baseada nas sequências *gag* e *pol*, o CAEV, juntamente com o MVV, passaram a ser denominados lentivírus de pequenos ruminantes (LVPR), sendo classificados em quatro grupos equidistantes, de A a D (SHAH et al., 2004). O grupo A pode ser subdividido em sete subtipos A1-A7, dentre os quais o subtipo A1 é designado como vírus Maedi-Visna por ser genético e geograficamente heterogêneo, enquanto o grupo B se refere ao tipo CAEV e compreende apenas dois subtipos distintos- B1 e B2. Os grupos C e D são representados por poucos isolados e reconhecidos apenas pela sequência *pol* (SHAH et al., 2004). Dois novos subtipos foram alocados ao genótipo A- os subtipos A8- encontrados em cabras, e A9, em caprinos e ovinos (GREGO et al, 2007).

2.1.6 Antigenicidade

Os lentivírus CAEV e MVV apresentam-se relacionados imunologicamente, visto que um soro caprino infectado com CAEV precipitou proteínas e glicoproteínas dos dois vírus, apesar do perfil eletroforético dos vírus diferir significativamente, com exceção da proteína do capsídeo, que apresentou peso molecular de 28 Kda para a CAEV e 27 KDa para o MVV (DAHLBERG; GASKIN; PERK, 1981).

Estudos de McGuire (1987) e Marcom et al. (1991) confirmaram que entre o CAEV e o MVV existe no mínimo um epítipo em comum em cada uma das suas proteínas estruturais. Apesar disso, é também sabido que ambas as viroses têm a capacidade para apresentar variação antigênica significativa e que dentro do mesmo animal infectado pode existir mais de uma cepa viral ao mesmo tempo (ELLIS;WILCOX;ROBINSON, 1987).

2.1.7 Resposta Imune

A resposta imune de um animal contra uma infecção vírica pode ser tanto do tipo natural (inespecífica) quanto adquirida (específica). A resposta imune natural, mediada por

citocinas e células, inicia-se poucas horas após a infecção. Embora seja ineficaz para prevenir a infecção viral, seu papel é de enorme importância no controle da intensidade da infecção até que o organismo comece a produzir elementos específicos de defesa, o que demanda entre cinco e sete dias. Os principais mecanismos da resposta imune natural consistem no bloqueio à infecção de novas células, inibição da replicação do vírus dentro das células e eliminação de células infectadas (MADRUGA; ARAÚJO; SOARES, 2001).

Os vírus da família *Retroviridae* podem persistir no hospedeiro durante toda a vida do animal, mesmo que esse manifeste resposta imune. Esse perfil de persistência resulta da capacidade do vírus de inserir cópias do seu genoma nos cromossomos das células hospedeiras e produzir a enzima denominada transcriptase reversa, que transcreve o genoma (RNA para DNA), mas não corrige seus próprios erros. Esse processo promove o surgimento, a cada ciclo, das *quasiespécies*, indivíduos com discretas diferenças genéticas (FLORES, 2007).

A inflamação crônica das articulações parece ser mediada pelo depósito de imunocomplexos, pois há evidência de uma relação direta entre o título de anticorpos contra a proteína do envelope viral e a severidade das lesões articulares. A resposta imune humoral em caprinos infectados só pode ser detectada tardiamente após a infecção. Além disso, já foi demonstrada resistência à doença por animais portadores de certos haplótipos de complexo principal de histocompatibilidade (MHC) (RAVAZZOLO; COSTA, 2007).

O vírus persiste no animal, apesar da resposta imune humoral e celular. Em que, a maioria, os animais infectados permanecem assintomáticos por anos. Portanto, a identificação dos portadores dos vírus no rebanho pode basear-se na detecção de anticorpos específicos para CAEV. A resposta humoral contra as proteínas virais produzidas pelos genes *gag* e *env* aparece, inicialmente, após infecção natural e experimental, e varia muito de acordo com o curso da doença. Tem-se observado que os anticorpos direcionados contra p25, p16 e p14 desaparecerem em estádios tardios da doença (FEVEREIRO; BARROS; FAGULHA, 1999).

Anticorpos humorais são ordinariamente detectados entre dois a três meses da inoculação de amplas doses de vírus Maedi - Visna e esses podem ser recuperados de leucócitos sanguíneos, apesar do aparecimento de anticorpos neutralizantes (SIHVONEN, 1981). Enquanto isso, os anticorpos neutralizantes são produzidos em quantidades limitadas, tardiamente e são de baixa afinidade, de modo que não impedem o ciclo de replicação viral (KENNEDY – STOSKOPF; NARAYAN, 1986; BERTONI et al., 1994).

Tizard (1998) assevera que a resposta imune contra os vírus pode ser observada de duas formas principais: contra as próprias proteínas do vírus, principalmente as do capsídeo e

do envelope, como no caso do MVV, ou pelo impedimento à infecção da célula - alvo pelo vírus. Esse impedimento à infecção celular pode ocorrer mediante o bloqueio da adsorção de um vírus recobrando a célula-alvo, iniciando a virólise mediada pelo complemento, causando agrupamento dos vírus, reduzindo assim o número de unidades infectantes disponíveis, ou pelo estímulo da fagocitose dos vírus pelos macrófagos.

Um propósito da resposta imune celular mediada é lisar as células que expressam antígenos estranhos na superfície, nesse caso, macrófagos. Pouco se sabe da capacidade dos macrófagos infectados com CAEV ou MVV de agirem como apresentadores de antígeno, mas a proporção de macrófagos infectados nos tecidos é normalmente baixa, sugerindo que a lise imunomediada de macrófagos infectados não suprime diretamente a resposta imune (ZINK; JOHNSON, 1994).

A habilidade para replicar em macrófagos e a dependência de replicação viral na maturação celular são os fatores - chaves na patogênese de doenças causadas pelos lentivírus de ovinos e caprinos. Os macrófagos são células de vida longa que derivam de pró-monócitos na medula óssea, circulam como monócitos no sangue e são distribuídos para todos os tecidos do corpo, onde são maturados e diferenciados em macrófagos teciduais. Pró-monócitos infectados latentemente podem ser detectados na medula óssea de animais infectados experimentalmente logo após inoculação e durante todo o curso da doença (ZINK; JOHNSON, 1994).

Em decorrência de a replicação viral ser maturação dependente, essas células imaturas da linhagem macrófago podem permanecer persistentemente infectadas por longos períodos. Na ausência de expressão de antígeno viral, o sistema imune do hospedeiro é incapaz de detectar o vírus. A medula óssea então age como um reservatório de vírus, liberando de forma contínua e persistente monócitos infectados para o sangue periférico, os quais são distribuídos por todo o corpo. Quando as células maturam no tecido, a expressão gênica viral é regulada e o antígeno viral é então exibido para o sistema imune do hospedeiro (ZINK; JOHNSON, 1994).

Jan et al. (2000) verificaram, *in vitro*, que as células endoteliais vasculares infectadas apresentam capacidade de ligação aos leucócitos duas vezes maior do que as células não infectadas e que elas mantêm a expressão de marcadores, aumentam, inicialmente, a expressão de antígeno MHC- I e, posteriormente, MHC – II. Tais eventos podem contribuir para a distribuição de células linfóides nos tecidos e demonstrar a ocorrência da resposta imune local na infecção do CAEV.

2.1.8 Epidemiologia

O CAEV foi isolado de caprinos em 1980, embora a artrite-encefalite caprina (CAE) tenha sido descrita pela primeira vez na década de 1970, nos EUA (CORK, 1974). A partir de então, essa enfermidade se distribuiu mundialmente. Com isso, diversas técnicas sorológicas são empregadas, com o objetivo de realizar um levantamento epidemiológico, para se ter conhecimento da prevalência ou da ocorrência do vírus da CAE (PINHEIRO, 2001).

No Brasil, em estudos realizados na região Nordeste, a ocorrência de caprinos soropositivos para o CAEV no Ceará foi de 40,73% (MELO; FRANKE, 1997). Em outro estudo nesse mesmo Estado, foi verificada uma prevalência da infecção pelo CAEV de 1% (40/ 4019) e, quando os caprinos soropositivos foram agrupados em faixas etárias, observou-se que aqueles com mais de três anos representaram 32,5% dos animais soropositivos; os de dois a três anos representaram 25%; de um ano e meio a dois anos, 15%; de um ano a um ano e meio, 20% e, de seis meses a um ano, 7,5% (PINHEIRO; GOUVEIA; ALVES, 2001). Avaliando somente os reprodutores caprinos desse Estado, Pinheiro; Gouveia; Andrioli, (1999) verificaram 13,20% de soropositividade e alertaram para o fato de que a contaminação do rebanho nativo estava ocorrendo por meio da compra de machos melhorados, que apresentavam anticorpos para o vírus da CAE, mas que não tinham confirmação diagnóstica para a CAE. Caminha et al, (2008) realizaram o levantamento sorológico por IDGA, de CAEV, na região metropolitana do Ceará e encontraram 16 (12,8%) positivos entre os 125 caprinos testados.

Nos outros estados da região Nordeste, a prevalência encontrada foi de 13,40%; 0,73% e 26,1% na Bahia (ALMEIDA et al., 2001; OLIVEIRA et al., 2006; TIGRE et al., 2006), de 4,4% e 2,5% no Piauí (PINHEIRO et al., 1996; BATISTA et al., 2004), de 2,2% e 8,2% na Paraíba (CASTRO et al., 2002; BANDEIRA et al., 2008), de 11,0% no Rio Grande do Norte (SILVA et al., 2005), de 50,6% no Maranhão (ALVES; PINHEIRO, 1997), de 17,7% e 3,9% em Pernambuco (CASTRO et al., 1994; CASTRO et al., 2002) e de 4,25% em Sergipe (MELO et al., 2003).

Silva, et al. (2005) analisaram amostras de soro caprino no Estado do Rio Grande do Norte, verificando na ocasião que, do total dos 184 animais testados, 2,71 % foram positivos. Em Pernambuco, Oliveira et al. (2006), analisando amostras de soro caprino, provenientes de abatedouros, notificaram o fato de que 3,8% eram positivos a CAEV.

Nos estados da região Sudeste do Brasil, a ocorrência de animais com CAE observada em São Paulo foi de 43,01% e 34,93% (LEITE et al., 2004; MADUREIRA; GOMES, 2007), em Minas Gerais de 33,3% e 23,6% (ASSIS; GOUVEIA, 1994; GOUVEIA et al., 1998),

Espírito Santo de 47,5% (GOUVEIA et al., 1998) e no Rio de Janeiro de 29,7%; 21,0% e 10,6% (ASSIS; GOUVEIA, 1994; CUNHA; NASCIMENTO, 1995; GOUVEIA et al., 1998).

Na região Sul do Brasil a prevalência encontrada no Paraná foi de 28,2% (SOTOMAYOR; MILCZEWSKI, 1997). No Rio Grande do Sul, de 6,0% (MOOJEN et al., 1986) e em Santa Catarina de 6,72% (SELL, 2000). Em estados de outras regiões brasileiras como, Goiás, a prevalência relatada foi de 10,0% (GOUVEIA et al., 1998) e no Pará de 40,0% (RAMOS et al., 1996).

2.1.9 Sinais Clínicos

O período de incubação da CAE é variável, podendo se estender por vários anos. O aparecimento da manifestação clínica da doença e a produção de patologia significativa induzida pelo vírus podem ocorrer meses ou anos após a infecção (NARAYAN; CLEMENTS, 1989). A manifestação sintomatológica da CAE pode ser dividida em quatro aspectos clínicos principais, podendo ocorrer de forma isolada ou simultânea, incluindo artrite, encefalite, mamite e pneumonia (FRANKE, 1998).

A CAE também compromete o estado geral dos animais infectados. A infecção tem longa incubação e a doença evolução crônica, com instalação progressiva das lesões, sendo, na maioria dos casos, manifesta em animais adultos (CASTRO, 1998).

2.1.10 Diagnóstico clínico

Observam-se as manifestações da sintomatologia como pneumonia, artrite, mamite ou encefalite, dados epidemiológicos e manejo dos animais, porém, o diagnóstico de CAE só é confirmado com testes laboratoriais (PINHEIRO, 2001).

2.1.11 Diagnóstico laboratorial

Muitos fatores influenciam no diagnóstico sorológico de caprinos infectados com CAEV, incluindo a variação no tempo relativo ao início da infecção, especificidade da proteína viral dos anticorpos do soro e sua quantidade, efeitos da cepa viral e diferenças baseadas nos hospedeiros com relação à resposta imunológica para infecção (DeMARTINI et al., 1999).

As características da relação hospedeiro-lentivírus que afetam a detecção em caprinos infectados incluem: heterogeneidade viral, mutação em animais infectados, bem como baixos níveis de replicação viral *in vivo*. Os caprinos infectados podem ser detectados com base na

presença de anticorpos antivirais no soro, pela detecção de proteínas ou do ácido nucléico, além do isolamento viral (DeMARTINI et al., 1999).

Essa enfermidade pode ser diagnosticada por vários métodos, sendo o principal a imunodifusão em gel de agarose, que é o teste recomendado pela Organização Mundial de Saúde Animal (OIE). Existe também o ELISA, o *Western Blot*, a imunofluorescência indireta, o isolamento do vírus por cultivo celular, a reação em cadeia de polimerase (PCR), a imunohistoquímica e a microscopia eletrônica, porém esses procedimentos são mais empregados nas pesquisas científicas (DANTAS, et al, 2008).

2.1.11.1 Isolamento viral

O isolamento viral em cultivo celular é a principal técnica utilizada para o diagnóstico da maioria das infecções virais. Baseia-se na capacidade de demonstrar a propagação dos vírus em cultura de células, mediante observação de alterações morfofisiológicas apresentadas pela monocamada celular, o chamado efeito citopático (CPE). Essa técnica é aplicável ao diagnóstico de quase todas as viroses de interesse veterinário inclusive CAE, capaz de detectar quantidades mínimas de vírus, sendo considerado um teste padrão de diagnóstico em virologia. Existem, no entanto, algumas restrições, uma vez que é demorada, dispendiosa, necessita da implantação de cultivos celulares especiais e, além disso, é incapaz de detectar vírus que não causem efeito citopático (KNOWLES, 1997).

Geralmente, o CAEV pode ser isolado de animais vivos pelo cocultivo de células, como leucócitos do sangue periférico, células somáticas de leite ou células de membrana sinovial caprina (MSC) (PINHEIRO, 2001).

2.1.11.2 Reação em cadeia de polimerase (PCR)

Vários trabalhos demonstram com sucesso o uso da técnica de PCR na detecção do DNA proviral do CAEV. A PCR permite a identificação por amplificação direta de parte do ácido nucléico viral específica de fluidos e tecidos de um animal infectado (PINHEIRO, 2001). Esta técnica é mas bem empregada em associação com métodos sorológicos em programas de controle avançados.

A detecção de infecção por CAEV mediante PCR é indicativa de uma infecção persistente e é dependente da quantidade amplificada da sequência- alvo e da especificidade do *primer*. Essa técnica, entretanto, poderá ser utilizada em programas de erradicação, quando identificar os animais não diagnosticados por sorologia. Em virtude do alto custo e dos resultados discordantes entre testes sorológicos e PCR, sugere-se que a PCR seja empregada

para esclarecer resultados sorológicos indeterminados ou negativos (KNOWLES, 1997; RIET-CORREA, 2001).

2.1.11.3. Imunodifusão em gel de agarose (IDGA)

Recomendado pela OIE, por ser de fácil aplicabilidade e não exigir equipamentos nem instalações sofisticadas, o IDGA é a forma diagnóstica mais utilizada em todo o mundo, principalmente em programas de controle da doença (MOOJEN et al., 1986). O IDGA tem alta especificidade, característica essa que o credencia a ser empregado como padrão no diagnóstico de triagem (VAREA et al., 2001).

Segundo Vitu et al. (1982), o teste de IDGA é capaz de identificar animais experimentalmente infectados com CAEV cerca de quatro a cinco meses após a infecção. Os autores indicam ainda que esse teste se mostrou mais sensível do que o teste de fixação do complemento e, ao ser comparado com o ELISA, mostrou resultados bastante correlacionados. Vale salientar que, ao se empregar o ELISA, a infecção pode ser identificada de modo mais precoce, até sete semanas após o período de incubação. Esse fato foi confirmado por Larsen; Hyllseth; Krogsrud, (1982), ao avaliarem caprinos experimentalmente infectados, afirmando a presença de anticorpos precipitantes, os quais podiam ser detectados de maneira mais precoce e com maior intensidade do que na fixação do complemento.

O teste IDGA pode ser utilizado para a detecção de anticorpos anti-CAEV tanto no soro sanguíneo quanto no colostro de animais infectados, e a presença de anticorpos no colostro pode ser utilizada na detecção da infecção no rebanho (ALKAN; TAN, 1998).

2.1.11.4 Ensaio imunoenzimático (ELISA) indireto

Nesse teste utilizam-se duas IgG, uma para reconhecer o antígeno e outra (anti-IgG) produzida em diferentes espécies de animal que reconhece a primeira IgG, com a qual se ligará (ALMEIDA; LIMA, 2001).

É um ensaio amplamente utilizado para a detecção e/ou quantificação de anticorpos em amostras de soro, com destaque em estudos soropidemiológicos. A especificidade dessa prova é garantida principalmente pela qualidade do antígeno adsorvido à placa (MADRUGA; ARAÚJO; SOARES, 2001).

Vários métodos de ELISA indiretos usando vírus inteiro, proteínas do capsídeo CAEV ou recombinante têm sido descritos (REYBURN et al., 1992; CAREY; ROY; DALZIEL, 1993; DANTAS et al., 2008). Esse teste permite a detecção de estirpes de um

mesmo vírus que, embora sejam sorologicamente relacionadas, apresentam maior variação entre si (ALMEIDA; LIMA, 2001).

2.1.11.5 *Western blotting* ou *imunoblotting*

É uma técnica imunoenzimática de detecção de proteínas, foi largamente empregada em estudos bioquímicos e imunológicos, e, com o advento das técnicas de Biologia Molecular, tal método é aplicado como ferramenta valiosa nos estudos de expressão gênica. As análises de *Western blot* são deveras úteis na identificação e quantificação de proteínas específicas, em uma mistura complexa de proteínas, com a vantagem de não se empregar qualquer marcação radioativa (REGITANO; COUTINHO, 2001).

2.1.12. Prevenção e controle

Até o presente, não existe tratamento nem vacina contra CAEV. Com isso, o controle dessa lentivirose é muito difícil, devendo-se impedir a entrada de animais infectados no plantel e fazer exames periódicos do rebanho, para que os animais doentes possam ser identificados e separados dos sadios, ou mesmo eliminados do rebanho (CASTRO, 1998).

Quando a prevalência for maior do que 30%, sugere-se a formação de um rebanho de animais negativos separado dos positivos, de modo a estabelecer o saneamento da propriedade mediante um rigoroso manejo sanitário de ambos os grupos e da gradativa eliminação do grupo dos animais infectados (FRANKE, 1998). Nos plantéis suspeitos ou sabidamente positivos, devem-se separar os cabritos imediatamente após o nascimento, evitando ao máximo seu contato com as secreções da mãe; administrar colostro de cabras soronegativas por IDGA, tratado a 56 °C por 60 min, ou mesmo de vaca; alimentar os cabritos com leite de vaca ou leite de cabras pasteurizado; testar os cabritos a cada seis meses e separar os positivos (CASTRO, 1998).

Apesar da inexistência de tratamento, Araújo (2008), estudando a atividade antiviral de inibidores da enzima transcriptase reversa (lamivudina, estavudina, zidovudina e efavirens), observou que estes inibiram *in vitro* a replicação dos LVPR, enquanto os inibidores da enzima protease não impediram a multiplicação dos LVPR. Nesse mesmo trabalho, o autor avaliou a atividade antiviral dos extratos, tanto do cinamomo (*Melia azedarach* L.) quando do nim (*Azadirachta indica* A. Juss), e verificou que estes inibiram *in vitro* a replicação dos vírus da artrite encefalite caprina e da Maedi-Visna.

O desenvolvimento de uma vacina é um processo longo e dispendioso. Várias vacinas já foram e estão sendo testadas contra os LVPR, porém nenhuma apresentou uma proteção

eficaz contra eles embora algumas tenham apresentado produção de anticorpos precipitantes e neutralizantes.

Cultip et al, (1987), utilizando um vírus inativado por calor, formalina com ou sem adjuvante incompleto de Freund e adjuvante de hidróxido de alumínio para vacinar ovinos, observaram que os ovinos produziram anticorpos precipitantes contra o vírus, os quais não protegeram contra a infecção quando desafiado com o MVV vivo.

Não obstante, experimentos de vacinação com o vírus da imunodeficiência símia (SIV) atenuado têm mostrado reduzir a carga viral e atrasar a progressão da infecção para a doença clínica (WYAND et al, 1996). Resultados similares são relatados com vírus da imunodeficiência felina (FIV) (PISTELLO et al, 2003).

Pertusson et al (2005) utilizando clone do vírus MVV atenuado por via intratraqueal observaram em dois dos ovinos vacinados que os anticorpos neutralizantes foram específicos para o vírus vacinado, mas não neutralizaram o vírus do desafio, apesar da grande similaridade genética de ambos os vírus.

Caprinos Saanen foram imunizados com glicoproteína de superfície gp 135 purificada de isolado 79-63 (CAEV-63), e avaliados para a produção de anticorpos neutralizantes homólogos e a ocorrência de reação cruzada. Os anticorpos neutralizantes CAEV-63 foram detectados em todos os animais após sete imunizações com gp 135 em adjuvante Quil A. Além disso, o soro de três dos quatro testados neutralizou um isolado do CAEV_{co}; todavia, o soro de um dos caprinos não manifestou neutralização para o CAEV_{co} heterólogo, porém inibiu um CAEV_{co} neutralizado por outro soro. Em suma, o estudo demonstrou que a vacina de subunidades da glicoproteína desse lentivírus pode induzir resposta humoral neutralizante cruzada em caprinos (KEMP et al., 2000).

2.2 Proteína p 28

As proteínas estruturais principais do CAEV consistem dos componentes internos p28, p19 e p16 e a glicoproteína de superfície gp135, todas antigenicamente relacionadas com as proteínas estruturais análogas do Maedi-Visna vírus (GOGOLEWSKI et al., 1985).

As proteínas do núcleo do vírion codificadas pelo gene *gag* são formadas pela clivagem do precursor 55K M_r com vários polipeptídeos intermediários, enquanto a glicoproteína de superfície gp 135 codificada pelo gene *env* foi formada pela modificação pós-traducional da glicosilação do precursor de 150K (CHEEVERS et al., 1988).

O gene *gag* é traduzido em uma poliproteína precursora Pr55^{gag} que, após clivagem pela protease viral, dá origem às proteínas do capsídeo (CA ou p28), do nucleocapsídeo (NC ou p16) e da matriz (M ou p19). A proteína do capsídeo é a mais abundante e forma o núcleo hidrofóbico no vírion. Está relacionada com uma forte resposta imune humoral durante a infecção e, desta forma, é uma proteína importante na produção de testes diagnósticos (JOAG; STEPHENS; NARAYAN, 1996; PEPIN et al., 1998). Dentro do vírus, a proteína da matriz está localizada entre o envelope viral e o capsídeo, sendo a responsável pela associação da proteína Pr55^{gag} com a membrana celular durante a replicação (COSTA, 2004).

A p28 é a maior nucleoproteína do CAEV para o qual a maioria dos animais infectados com o lentivírus caprino faz anticorpos para essa proteína (CRAWFORD et al., 1980; ROBERSON et al., 1982).

2.3 Tecnologia do DNA recombinante

A clonagem do DNA facilita o isolamento e a manipulação dos fragmentos do genoma de um organismo, replicando-os independentemente como parte de um vetor autônomo (TURNER et al., 2004).

De acordo com Burns; Bottino (1991), o processo geral baseia-se em três enfoques experimentais principais: produção de fragmentos de DNA de fontes diferentes que contenham as seqüências gênicas de interesse; reunião desses segmentos em uma molécula de DNA capaz de se replicar, normalmente, um plasmídeo bacteriano e; transformação de células bacterianas com a molécula recombinante, de modo que elas se repliquem e então se expressem.

Proteína recombinante é uma proteína codificada por um gene (ou um DNA recombinante) que tenha sido clonado em um sistema que permite a transcrição do gene em RNA mensageiro e a tradução do RNAm resultante em proteína (CREIGHTON, 1999).

As aplicações das proteínas recombinantes são imunização, análise tridimensional de proteínas, uso terapêutico e biotecnológico. Para a produção de proteínas recombinantes, utiliza-se a clonagem de genes em vetores de expressão apropriados que estejam sob o controle de promotores. Essa expressão de gene recombinante, porém, depende de fatores como ótimos sinais de expressão, enovelamento correto da proteína e as características do crescimento celular (SCHUMANN; FERREIRA, 2004).

2.3.1 Vetores

Um vetor de clonagem é um replicante no qual se pode inserir uma sequência nucleotídica (DNA exógeno ou inserção), para efetuar seu isolamento e amplificação. Esse tem a vantagem de poder se replicar em uma bactéria, levando a uma multiplicação da sequência de DNA de interesse. Existem vários tipos de vetores, como plasmídeos, fagos, cosmídeos, cromossomos artificiais de bactérias ou BAC e de cromossomos artificiais de leveduras ou YAC, entre outros. A escolha deles depende do tamanho do inserto a ser manipulado bem como dos objetivos da pesquisa (VERNEUIL, 2006).

Plasmídeos são pequenas moléculas de DNA dupla fita, contendo os elementos necessários para a sua replicação e pelo menos um gene que confere resistência a antibiótico. Estes elementos genéticos extracromossomais variam de 5 a 400 kilobases. Os plasmídeos presentes num grande número de cópias são usados como veículos de clonagem, desde que capacitem a amplificação do segmento do DNA neles clonado (NASCIMENTO et al., 2003).

O plasmídeo de expressão requer elementos que garantam altos níveis de expressão da proteína recombinante. O promotor é posicionado aproximadamente de 10 a 100 pares de base upstream do sítio de ligação do ribossomo (RBS) e está sob o controle de um gene regulatório, o qual pode estar presente no próprio vetor ou integrado no cromossomo do hospedeiro (MAKRIDES, 1996).

Dentre os plasmídeos, existem vários tipos, que, dependendo do objetivo, podem ser utilizados. Para a expressão de proteínas sem fusão em *Escherichia coli*, há vários, sendo os mais referidos os da série pET (plasmid for expression by T7 RNA polimerase), cuja expressão está sob o controle do promotor de transcrição *f₁₀* e dos sinais de iniciação de tradução *s₁₀* da proteína do gene 10 (a principal proteína do capsídeo) do bacteriófago T7. A grande vantagem deste vetor é que ele é transcrito pela T7 RNA polimerase, a qual é muito seletiva e ativa, sendo capaz de alongar cadeia de RNA aproximadamente cinco vezes mais rápido do que a RNA polimerase de *E. coli*. Alguns vetores da série pET (Figura 3) apresentam o promotor T7-lac, colocando a expressão da proteína sob o controle lac e reduzindo, portanto, o *background* de expressão da proteína -alvo na ausência de isopropyl β -D-1-thiogalactopyranoside (IPTG) (NASCIMENTO et al., 2003; LaVALLIE et al., 1993).

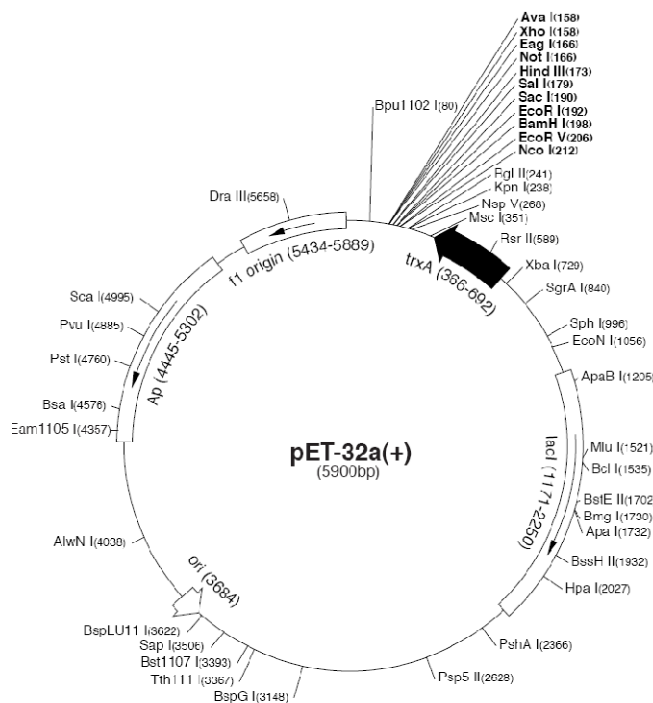


Figura 3. Representação do mapa do plasmídeo pET 32a (http://www.merck-chemicals.com.br/life-science-research/pet-32b%2B-dna/EMD_BIO-69016/p_2tOb.s1OkacAAAEjWhl9.zLX).

Mais de 40 tipos diferentes de pET são comercializados. O sistema inclui promotores híbridos, sítios múltiplos de clonagem para a incorporação de sítios diferentes de clivagem de proteases, juntamente com um elevado número de modificações genéticas para diferentes propósitos de expressão. A expressão requer uma cepa hospedeira lisogênica por um fragmento do fago DE3, codificando a polimerase RNA T7, sobre o controle do IPTG, para induzir o promotor lacUV5 (SORENSEN; MORTENSEN, 2005).

Os plasmídeos, da série pUC, contêm uma versão construída do gene lacZ, que tem vários sítios da enzima de restrição dentro da primeira parte da região codificante do gene (Figura 4). Essa região é conhecida como sítio de clonagem múltipla (MCS). A inserção do DNA-alvo em qualquer um desses sítios, ou entre qualquer parte, inativa o gene LacZ', forma colônia branca. Os vetores pUC18 and pUC19 são pequenos, número de cópias maior e plasmídeo de *E. coli*, com um tamanho de 2686 bp (YANISCH-PERRON; VIEIRA; MESSING, 1985).

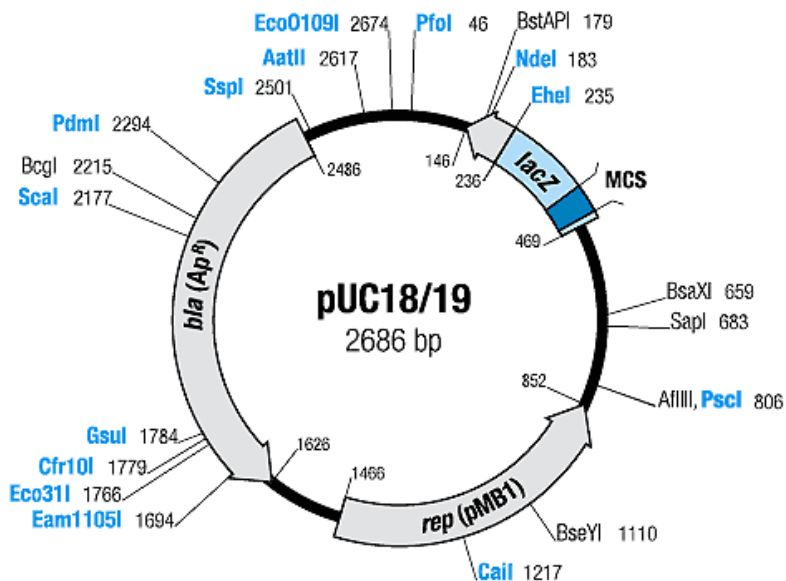


Figura 4. Mapa do plasmídeo pUC18/19 (<http://www.fermentas.com/techinfo/nucleicacids/mappuc1819.htm>)

O sistema de vetores pGEM -T e pGEM-T easy (Figura 5) facilita a clonagem de produtos da PCR por ser vetores lineares que têm uma extensão de timidina na extremidade 3'. Essas timidinas terminais são complementares aos resíduos de adenosinas adicionadas ao produto da dupla fita de DNA por muitas polimerases (FRACKMAN; KEPHART, 1999).

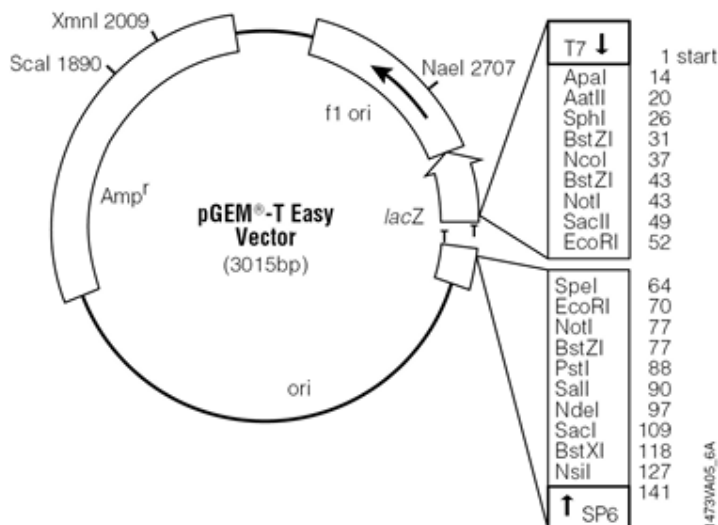


Figure 5. Mapa do vetor pGEM-T easy (<http://www.promega.com/figures/popup.asp?fn=1473va>)

Existem também os bacteriófagos, vírus que infectam bactérias, também usados como vetores em *E. coli*. Por exemplo, o fago λ pode ser usado para clonar fragmentos maiores do que os vetores plasmidiais e o fago M13 permite que o DNA clonado seja isolado sob a forma unifilamentar. Foram criados vetores mais especializados para usar aspectos dos plasmídicos e bacteriófagos, tais como os híbridos plasmídeo-bacteriófagos λ conhecidos como cosmídeos (MOREIRA; MENDES, 1998; TURNER et al., 2004).

2.3.2 Hospedeiros.

A *E. coli* é um dos hospedeiros mais utilizados para a obtenção de proteína heteróloga em quantidade suficiente para o estudo da sua estrutura e função ou para aplicações clínicas ou industriais. É hoje disseminado e constitui um marco na história do conhecimento de estrutura de proteínas (NASCIMENTO et al., 2003; BANEYS, 1999).

As muitas vantagens da *E. coli* é ser um valioso hospedeiro eficiente, de baixo custo e com uma produção de alto nível de proteínas heterólogas, bem como o fato de existir um vasto conhecimento da Genética e Fisiologia desta, por, apresentar uma diversidade de vetores de clonagem, ser de fácil controle da expressão gênica e exibir um fácil crescimento em elevadas produções. E as desvantagens como sistema de expressão incluem a incapacidade de fazer modificações pós-traducionais encontradas em proteínas eucarióticas; a falta de um mecanismo de secreção para a liberação eficiente da proteína em um meio de cultura; e a

limitada habilidade de facilitar a formação de pontes dissulfeto (HANNIG; MAKRIDES, 1998).

E. coli BL21 é a bactéria mais utilizada para expressão de proteínas heterólogas, pois é deficiente nas proteases *lon* e *ompT*, evitando, assim, a degradação proteolítica da proteína recombinante por essas proteases da *E. coli*. A bactéria BL21(DE3) é uma linhagem lisogênica muito utilizada no sistema pET de expressão. Ela é obtida pela infecção da *E. coli* BL21 pelo fago DE3, um derivado do fago λ , que contém clonado o gene da T7 RNA polimerase sob controle do promotor LacUV5. É capaz de produzir T7 RNA polimerase, quando o promotor lacUV5 for induzido com IPTG adicionado ao meio de cultura. A T7 RNA polimerase produzida transcreve o DNA clonado no vetor pET, produzindo grandes quantidades de mRNA, e então utilizado pela bactéria para produzir grandes quantidades da proteína recombinante (NAKAGHI, 2008).

No campo da pesquisa aplicada, a levedura *Saccharomyces cerevisiae* (Meyen ex E.C. Hansen) logo se destacou como um interessante candidato para a expressão de genes heterólogos de interesse biotecnológico. Embora a bactéria *Escherichia coli* (T. Escherich, 1885) represente uns dos mais poderosos sistemas de expressão heteróloga, várias proteínas eucarióticas de interesse comercial não puderam ser expressas eficientemente nesse microrganismo. Entre as razões para esses insucessos se pode mencionar: conformação incorreta, ausência de modificações pós-traducionais e baixos níveis de expressão. Alguns desses problemas puderam ser resolvidos quando as mesmas proteínas foram expressas em *S. cerevisiae* (TORRES; MORAES, 2009).

Ao longo das últimas duas décadas, outras leveduras têm sido apresentadas como sistemas alternativos de expressão por apresentarem vantagens sobre *S. cerevisiae*. Entre esses novos sistemas, destaca-se *Pichia pastoris* (Guillierm.) Phaff 1956, uma levedura metilotrófica, ou seja, que é capaz de crescer em meio de cultura contendo metanol como única fonte de carbono (CREGG et al., 1985; CREGG; VEDVICK; RASCHKE, 1993)

A levedura *P. pastoris* apresenta duas características que a tornam uma atraente hospedeira para a produção de proteínas heterólogas. A primeira é o forte promotor usado para transcrever genes heterólogos, o qual é derivado do gene do álcool oxidase (AOX1) de *P.*

pastoris. Esse promotor é regulado transcricionalmente por metanol, um indutor relativamente barato (CREGG et al., 1987).

Para a produção de proteínas, o plasmídeo recombinante deve ser transferido para uma cepa de *E.coli* que contém uma cópia cromossomal do gene para T7 RNA polimerase, não ocorrente nos hospedeiros para clonagem (figura 6). Os hospedeiros de expressão são células infectadas de bacteriófago DE3, um derivado lambda que tem a região imune do fago 21 e carrega um fragmento de DNA contendo o gene LacI, o promotor LacUV5 e o gene para a T7 RNA polimerase (figura 7) (NOVY et al., 2001; STUDIER; MOFFAT, 1986).

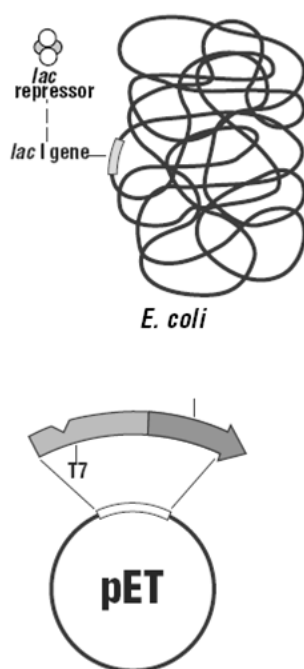


Figura 6 Descrição dos componentes do hospedeiro para clonagem (NOVAGEN, 2005).

3 JUSTIFICATIVA

A artrite encefalite caprina é uma doença contagiosa, que pode causar sintomas como mamite, pneumonia, artrite e encefalite em animais jovens. Nenhuma de suas formas é curável. O contágio acontece principalmente pela ingestão de colostro ou leite contaminados, ou contato prolongado entre animais, via secreções. Essa enfermidade já é considerada uma das prioridades do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) para erradicação no Brasil, entretanto ainda não existe um programa regulamentado, o que dificulta o controle da doença.

Apesar de não haver normas oficiais para o controle do CAEV, existem as resoluções, como a 65/94 e 66/94 do MERCOSUL, que obrigam os países- membros do bloco a certificar-se, em caso de exportação e importação de ovinos e caprinos, de que o país de origem dos animais seja livre de MVV e CAEV por pelo menos três anos. Esses preceitos sanitários enfatizam a importância econômica do controle e da erradicação dessas enfermidades.

O crescente aumento dos prejuízos econômicos dos produtores, a precariedade no repasse de informações e disponibilização de métodos diagnósticos complementares ao teste sorológico de IDGA para detecção precoce de animais positivos são entraves à eliminação da CAE.

Outro grande obstáculo é a ausência de tratamento ou de vacinas eficazes e disponíveis no mercado para CAEV, o que implica a eliminação dos animais positivos. Para o controle da CAE, faz-se necessária a realização periódica de testes nos rebanhos estabelecidos precocemente, além do isolamento ou descarte dos animais soropositivos e a separação dos filhotes ao nascimento, impedindo a ingestão do colostro e leite de fêmeas contaminadas.

A CAE atua negativamente na produtividade do rebanho, uma vez que reduz em 5,6% o peso dos cabritos ao nascer, em 23,7% da taxa de crescimento antes e de 72,1% desta taxa depois do desmame (GREENWOOD, 1995). Além dessas reduções, os reprodutores infectados com o CAEV que apresentam graves problemas articulares se tornam incapazes de realizar a monta natural, sendo descartados do rebanho (PINHEIRO; GOUVEIA; ANDRIOLI, 1999).

O vírus da artrite-encefalite caprina pôde contribuir no comprometimento de parâmetros reprodutivos de rebanhos caprinos, principalmente na taxa de infertilidade, serviços por concepção e peso vivo das crias ao nascer (BRITO, 2009).

Nesse sentido, em função das grandes perdas de animais pela doença, e da ausência de cura, bem como considerando ser a vacinação uma excelente forma de prevenção, os pesquisadores investem em estudos que propiciem o desenvolvimento de testes diagnósticos de acurácia e na produção de vacinas contra o CAEV e outros lentivírus.

As vacinas e os métodos dos diagnósticos são ferramentas indispensáveis à prevenção da maioria das doenças que acomete os rebanhos. Atualmente, a tecnologia abalizada pela Biologia Molecular fornece soluções promissoras capazes de conferir precisão e rapidez a muitos procedimentos de rotina.

Dessa forma, os avanços na Biotecnologia, durante a última década, proporcionaram a sua utilização no diagnóstico e prevenção da infecção de variados microorganismos. Como resultado, novas pesquisas, que visam ao desenvolvimento de uma vacina eficaz contra os lentivírus caprinos, vêm crescendo. Para isso, várias estratégias são aplicadas, como, por exemplo, proteínas recombinantes, quimeras, subunidades virais entre outras.

A tecnologia do DNA recombinante é uma das ferramentas mais utilizada na Biologia Molecular, uma vez que permite a produção de proteínas recombinantes para diversas funções, entre as quais, o estudo do potencial imunogênico da proteína. Faz-se necessário selecionar, no entanto, um vetor de clonagem e expressão adequado, bem como o hospedeiro apropriado para expressar a proteína.

A proteína mais utilizada como antígenos nos *kits* diagnóstico é a p28 do CAEV, produzida pelo gene *gag*, e apresenta um potencial imunodominante, além de ser encontrada e conservada entre os diferentes isolados do vírus, assumindo, com efeito, um importante papel no diagnóstico e desenvolvimento de imunógenos contra a CAE.

O diagnóstico do CAEV é baseado principalmente em testes sorológicos. O mais aplicado é a IDGA. O antígeno empregado para o diagnóstico sorológico por IDGA é composto pelas proteínas estruturais p28 e gp135. O IDGA pode determinar resultados falsonegativos, por ser um teste com alta especificidade e baixa sensibilidade. A produção de uma proteína recombinante, contudo, poderá aumentar a sensibilidade do teste.

Com base nessas premissas, foi realizada a produção da proteína p28 recombinante do CAEV, a qual foi expressa em bactérias com a finalidade de avaliar seu potencial antigênico a ser utilizada como antígeno para testes diagnósticos, tais como IDGA, ELISA ou *Western blot*.

4 HIPÓTESE CIENTÍFICA

A proteína p28 recombinante conserva epitopos imunoreagentes, sendo reconhecida pelos anticorpos padrões do CAEV.

5 OBJETIVOS

5.1 OBJETIVOS GERAIS

Desenvolver uma proteína recombinante p28 do CAEV para análise do seu potencial antigênico.

Relatar as principais pesquisas de vacinas contra lentivírus animal.

5.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Realizar a clonagem do gene da p28 em plasmídeo pUC19 e pET32b;
- promover a expressão da p28 recombinante em *E.coli* BL21;
- analisar diferentes protocolos de expressão para a proteína p28; e
- verificar a antigenicidade da proteína recombinante no *western blot*

6 CAPÍTULO I

Vacinas contra lentivírus animais

Animal Lentivirus Vaccines

Periodico: Ciência Animal (Submetido em Junho de 2008 e Aceito em Outubro de 2009)

Vacinas contra lentivírus animais

(Animal Lentivirus Vaccines)

Tânia Valeska Medeiros Dantas¹, Suzana Aparecida Costa de Araújo¹, Aracely Rafaelle Fernandes Ricarte¹, Edmara Chaves Costa¹, Jean Berg Alves da Silva², Valeska Shelda Pessoa de Melo¹, Aryana Lushese Vasconcelos Lima Feitosa¹, Maria Fátima da Silva Teixeira^{1*}.

¹ Laboratório de Virologia do Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias (PPGCV) - Universidade Estadual do Ceará (UECE) - Fortaleza-CE, ² Professor da Universidade Federal Rural do semi-árido (UFERSA) -Mossoró – RN

* labovirfavetuece@yahoo.com.br

Resumo

Vacina é uma preparação de antígenos capaz de induzir resposta imunológica específica no hospedeiro. Por isso as vacinas são ferramentas importantes na prevenção de doenças. Os lentivírus causam enfermidades infecto-contagiosas importantes nos animais (bovinos, felinos, primatas, caprinos, ovinos e eqüinos) devidos causar grandes prejuízos econômicos. Considerando que o controle dessas lentiviroses é feito somente por barreiras sanitárias e não existe tratamento, a busca por vacinas eficazes contra qualquer uma delas é um passo importante, principalmente para a descoberta da vacina contra o HIV. Com base nessa premissa, testam-se vacinas de subunidade, de vetores recombinantes, de DNA, e de vetores de plantas. O potencial para o desenvolvimento de vacinas no século XXI tem sido um sucesso, principalmente no que tange ao avanço das vacinas contra lentivírus animais que serão de grande valia em todo mundo, em especial no setor agropecuário, favorecendo sobre maneira o comércio de animais. Essa revisão teve por objetivo apresentar os principais

resultados das vacinas produzidas e testadas contra os lentivírus animais nos últimos dez anos.

Palavras Chaves: vacina, lentivírus, imunização

Abstract

Vaccine is a preparation of antigens used to induce specific immune response in the host, and this are therefore important tools in disease prevention. The Lentivirus cause important infectious contagious diseases in animals (cattle, cats, primates, goats, sheep and horses) causing major economic losses. Considering that lentiviroses are controlled only by health barriers and no treatment, the search for effective vaccines against any of them is an important step, especially for the discovery of a vaccine against HIV. Therefore, vaccines of the type subunit, recombinant vectors, DNA, and plant vectors were tested. The potential for vaccine development in the XXI century has been successful, mainly regarding the advance with vaccines against animal lentivirus that will be of great value throughout the world, especially the farming sector, thus favoring animal commerce. The objective of this review was to report the results of vaccines constructed and tested against animal lentivirus in the last ten years.

Key words: vaccine, lentivirus, immunization

Introdução

As lentiviroses são enfermidades infecto-contagiosas, causadas pelos vírus das imunodeficiências felina (FIV), bovina (BIV), símia (SIV) e humana (HIV), pelos vírus da anemia infecciosa eqüina (AIEV), da artrite encefalite caprina (CAEV), do Maedi-Visna (MVV) e pelo vírus da doença de Jembrana (JDV). Esses vírus acometem naturalmente felinos, bovinos (*Bos taurus*), primatas, humanos, eqüídeos, caprinos, ovinos e bovinos (*Bos javanicus*), respectivamente (HAASE, 1986).

Cabe destacar a não existência de tratamento eficaz ou vacina para as lentivirose em função da alta taxa de mutação dos agentes, bem como, pela peculiaridade do seu mecanismo de persistência através do qual os patógenos tornam-se capazes de escapar da resposta imune do hospedeiro (BOGERS et al., 2000).

Várias são as pesquisas com vacinas contra os lentivirus, sendo o FIV e o SIV os mais estudados devido à utilização desses como modelo experimental para o estudo do HIV. As vacinas apresentam-se como as melhores formas de prevenção contra as diversas doenças, sendo constante a busca por uma vacina eficaz e segura contra os lentivírus, com a prerrogativa de minorar perdas econômicas e de animais de elevado valor zootécnico. Portanto essa revisão tem por objetivo apresentar os principais resultados das vacinas produzidas e testadas contra os lentivírus nos últimos dez anos.

2 *Vacinas: uma visão geral*

Vacina é um material imunogênico capaz de estimular a imunidade em animais sem induzir qualquer doença. Vacinas podem ser baseadas em microrganismos mortos ou atenuados, toxinas alteradas ou vírus (SMITH, 2000).

O uso de vacinas de forma mais ampla foi introduzido a partir do início do século passado e contribuiu de forma inequívoca para a redução da incidência das doenças infecciosas. Nas duas últimas décadas, o rápido progresso das pesquisas, em particular nas áreas da imunologia e da biologia molecular, lançou as bases de um desenvolvimento sem precedentes para a implementação de novas vacinas e de novas estratégias de vacinação em todo mundo. O desenvolvimento de vacinas depende fundamentalmente do conhecimento dos mecanismos imunológicos envolvidos em resposta às infecções, bem como dos mecanismos de patogênese das infecções (SCHATZMAYR, 2003).

A produção de uma vacina leva anos até chegar a comercialização, nesse processo inclui as etapas de documentário, viabilidade, pré-desenvolvimento, desenvolvimento, registro e comercialização. Vale salientar que cada etapa dessas é composta de sub-etapas que demandam muito tempo (Tabela 1).

A primeira interação entre o patógeno e o hospedeiro ocorre nas mucosas e células epiteliais, que representa a primeira barreira contra os microrganismos, dificultando ou impedindo a adesão dos agentes à superfície das células epiteliais de revestimento (BORASCHI et al., 2003).

Existe uma forte evidência sugerindo que a resposta celular T vírus específico mostra-se crucial para o controle da infecção crônica persistente causada pelos lentivírus (KLENERMAN & HILL, 2005).

Além da resposta celular, a resistência às infecções virais depende da formação, pelo organismo, de resposta imune humoral (anticorpos ou imunoglobulinas) aos antígenos presentes na superfície dos vírus ou na superfície das células por eles infectadas. As respostas imune celular e humoral impedem que os vírus penetrem em novas células do organismo ou conduzem à destruição de células já infectadas (SCHATZMAYR, 2003).

Existem duas categorias de vacinas, as vacinas replicativas e a não-replicativas. As vacinas replicativas contém o vírus viável e por isso, proporcionam a replicação do agente no organismo hospedeiro, resultando na amplificação viral e no aumento da quantidade de antígeno que é apresentada ao sistema imunológico. As vacinas replicativas podem ser vírus patogênicos, vírus heterólogos, vírus atenuados e vetores virais (FLORES, 2007).

As vacinas não-replicativas (sem vírus vivo) não contém o agente viral e, por isso, são mais seguras do que as vacinas com vírus replicativo, pois não oferecem a possibilidade de reversão a virulência e de causar doença. Incluem-se nessa categoria as vacinas inativadas,

subunidades, proteínas recombinantes, vacinas de peptídeos sintéticos, vacinas DNA e RNA (FLORES, 2007).

A decisão estratégica para desenvolvimento de uma vacina viva, subunidade, inativada ou DNA deve ser baseada na patogênese, imunobiologia e epidemiologia da infecção ou doença (ELLIS, 2001).

As vacinas atenuadas tiveram como trabalho pioneiro aquele desenvolvido por Jenner, no século XVIII, o qual utilizou material obtido de lesões de pele de animais para realizar a imunização contra a varíola. Entre as desvantagens das vacinas vivas, destaca-se o desenvolvimento potencial de efeitos adversos que surgem no momento da multiplicação no hospedeiro, seja por fatores individuais, seja por uma reversão genética da amostra vacinal, tornando-a mais virulenta (SCHATZMAYR, 2003).

Tradicionalmente, as vacinas atenuadas eram feitas por passagens repetidas do agente infeccioso em cultura tissular ou em animais hospedeiros até que sua virulência fosse atenuada, porém sua imunogenicidade era mantida. Alternativamente, ao cultivo celular, agentes químicos como a formalina foram usados para destruir a infectividade. Mais recentemente, parte de um agente infeccioso, usualmente um antígeno de superfície, passou a ser empregado como vacina de subunidade (ADA, 2001).

Antígenos virais e bacterianos têm sido produzidos em plantas transgênicas. O antígeno de superfície da hepatite B, a enterotoxina da *Escherichia coli*, a glicoproteína do vírus da raiva, que têm sido produzidos em plantas transgênicas induzem a produção de IgG com especificidade antigênica após a administração oral em ratos. Uma vantagem potencial desse caminho inclui seu baixo custo e a habilidade de propiciar uma vacinação simplesmente pela ingestão de uma parte selecionada (folha, fruto ou etc que contenha o vírus de interesse) da planta transgênica pelo animal (HAMMOND, J. et al., 1999).

O uso de peptídeos como vacinas têm muitas vantagens, mas, por outro lado, apresenta algumas desvantagens. As vantagens incluem o fato do produto ser quimicamente definido, estável, seguro e conter apenas epítomos importantes para células B e T. As desvantagens manifestam-se na dificuldade em mimetizar a conformação tridimensional dos antígenos encontrados em muitos vírus, pelo fato dos epítomos de célula B reconhecidas pelos anticorpos neutralizantes serem por vezes seqüências descontínuas e pela suscetibilidade dos peptídeos à proteólise. Assim, várias administrações, usualmente com adjuvantes, podem ser necessárias (ADA, 2001).

As vacinas de subunidades são frequentemente produzidas a partir do uso de tecnologia de DNA recombinante. Essas vacinas apresentam um poder imunogênico maior devido a utilizar partes específicas dos microrganismos que oferecem um potencial imunogênico.

Vacina DNA é composta por moléculas de DNA que contém o gene da proteína contra a qual se deseja produzir resposta imunológica. Um importante atributo dessa vacina é a apresentação antigênica via moléculas de MHC de classe I e classe II, o que mimetiza o processo resultante de uma infecção natural, ativando linfócitos T CD4⁺, CD8⁺ além da produção de anticorpos.

A imunização com DNA tem muitas vantagens potenciais, incluindo seu baixo custo-benefício, estabilidade e ausência de infectividade (embora a resposta imunológica seja semelhante àquela vista após a infecção natural), junto ao fato de que a presença de anticorpo contra o antígeno que será expresso não inibe a resposta. A principal desvantagem potencial da técnica abrange a possibilidade de integração do DNA no genoma da célula hospedeira, a qual pode resultar na ativação ou produção de eventos tumorais, e a formação de anticorpos anti-DNA, porém ainda não há registros de eventos desse tipo (ADA, 2001).

Vacinas de DNA estimulam primariamente a imunidade celular enquanto vacinas de vetores recombinantes atuam na imunidade celular e humoral (UHL et al., 2002). A vacina DNA pressupõe a imunização contra o DNA que codifica os antígenos. Tipicamente, a vacina DNA é composta por uma molécula de DNA plasmidial contendo o gene de interesse e elementos genéticos apropriados, requeridos para expressão *in vivo* do antígeno de interesse no organismo alvo (KRISHNAM, 2000).

Vacinas DNA despertam resposta imune celular dentre eles o T citotóxico, desempenhando um papel crítico na indução de uma resposta imune forte e longa conferindo sucesso na proteção contra o desafio subsequente, conferindo uma produção de anticorpos (BAROUCH et al., 2001).

O uso das vacinas de DNA oferece uma série de vantagens econômicas, técnicas e logísticas quando comparado com as vacinas clássicas. Por exemplo, a produção em larga escala é bem mais barata, a manutenção do controle de qualidade mais fácil, e a comercialização não necessitam de uma rede de refrigeração, pois estas vacinas são estáveis à temperatura ambiente.

Adicionalmente, existem as quimeras virais que são partículas inexistentes na natureza, obtidas por introdução de fragmentos de um vírus em outro, em geral, mas não necessariamente, da mesma família. Essa tecnologia vem se expandindo fortemente, sendo numerosos os exemplos e entre eles destaca-se a utilização do vírus vacinal da Febre Amarela para expressar fragmentos de outros flavivírus, como Dengue e Encefalite Japonesa B. No caso do Dengue, partículas virais do tipo 4 foram utilizadas para a construção de quimeras contendo os demais tipos (SCHATZMAYR, 2003).

A obtenção de proteínas de vírus animal em células vegetais é apontada como um caminho extremamente promissor. É possível, por exemplo, a expressão de proteínas do

agente da Doença Hemorrágica do coelho e do vírus da Hepatite B em plantas de batata e, igualmente, antígenos de Hepatite B e Raiva em plantas do tabaco (KOPROWSKI & YUSIBOV, 2001; SCHATZMAYR, 2002). O uso simultâneo de vegetais modificados para alimentação e para vacinação tem sido apresentado como uma possibilidade real, como a produção de proteínas do vírus da Aftosa por plantas de alfafa transgênica. Para se alcançar a expressão de proteínas de vírus animal em vegetais há dois caminhos principais: a introdução no genoma da planta do fragmento do vírus animal a ser produzido ou a infecção da planta com vírus vegetal modificado geneticamente para gerar, durante a sua replicação, as proteínas virais desejadas (SCHATZMAYR, 2003).

O uso de vírus vegetais como sistema de expressão de genes tem crescido devidos esses terem essa capacidade de expressar genes estranhos sem perder sua infectividade e sem causar doenças nos animais e humanos, serem de fácil propagação em plantas e mais barato a sua obtenção.

Atualmente, um dos vírus mais utilizado para produção de quimeras é o vírus do mosaico do caupi (CPMV). A expressão de peptídeos estranhos na superfície das partículas do CPMV pode criar quimeras com uma grande variedade de fenótipos. Estudos envolvendo a transmissão e comportamentos dos hospedeiros revelaram que a expressão de peptídeos estranhos não altera a especificidade do agente em relação a seus hospedeiros, não aumenta a taxa de transmissão dos agentes por coleópteros ou sementes modificadas nem muda a ecologia do inseto vetor (PORTA et al., 2003).

O Vírus CPMV já foi utilizado para expressar proteínas do vírus HIV, como foi descrito por Porta et al. (1994), Mclain et al. (1996), Durrani et al. (1998) e McInerney et al. (1999). Outros vírus de plantas também já foram utilizados para expressar proteínas do HIV,

como o Tobacco (TMV) (SUGIYAMA et al. 1995; KARASEV et al., 2005), o tomato bushy stunt vírus (JOELSON et al, 1997; ZHANG et al., 2000).

A mais moderna tecnologia aplicada na produção de vacinas é a denominada vacinologia reversa, desenvolvida nos últimos cinco anos. É feito o seqüenciamento do genoma do agente, a análise de suas proteínas, previstas através da bioinformática. Finalmente é avaliada sua capacidade teórica de produzir resposta imune. Os peptídeos selecionados podem, então, ser sintetizados ou expressos em vetores para a comprovação de sua real capacidade de induzir imunidade em animais (ADU-BOBIE et al., 2003).

As pesquisas com vacinas não param, pois essas são fundamentais para prevenção de várias doenças e mesmo para aquelas que já existem vacinas sempre se busca melhorar a qualidade e a segurança da mesma.

Testes de imunização com lentivírus

Vírus da Imunodeficiência Felina (FIV)

O vírus da Imunodeficiência Felina (FIV) infecta somente felinos e causa imunodeficiência. Devido à grande similaridade genética ao HIV, o FIV é bastante estudado tanto na produção de vacinas quanto de antivirais.

Na década de 90, vários foram os trabalhos com vacinas FIV, testaram-se vacinas inativadas, DNA, porém nenhuma apresentou proteção eficaz (Quadro 1).

Vacinas testadas contra o FIV produziram manifestações clínicas caracterizadas por febre alta recorrente, aumento da incidência de infecção secundária, leucopenia, perda de linfócitos CD4+ e inversão da razão CD4/CD8 (CALLANAN et al., 1992, DIEHL et al., 1995).

Vários são os experimentos com vacinas FIV que tentam avaliar o nível de proteção heterólogo, ou seja, verificar se a vacina produzida com uma cepa de vírus é capaz de oferecer proteção contra outros tipos de cepas virais. Como foi observado no experimento de Yamamoto et al. (1991) que observaram uma indução a resposta imune contra vírus homólogo.

Os testes com vacinas DNA iniciaram ainda na década de 90, como por exemplo os experimentos envolvendo a administração de DNA plasmidial associado aos genes *env* e *gag*, que codificam a glicoproteína (gp120) e nucleoproteína (p 10), respectivamente propiciaram a produção de resposta humoral, porém não protegeram contra o desafio. Portanto, a imunização com vacinas DNA gp120 e p10 não promoveram redução significativa da carga próviral após desafio com FIV (CUISINIER et al., 1997).

Foi evidenciada proteção contra o desafio viral em felinos vacinados com a vacina de DNA, incluindo pró-vírus clonado molecularmente com replicação defeituosa após deleção no gene da Transcriptase Reversa (TR). A vacinação induziu uma forte resposta de linfócitos T citotóxicos apesar de nenhuma resposta humoral específica ter sido detectada (FLYNN et al., 2000).

A partir do desenho de vacinas contra FIV, baseadas em vírus inativados, vetores recombinantes e DNA, percebeu-se que a formação de anticorpos neutralizantes foi mais consistente em felinos imunizados com a vacina convencional por vírus inativados seguido pela utilização de uma vacina com vetor recombinante (GIANECCHINI et al., 2001, PU et al., 2001).

Tem-se comprovado que felinos podem ser protegidos contra a infecção com o protótipo da cepa FIV_{pet} através do uso de vacinas baseadas em partículas de vírus inativados ou DNA pró-viral com replicação defeituosa. Entretanto, a utilização dessas

vacinas a campo é incerta, devido à ausência de proteção consistente contra cepas distintas antigenicamente sendo preocupante o fato de que a cepa FIV_{pet} é um isolado atenuado (HOSIE et al., 2000).

O FIV com deleção no gene acessório ORF-A foi testado como vacina DNA em felinos livres de patógenos específicos. Os animais foram desafiados com vírus homólogo virulento. Os animais após receberem a dose da vacina ficaram em observação durante 22 meses, período esse que não foi detectado nenhuma infecção ou sintomatologia. Após esse período foi realizado o desafio e observou-se que todos os animais não vacinados ficaram infectados e dos nove animais vacinados, três animais não apresentaram infecção até 15 meses de observação (PISTELLO et al., 2005).

As pesquisas com o FIV são muito mais intensas, devido esse vírus ter muita semelhança com o HIV, tanto pela sintomatologia quanto pela filogenia do vírus, e pelo estudo se tornar mais prático, barato e acessível devido a utilização de animais. Com isso são testadas inúmeras formas de vacinas contra o FIV na esperança de que alguma apresente um bom resultado e possa ter uma continuidade no processo de produção de vacinas e que se essa apresente alguma eficiência possa se iniciar um estudo para o HIV também.

Fel-O-Vax FIV foi a primeira vacina licenciada pelo USDA para ajudar na prevenção da infecção FIV, que causa a AIDS felina. Este foi um avanço científico nas áreas da investigação vacina de lentivirus e medicina preventiva.

Essa vacina é comercializada desde 2002, ela seria uma ótima solução, porém apresenta alguns problemas como, por exemplo, não é possível fazer a distinção dos vacinados dos não vacinados e o uso de adjuvantes para estimular o sistema imune.

Vírus da Imunodeficiência Símia (SIV)

O vírus da imunodeficiência símia infecta primatas não humanos causando imunodeficiência. Os estudos de vacina com o SIV iniciaram na década de 80. E as pesquisas continuam crescendo na área de vacinas (Quadro 2).

Em macacos, a imunização com SIV vivo atenuado tem induzido uma imunidade protetora mais potente. Atualmente, evidências suportam o envolvimento de anticorpos neutralizantes e linfócitos T citotóxicos na imunidade protetora contra a infecção por SIV (JOHNSON & DESROSIERS, 1998).

Recentemente, relatou-se que a imunização de macacos Rhesus com uma vacina quimérica recombinante (SIV E HIV) tem mostrado resultados promissores na proteção dos animais contra o desafio subsequente aos protocolos de vacinação (BU et al., 2003).

Atualmente os estudos com SIV têm usado muita biotecnologia em busca de uma vacina eficaz, utiliza os artifícios de deleção de genes, vírus quiméricos, DNA recombinante entre outros.

Macacos Rhesus foram imunizados com a cepa scSIV por via intravenosa com três doses. O desafio foi realizado após seis semanas com duas cepas SIVmac239 e SIVmac251LA que resultou na estimulação da resposta imune específica e reduzindo o título viral após o desafio. Títulos de anticorpos neutralizantes para SIVmac239 foram expressivamente maiores em animais imunizados com scSIV do que nos controles no período de 2 e 4 semanas pós desafio (EVANS et al., 2005).

O uso de vírus como vetores para expressar genes de outros vírus e serem utilizados como vacinas é uma nova forma de produção de vacinas que vem sendo bastante utilizada, por favorecer uma vacina mais segura, devido a utilização de genes específicos para promover a imunogenicidade.

Nesse caso cita-se, a atenuação da infecção pela cepa viral SIV_{mac238}, mediante a imunização profilática com uma vacina DNA recombinante de adenovírus expressando gene Gag do SIV que promoveu uma redução no título dos vírus atenuados e um retardo na progressão da doença clínica em macacos desafiados com o vírus (CASIMIRO et al., 2005).

Estudos com vírus quimérico é uma modalidade de vacinas comumente testadas como observado no estudo de Sparger et al.(2008) que testou em primatas não humanos, o SIV e vírus da imunodeficiência humana/Símia (SHIV), e apontaram uma alta efetividade das vacinas virais vivas atenuadas. Ademais, esses vírus vacinais mantêm uma baixa patogenicidade. Vale salientar que a atenuação dos lentivirus associada com a deleção do gene viral *vif* promove uma redução significativa do risco para patogenicidade, além de manter o potencial para replicação viral de baixa magnitude no hospedeiro.

O pro-vírus SIV_{mac 239} com deleção do *vif* foi testado como vacina DNA proviral atenuada pela inoculação em fêmeas de macacos Rhesus. Essa vacina mostrou-se imunogênica e capaz de diminuir a carga de vírus patogênico utilizado como desafio (SPARGER et al., 2008).

Vírus da Doença de Jembrana (JDV)

Pouca literatura em torno do tema tem sido produzida pela comunidade científica, provavelmente pelo fato da Doença de Jembrana (JD) ser restrita ao gado Bali, na indonésia e não servir como modelo experimental às demais lentivirose.

Das poucas referências encontradas, destaca-se que uma resposta imune protetora foi induzida em *Bos javanicus*, com infecção aguda, pela vacinação com tecido de baço e plasma contendo vírus inativados, pelo Triton X-100. Os vírus, após inativados, foram emulsificados em adjuvante incompleto de Freund. A vacinação reduziu a severidade da

doença, mas não foi capaz de prevenir completamente o seu desenvolvimento nos animais desafiados com 100 doses infecciosas do vírus (HARTANINGSIH et al., 2001).

A eficácia dessa vacina derivada de tecido do baço a qual é usualmente utilizada na Indonésia para o controle da doença de Jembrana, foi determinada por quantificação viral, o que foi possível constatar que houve uma redução de 96% da carga viral e que o risco de transmissão do vírus foi reduzido em torno de 33%. Entretanto não houve redução significativa na duração do período febril em animais vacinados (DITCHAM et al, 2009)

Apesar de existir escassas literaturas sobre vacinas contra doença de Jembrana observa-se que vem sendo testada desde 2000 na região uma vacina de cultivo tecidual de baço, como uma forma de controlar a doença, pois a mesma consegue diminuir a transmissão do vírus para os outros animais. Esse resultado pode gerar uma expectativa em torno dessa metodologia já que a mesma não requer nem uma tecnologia avançada.

Vírus da Imunodeficiência Bovina (BIV)

À semelhança do JDV não existem muitos trabalhos com vacinas para o BIV na literatura, contudo esse vírus tem sido utilizado para produzir quimeras destinadas à composição de vacinas contra o Vírus da Imunodeficiência Humana (HIV).

Zhu et al (2005) realizaram a inserção do gene gag do HIV com o gene do BIV, construindo uma quimera, que pode ser utilizada como uma vacina. Genes em BHIVs quiméricos foram expressos corretamente, constatando assim, que as quimeras têm potenciais para tornarem-se um novo grupo de vacinas HIV/AIDS.

Vírus da Anemia Infecciosa Equina (AIEV)

Dentre as lentivirose animais, a Anemia Infecciosa Equina (AIE) é a mais importante economicamente, apresentando assim um controle sanitário rígido, fiscalizado

pelo Ministério da Agricultura do Brasil (MAPA), onde os animais positivos devem ser sacrificados.

Li et al. (2003), utilizando uma vacina atenuada com modificações no gene acessório S2 (AIEV_{UKA32}) para imunização de eqüinos, com duas doses em intervalos de trinta dias e desafio após seis meses, deduziram que a imunização propiciou a formação de resposta imune específica por um período de seis meses. Essa imunidade vacinal conferiu proteção contra a doença. Por outro lado, pôneis imunizados com uma vacina de proteína viral purificada, após desafio com AIEV, manifestaram redução do título viral e atraso na progressão para doença (HAMMOND, S.A. et al., 1999).

Shen et al. (2006) construíram um clone infeccioso avirulento da AIEV (pLG5-3-I-V) que teve os sítios da região *gag* e *env* (três aminoácidos em Gag e quatro aminoácidos em Env) mutados para o experimento e o vírus derivado do clone molecular (pLGFDE-V) . Esses clones foram testados em cavalos livre de AIE e observou-se que os cavalos imunizados com o pLGFD3-V permaneceram assintomáticos para AIE por um período de 6 meses, mantendo os níveis normais de plaquetas no sangue, ausência de febre e níveis baixos de vírus (10^3 cópias RNA/ml plasma).

Em contraste, os animais inoculados com pLG5-3-I-V desenvolveram uma aparente progressão clínica, definido pela temperatura retal acima de 39°C e contagem de plaquetas abaixo de 100.000 plaquetas/1 µl de sangue. Todos os sinais clínicos de indicação de AIE foram associados com febre, trombocitopenia e níveis RNA viral no plasma acima de 10^3 cópias/ml plasma (SHEN et al. 2006).

Durante os últimos 15 anos, tem sido avaliado experimentalmente um número expressivo de vacinas AIEV baseadas em vírus completos inativados e de subunidades do envelope viral. Os resultados oriundos dos testes com essas vacinas demonstraram um

notável crescimento da eficácia, variando de uma proteção à infecção ou à doença, até um severo aumento da replicação AIEV. Esses achados indicam, que a resposta imune à vacina pode tanto beneficiar quanto causar efeitos deletérios no caso de exposição ao vírus (HAMMOND, S.A. et al., 1999, ISSEL et al., 1992, RAABE et al., 1998).

Vírus da Artrite Encefalite Caprina (CAEV)

Vírus da artrite encefalite caprina (CAEV) acomete caprinos ocasionando problemas de artrite e encefalite, principalmente em animais adultos e jovens, respectivamente.

Caprinos Saanen foram imunizados com glicoproteína de superfície gp 135 purificada de isolado 79-63 (CAEV-63) avaliando-se a produção de anticorpos neutralizantes homólogos e a ocorrência de reação cruzada. Anticorpos neutralizantes CAEV-63 foram detectados em todos os caprinos após sete imunizações com gp 135 em adjuvante Quil A; além disso, o soro de três dos quatro animais testados neutralizou um isolado do CAEV_{co}. Todavia, o soro de um dos caprinos não apresentou neutralização para o CAEV_{co} heterólogo, porém inibiu um CAEV_{co} neutralizado por outro soro. Em suma, o estudo demonstrou que vacina de subunidades da glicoproteína do CAEV pode induzir resposta humoral neutralizante cruzada em caprinos (KEMP et al., 2000).

Através da utilização de um vetor DNA plasmideal, baseado no gene *env* do CAEV, em caprinos, observou-se que a vacinação pode induzir uma significativa supressão da replicação viral após desafio, com a diminuição na carga viral e um retardo no desenvolvimento de artrite (CHEEVERS et al., 2003).

Sousa et al. (2005), fazendo uso do vírus do mosaico severo do caupi (CpSMV) como molécula carreadora de p28 do CAEV (CpSMV-p28) por ligação covalente, inoculados em camudongos por via subcutânea, identificaram que a ligação covalente entre o CpSMV e a p28 foi eficaz na formação de uma quimera imunogênica, visto que a mesma

foi capaz de imunizar camundongos contra a p28, como mostraram os testes de ELISA e *western blotting*, sugerindo a possibilidade do emprego dessa quimera como antígeno para diagnóstico e vacinas.

Nenci et al (2007) testaram o efeito da indução da resposta celular T-helper CAEV específica na replicação do vírus *in vivo*, imunizando caprinos com um peptídeo sintético do CAEV capaz de promover uma forte resposta celular linfócitos T CD₄⁺ e, subsequentemente desafiaram os animais com CAEV. O peptídeo usado era parte da proteína estrutural do Gag do CAEV, mostrando uma forte similaridade seqüencial e estrutural com os peptídeos homólogos do HIV e com outros retrovírus, além disso, carregava um epítipo imunodominante T-helper capaz de induzir uma forte resposta em caprinos vacinados. Quinze dias após o desafio com a cepa CAEV_{CO} clonada, os animais vacinados apresentaram uma carga proviral (*proviral load*) superior aos controles.

Vírus Maedi-Visna (MVV)

Mais recentemente, foi testada a habilidade de uma vacina MVV atenuada em induzir proteção após infecção experimental contra infecção por um Vírus MVV altamente patogênico. Nesse intento, foram utilizados quatro ovinos de dez meses de idade, que receberam duas doses da vacina com intervalo de 17 semanas, sendo desafiados 46 semanas depois. Todos os animais infectados com o vírus atenuado desenvolveram baixo título de anticorpos vírus - específico identificado pela técnica de ELISA no decorrer de 4 a 6 semanas. Após vinte semanas do desafio, os ovinos vacinados começaram a apresentar atividade neutralizante contra o vírus desafiante. No entanto, concluiu-se que os anticorpos neutralizantes em dois dos ovinos vacinados eram específicos para o vírus vacinal, mas não neutralizaram o vírus desafio apesar das similaridades genéticas das cepas (PERTUSSON et al., 2005).

O uso de uma vacina DNA recombinante contendo o gene *env* do MVV, inoculada por biobalística, promoveu um grau significativo de proteção inicial quando aplicada via mucosa em animais comprovadamente infectados provenientes de rebanhos acometidos. Foram utilizados 12 ovinos de dois anos de idade. A imunização foi realizada diretamente na área vulvar, seguindo um protocolo de duas doses com intervalo de quatro semanas. O desafio foi realizado duas semanas após a administração da segunda dose, por via intratraqueal numa concentração de 10^3 TCID₅₀ da cepa EV1 do MVV (GONZALEZ et al., 2005).

Adicionalmente, uma candidata à vacina DNA contra MVV foi construída pela clonagem de genes que codificam a poliproteína Gag MVV e as proteínas Gag p16 e p25 fusionada a β-galactosidase em plasmídeo. O plasmídeo construído mostrou ser capaz de produzir uma forte resposta humoral em camundongos vacinados (HENRIQUES et al., 2007).

Considerações Finais

As lentivirose representam uma ameaça em todos os setores, principalmente em humanos no caso do HIV, mas não menos importante nos animais, devido às grandes perdas econômicas, sociais e genéticas oriundas dessas enfermidades, pois deve-se levar em conta que a forma primordial de controle dessas é o sacrifício dos animais portadores e enfermos.

As pesquisas com vacinas contra lentivírus animais iniciaram na década de 80, contudo, até hoje, existe apenas uma vacina comercial para o lentivírus felino, FIV, porém é comercializada somente nos Estados Unidos da América (EUA). No entanto, atualmente os estudos vêm se intensificando, devido à necessidade de se encontrar uma vacina contra as lentivirose, bem como, para dar resposta ao exigente mercado consumidor que busca a qualidade dos produtos e subprodutos animais. Além da saúde dos próprios animais.

A produção de uma vacina eficaz contra CAE que possa ser comercializada é muito complicada devido o vírus ser mutável capaz de se esconder do sistema imune, ficando

assim difícil combatê-lo. Para isso ainda são necessários muitos estudos na imunologia, patologia e biologia dos lentivírus para se ter grandes avanços na produção de vacinas.

Os alcances do século XXI com vacinas devem ser tão bons e até melhores quantos aqueles do século XX, principalmente em função dos avanços com as vacinas contra lentivírus que serão de grande valia em todo mundo, em especial no setor agropecuário, favorecendo o comércio de animais, bem como, culminando com a utilização das vacinas animais como modelo para a produção da vacina contra o HIV.

Sempre vem surgindo novas tecnologias para produção de vacinas que possibilitem a produção de uma vacina mais eficaz, segura e que imunize um maior número de cepas de microorganismos principalmente de vírus. A existência de uma vacina contra esse vírus seria a melhor forma de prevenir a doença já que não existe tratamento. Possibilitando assim uma esperança também para o desenvolvimento de vacinas contra o vírus HIV.

4. Agradecimentos

Ao BNB/FUNDECI pelo financiamento do projeto, bem como a CAPES pelo o apoio financeiro concedido em forma de bolsa.

5. Referências Bibliográficas

ADU-BOBIE, J., CAPECCHI, B., SERRUTO, D., RAPPUOLI, R., PIZZA, M. Two years in reverse vaccinology. *Vaccine*, v. 21, pp. 605-610. 2003

ADA, G. Advances in Immunology: Vaccines and Vaccination. *The New England Journal of medicine*, v.345, p. 1042-1053, 2001.

BAROUCH, D.H., CRAIU, A., SANTRA, S., EGAN, M. A., SCHMITZ, J. E., KURODA, M. J., FU, T-M., NAM, J-H., WYATT, L. S., LIFTON, M. A., KRIVULKA, G. R., NICKERSON, C. E., LORD, C. I., MOSS, B., LEWIS, M. G., HIRSCH, V. M., SHIVER, J.

W., LETVIN, N. L. Elicitation of high-frequency cytotoxic T-lymphocyte responses against both dominant and subdominant simian-human immunodeficiency virus epitopes by DNA vaccination of rhesus monkeys. *Journal of Virology*, v.75, p.2462–2467, 2001.

BISHOP, S.A. ; STOKES, C.R.; GRUFFYDD-JONES, T.J.; WHITING, C.V.; HARBOUR, D.A. Vaginal and rectal infection of cats with feline immunodeficiency virus. *Veterinary Microbiology*, v.51, p.217-227, 1996.

BORASCHI, D. TAGLIABUE , A., MARTIN, M. U., RAPPUOLI, R. INNAMORA, an European workshop focused on the mechanisms of innate immunity in pathogen-hostinteraction and their exploitation in novel mucosal immunization strategies. *Vaccine*. v. 21, S2/1–S2/11, 2003.

BOGERS, W.M.; CHENG-MAYER, C.; MONTELARO, R.C.Development in preclinical AIDS vaccine efficacy models. *AIDS*, v.14, p.S141-S151, 2000.

BU, Z. YE, L. ; COMPANS, R.W.; YANG, C. Enhanced cellular immune response against SIV Gag induced by immunization with DNA vaccines expressing assembly and release-defective SIV Gag proteins. *Virology*, v.309, p.272-281, 2003.

CALLANAN, J.J. ; THOMPSON, H.; TOTH, S.R.; O'NEIL, B.; LAWRENCE, C.E.; WILLETT, B.; JARRETT, O. Clinical and pathological findings in feline immunodeficiency virus experimental infection. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, v.35, p.3-13, 1992.

CASIMIRO, D. R. ; WANG, F.; SCHLEIF, W. A.; LIANG, X.; ZHANG, Z.; TOBERY, T.W.; DAVIES, M.E.; MCDERMOTT, A.B.; O'CONNOR, D.H.; FRIDMAN, A.; BAGCHI, A.; TUSSEY, L. G.; BETT, A. J.; FINNEFROCK, A. C.; FU, T.; TANG, A.; WILSON, K. A.; CHEN, M.; PERRY, H. C.; HEIDECKER, G. J.; FREED, D. C.; CARELLA, A.; PUNT, K. S.; SYKES, K. J.; HUANG, L.; AUSENSI, V. I.; BACHINSKY,M.; SADASIVAN-

NAIR,U.; WATKINS, D. I.; EMINI, E. A.; SHIVER, J. W. Attenuation of Simian Immunodeficiency Virus SIVmac239 Infection by Prophylactic Immunization with DNA and Recombinant Adenoviral Vaccine Vectors Expressing Gag. *Journal of virology*, v.79, p.15547-15555, 2005.

CHEEVERS, W.P.; SNEKVIK, K.R.; TRUJILLO, J.D.; KUMPULA-MCWHIRTER, N.M.; PRETTY ON TOP, K.J.; KNOWLES, D.P. Prime-boost vaccination with plasmid DNA encoding caprine-arthritis encephalitis lentivirus env and viral SU suppresses challenge virus and development of arthritis. *Virology*, v.306, p.116-125, 2003.

CUISINIER, A.M. ; MALLET, V.; MEYER, A.; CALDOR, A.C.; AUBERT, A. DNA vaccination using expression vectors carrying FIV structural genes induces immune response against feline immunodeficiency virus. *Vaccine*, v. 15, p.1085-1094, 1997.

DIEHL, L.J. ; MATHIASON-DUBARD, C.K.; O'NEIL, L.L.; OBERT, L.A.; HOOVER, E.A. Induction of accelerated feline immunodeficiency virus disease by acute-phase virus passage. *Journal of Virology*, v.69, p.6149-6157, 1995.

DITCHAM , W. G.F.; LEWIS, J. R.; DOBSON , R. J.; HARTANINGSIH , N; WILCOX G. E.; DESPORT, M. Vaccination reduces the viral load and the risk of transmission of Jembrana disease virus in Bali cattle. *Virology*, v. 386, p.317–324, 2009.

DUNHAM, S.P. ; FLYNN, J.N.; RIGBY, M.A.; MACDONALD, J.; BRUCE, J.; CANNON, C.; GOLDER, M.C.; HANLON, L.; HARBOUR, D.A.; MACKAY, N.A.; SPIBEY, N.; JARRETT, O.; NEIL, J.C. Protection against feline immunodeficiency virus using replication defective pró-viral DNA vaccines with feline interleukin-12 and 18. *Vaccine*, v.20, p.1483-1496, 2002.

DURRANI, Z.; MCINERNEY, T.L.; MCLAIN, L.; JONES, T.; BELLABY, T.; BRENNAN, F.R.; DIMMOCK, N. J. Intranasal immunization with a plant virus expressing a peptide

from HIV-1 gp41 stimulates better mucosal and systemic HIV-1-specific IgA and IgG than oral immunization. *J Immunol Methods*, v.;220, p.93-103, 1998

ELLIS, R.W. Technologies for the design, discovery, formulation and administration of vaccines. *Vaccine*, v.19, p. 2681–2687, 2001.

EVANS, D.T. ; BRICKER, J.E.; SANFORD, H.B.; LANG, S.; CARVILLE, A.; RICHARDSON, B.A.; PIATAK JR. M.; LIFSON, J.D.; MANSFIELD, K.G.; DESROSIERES, R.C. Immunization of macaques with Single-cycle simian immunodeficiency virus(SIV) stimulates diverse virus-specific immune responses and reduces viral loads after challenge with SIV_{mac} 239. *Journal of virology*, v.79, p.7707-7720. 2005.

FLORES, E. F. *Virologia Veterinária*. Santa Maria: Ufsm, 2007. 888 p.

FLURI, A., NENCI, C., ZAHNO, M. L., VOGT, H. R., CHARAN, S., BUSATO, A., PANCINO, G., PETERHANS, E., OBEXER-RUFF, G. , BERTONI, G. The MHC-haplotype influences primary, but not memory, immune responses to an immunodominant peptide containing T- and B-cell epitopes of the caprine arthritis encephalitis virus Gag protein. *Vaccine*. v.24, p.597–606, 2006.

FLYNN, N. ; HOSIE, M.J.; RIGBY, M.A.; MACKAY, N.; CANNON, C.A.; DUNSFORD, T.; NEIL, J.C.; JARRETT, O. Factors influencing cellular immune responses to feline immunodeficiency virus induced by DNA vaccination. *Vaccine*, v.18, p.1118-1132. January 2000.

GIANNECCHINI, S.; del MAURO, D.; MATTEUCCI, D.; BENDINELLI, M. AIDS vaccination studies using an ex vivo feline immunodeficiency virus model:reevaluation of neutralizing antibody levels elicited by a protective and a nonprotective vaccine after removal of antisubstrate cell antibodies. *Journal of Virology*, v.75, p.4424-4429, 2001.

GONZALEZ, B. ; REINA, R.; GARCIA, I.; ANDRES, S.; GLARIA, I.; ALZUETA, M.; MORA, M.I.; JUGO, B.M.; ARRIETA-AGUIRRE, I.; LASTRA, J.M.P. de la;

RODRIGUES, D.; RODRIGUES, J.R.; ESTEBAN, M.; GRILLÓ, M.J.; BLACKLAWS, B.A.; HARKISS, G.D.; CHEBLOUNE, Y.; LUJAN, L.; ANDRES, D.; AMORENA, B. Mucosal immunization of sheep with a maedi-visna virus (MVV) env DNA vaccine protects against early MVV productive infection. *Vaccine*, v.23, p.4342-4352, 2005.

HAASE, A. T. Pathogenesis lentivirus infection. *Nature*, v. 322, n. 10, p. 130-136 1986.

HAMMOND, S. A. ; RAABE,M.L.; ISSEL, C.J.; MONTELARO, R.C. Evaluation of antibody parameters as potential correlates of protection or enhancement by experimental vaccines to equine infectious anemia virus. *Virology*, v. 262, p.416–430,1999.

HAMMOND, J.; McGARVEY, P.; YUSIBOV, V. Plants biotechnology: new products and applications. *Current Topics in Microbiology and Immunology*, v.240, p.81-94, 1999.

HARTANINGSIH, N.; DHARMA, D.M.N.; SOEHARSONO, S.; WILCOX, G.E. The induction of a protective immunity against Jembrana disease in cattle by vaccination with inactivated tissue-derived virus antigens. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, v. 78, p. 163-176, 2001.

HELDENS, J.G.M.; PATEL, J.R.; CHANTER, N.; TEN THIJ, G.J.; GRAVENDIJCK, M.; SCHIJNS, V.E.J.C.; LANGEN, A.; SCHETTERS, Th.P.M. Veterinary vaccine development from an industrial perspective. *The Veterinary Journal*, v.178, p. 7-20, 2008.

HENRIQUES, A. M.; FEVEREIRO, M.; PRAZERES, D. M. F.; MONTEIRO, G. A. Development of a candidate DNA vaccine against Maedi-Visna virus. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, v.119, p. 222–232, 2007.

HOSIE, M. ; OSBORNE, R.; YAMAMOTO, J.K.; NEIL, J.C.; JARRETT, O. Protection against homologous but not heterologous challenge induced by inactivated feline immunodeficiency virus vaccines. *Journal of Virology*, v.69, p.1253-1257, 1995.

HOSIE, M.J. ; DUNSFORD, T.; KLEIN, D.; WILLETT, B.J.; CANNON, C.; OSBORNE, R.; MACDONALD, J.; SPIBEY, N.; MACKAY, N.; JARRETT, O.; NEIL, J.C. Vaccination with Inactivated Virus but Not Viral DNA Reduces Virus Load following Challenge with a Heterologous and Virulent Isolate of Feline Immunodeficiency Virus. *Journal of Virology*, v. 74, p. 9403–9411, oct. 2000.

ISSEL, C. J. ; HOROHOV, D. W.; LEA, D. F.; ADAMS, JR. W. V.; HAGIUS, S. D.; MCMANUS, J. M. ; ALLISON, A. C.; MONTELARO, R. C. Efficacy of inactivated whole-virus and subunit vaccines in preventing infection and disease caused by equine infectious anemia virus. *Journal of Virology*, v.66, p.3398–3408, 1992.

JOELSON, T.; AKERBLUM, L.; OXELFELT, P.; STRANDBERG, B.; TOMENIUS, K.; MORRIS, T.J. Presentation of a foreign viral peptide on the surface of the tomato bushy stunt virus. *J Gen Virol*, v.78, p.1428–35, 1997

JOHNSON, R.P.; DESROSIERS, R.C. Protective immunity induced by live attenuated simian immunodeficiency virus. *Current Opinion in Immunology*, v.10, p.436-443, 1998.

KARASEV, A.V.; FOULKE, S.; WELLENS, C.; RICH, A.; SHON, K.J.; ZWIERZYNSKI, I.; HONE, D.; KOPROWSKI, H.; REITZ, M. Plant based HIV-1 vaccine candidate: Tat protein produced in spinach. *Vaccine*, v.23, p.1875–80, 2005

KEMP, R.K. ; KNOWLES, D.P.; PERRY, L.L.; McGUIRE, T.C.; CHEEVERS, W.P. Crossreactive neutralizing antibodies induced by immunization with caprine arthritis encephalitis virus surface glycoprotein. *Vaccine*, v.18, p.1282-1287, 2000.

KLENERMAN, P., HILL, A. T cells and viral persistence: lessons from diverse infections. *Nat. Immunol.*, v.6, p.873-879, 2005.

KOPROWSKI , H., YUSIBOV, V. The green revolution: plants as heterologous expression factors. *Vaccine*, v. 19, p. 2.735-2741, 2001.

KRISHNAN, B.R. Current status of DNA vaccines in veterinary medicine. *Advanced drug delivery reviews*, v.43, p.3-11, 2000.

LI, F. ; CRAIGO, J.K.; HOWE, L.; STECKBECK, J.D.; COOK, S.; ISSEL, C.; MONTELARO, R.C. A live attenuated equine infectious anemia virus pró-viral vaccine with a modified *s2* gene provides protection from detectable Infection by intravenous virulent virus challenge of experimentally inoculated horses. *Journal of Virology*, v. 77, p. 7244–7253, 2003.

MARX, P. A.; PEDERSON, N.; LERCHE, N.; OSBURN, K.; LOWENSTINE, L.; LACKNER, A.; MAUL, D.; KWANG, H.; KLUGE, J. D.; ZAISS, C.; SHARPE, V.; SPINNER, A.; ALLISON, A. C.; GARDNER, M. Prevention of simian acquired immune deficiency syndrome with a formalin-inactivated type D retrovirus vaccine. *Journal of Virological*, v. 60, p. 431-435, 1986.

MCINERNEY, T.L.; BRENNAN, F.R.; JONES, T.D.; DIMMOCK, N.J. Analysis of the ability of five adjuvants to enhance immune responses to a chimeric plant virus displaying an HIV-1 peptide. *Vaccine*,v.17, p.1359–1368, 1999.

MCLAIN, L.; DURRANI, Z.; WISNIEWSKI, L.A.; PORTA, C.; LOMONOSSOFF, G.P.; DIMMOCK, N.J. Stimulation of neutralizing antibodies to human immunodeficiency virus type 1 in three strains of mice immunized with a 22 amino acid peptide of gp41 expressed on the surface of a plant virus. *Vaccine*, v.;14, p.799–810, 1996.

NENCI, C., ZAHNO, M.L., VOGT, H.R., OBEXER-RUFF, G., DOHERR, M. G., ZANONI, R., PETERHANS, E., BERTONI, G. Vaccination with a T-cell-priming Gag peptide of

caprine arthritis encephalitis virus enhances virus replication transiently in vivo. *Journal of General Virology*, v.88, p.1589–1593, 2007.

PERTUSSON, G. ; MTHIASDOTTIR, S.; SVANSSON, V.; ANDRESDOTTIR, V.; GEORGSSON, G.; MARTIN, A.H.; AGNARSDOTTIR, G.; GISLADÓTTIR, E.; ÁRNADÓTTIR, S.; HOGNADÓTTIR, S.; JÓHNSON, S.R.; ANDRÉSSON, O.S.; TORSTEINSDÓTTIR, S. Mucosal vaccination with an attenuated maedi-visna virus clone. *Vaccine*, v.23, p.3223-3228, 2005.

PISTELLO, M. ; BONCI, F.; ISOLA, P.; MAZZETTI, P.; MERICO, A.; ZACCARO, L.; MATTEUCCI, D.; BENDINELLI, M. Evaluation of feline immunodeficiency virus ORF-A mutants as candidate attenuated vaccine. *Virology*, v. 332, p.676-690, 2005.

PORTA, C.; SPALL, V.E.; FINDLAY, K.C.; GERGERICH, R. C.; FARRANCE, C. E.; LOMONOSSOFF, GEORGE P. Cowpea mosaic virus-based chimaeras Effects of inserted peptides on the phenotype, host range, and transmissibility of the modified viruses. *Virology*, n.310, p.50–63, 2003.

PORTA, C.; SPALL, S.E.; LOVELAND, J.; JOHNSON, J.E.; BARKER, P.J.; LOMONOSSOFF, G.P. Development of cowpea mosaic virus as high-yielding system to the presentation for foreign peptides. *Virology*, v.202, p.949–955, 1994.

PU, R. ; COLEMAN, J.; OMORI; MISON, M.; HUANG, C.; ARAI, M.; TANABE, T.; YAMAMOTO, J.K. Dual-subtype FIV vaccine protects cats against in vivo swarms of both homologous and heterologous subtype FIV isolates. *AIDS*, v. 15, p.1-13, 2001.

RAABE, M. L. ; ISSEL, C. J. ; COOK, S. J.; COOK, R. F.; WOODSON, B.; MONTELARO, R. C. Immunization with a recombinant envelope protein (rgp90) of EIAV produces a spectrum of vaccine efficacy ranging from lack of clinical disease to severe enhancement. *Virology*, v.245, p.151–162, 1998.

SCHATZMAYR, H.G . Use of plants as vectors for production of biomedical products. *Virus Reviews & Research*, v.07, p.22-27, 2002.

SCHATZMAYR, H. G. Novas perspectivas em vacinas virais. *História, Ciências, Saúde, Manguinhos*, v. 10, p.655-69, 2003.

SHEN, T. ; LIANG, H.; TONG, X.; FAN, X.; HE, X.; MA, Y.; XIANG, W.; SHEN, R.; ZHANG, X.; SHAO, Y. Amino acid mutations of the infectious clone from Chinese EIAV attenuated vaccine resulted in reversion of virulence. *Vaccine*, v.24, p. 738-749, 2006.

SMITH, A. D. In: *Oxford Dictionary of Biochemistry and Molecular Biology*. Second Edition. Ed Richard Cammack, Teresa Atwood, Peter Campbell, Howard Parish, Tony Smith, John Stirling and Frank Vella. New York, Oxford, 2000.

SOUSA, F.J.S.; OLIVEIRA, M.R.; ALMEIDA, N.C.; MARTINS, M.G.; ARAGÃO, M.E.F.; TEIXEIRA, M.F.S.; GUEDES, M.I.F. Vírus do mosaico severo do caupi-CpSMV como molécula carreadora para a p28 do vírus da artrite encefalite caprina-CAEV. *Ciência Rural*, v.35, p.1363-1367, 2005.

SPARGER, E. E.; DUBIE, R.A.; SHACKLETT, B. L.; COLE , K.S.; CHANG , W.L.; LUCIW, P. A. Vaccination of rhesus macaques with a vif-deleted simian immunodeficiency virus proviral DNA vaccine. *Virology*, v. 374, p. 261–272, 2008.

SUGIYAMA, Y.; HAMAMOTO, H.; TAKEMOTO, S.; WATANABE, Y.; OKADA, Y. Systemic production of foreign peptides on the particle surface of tobacco mosaic virus. *FEBS Lett*,v.359, p.247–250, 1995.

WYAND, M.S.; MANSON, K.H.; GARCIA-MOL, M.; MONTEFIORI, D.; DESROSIERS , R.C. Vaccine protection by a triple deletion mutant of simian immunodeficiency virus. *Journal of Virology*. v.70, p.3724-3733, 1996.

YAMAMOTO, J.K. ; OKUDA, T.; ACKLEY, C.D.; LOUIE, H.; PEMBROKE, E.; ZOCHLINSKI, H.; MUNN, R.J.; GARDNER, M.B. Experimental vaccine protection against feline immunodeficiency virus. *AIDS Research Humane Retroviruses*, v.7, p.911-921, 1991.

ZHANG, G.; LEUNG, C.; MURDIN, L.; ROVINSKI, B.; WHITE, K.A. In planta expression of HIV-1 p24 protein using an RNA plant virusbased expression vector. *Mol Biotechnol*, v.14, p.99-107, 2000.

ZHU, Y.X, LIU, C., LIU, X.L., QIAO, W.T., CHEN, Q.M., ZENG, Y., GENG, Y.Q. Construction and characterization of chimeric BHIV (BIV/HIV-1) viruses carrying the bovine immunodeficiency virus gag gene. *World Journal of Gastroenterology*. v.11, p.2609-2615, 2005.

Tabela 1. Fases de Desenvolvimento para produção de vacina ^a

Documentário	Viabilidade	Pré- desenvolvimento	Desenvolvimento	Registro	Comercialização
Perfil do produto	Seleção do antígeno, formulação experimental	do Protótipo, estudo da dose, testes de controle, formulação	estudo efeito, validação do processo de produção, testes em campo (indicações, contra-indicações, eficácia, segurança)	piloto, do dossier, de compilação e Registro do dossier, de compilação e submissão para licença	Venda e marketing farmacovigilância

^a Tabela modificada adaptada de Heldens et al, (2008).

Quadro 1. Testes experimentais de vacinas para FIV

Tipo de vacina	Cepa viral	Desafio	Resposta	Autor
Inativada	FIV petaluma	Vírus homólogo	Imune eficaz contra o vírus	YAMAMOTO et al, 1991.
Inativada	FIV petaluma	FIV _{A6} e FIV _{GL8}	Títulos de anticorpos neutralizantes foram maiores para o FIV petaluma	HOSIE et al, 1995
Atenuada por cultivo	FIV	Vírus homólogo e heterólogo	Altamente imunogênica e altos títulos de anticorpos neutralizantes	BISHOP et al, 1996
DNA	Gene env	FIV	Resposta humoral, mas sem proteção	CUISINIER et al, 1997
DNA	Deleção do gene da Transcriptase Reversa (TR)	FIV	Forte resposta celular, linfócitos T citotóxicos	FLYNN et al, 2000
DNA	FIV _{GL8} , deleção do gene TR ou integrase (IN)	FIV petaluma virulento e FIV pouco virulento	Proteção contra o FIV pouco virulento	DUNHAM et al, 2002
DNA	Deleção gene ORF	Vírus homólogo	Proteção de 3 animais vacinados por até 15me	PISTELLO et al, 2005

Quadro 2. Testes experimentais de vacinas para SIV

Tipo de vacina	Cepa do vírus	Desafio	Resposta	Autor
Inativado/formalina	SIV	SIV	Títulos de anticorpos neutralizantes; os animais não apresentaram doença	MARX et al, 1986
Atenuado	SIV	SIV	Redução da carga viral e retardo na progressão da infecção	WYAND et al, 1996
Recombinante	scSIV	SIVmac239	Baixos títulos virais	EVANS et al, 2005
Quimera	SIV/adenovírus	SIVmac238	Diminuição do título de vírus e retardo na progressão da doença	CASIMIRO et al, 2005

7 CAPÍTULO II

**Cloning and expression of recombinant p28 protein of the *Goat Caprine Arthritis
Encephalitis Virus virus***

Cloning and expression of recombinant p28 protein of the Goat Caprine Arthritis Encephalitis Virus virus

Tania Valeska Medeiros Dantas¹, Rodrigo Maranguape Silva da Cunha², Maria Fátima da Silva Teixeira¹, Maria Gleiciane de Queiroz Martins², Roberta Lomonte Lemos de Brito³, Aryana Lushese Vasconcelos Lima Feitosa¹, Suzana Aparecida Costa de Araújo⁴, Valeska Shelda Pessoa de Melo⁴, Cinthia Maria Monteiro Caminha¹, Igor Ciriaco Barroso¹, Apoliana de Silva Rodrigues³, Daniel de Brito², Raymundo R. Pinheiro³, Alice Andrioli³

TANIA V. M. DANTAS*, corresponding autor

¹Virology Laboratory of the Post-Graduate Program in Veterinary Science at the State University Ceara; Av. Paranjana, 1700 Itapery

Fortaleza,CE/Brasil. CEP 60740-903 Fone e fax (085) 3101 9849

Email: taniavet@yahoo.com.br

²Molecular genetic laboratory-Biotechnology Nucleus of Sobral (NUBIS) - Vale do Acaraú University, Sobral- CE- Brazil

³National Center for research on Goats and Sheep-EMBRAPA-CNPC
Sobral-CE-Brazil

⁴Federal University Paraiba-UFPB

Department of Veterinary Sciences. Center for Agricultural Sciences, Campus II

Areia-PB- Brazil

Resumo

O objetivo desse trabalho foi produzir a proteína p28, do vírus da artrite encefalite caprina, recombinante, expressá-la na bactéria *Escherichia coli* e testar o potencial antigênico da proteína em western blot. A região do gene *gag* que codifica para a proteína p28 do vírus foi subclonado em pET32b. A melhor condição de expressão da proteína recombinante foi testada a 37°C e temperatura ambiente, utilizando como indutor o isopropil β-D-1-thiogalactopiranosidase nas concentrações de 0,5, 1 e 3mM. Para verificar o resultado da expressão as proteínas foram analisadas pela eletroforese em gel de poliacrilamida. As amostras foram submetidas ao *immunoblotting* para avaliação do seu potencial antigênico. A 37°C, a bactéria expressou a proteína em menores intensidades, e na concentração a 0,5 mM de IPTG não houve expressão. A temperatura ambiente, em todas as concentrações a proteína foi expressa sendo que a 1 mM de IPTG a proteína apresentou uma maior intensidade. Ao analisar o potencial antigênico da proteína recombinante no *immunoblotting*, essa reagiu com o soro positivo de caprino apresentando uma forte banda característica de peso molecular 28 kDa. Concluindo que houve a produção da proteína p28 do CAEV recombinante pela bactéria e essa apresenta um potencial antigênico que provavelmente poderá ser utilizado como antígenos em testes diagnósticos.

Palavras chaves: 1 Lentivírus. 2.expressão de proteínas. 3. p28. 4. Clonagem. 5. Immunoblotting.

Abstract

The objective of this study was to produce the recombinant p28 protein from the Caprine Arthritis Encephalitis Virus and express it in the *Escherichia coli* bacteria and test the antigenic potential of the protein in the western blot test. The *gag* region of the gene that codifies for the p28 protein of the virus was sub-cloned in pET32b. The best condition of the recombinant protein expression was tested at 37°C and room temperature using Isopropyl β-D-1-thiogalactopyranoside as inducer at concentrations of 0.5, 1 and 3 mM. The proteins was analyzed by electrophoresis in polyacrylamide gel to verify the result of the expression. The samples were submitted to immunoblotting to assess their antigenic potential. At 37°C, the bacteria expressed the protein at lower intensities and there was no expression at the

concentration of 0.5 mM IPTG. At room temperature, at all the concentrations the protein was expressed and at 1 mM IPTG the protein presented great intensity. When analyzing the antigenic potential of the recombinant protein in immunoblotting, it reacted with positive goat serum presenting a strong band characteristic of 28 kDa molecular weight. It was concluded that there was production of the p28 recombinant protein of the CAEV by the bacteria and this presented an antigenic potential that could be used as antigen in diagnostic tests.

Keywords: 1. Lentivirus 2. Protein expression 3. p28 4. cloning 5. immunoblotting

Caprine arthritis encephalitis virus (CAEV) is an RNA virus belonging to the *Retroviridae* family and *Lentivirinae* subfamily that includes the *Lentivirus* genus, that includes, in addition to CAEV, the Maedi-Visna virus (MVV), the feline immunodeficiency virus (FIV), bovine immunodeficiency virus (BIV), simian immunodeficiency virus (SIV) and human immunodeficiency virus (HIV-1, HIV-2), equine infectious anemia virus (AIEV) (Haase, 1986; Clements and Payne, 1994) and the Jembrana disease virus (Burkala *et al.*, 1998). These virus are not oncogenic and have a morphological identity and are characterized by the antigenic and/or genetic variation during persistent infection (Haase, 1986; Clements and Zink, 1996).

CAEV accounts for a chronic and debilitating disease in goats, causing large economic losses to producers because of decrease in milk production, weight gain and difficulty of movement causing the death of the animals.

The lentiviral genome contains the *gag* genes (proteins of the matrix, capsid and nucleoproteins), *pol* (reverse transcriptase, integrase, dUTPase and proteases) and *env* (envelope glycoproteins) that codify the structural and enzyme proteins that make up the virus particle. The virus also contains the *tat*, *pol* and *ver* accessory genes that codify the expression of the regulating genes (Joag *et al.*, 1996). The CAEV Gag protein is produced by a polyprotein precursor (p51 *gag*) which is cleaved by the protease originating from the p28 (capsid protein) p19 (matrix protein) and p16 (nucleoprotein) (Saltarelli *et al.*, 1990).

Members of the lentivirus have many common characteristics, including a large RNA genome 9kb or more in length and show conserved genomic organization (Hussain *et al.*, 1988; Birkett *et al.*, 1997)

Most of the animals infected with CAEV produce antibodies for the larger p28 polyprotein and these antibodies are used in the diagnostic tests (Crawford *et al.*, 1980; Roberson *et al.*, 1982). CAEV has approximately 20% similarity with the Maedi-Visna virus (Roberson *et al.*, 1982). In other experiments, Weiss *et al.*, (1976) showed that only 25% of the ovine viruses are related by genomic homology. All three of these viruses, however, are antigenically related by shared determinants on the major structural protein, p28. (Roberson *et al.*, 1982) Suggested that although regions of homology may extend along the entire genome, most of the similarity among these viruses may be explained by a highly conserved nucleotide sequence within the gag region which codes for group-specific determinants on p28.

In this regard, group-specific epitopes associated with the major structural protein of the ovine viruses (Stowring *et al.*, 1979) have been exhibited by the p28 of all CAEV isolates so far examined. Antigenic cross-reactivity between the 135K surface glycoproteins of goat and ovine viruses has also been observed (Gogolewski *et al.*, 1985) although neutralizing antisera appear to be specific for individual virus isolates (Narayan *et al.*, 1984)

Because p28, the most abundant protein in the virion (Cheevers *et al.*, 1981), is recognized by most virus-infected goats (Adams *et al.*, 1980; Roberson *et al.*, 1982), it is important to quantify its role in the immune response. Study of the p28 protein is most important for antigen production for diagnostic tests. The objective of the present study was to produce and test the best treatment to express a CAEV p28 recombinant protein for future use as antigen in tests such as ELISA and immunoblotting.

For the PCR reactions, the primers were designed based on the published sequence of CAEV-Co(position 971-1606) (Saltarelli *et al.*, 1990), with the help of the programs Blastn (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast>), Oligo® and OligoTech (Version 1.0) (<http://www.oligosetec.com/OLIGOTech.HTM>) and with the objective of amplifying a fragment of 636pb of the *gag* region of the pro-viral genome, corresponding to the protein of the viral capsid protein, p28. The following primers were chosen: 5'AGC TGG AAA GCA GTA GAT TC 3' and 5'GAA CCC TTC TGA TCC CAC ATC 3'.

PCR was performed to verify the amplification efficiency and specificity, using the following temperatures and cycles: initial denaturation at 94°C for 3 minutes followed by 42 cycles at 94°C for 1 minute, 55°C for 1 minutes, 72°C for 2 minutes and a final extension at 72°C for 8 minutes. The CAEV derived from the cell culture supernatant was used as DNA

template. The amplified product was visualized in 1% agarose gel, stained with ethidium bromide using 100bp molecular weight standards.

The fragment of the *gag* gene (position 971-1606) referent to the CAEV p28 protein was digested by the *Sma*I enzyme and cloned in the pUC19 vector. The pET32b vector was used for sub-cloning, that was used to express the p28 preteen after cloning the gene in the pUC19 vector. This expression system was chosen because of some important characteristics. The pET system is the most used currently to express recombinant proteins in *Escherichia coli*.

For the sub-cloning the recombinant pUC19 plasmid was digested with the EcoRI/XhoI enzymes. The resulting plasmidd was called pET32b/p28. Both the cloning and the sub- cloning were carried out by the Epochbiolabs (<http://www.epochbiolabs.com/>). The constructions were sequenced, aligned and purified, including the plasmid map and the electropherogram of the sequence.

The pET32b/p28 plasmid, presenting the correct reading phase, was selected to transform competent *Escherichia coli* cells in the BL21 (DE3) lines. *E. coli* BL21 is the most used bacteria to express heterologous proteins because it is deficient in the *lon* and *ompT* proteases, and thus prevents the proteolytic degradation of the recombinant protein by these *E. coli* proteases (Nakaghi, 2008). The transformation was carried out by electroporation following instructions from Epochbioloabs. The recombinant plasmid of the transforming colonies were extracted by the alkaline lysis method according to Sambrook *et al.*, (2001). The presence of the p28 fragment was confirmed by PCR of the plasmedium DNA using the primers of the p28 gene and vector.

A white colony carrying the recombinant expression vector was inoculated in 5 mL Luria Bertani culture medium (LB) with the addition of ampiciline and incubated at 37°C with overnight agitation. One 1.5 mL aliquot was removed from the bacterial culture and 8.5 mL LB was added and left to grow, under the same conditions, until it reached an optical density of 0.4 to 0.6 at 600nm. An aliquot of this inoculant was removed (time zero induction) and IPTG was added to the rest of the culture at concentrations of 0.5, 1 and 3 mM so the protein expression was induced. This induction took place at 37°C and room temperature, thus making up six expression treatments. Aliquots were removed from the culture at different induction times ranging from zero to 5 hours to verify which was the best expression condition. The collected samples were centrifuged at 3250g for 10 minutes. The

supernatant was discarded and the pellet was stored at -20°C . The proteins were analyzed in 12% polyacrylamide gel (DSD-PAGE), according to Laemmi (1970). The electrophoretic profile was determined in the antigen samples diluted in sample buffer (10% SDS; 20% glycerol 0.2% bromophenol blue; 0.5M Tris-HCl, 6.8 pH) and the mixture was heated to 100°C for 3 minutes. The proteins from the gel were stained with Comassie blue, according to Harlon and Lane (1988).

Expression of the recombinant p28/CAEV protein was confirmed by an antigen-antibody reaction, using immunoblotting according to Aragão *et al.*, (2008) with a small modifications. For this, the protein fractions separated in the polyacrylamide gel were transferred to a nitrocellulose membrane (MN) by the trans-blot method in a transference buffer for 60 minutes at 100 volts and 350 mA. After transference to MN, the proteins were blocked with blocking solution (0.3% PBS Tween) for 60 minutes and washed three times for five minutes with washing solution (0.5% PBS Tween). The positive serum of a proven positive animal was diluted (1:50) added to the MN and incubated for 30 minutes. The MN were then washed again and placed in goat anti-IgG rabbit conjugate marked with diluted peroxidase (1:18000) for 45 minutes. After washing three times for five minutes with 0.5% PBS Tween the MN were placed in DAB/4-Cloronaphthol solution (solution of A- 12 mg Diaminobenzidine7 in 12 mL PBS, solution B- 5 mg of 4-Cloronaphthol8 with the addition of 2 mL methanol plus 10 mL de PBS), 10 mL H_2O_2 at 30% was added for approximately 5 minutes without light. The reaction was finalized by washing the MN in distilled water. All the steps, except for the developing, were carried out under agitation.

Immunoblotting was used to confirm whether the protein produced was CAEV p28 and to verify the antigenic potential of the recombinant protein. The LWM electrophoresis molecular weight marker was used, the antigen produced by EMBRAPA Goats and Sheep from the CAEV virus cork strain (CAEV_{cork}), used in the company's immunoblot test, here called native p28, as positive control. Goat serum from a proven positive animal was used as primary antibody.

The amplification of the CAEV *gag* gene (p28) by PCR was proven by electrophoresis in 1% agarose gel, and the presence of the fragment was observed with the expected size (approximately 636 based pairs -pb).

The recombinant plasmidiums, pUC19/636 and pET32b/p28, presented sizes of 3238 bps and 6511 bps, respectively. The plasmidiums were sequenced to verify the correct

insertion and whether this was in the reading frame to produce the protein correctly. Birkett *et al.*, (1997) cloned the p26 gene of the Equine Infectious Anemia Virus (AIEV) on plasmid pKK322-3 by successfully inserting the 712 pb gene.

The recombinant vector (pET32b/p28) was inserted in bacteria of the BL21 line in which were induced the six expression treatments with IPTG. After this bacterial transformation, PCR was carried out on the colony and the DNA extracted by alkaline lysis and a band of great intensity of approximately 636 bp was observed. Analysis of the expression by electrophoresis in acrylamide gel showed a band of 28kDa proteins that was the size of the CAEV p28 protein.

Electrophoresis showed that the BL21 expressed the protein at several temperatures, times and IPTG concentrations. However, there was no production of the recombinant p28 at 0.5 mM concentration at 37°C at any of the times. It was also observed that there was protein expression after two hours of induction for all the other conditions. There was recombinant p28 production at room temperature at all the IPTG concentrations, but at 1 mM IPTG concentration the intensity of the band was greater than the others. The bands at 37°C were much less intense (Figure 1).

Russo-Carbolante *et al.*, (2007) cloned transmembrane glycoprotein (gp21) of the human T cell lymphotropic virus (HTLV) in pDEST15 expression vector and the expression of the recombinant 13 was observed in an induction time 30 minutes shorter than that observed in the present experiment.

Barbieri *et al.*, (2004) also expressed the capsidial protein of the watermelon mosaic virus (WMV) in *Escherichia coli* BL21 but the expression occurred with the addition of IPTG at a final concentration of 10 mM and four hours induction. The IPTG concentration was much greater than that found in the conditions used in the present study (0.5 to 3 mM).

The recombinant protein of the Jembrana disease virus (JDV), a lentivirus, was expressed under conditions of 0.2 mM IPTG at 37°C with vigorous shaking (Burkala *et al.*, 1998), a condition that was not tested in the present experiment, but at the concentration of 0.5 mM and at the same temperature there was no protein expression.

Immunoblotting showed the protein in samples induced by IPTG but there was no revelation of the band referent to the protein in non-induced samples (Figure 2). This result showed that the recombinant p28 presented antigenic potential, because its epitopes were

recognized by the CAEV anti-bodies from a positive animal. It also showed a large background indicating a nonspecific recognition probably because a primary polyclonal antibody was used and as the animals had direct contact with the *Escherichia coli* bacteria and the samples used in the tests contained these bacterial proteins, some proteins from the bacteria were shown.

Burkala *et al.*, (1998) observed that the JDV recombinant proteins reacted with the CM of infected animals both in immunoblotting and in Elisa by competition. The authors reported that the use of recombinant proteins for immunoassays is desirable because they can be produced in large quantities, are easily purified, are obtained from a reproducible source and are highly specific.

Marana *et al.*, (2009) reported that bovine serum, naturally and experimentally infected with *Anaplasma marginale* and rabbit serum immunized with the recombinant *msp5* gene recognized the epitopes of the recombinant gene by the immunoblotting technique.

Royuela and Sanchez-fauquier (2010) studied the expression of VP26 proteins of the human Astrovirus (HAstV) in *E. coli* M15 with IPTG at 1 mM , 37°C and for 2 hours found two proteins of approximately 26 KDa and 22KDa and immunoblotting analysis showed the p26 protein of the virus.

The recombinant protein produced in our laboratory was recognized by the serum-positive animal antibodies for CAEV. It presented the expected size for the protein, 28KDa.

Recombinant protein production is a growing area. Developing these proteins is the start of a process that would lead to the production of Brazilian diagnostic kits with technology competitive with other countries, presenting greater specificity than the non-recombinant antigens that are produced from the complete virus. We have reported production of the p28/CAEV recombinant protein that may eventually be used in diagnostic tests of the Elisa and immunoblotting type.

Acknowledgments

The authors would like to thank the Molecular Biology Laboratory of the Sobral Biotechnology Nucleus for technical support. They also gratefully acknowledge the financial support from the Fund for Scientific and Technological Development- FUNDECI-BNB and Coordination of Improvement of Higher Education- CAPES. The authors would especially like to thank the National Center for research on Goats and Sheep-EMBRAPA-CNPC. They

also thank the Laboratory of Biologically Active Molecules at the Federal University of Ceará.

References

- Adams DS, Crawford TB, Banks KL, McGuire TC and Perryman LE (1980) Immune responses in goats persistently infected with caprine arthritis-encephalitis virus. *Infect Immun* 28:421-427.
- Aragão MAC, Pinheiro RR, Andrioli A, Alves FSF, Oliveira AAF and Teixeira MFS (2008) Maedi-visna vírus: produção de antígeno, análise protéica e antigênica *Arq Inst Biol* 75:423-429.
- Barbieri MR, Carvalho MG, Zambolim, EM and Zerbini FM (2004) Expressão em *Escherichia coli* da proteína capsidial do watermelon mosaic vírus e produção de anti-soro. *Fitopatologia Brasileira*, 29: 215-219.
- Birkett AJ, Ye'lamos B, Crespo IR, Gavilanes F and Peterson DL (1997) Cloning, expression, purification, and characterization of the major core protein_p26/ from equine infectious anemia vírus. *Biochimica et Biophysica Acta* 1339:62-72.
- Burkala E J, Narayan O, Hartaningsih N, Kertayadnya G, Berryman DI and Wilcox GE (1998) Recombinant Jembrana disease virus proteins as antigens for the detection of antibody to bovine lentiviruses. *Journal of Virological Methods* 74: 39-46.
- Cheevers WP, Roberson S, Klevjer-Anderson P and Crawford TB (1981) Characterization of caprine arthritis-encephalitis virus: a retrovirus of goats. *Arch Virol* 67:111-117.
- Clements JE and Payne SL (1994) Molecular basis of the pathology of lentiviruses. *Virus Research* 32: 97-109.
- Clements JE and Zink C (1996) Molecular Biology and Pathogenesis of Animal Lentivirus Infections. *Clinical Microbiology Reviews* 9:100-117.
- Crawford TB, Adams DS, Cheevers WP and CORK LC (1980) Chronic Arthritis in Goats Caused by a Retrovirus. *Science* 207: 997-999.
- Gogolewski RP, Adams DS, McGuire TC, Banks KL and Cheevers WP (1985) Antigenic cross-reactivity between caprine arthritis-encephalitis, visna and progressive pneumonia viruses involves all virion-associated proteins and glycoproteins. *Journal of General Virology* 66: 1233-1240.
- Haase AT (1986) Pathogenesis lentivirus infection. *Nature* 322: 130-136

- Harlon E and LANE D (1988) Antibodies: a laboratory manual. New York: Cold Spring Harbor Laboratory. 865p.
- Hussain KA, Issel CJ, Rwambo PM, Arnizaut AB, Ball JM, Schmorrr KL and Montelaro RC (1988) Identification of *gag* Precursor of Equine Infectious Anaemia Virus with Monoclonal Antibodies to the Major Viral Core Protein, p26. J Gen Virol 69:1719–1724.
- Joag SV, Stephens EB and Narayan O (1996) Lentiviroses. In: Fields MD and Knipe DM Fields Virology. 3rd edition. New Iork: Raven Press, pp.1977-1996.
- Laemmli UK (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. Nature 227:680-685.
- Marana ERM, Kano F S, Vicentini JC, Spurio RS, Ribeiro M, Coelho AM, Vidotto MC and Vidotto O (2009) Clonagem, expressão, caracterização molecular da proteína de superfície MSP5 da amostra PR1 de Anaplasma marginale e sua aplicação em um teste de ELISA por competição. Revista Brasileira de Parasitologia veterinária 18:.5-12.
- Nakaghi ACH (2008) Clonagem do gene *p28* e análise da expressão da proteína recombinante a partir da amostra de *Ehrlichia canis* e sua aplicação no diagnóstico da erliquiose canina. 104 p.Tese (doutorado em clínica médica veterinária). Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias- Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, Jaboticabal, 2008.
- Narayan O, Sheffer D, Griffin DE, Clements J and Hess J (1984) Lack of neutralizing antibodies to caprine arthritis-encephalitis lentivirus in persistently infected goats can be overcome by immunization with inactivated *Mycobacterium tuberculosis*. Journal of Virology 49:349-355.
- Roberson SM, Mcguire TC, Klevjer-Anderson P, Gorham JR and Citeevers WP (1982) Caprine arthritis encephalitis virus is distinct from visna and progressive pneumonia viruses as measured by genome sequence homology. Journal of Virology 44: 755-758.
- Royuela E and Sanchez-fauquier A (2010) Molecular cloning, expression and first antigenic characterization of human astrovirus VP26 structural protein and a C-terminal deleted form. Comparative Immunology, microbiology and Infectious diseases.33:1-14.
- Russo-Carbolante SEM, Penteado FCL, Medeiros L, Kashima S, Takayanagui OM and Covas DT (2007) Clonagem e expressão da glicoproteína transmembrana do vírus linfotrópico de células T humanas em sistema procarioto. Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical 40: 277-281.

- Saltarelli M, Querat G, Konings DA, Vigne R and Clements JE (1990) Nucleotide sequence and transcriptional analysis of molecular clones of CAEV which generate infectious virus. *Virology* 179:347-64
- Sambrook J and Russel DW (2001) *Molecular Cloning: A laboraroty manual*. 3rd edition. Cold Spring Harbor Laboratory Press: USA. 1448p.
- Stowring L, Haase AT and Charman HP (1979) Serologic definition of the lentivirus group of retroviruses. *The Journal of Virology* 29:523 528.
- Weiss MJ, Sweet RW, Gulati SC and Harter DH (1976) Nucleic acid sequence relationships among "slow" viruses of sheep. *Virology* 71:395-401.

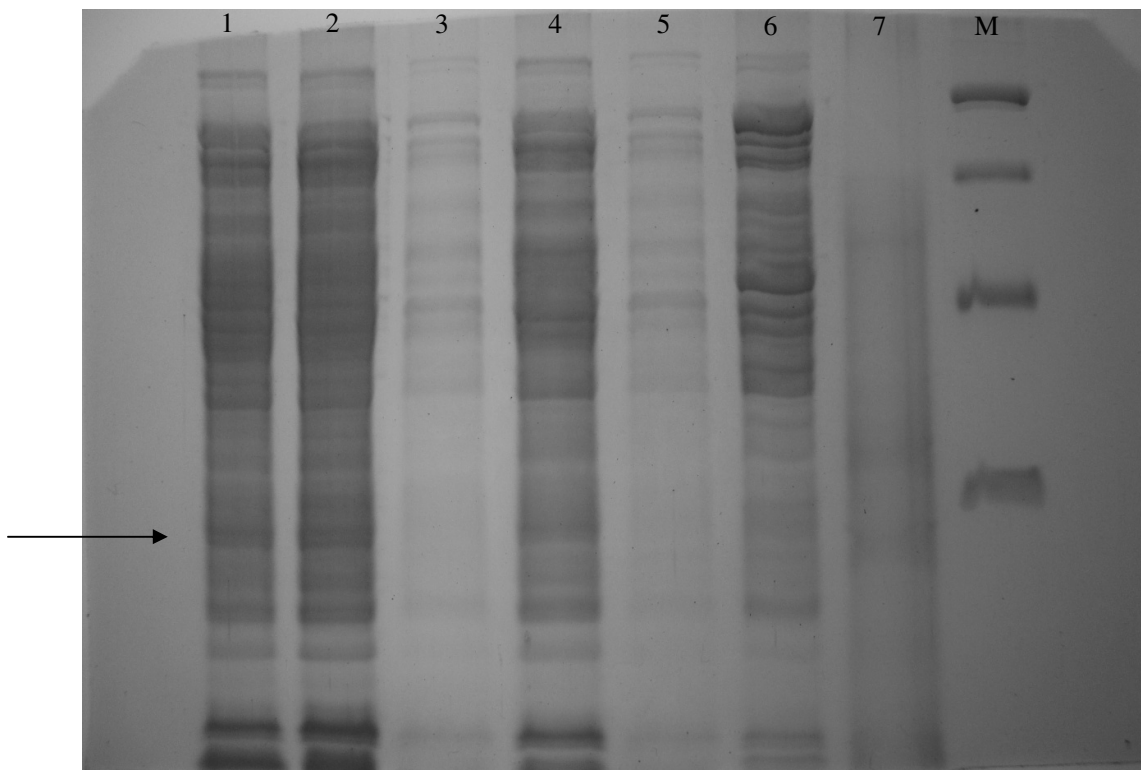


Figure 1. Polyacrylamide gel electrophoresis (12,5%) showing the expression induction p28 CAEV by room temperature and 37°C. Lane 1, 2 room temperature and 3mM, 1 mM IPTG, respectively. Lane 3 and 7- non-induction control. Lane 4, 5 and 6- 37° and 3 mM, 0,5 mM and 1 mM IPTG, respectively. M- Molecular mass standard (LWN electrophoresis),

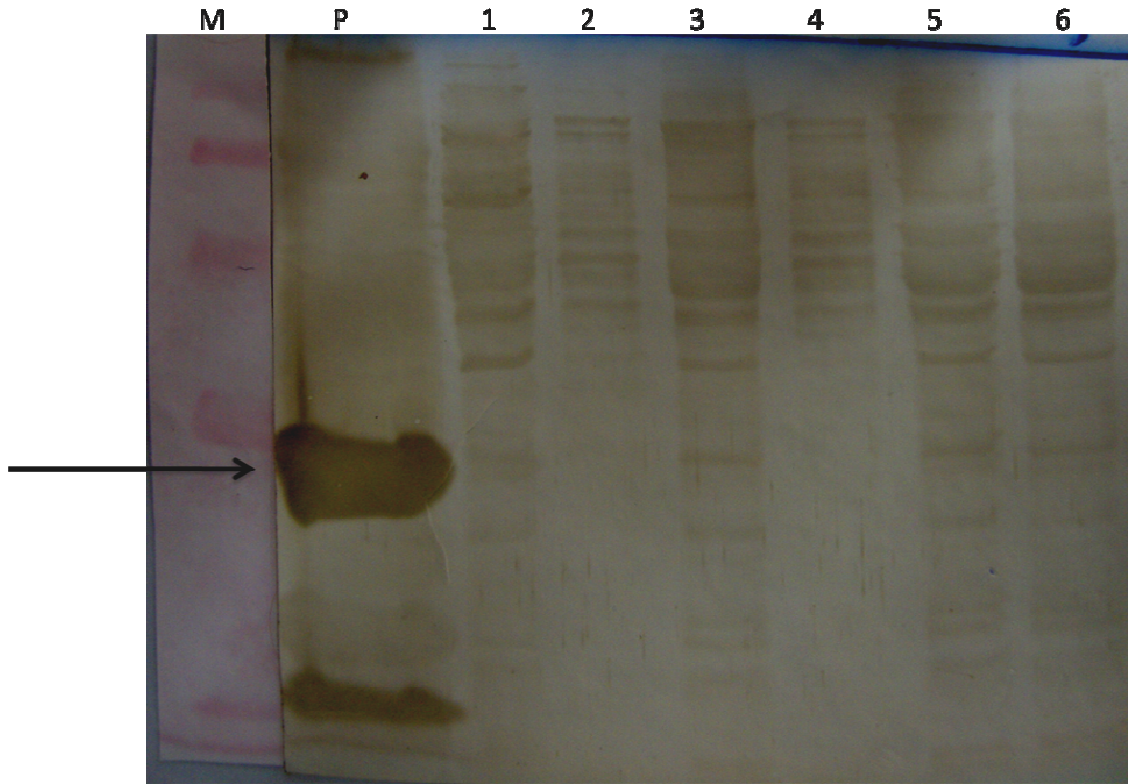


Figure 2. p28 protein expression by IPTG at room temperature. Immunoblotting analysis. M molecular mass standard (LWM electrophoresis), P native p28, 1 0,5mM 5 hours, 2 non induced control, 3 1mM 2 hours, 4 non induced control, 5 3mM 2hours, 6 1mM 2 hours. Band 28 KDa is indicated by arrows.

8 CONCLUSÕES GERAIS

Não houve ainda sucesso numa vacina contra o vírus da artrite encefalite caprina;

A clonagem do gene *gag* que codifica a proteína p28 do CAEV foi adequadamente realizada, produzindo clones específicos nos vetores pUC19 e pET32b.

A *E.coli* BL21 expressou a proteína recombinante em diversas condições, porém, na condição de 0,5 mM a 37°C, não houve expressão, e na condição de 1mM de IPTG, a temperatura ambiente, a banda apresentava maior intensidade.

A proteína recombinante p28 demonstrou um potencial antigênico revelado no teste de *western blot*.

9 PERSPECTIVAS

Os resultados obtidos com a expressão da proteína recombinante são promissores. Por se tratar da maior proteína do capsídeo do vírus, a mais conservada e também a mais utilizada na fabricação de antígenos, essa poderá ser testada como antígeno em outros testes sorológico como *western blot* e *ELISA*. Apesar de se atribuir a essa proteína uma expressiva competência antigênica, faz-se necessário o desenvolvimento de estudos imunogênicos no sentido de avaliar seu potencial imunoprotetor. Para tanto, são necessários estudos mais aprofundados com relação a antigenicidade e imunogenicidade e à estrutura tridimensional da proteína p28 recombinante

11 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADA, G. Advances in Immunology: Vaccines and Vaccination. *The New England Journal of medicine*, v.345, n. 14, p. 1042-1053, 2001.

ADAMS, D. S.; CRAWFORD, T. B.; BANKS, K. L.; MCGUIRE, T. C.; PERRYMAN, L. E. Immune responses in goats persistently infected with caprine arthritis-encephalitis virus. *Infection and Immunity*, v.28, n.2, p.421-427, 1980.

ADU-BOBIE, J.; CAPECCHI, B.; SERRUTO, D.; RAPPUOLI, R.; PIZZA, M. Two years in reverse vaccinology. *Vaccine*, v. 21, n., 7-8, p. 605-610, 2003.

ALKAN, F.; TAN, M. T. A. A comparative study on the diagnosis of Maedi-Visna infection in serum and colostrum samples using agar gel immunodiffusion (AGID) technique. *Deutsche Tierärztliche Wochenschrift*, v. 105, n.7, p.276-278, 1998.

ALMEIDA, A. M. R.; LIMA, J. A. A. *Princípios e técnicas de diagnose em fitovirologia*. Brasília/Fortaleza: Publicação SBF, 2001.186p.

ALMEIDA, M. G. A. R.; ANUNCIACÃO, A. V. M.; FIGUEREDO, A.; MARTINEZ, T. C. N.; LABORDA, S. S. Dados sorológicos sobre a presença e distribuição da Artrite - Encefalite Caprina (CAE) no estado da Bahia, Brasil. *Revista Brasileira de Saúde e Produção Animal*, v. 1, n. 3, p. 78 – 83, 2001.

ALVES, F. S. F.; PINHEIRO, R. R. A importância do leite de cabra na nutrição humana. *Revista Agropecuária Catarinense*, v. 16, n. 1, 2003.

ANDRIOLI, A.; SOUZA, K. C.; PINHEIRO, R. R.; SOUSA, F. M. L. *Protocolo para extração do DNA – proviral e PCR do lentivírus caprino em sangue*. Sobral, CE: Embrapa Caprinos, 2006c. 5 p. (Comunicado Técnico, 72).

ARAGÃO, M. A. C.; PINHEIRO, R. R.; ANDRIOLI, A. ALVES, F. S. F.; OLIVEIRA, A. A. F; TEIXEIRA, M. F. S. Maedi-visna vírus: produção de antígeno, análise protéica e antigênica *Arquivos do Instituto Biológico*, v.75, n.4, p.423-429, 2008.

ARAÚJO, S. A. C. *Avaliação in vitro da atividade antiviral de produtos sintéticos e naturais contra lentivírus de pequenos ruminantes*. 2008. 120p. Tese (Doutorado em Ciências Veterinárias) – Universidade Estadual do Ceará, Fortaleza, 2008.

ASSIS, A. P. M. V.; GOUVEIA, A. M. G. Evidência sorológica de Lentivírus (Maedi Visna/Atrite-encefalite caprina) em rebanhos nos Estados de MG, RJ, BA e CE. In:

CONGRESSO BRASILEIRO DE MEDICINA VETERINÁRIA, XXIII, 1994, Recife.
Anais... Recife: SPMV, 1994. p. 104.

BANDEIRA, D. A. B.; DE CASTRO, R. S.; AZEVEDO, E. O.; MELO, L. S. S.;
MELO, C. B. Seroprevalence of Caprine Arthritis–Encephalitis Virus in goats in the
Cariri region, Paraíba state, Brazil. *The Veterinary Journal*, v. 180, n. 3, p. 399-401, 2009.

BANEYX, F. Recombinant protein expression in *Escherichia coli*. *Current Opinion in
Biotechnology*, v. 10, n. 5, p. 411–421, 1999.

BARBIERI, M. R. ; CARVALHO, M. G.; ZAMBOLIM, E. M.; ZERBINI, F. M. Expressão
em *Escherichia coli* da proteína capsidial do watermelon mosaic vírus e produção de anti-
soro. *Fitopatologia Brasileira*, v.29, n.2, p. 215-219, 2004.

BAROUCH, D. H.; CRAIU, A.; SANTRA, S.; EGAN, M. A.; SCHMITZ, J. E.; KURODA,
M. J.; FU, T. M.; NAM, J. H.; WYATT, L. S.; LIFTON, M. A.; KRIVULKA, G. R.;
NICKERSON, C. E.; LORD, C. I.; MOSS, B.; LEWIS, M. G.; HIRSCH, V. M.; SHIVER, J.
W.; LETVIN, N. L. Elicitation of high-frequency cytotoxic T-lymphocyte responses against
both dominant and subdominant simian-human immunodeficiency virus epitopes by DNA
vaccination of rhesus monkeys. *Journal of Virology*, v.75, n.5, p.2462–2467, 2001.

BATISTA, M. C. S.; DE CASTRO, R. S.; CARVALHO, F. A. A.; CRUZ, M. S. P.;
SILVA, S. M. M. S.; REGO, E. W.; LOPES, J. B. Anticorpos anti-Lentivírus de
pequenos ruminantes em caprinos integrantes de nove municípios Piauienses. *Ciência
Veterinária nos Trópicos*, v.7, n 2 e 3, p. 75 – 81, 2004.

BERTONI, G.; ZAHNO, M. L.; ZANONI, R.; VOGT, H. R.; PETEKHANS, E.; RUFF, G.;
CHEEVERS, W. P.; SONIGO, G. Antibody reactivity to the immunodominant epitopes of the
caprine arthritis – encephalites virus gp 38 transmembrane protein associates with development
of arthritis. *Journal of Virology*, v. 68, n.11, p. 7139-7147, 1994.

BIRKETT, A. J., YE LAMOS, B., CRESPO, I. R., GAVILANES, F., PETERSON, D. L.
Cloning, expression, purification, and characterization of the major core protein_p26/ from
equine infectious anemia vírus. *Biochimica et Biophysica Acta*, v. 1339, n.1, p.62–72, 1997.

BISHOP, S. A. ; STOKES, C. R.; GRUFFYDD-JONES, T. J.; WHITING, C. V.;
HARBOUR, D. A. Vaginal and rectal infection of cats with feline immunodeficiency virus.
Veterinary Microbiology, v.51, n. 3-4, p.217-227, 1996.

BOGERS, W. M.; CHENG-MAYER, C.; MONTELARO, R. C. Development in preclinical
AIDS vaccine efficacy models. *AIDS*, v.14, n. 3, p.S141-S151, 2000.

BORASCHI, D.; TAGLIABUE, A.; MARTIN, M. U.; RAPPUOLI, R. INNAMORA, an European workshop focused on the mechanisms of innate immunity in pathogen-host interaction and their exploitation in novel mucosal immunization strategies. *Vaccine*, v. 21, S2/1–S2/11, 2003.

BORDERÍAS, M.N.P. *Seguimiento de la infección por el Virus de Maedi Visna en una explotación de ganado ovino*. 2004. Tese (Doutorado em Licenciatura) - Facultad de Veterinaria, Universidad Complutense, 2004.

BOUZAR, A. B.; GUIGUEN, F.; MORIN, T.; VILLET, S.; FORNAZERO, C.; GARNIER, C.; GALLAY, K.; GOUNEL, F.; FAVIER, C.; DURAND, J.; BALLEYDIER, S.; MORNEX, J. F.; NARAYAN, O.; CHEBLOUNE, Y. Specific G2 arrest of caprine cells infected with a caprine arthritis encephalitis virus expressing vpr and vpx genes from simian immunodeficiency virus. *Virology*, v.309, n. 1, p.41–52, 2003.

BRITO, R. L. L. *Implicações da artrite-encefalite caprina na Reprodução, produção e na qualidade do leite de Cabras*. 2009.107p. Dissertação (Mestrado em zootecnia). Universidade Estadual do Vale do Acaraú, Sobral-CE, 2009.

BRODIE, S.; PEARSON, L.; ZINK, M. Ovine lentivirus expression and disease. Virus replication, but no entry, is restricted to macrophages of specific tissues. *American Journal of Pathology*, v.146, n.1, p. 250-263, 1995.

BU, Z. ; YE, L. ; COMPANS, R. W.; YANG, C. Enhanced cellular immune response against SIV Gag induced by immunization with DNA vaccines expressing assembly and release-defective SIV Gag proteins. *Virology*, v.309, n. 2, p.272-281, 2003.

BURKALA, E. J.; NARAYANI, I.; HARTANINGSIH, N.; KERTAYADNYA, G.; BERRYMAN, D. I.; WILCOX, G. E. Recombinant Membrane disease virus proteins as antigens for the detection of antibody to bovine lentiviruses. *Journal of Virological Methods*, v. 74, n. 1, p. 39-46, 1998.

BURNS, G. W. ; BOTTINO, P. J. *Genética*. 6ª Edição. Rio de Janeiro: Editora Guanabara Koogan, p.319-320, 1991.

CALLANAN, J. J. ; THOMPSON, H.; TOTH, S. R.; O'NEIL, B.; LAWRENCE, C. E.; WILLETT, B.; JARRETT, O. Clinical and pathological findings in feline immunodeficiency virus experimental infection. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, v.35, n.1-2, p.3-13, 1992.

CAMINHA, C. M. M.; TEIXEIRA, M. F. S.; FEITOSA, A. L. V. L.; MELO, V. S. P.; MARTINS, G. R.; DANTAS, T. V. M. ; PINHEIRO, R. R. Levantamento Sorológico Do Vírus Da Artrite Encefalite Caprina E Do Vírus Maedi Visna Na Região Norte E Nordeste Do

Ceará. In: XIII SEMANA UNIVERSITÁRIA DA UECE, 2008, Fortaleza; V FEIRA DE CIÊNCIA, CULTURA, TECNOLOGIA E INOVAÇÃO DO ESTADO DO CEARÁ, 2008, Fortaleza. *Anais...Fortaleza*, 2008.

CAREY, N.; ROY, D. J.; DALZIEL, R. G. Use of recombinant gp 135 to study pitopespecific antibody responses to Maedi-Visna virus. *Journal of Virological Methods*, v. 43, n.2, p. 221-323, 1993.

CASIMIRO, D. R. ; WANG, F.; SCHLEIF, W. A.; LIANG, X.; ZHANG, Z.; TOBERY, T. W.; DAVIES, M. E.; MCDERMOTT, A. B.; O'CONNOR, D. H.; FRIDMAN, A.; BAGCHI, A.; TUSSEY, L. G.; BETT, A. J.; FINNEFROCK, A. C.; FU, T.; TANG, A.; WILSON, K. A.; CHEN, M.; PERRY, H. C.; HEIDECKER, G. J.; FREED, D. C.; CARELLA, A.; PUNT, K. S.; SYKES, K. J.; HUANG, L.; AUSENSI, V. I.; BACHINSKY, M.; SADASIVAN-NAIR, U.; WATKINS, D. I.; EMINI, E. A.; SHIVER, J. W. Attenuation of Simian Immunodeficiency Virus SIVmac239 Infection by Prophylactic Immunization with DNA and Recombinant Adenoviral Vaccine Vectors Expressing Gag. *Journal of virology*, v.79, n. 24, p.15547-15555, 2005.

CASTRO, R.S. *Lentivírus de pequenos ruminantes: ensaios imunoenzimáticos, perfil sorológico e inferências filogenéticas*. 1998. Tese (Doutorado) - Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 1998.

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. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*, v.46, n. 5, p. 571-572, 1994.

CASTRO, R. S.; AZEVEDO, E. O.; TABOSA, I.; NASCIMENTO, S. A.; OLIVEIRA, M. M. M. Anticorpos para o Vírus da Artrite-Encefalite Caprina em animais sem raça definida (SRD) de abatedouros dos estados de Pernambuco e Paraíba. *Ciência Veterinária nos Trópicos*, v. 5, n. 2 – 3, p. 121 – 123, 2002.

CHEEVERS, W. P., ROBERSON, S., KLEVJER-ANDERSON, P., CRAWFORD, T. B. Characterization of caprine arthritis- encephalitis virus: a retrovirus of goats. *Archives of Virology*, v. 67, n.1, p.111-117,1981.

CHEVEERS, W. P.; STEM, T. A.; KNOWLES, D. P.; MCGUIRE, T. C. Precursor polypeptides of Caprine Arthritis-Encephalitis Lentivirus structural proteins. *Journal of General Virology*, v. 69, n.3, p. 675-681, 1988.

CHEEVERS, W. P.; SNEKVIK, K. R.; TRUJILLO, J. D.; KUMPULA-MCWHIRTER, N. M.; PRETTY ON TOP, K. J.; KNOWLES, D. P. Prime-boost vaccination with plasmid DNA encoding caprine-arthritis encephalitis lentivirus env and viral SU suppresses challenge vírus and development of arthritis. *Virology*, v.306, n. 1, p.116-125, 2003.

CLEMENTS, J. E.; PAYNE, S. L. Molecular basis of the pathology of lentiviruses. *Virus Research*, v. 32, n. 2, p. 97-109, 1994.

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 their of replication. In: _____. *Fields Virology*. 3eds. Philadelphia: Lippincott-Raven, 1996. cap.5, p. 1767-1847.

CORK, L. C.; HADLOW, W. J.; CRAWFORD, T. B.; GORHAM, J. R.; PIPER, R. C. Infectious leukoencephalomyelitis of young goats. *Journal Infectio Disease*, v. 129, n.2, p.134-141, 1974.

COSTA, U. M. *Obtenção e caracterização de células de membrana sinovial ovina transformadas pelo antígeno T do vírus símio 40: Influência na variabilidade dos genes gag e env e do LTR dos vírus da Artrite Encefalite (CAEV) e Maedi-Visna (MVV) dos ovinos*. 2004. 146p. Tese (Doutorado em Ciências Veterinárias)- Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre,2004.

CRAWFORD, T. B.; ADAMS, D. S.; CHEEVERS, W. P.; CORK, L. C. Chronic Arthritis in Goats Caused by a Retrovirus. *Science*, v. 207, n.4434, p. 997-999, 1980.

CREIGHTON, T. E. *Enciclopedia of Molecular Biology*. v. 1-4. New York: John Wiley;Sons Inc, p. 2878, 1999.

CREGG, J. M.; BARRINGER, K. J.; HESSLER, A. Y; MADDEN, K. R. Pichia pastoris as a host system for transformants. *Molecular and Cell Biology*, v. 5, n. 12, p.3376-3385, 1985.

CREGG, J. M.; VEDVICK, T. S.; RASCHKE, W. C. Recent advances in the expression of foreign genes in Pichia pastoris. *Naturebiotechnology*, v.11, n.8, p.905-910, 1993.

CREGG, J. M.; TSCHOPP, J. F.; STILLMAN, C.; SIEGEL, R.; AKONG, M.; CRAIG, W. S.; BUCKHOLTZ, R. G.; MADDEN, K. R.; KELLARIS, P. A.; DAVIS, G. R.; SMILEY, B. L.; CRUZE, J.; TORREGROSSA, R.; VELICELEBI, G.; THILL, G. P. High-level expression and efficient assembly of hepatitis B surface antigen in the methylotrophic yeast Pichia pastoris. *Naturebiotechnology*, v. 5, n.5, p. 479-485, 1987.

CUISINIER, A.M. ; MALLET, V.; MEYER, A.; CALDOR, A. C.; AUBERT, A. DNA vaccination using expression vectors carrying FIV structural genes induces immune response against feline immunodeficiency virus. *Vaccine*, v. 15, n. 10, p.1085-1094, 1997.

CUTLIP, R. C.; LEHMKUHL, H. D.; BROGDEN, K. A.; SCHMERR, M. J. F. Failure of experimental vaccines to protect against infection with ovine progressive pneumonia (maedi-Visna) virus. *Veterinary Microbiology*, v.13, n.3, p.201-204, 1987.

CUTLIP, R. C.; LEHMKUHL, H. D.; SACKS, J. M.; WEAVER, A. L. Prevalence of antibody to caprine arthritis-encephalitis virus in goat in the United States. *Journal of American Veterinary Medical Association*, v. 200, p. 802 -805, 1992.

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.

DAHLBERG, J. E.; GASKIN, J. M.; PERK, K. Morphological and immunological comparasion of caprine arthritis encephalites and ovine progresses pneumonia viruses. *The Journal of Virology*, v. 39, n. 3, p. 914-919, 1981.

DANTAS, T. V. M.; ARAÚJO, S. A. C.; PINHEIRO, R. R.; ARAGÃO, M. A. C.; SILVA, J. B. A.; RICARTE, A. R. F.; RIBEIRO, A. L.; TEIXEIRA, M. F. S. Desenvolvimento e padronização de um ELISA indireto para Diagnóstico de Maedi Visna em ovinos. *Ciência Animal Brasileira*, v. 9, n. 1, p. 181-187, 2008.

DeMARTINI, J. C.; HALSEY, W.; BOSHOFF, C.; DENNIS, Y.; HOWELL, M. D. Comparison of a Maedi- Visna virus CA-TM fusion protein ELISA with other assays for detecting sheep infected with North American ovine lentivirus strains. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, v. 71, n., 1, p. 29-40, 1999.

DIEHL, L. J. ; MATHIASON-DUBARD, C. K.; O'NEIL, L. L.; OBERT, L. A.; HOOVER, E. A. Induction of accelerated feline immunodeficiency virus disease by acute-phase virus passage. *The Journal of Virology*, v.69, n.10, p.6149-6157, 1995.

DITCHAM , W. G. F.; LEWIS, J. R.; DOBSON , R. J.; HARTANINGSIH , N; WILCOX, G. E.; DESPORT, M. Vaccination reduces the viral load and the risk of transmission of Jembrana disease virus in Bali cattle. *Virology*, v. 386, n.2, p.317-324, 2009.

DUNHAM, S. P. ; FLYNN, J. N.; RIGBY, M. A.; MACDONALD, J.; BRUCE, J.; CANNON, C.; GOLDER, M. C.; HANLON, L.; HARBOUR, D. A.; MACKAY, N. A.; SPIBEY, N.; JARRETT, O.; NEIL, J. C. Protection against feline immunodeficiency virus using replication defective pró-viral DNA vaccines with feline interleukin-12 and 18. *Vaccine*, v.20, n. 11-12, p.1483-1496, 2002.

DURRANI, Z.; MCINERNEY, T. L.; MCLAIN, L.; JONES, T.; BELLABY, T.; BRENNAN, F. R.; DIMMOCK, N. J. Intranasal immunization with a plant virus expressing a peptide from HIV-1 gp41 stimulates better mucosal and systemic HIV-1-specific IgA and IgG than oral immunization. *Journal of Immunological Methods*, v.220, n. 1-2, p.93-103, 1998.

ELLIS, R. W. Technologies for the design, discovery, formulation and administration of vaccines. *Vaccine*, v.19, n.17-19, p. 2681–2687, 2001.

ELLIS, T. M.; WILCOX, G.E.; ROBINSON, W.F. Antigenic variation of caprine arthritis encephalitis virus during persistent infection of goats. *Journal of General Virology*, v.63, n.12, p. 3145-3152, 1987.

EVANS, D. T. ; BRICKER, J. E.; SANFORD, H. B.; LANG, S.; CARVILLE, A.; RICHARDSON, B. A.; PIATAK JR. M.; LIFSON, J. D.; MANSFIELD, K. G.; DESROSIERES, R. C. Immunization of macaques with Single-cycle simian immunodeficiency virus (SIV) stimulates diverse virus-specific immune responses and reduces viral loads after challenge with SIV_{mac} 239. *Journal of virology*, v.79, n. 12, p.7707-7720. 2005.

FEVEREIRO, M.; BARROS, S.; FAGULHA, T. Development of a monoclonal antibody blocking – ELISA for detection of antibodies against Maedi-Visna virus. *Journal of Virological methods*, v. 81, n. 1-2, p. 101-108, 1999.

FLORES, E. F. *Virologia Veterinária*. Santa Maria: UFSM, 2007. 888 p.

FLURI, A.; NENCI, C.; ZAHNO, M. L.; VOGT, H. R.; CHARAN, S.; BUSATO, A.; PANCINO, G.; PETERHANS, E.; OBEXER-RUFF, G. ; BERTONI, G. The MHC-haplotype influences primary, but not memory, immune responses to an immunodominant peptide containing T- and B-cell epitopes of the caprine arthritis encephalitis virus Gag protein. *Vaccine*, v.24, n.5, p.597–606, 2006.

FLYNN, N. ; HOSIE, M. J.; RIGBY, M. A.; MACKAY, N.; CANNON, C. A.; DUNSFORD, T.; NEIL, J. C.; JARRETT, O. Factors influencing cellular immune responses to feline immunodeficiency virus induced by DNA vaccination. *Vaccine*, v.18, n.11-12, p.1118-1132, 2000.

FRACKMAN, S.; KEPHART, D. Rapid Ligation for the pGEM®-T and pGEM®-T Easy Vector Systems. *Promega Notes* n. 71, p. 08, 1999. Disponível em: <http://www.promega.com/pnotes/71/7807_08/7807_08_core.pdf>. Acesso em: 27 set. 2009.

FRANKE, C. R. *Controle sanitário da artrite-encefalite caprina* . Salvador: EDUFBA, 1998-70p.

GIANNECCHINI, S.; MAURO, D. D.; MATTEUCCI, D.; BENDINELLI, M. AIDS vaccination studies using an ex vivo feline immunodeficiency virus model: reevaluation of neutralizing antibody levels elicited by a protective and a nonprotective vaccine after removal of antisubstrate cell antibodies. *The Journal of Virology*, v.75, n.9, p.4424-4429, 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, n.6, 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.

GONDA, M. A.; BRAUM, M. J.; CLEMENTS, J. E.; PYPHER, J. M.; WONGSTAAL, F.; GALLO, R. C.; GILDEN, R. V. Human T-cell lymphotropic virus type III shares sequence homology with a family of pathogenic lentiviruses. *Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America*, v. 83, n.11, p. 4007-4011, 1986.

GONZALEZ, B. ; REINA, R.; GARCIA, I.; ANDRES, S.; GLARIA, I.; ALZUETA, M.; MORA, M. I.; JUGO, B. M.; ARRIETA-AGUIRRE, I.; LASTRA, J. M. P. de la.; RODRIGUES, D.; RODRIGUES, J. R.; ESTEBAN, M.; GRILLÓ, M. J.; BLACKLAWS, B. A.; HARKISS, G. D.; CHEBLOUNE, Y.; LUJAN, L.; ANDRES, D.; AMORENA, B. Mucosal immunization of sheep with a maedi-visna virus (MVV) env DNA vaccine protects against early MVV productive infection. *Vaccine*, v.23, n. 34, p.4342-4352, 2005.

GOUVEIA, A. M. G.; COURA, M. A.; BRANDÃO, H. M.; ATANÁSIO, C. Distribuição sorológica do lentivírus caprino em amostragem por demanda. In: ENCONTRO DE PESQUISA DA ESCOLA DE VETERINÁRIA DA UFMG, Belo Horizonte. *Anais...* Belo Horizonte, 1998, p. 116.

GREGO, E.;BERTOLOTTI, L.; QUASSO, A.; PROFITI, M.; LACERENZA, D.; MUZ, D.; ROSATI, S.. Genetic characterization of small ruminant lentivirus in Italian mixed flocks: evidence for a novel genotype circulating in a local goat population. *Journal of general virology*, v.88, n. 12, p.3423-3427, 2007.

GREENWOOD, P. L. Effects of Caprine Arthritis-Encephalitis Virus on productivity and health of dairy goats in New South Wales, Australia. *Preventive Veterinary Medicine*, v. 1-2, n. 22, p. 71-87, 1995.

HAASE, A. T. Pathogenesis lentivirus infection. *Nature*, v. 322, n. 6075, p. 130-136, 1986.

HAMMOND, J.; McGARVEY, P.; YUSIBOV, V. *Plants biotechnology: new products and applications*. Springer-Verlag Telos. 1999. 196p.

HAMMOND, S. A. ; RAABE, M. L.; ISSEL, C. J.; MONTELARO, R. C. Evaluation of antibody parameters as potential correlates of protection or enhancement by experimental vaccines to equine infectious anemia virus. *Virology*, v. 262, n. 2, p.416-430, 1999.

HANNIG, G.; MAKRIDES, S. C. Strategies for optimizing heterologous protein expression in *Escherichia coli*. *Trends in Biotechnology*, v.16, n.2, p. 54-60, 1998.

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.

HARLON, E.; LANE, D. *Antibodies: a laboratory manual*. New York: Cold Spring Harbor Laboratory, 1988. 865p.

HARTANINGSIH, N.; DHARMA, D. M. N.; SOEHARSONO, S.; WILCOX, G. E. The induction of a protective immunity against Jembrana disease in cattle by vaccination with inactivated tissue-derived virus antigens. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, v. 78, n.2, p. 163-176, 2001.

HELDENS, J. G. M.; PATEL, J. R.; CHANTER, N.; TEN THIJ, G. J.; GRAVENDIJK, M.; SCHIJNS, V. E. J. C.; LANGEN, A.; SCHETTERS, Th. P. M. Veterinary vaccine development from an industrial perspective. *The Veterinary Journal*, v.178, n.1, p. 7-20, 2008.

HENRIQUES, A. M.; FEVEREIRO, M.; PRAZERES, D. M. F.; MONTEIRO, G. A. Development of a candidate DNA vaccine against Maedi-Visna virus. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, v.119, n.3-4, p. 222-232, 2007.

HOSIE, M. ; OSBORNE, R.; YAMAMOTO, J. K.; NEIL, J. C.; JARRETT, O. Protection against homologous but not heterologous challenge induced by inactivated feline immunodeficiency virus vaccines. *Journal of Virology*, v.69, n.2, p.1253-1257, 1995.

HOSIE, M. J. ; DUNSFORD, T.; KLEIN, D.; WILLETT, B. J.; CANNON, C.; OSBORNE, R.; MACDONALD, J.; SPIBEY, N.; MACKAY, N.; JARRETT, O.; NEIL, J. C. Vaccination with Inactivated Virus but Not Viral DNA Reduces Virus Load following Challenge with a Heterologous and Virulent Isolate of Feline Immunodeficiency Virus. *Journal of Virology*, v. 74, n.20, p. 9403-9411, 2000.

HUSSAIN, K. A., ISSEL, C. J., RWAMBO, P. M., ARNIZAUT, A. B, BALL, J. M., SCHMORR, K. L., MONTELARO, R. C. Identification of *gag* Precursor of Equine Infectious Anaemia Virus with Monoclonal Antibodies to the Major Viral Core Protein, p26. *Journal of General Virology*, v. 69, n.7, p.1719-1724, 1988.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATISTICA. CENSO AGROPECUARIO, 2008. Disponível em:<

http://www.ibge.gov.br/home/estatistica/economia/agropecuaria/censoagro/2006/tabela1_1.pdf
f> . Acesso em: 30 set. 2008.

ISSEL, C. J. ; HOROHOV, D. W.; LEA, D. F.; ADAMS, JR. W. V.; HAGIUS, S. D.; MCMANUS, J. M. ; ALLISON, A. C.; MONTELARO, R. C. Efficacy of inactivated whole-virus and subunit vaccines in preventing infection and disease caused by equine infectious anemia virus. *Journal of Virology*, v.66, n. 6, p.3398–3408, 1992.

JAN, C. L.; GREENLAND, T.; GOUNEL, F.; BALLEYDIERS, S.; MORNEX, J. F. Activation of small ruminant aortic endothelial cells after in vivo infection by caprine arthritis encephalitis virus. *Research in Veterinary Science*, v. 69, n. 3, p. 225-231, 2000.

JOAG, S. V.; STEPHENS, E. B.; NARAYAN, O. Lentiviroses. In: ____FIELDS, M. D.; KNIPE, D. M. *Fields Virology*, 3ª Ed. New York: Raven Press, 1996. p.1977-1996.

JOELSON, T.; AKERBLUM, L.; OXELFELT, P.; STRANDBERB, B.; TOMENIUS, K.; MORRIS, T. J. Presentation of a foreign peptide on the surface of tomato bushy stunt virus. *Journal of General Virology*, v.78, n.6, p. 1213-1217, 1997.

JOHNSON, R.P.; DESROSIERS, R.C. Protective immunity induced by live attenuated simian immunodeficiency virus. *Current Opinion in Immunology*, v.10, n.4, p.436-443, 1998.

KARASEV, A.V.; FOULKE, S.; WELLENS, C.; RICH, A.; SHON, K. J.; ZWIERZYNSKI, I.; HONE, D.; KOPROWSKI, H.; REITZ, M. Plant based HIV-1 vaccine candidate: Tat protein produced in spinach. *Vaccine*, v.23, n.15, p.1875–80, 2005

KEMP, R. K. ; KNOWLES, D. P.; PERRY, L. L.; McGUIRE, T. C.; CHEEVERS, W. P. Crossreactive neutralizing antibodies induced by immunization with caprine arthritis encephalitis virus surface glycoprotein. *Vaccine*, v.18, n.13, p.1282-1287, 2000.

KENNEDY - STOSKOPF, S.; NARAYAN, D. Neutralizing anti bodies to visna lentivirus: mechanisms of action and possible role in virus persistence. *Journal of Virology*, v. 59, n.1, p. 37-44, 1986.

KLENERMAN, P.; HILL, A. T cells and viral persistente: lessons from diverse infections. *Nature Immunology*, v.6, n.9, p.873-879, 2005.

KNOWLES, D. P. Laboratory diagnostic test for Retrovirus infections of small ruminants. *Veterinary Clinics of North American: Food Animal Practice*, v. 13, n.1, p. 1-11, 1997.

KNOWLES JÚNIOR, D. P.; 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.

KOPROWSKI , H.; YUSIBOV, V. The green revolution: plants as heterologous expression factors. *Vaccine*, v. 19, n. 17-19, p. 2735-2741, 2001.

KRISHNAN, B.R. Current status of DNA vaccines in veterinary medicine. *Advanced Drug Delivery Reviews*, v.43, n.1, p.3-11, 2000.

LAEMMLI, U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, v. 227, n. , 5259, p. 680-685, 1970

LARSEN, H. J.; HYLLSETH, B.; KROGSRUD, J. Experimental maedi virus infection in sheep: cellular and humoral immune response during three years following intranasal inoculation. *American Journal of Veterinary Research*, v. 43, n. 3, p. 384-389, 1982.

LaVALLIE, E. R.; DIBLASIO, E. A; KOVACIC, S.; GRANT, K. L.; SCHENDEL, P. F.; MCCOY, J. M. A thioredoxin gene fusion expression system that circumvents inclusion body formation in the *E. coli* cytoplasm. *Nature Biotechnology*, v.11, n. 2, p 187-193, 1993

LEITE, B. L. S.; MODOLO, J. R.; PADOVANI, C. R.; STACHISSINI, A. V. M.; CASTRO, R. S.; SIMÕES, L. B. Avaliação da taxa comparativa de ocorrência da Artrite-Encefalite Caprina a Vírus pelas regionais de defesa agropecuária do estado de São Paulo, Brasil, e seu mapeamento por meio de sistema de informações geográficas. *Arquivos do Instituto Biológico*, v. 71, n. 1, p. 21 -26, 2004.

LI, F. ; CRAIGO, J. K.; HOWE, L.; STECKBECK, J. D.; COOK, S.; ISSEL, C.; MONTELARO, R. C. A live attenuated equine infectious anemia virus pró-viral vaccine with a modified s2 gene provides protection from detectable Infection by intravenous virulent virus challenge of experimentally inoculated horses. *Journal of Virology*, v. 77, n. 13, p. 7244–7253, 2003.

MADRUGA, C. R.; ARAÚJO, F. R.; SOARES, C. O. Princípios, padronização e validação de provas sorológicas. In: _____ MADRUGA, C. R.; ARAÚJO, F. R.; SOARES, C. O. *Imunodiagnóstico em medicina Veterinária*. Campo Grande: EMBRAPA gado de corte (Campo Grande- Mato Grosso do Sul- Brasil), 2001, p.145-175.

MADUREIRA, K. M.; GOMES, V. *Prevalência da Artrite-Encefalite Caprina (CAE) em propriedades leiteiras do estado de São Paulo*. 2007. Disponível em:

<http://www.unifian.edu.br/programasinst/Revistas/revistas2007/veterinaria/Prevalencia_da_artrite_encefalite.pdf>. Acesso em: 18 dez. 2009.

MAKRIDES, S.C. Strategies for achieving high-level expression of genes in *Escherichia coli*. *Microbiological Reviews*, v.60, n.3, p.512-538, 1996.

MARANA, E. R. M.; KANO, F. S.; VICENTINI, J.C.; SPURIO, R.S.; RIBEIRO, M.; COELHO, A. L. M.; VIDOTTO, M. C.; VIDOTTO, O. Clonagem, expressão, caracterização molecular da proteína de superfície MSP5 da amostra PR1 de *Anaplasma marginale* e sua aplicação em um teste de ELISA por competição. *Revista Brasileira de Parasitologia veterinária*, v.18, n.2, p.5-12, 2009.

MARCOM, K.A.; PEARSON, L.D.; CHUNG, C.S.; POULSON, J.M.; DeMARTINI, J.C. Epitope analysis of capsid and matrix proteins of North American ovine lentivirus field isolates. *Journal of Clinical Microbiology*, v.29, n.7, p.1472-1479, 1991.

MARX, P. A.; PEDERSON, N.; LERCHE, N.; OSBURN, K.; LOWENSTINE, L.; LACKNER, A.; MAUL, D.; KWANG, H.; KLUGE, J. D.; ZAISS, C.; SHARPE, V.; SPINNER, A.; ALLISON, A. C.; GARDNER, M. Prevention of simian acquired immune deficiency syndrome with a formalin-inactivated type D retrovirus vaccine. *Journal of Virology*, v. 60, n.2, p. 431-435, 1986.

McGUIRE, T. C. The immune response to viral antigens as a determinant of arthritis in Caprine Arthritis-encephalitis infection. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, v. 17, n. 1-4, p. 465-470, 1987.

MCGUIRE, T. C.; O'ROURKE, K. I.; KNOWLES, D. P.; CHEEVERS, W. A. Caprine Arthritis-Encephalitis lentivirus transmission and disease. *Current Topics In Microbiology And Immunology*, v. 160, p. 61 – 75, 1990.

MCINERNEY, T. L.; BRENNAN, F. R.; JONES, T. D.; DIMMOCK, N. J. Analysis of the ability of five adjuvants to enhance immune responses to a chimeric plant virus displaying an HIV-1 peptide. *Vaccine*, v.17, n. 11-12, p.1359–1368, 1999.

MCLAIN, L.; DURRANI, Z.; WISNIEWSKI, L. A.; PORTA, C.; LOMONOSSOFF, G. P.; DIMMOCK, N. J. Stimulation of neutralizing antibodies to human immunodeficiency virus type 1 in three strains of mice immunized with a 22 amino acid peptide of gp41 expressed on the surface of a plant virus. *Vaccine*, v.14, n. 8, p.799–810, 1996.

MELO, A. C. M.; FRANKE, R. F. Soroprevalência da artrite-encefalite caprina (CAE) no rebanho caprino leiteiro da região da grande Fortaleza, Ceará, Brasil. *Ciência Rural*, v.27, n.1, p. 113-117, 1997.

MELO, C. B.; DE CASTRO, R. S.; OLIVEIRA, A. A.; FONTES, L. B.; CALLADO, A. K. C.; NASCIMENTO, S. A. Estudo preliminar sobre a infecção por lentivírus de pequenos ruminantes em ovinos e caprinos de Sergipe. In: CONGRESSO LATINOAMERICANO DE BUIATRIA, 5º, Salvador. *Anais...* Salvador: SBB, 2003, p.47 – 48.

MOOJEN, V.; SOARES, H. C.; RAVAZZOLO, A. P.; PIZZOL, M.; GOMES, M. Evidência de infecção pelo lentivírus (Maedi/Visna - Artrite Encefalite Caprina) em caprinos no Rio Grande do Sul, Brasil. *Arquivos da Faculdade de Medicina Veterinária da UFRGS*, v. 14, p. 77-78, 1986.

MOREIRA, C.; MENDES, D. *Vetores de Clonagem. Engenharia Genética - Clonagem de DNAs em Bactérias (Módulo I)*. Universidade de Evora, 1998. Disponível em: http://www.dbio.uevora.pt/LBM/Foco/Vectores/vectores.html#_Toc436393296. Acesso em: 27 set. 2009.

NAKAGHI, A.C.H. *Clonagem do gene p28 e análise da expressão Da proteína recombinante a partir da amostra de ehrlichia canis e sua aplicação no Diagnóstico da erliquiose canina*. 2008.104 p. Tese (doutorado em clínica médica veterinária). Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias- Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, Jaboticabal, 2008.

NARAYAN, O.; CLEMENTS, J. E. Biology and pathogenesis of lentiviruses. *Journal of General Virological*, v. 70, n.7, p. 1617-1639, 1989.

NARAYAN, O.; SHEFFER, D.; GRIFFIN, D. E.; CLEMENTS, J.; HESS, J. Lack of neutralizing antibodies to caprine arthritis-encephalitis lentivirus in persistently infected goats can be overcome by immunization with inactivated Mycobacterium tuberculosis. *Journal of Virology*, v.49, n.2, p.349-355, 1984.

NASCIMENTO, A. A. C.; ESPREAFICO, E. M.; LARSON, M. L. P. ; MONESI, N.; ROSSI, N. M. M. ; RODRIGUES, V. *Tecnologia Do DNA Recombinante*. São Paulo: Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto (USP), 2003. Disponível em: <<http://morpheus.fmrp.usp.br/td/apostila.php>>. Acesso em 27 set. 2009.

NENCI, C.; ZAHNO, M. L.; VOGT, H. R.; OBEXER-RUFF, G.; DOHERR, M. G.; ZANONI, R.; PETERHANS, E.; BERTONI, G. Vaccination with a T-cell-priming Gag peptide of caprine arthritis encephalitis virus enhances virus replication transiently in vivo. *Journal of General Virology*, v.88, n.5, p.1589–1593, 2007.

NOVAGEN. *pET System Manual*. 11ed. Germany: EMD Bioscience. 2005, p.80. Disponível em : < http://kirschner.med.harvard.edu/files/protocols/Novagen_petsystem.pdf >. Acesso dia: 11 out. 2009.

NOVY, R.; DROTT, D.; YAEGER, K. ; MIERENDORF, R. Overcoming codon bias of E. coli for enhanced protein expression. *Innovations*, v.12, p.1-3, 2001.

OLIVEIRA, M. M. M.; CASTRO, R. S.; CARNEIRO, K. L.; NASCIMENTO, S. A.; CALLADO, A. K. C.; ALENCAR, C. S. A.; COSTA L. S. P. Anticorpos contra lentivírus de pequenos ruminantes em caprinos e ovinos em abatedouros do estado de Pernambuco. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*, v. 58, n.5, p. 947-949, 2006.

PEPIN, M.; VITU, C.; RUSSO, P.; MORNEX, J. F.; PETERHANS, E. Maedi-visna virus infection in sheep: a review. *Veterinary Research*, v. 29, n.3-4, p. 341-367, 1998.

PERTURSON, G.; ANDRÉSDÓTTIR, O. S.; ANDRÉSSON, G. Lentivírus disease of sheep and goat: Maedi –Visna an caprine Arthritis encephalitis. In: ___ SPEEDY, A. W. *Progress in sheep and Goat Research*, Keldur:Hardcover, 1992. p. 107-129.

PERTUSSON, G.; MTTTHIASDOTTIR, S.; SVANSSON, V.; ANDRESDOTTIR, V.; GEORGSSON, G.; MARTIN, A. H.; AGNARSDOTTIR, G.; GISLADÓTTIR, E.; ÁRNADÓTTIR, S.; HOGNADÓTTIR, S.; JÓHNSSON, S. R.; ANDRÉSSON, O. S.; TORSTEINSDÓTTIR, S. Mucosal vaccination with an attenuated maedi-visna virus clone. *Vaccine*, v.23, n.24 3223-3228, 2005.

PINHEIRO, R. R.; ALVES, F. S. F.; GIRÃO, E. S.; MEDEIROS, L. P. A.; GIRÃO, R. N. Presença da Artrite-Encefalite Caprina a Vírus (CAEV), em Teresina – Piauí. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE MEDICINA VETERINÁRIA, 24º, Goiânia. *Anais...* Goiânia. 1996. p. 161.

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. 449 – 454, 2001.

PINHEIRO, R. R.; GOUVEIA, A. M. G.; ANDRIOLI, A. Prevalência da Artrite-Encefalite Caprina em reprodutores caprinos nas principais regiões leiteiras do estado do Ceará. *Revista Brasileira de Reprodução Animal*, v. 23, n. 3, p. 421 – 423, 1999.

PINHEIRO, R. R. *Vírus de Artrite Encefalite Caprina: Desenvolvimento padronização de ensaios imunoenzimáticos (ELISA e Dot-Blot) e estudo epidemiológico no Estado do Ceará*. 2001. 115p. Tese (Doutorado)- Escola de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2001.

PINHEIRO, R. R.; CHAGAS, A. C. S.; ANDRIOLI, A.; ALVES, F. S. F. *Viroses de*

pequenos ruminantes. Sobral, CE: Embrapa Caprinos, 2003. 30 p. (Série Documentos, 46).

PISTELLO, M. ; BONCI, F.; ISOLA, P.; MAZZETTI, P.; MERICO, A.; ZACCARO, L.; MATTEUCCI, D.; BENDINELLI, M. Evaluation of feline immunodeficiency vírus ORF-A mutants as candidate attenuated vaccine. *Virology*, v. 332, n.2, p.676-690, 2005.

PISTELLO, M.; MATTEUCCI, D. ; DONCI, F; ISOLA, P.; MAZZETTI, P.; ZACCARO, L.; MERICO, A.; MAURO, D. D.; FLYNN, N. ; BENDINELLI, M. AIDS vaccination studies using an vivo feline immunodeficiency virus model: protection fro an intreclade challenge administered systemally or mucosally by an attenuated vaccine. *Journal of Virology*, v.77, n.20, p.10740-10750. 2003.

PORTA, C.; SPALL, S. E.; LOVELAND, J.; JOHNSON, J. E.; BARKER, P. J.; LOMONOSSOFF, G. P. Development of cowpea mosaic virus as high-yielding system to the presentation for foreign peptides. *Virology*, v.202, n. 2, p.949–955, 1994.

PORTA, C.; SPALL, V. E.; FINDLAY, K. C.; GERGERICH, R. C.; FARRANCE, C. E.; LOMONOSSOFF, G. P. Cowpea mosaic virus-based chimaeras Effects of inserted peptides on the phenotype, host range, and transmissibility of the modified viruses. *Virology*, v.310, n. 1, p.50–63, 2003.

PRESTON, B.; DOUGHERTY, J. P. Mechanisms of retroviral mutation. *Trends in Microbiology*, v. 4, p. 16-21, 1996.

PU, R. ; COLEMAN, J.; OMORI; MISON, M.; HUANG, C.; ARAI, M.; TANABE, T.; YAMAMOTO, J. K. Dual-subtype FIV vaccine protects cats against in vivo swarms of both homologous and heterologous subtype FIV isolates. *AIDS*, v. 15, n.10, p.1225-1237, 2001.

RAABE, M. L. ; ISSEL, C. J. ; COOK, S. J.; COOK, R. F.; WOODSON, B.; MONTELARO, R. C. Immunization with a recombinant envelope protein (rgp90) of EIAV produces a spectrum of vaccine efficacy ranging from lack of clinical disease to severe enhancement. *Virology*, v.245, n.1, p.151–162, 1998.

RAMOS, O. S.; SILVA, A. C. S; MONTENEGRO, A. J. D.; FREITAS, J. A.; WATANABE, N. A. Anticorpos para o Vírus da Artrite Encefálica no município de Castanhal – Pará. *Revista de Ciências Agrárias (Belém)*, v. 26, p. 107 – 111, 1996.

RAVAZZOLO, A.P.; COSTA, U. Retroviridae. In:___ FLORES, E. F. *Virologia Veterinária*. Santa Maria: UFSM, 2007. p. 809-830.

REGITANO, L. C. A.; COUTINHO, L. L. *Biologia molecular aplicada à produção animal*. Brasília: Embrapa. Informação tecnológica, 2001, 215p.

REYBURN, H. T.; ROY, D. J.; BLACKLAWS, B. A.; SARGAN, D. R.; McCONNELL, I. Expression of Maedi-visna virus major core protein p. 25: development of a sensitive p 25 antigen detection assay. *Journal of Virological Methods*, v. 37, n. 3, p. 305-320, 1992.

RIET-CORRÊA, F. *Doenças de Ruminantes e Equinos*. v.1, São Paulo: Varela, 2001, p.998.

ROBERSON, S. M.; McGUIRE, T. C.; KLEVJER-ANDERSON, P.; GORHAM, J. R.; CHEEVERS, W. P. Caprine arthritisencephalitis virus is distinct from visna and progressive pneumonia viruses as measured by genome sequence homology. *Journal of Virology*, v.44 ,n.2, p.755-758, 1982.

ROITT, I.; BROSTOFF, J. MALE, D. *Immunology*. 5ª ed, London: Mosby, 1998. 423 p.

ROYUELA; E.; SANCHEZ-FAUQUIER, A. Molecular cloning, expression and first antigenic characterization of human astrovirus VP26 structural protein and a C-terminal deleted form. *Comparative Immunology, microbiology and Infectious diseases*, v.33, p.1-14,2010.

RUSSO, P. Virus de l'arthrite-encéphalite caprine (CAEV). Brève Revue. *Annales de Recherches Vétérinaires*, Paris, v. 15, n. 1, p. 3 – 6, 1984.

RUSSO-CARBOLANTE, E. M. S. ; PENTEADO, F.C.L.; MEDEIROS, L.; KASHIMA, S.; TAKAYANAGUI, O. M.; COVAS, D. T. Clonagem e expressão da glicoproteína transmembrana do vírus linfotrópico de células T humanas em sistema procarioto. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, v. 40, n.3, p. 277-281, 2007.

SAMBROOK, J.; RUSSEL, D.W. *Molecular Cloning: A laboraroty manual*, 3 ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press: USA. 2001.1445p.

SALTARELLI, M.;QUERAT, G.; KONINGS, D. A.; VIGNE, R.; CLEMENTS, J. E. Nucleotide sequence and transcriptional analysis of molecular clones of CAEV which generate infectious virus. *Virology*, v.179, n.1, p.347-64, 1990.

SCHATZMAYR, H. G. Novas perspectivas em vacinas virais. *História, Ciências, Saúde, Manginhos*, v. 10, n.2, p.655-669, 2003.

SCHATZMAYR, H. G . Use of plants as vectors for production of biomedical products. *Virus Reviews and Research*, v.07, n.2, p.22-27, 2002.

SCHUMANN, W.; FERREIRA, L. C. S. Production of recombinant proteins in *Escherichia coli*. *Genetics and Molecular Biology*, v.27, n.3, p.442-453, 2004.

SHAH, C.; BONI, J.; HUDER, J. B.; VOGT, H. R.; MUHLHERR, J.; ZANONI, R.; MISEREZ, R.; LUTZ, H.; SCHUPBACH, J. Phylogenetic analysis and reclassification of caprine and ovine lentiviruses based on 104 new isolates: evidence for regular sheep-to-goat transmission and worldwide propagation through livestock trade. *Virology*, v. 319, n.1, p.12–26, 2004.

SHEN, T. ; LIANG, H.; TONG, X.; FAN, X.; HE, X.; MA, Y.; XIANG, W.; SHEN, R.; ZHANG, X.; SHAO, Y. Amino acid mutations of the infectious clone from Chinese EIAV attenuated vaccine resulted in reversion of virulence. *Vaccine*, v.24, n.6, p. 738-749, 2006.

SIHVONEN, L. Early immune responses in experimental maedi. *Research in Veterinary Science*, v.30, p.217-222, 1981.

SILVA, J. S.; CASTRO, R. S.; MELO, C. B.; FEIJÓ, F. M. C.. Infecção pelo vírus da artrite encefalite caprina no Rio Grande do Norte. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*, v. 57, n.6, p. 727-731, 2005.

SELL, B. E. *Prevalência de anticorpos para o vírus da Artrite-Encefalite Caprina em soros de caprinos no estado de Santa Catarina*. 2000. 23 f. Monografia (Especialização em Sanidade Animal) – Universidade do Estado de Santa Catarina, Lages, 2000.

SMITH, A. D. Vaccine. In ___CAMMACK, R.; ATWOOD, T.; CAMPBELL, P.; PARISH, H.; SMITH, T.; STIRLING, J.; VELLA, F. *Oxford Dictionary of Biochemistry and Molecular Biology*. Second Edition. New York: Oxford, 2000.

SØRENSEN, H. P.; MORTENSEN, K. K. Advanced genetic strategies for recombinant protein expression in *Escherichia coli*. *Journal of Biotechnology*, v. 115, n.2 , p.113–128, 2005.

SOTOMAIOR C.; MILCZEWSKI V. Relato de um rebanho ovino infectado pelo vírus maedi-visna no Estado do Paraná. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE MEDICINA VETERINÁRIA, 25, 1997, Gramado. *Anais...* Gramado, 1997. p. 179.

SOUSA, F. J. S.; OLIVEIRA, M. R.; ALMEIDA, N. C.; MARTINS, M. G.; ARAGÃO, M. E. F.; TEIXEIRA, M. F. S.; GUEDES, M. I. F. Vírus do mosaico severo do caupi-CpSMV como molécula carreadora para a p28 do vírus da artrite encefalite caprina-CAEV. *Ciência Rural*, v.35, n.6, p.1363-1367, 2005.

SPARGER, E. E.; DUBIE, R. A.; SHACKLETT, B. L.; COLE, K.S.; CHANG, W. L.; LUCIW, P. A. Vaccination of rhesus macaques with a vif-deleted simian immunodeficiency virus proviral DNA vaccine. *Virology*, v. 374, n.2, p. 261–272, 2008.

STOWRING, L.; HAASE, A. T.; CHARMAN, H. P. Serologic definition of the lentivirus group of retroviruses. *The Journal of Virology*, v. 29, n. 2, p.523–528, 1979.

STUDIER, F. W.; MOFFAT, B.A. Use of bacteriophage T7 RNA polymerase to direct selective high-level expression of cloned genes. *Journal of Molecular Biology*, v.189, n.1, p.113–130, 1986.

STÜNZ, H.; BUCHI, H.F.; LE ROY, HL. et al. Endemische Arthritis chronica bei Ziegen. *Schweiz. Arch. Tierheilk*, v.106, p.778–788, 1964.

SUGIYAMA, Y.; HAMAMOTO, H.; TAKEMOTO, S.; WATANABE, Y.; OKADA, Y. Systemic production of foreign peptides on the particle surface of tobacco mosaic virus. *FEBS Letters*, v.359, n 2-3, p.247–250, 1995.

TEIXEIRA, M. F. S.; LAMBERT, V.; MSELLI-LAKAHL, L.; CHETTAB, A.; CHEBLOUNE, Y.; MORNEX, J. F. Immortalization of caprine fibroblasts permissive for replication of small ruminant lentiviruses. *American Journal of Veterinary Research*, v.58, n.6, p.579–584, 1997.

TIGRE, D. M.; CAMPOS, G. S.; SARDI, S. I. Isolamento e identificação do Vírus da Artrite Encefalite Caprina, a partir do co-cultivo de células mononucleares do sangue com células de membrana sinovial de cabra. *Revista de Ciências Médicas e Biológicas*, v. 5, n. 2, p. 124 – 131, maio/ agosto, 2006.

TIZARD, I. *Introdução à Imunologia veterinária*. 2ed., São Paulo: Roca, 1998, p 545.

TORRES, F. A. G; MORAES, L. M. P. Proteínas recombinantes produzidas em leveduras. *Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento*. Disponível em: <<http://www.biotecnologia.com.br/revista/bio12/proteinas.pdf>> Acesso em: 23 set. 2009.

TURNER, P.C.; McLENNAN, A. G.; BATES, A. D.; WHITE, M. R. H. *Biologia Molecular*. 2ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2004, p.287.

UHL, E. W.; HEATON-JONES, T. G.; PU, R.; YAMAMOTO, J. K. FIV vaccine development and its importance to veterinary and human medicine: a review. *Veterinary immunology and immunopathology*, v. 90, n. 3-4, p. 113–132, 2002.

VAREA, R.; MONLEON, E.; PACHECO, C.; LUJAN, L.; BOLEA, R.; VARGAS, M. A.; VAN EYNDE, G.; SAMAN, E.; DICKSON, L.; HARKISS, G.; AMORENA, B.; BADIOLA, J. J. Early detection of maedi-visna (ovine progressive pneumonia) virus seroconversion in field sheep samples. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, v. 13, n.4, p. 301-307, 2001.

VERNEUIL, H. Métodos de estudo do genoma, do transcriptoma e do proteoma. In: ____ KAMOUN, P.; LAVOINNE, A.; VERNEUIL, H. *Bioquímica e Biologia Molecular*. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, p.105-117, 2006.

VITU, C.; RUSSO, P.; VIGNE, R.; QUERAT, G.; GIAUFFRET, A. An ELISA Test For Detection Of Maedi- Visna antibodies. Comparative study with Gel Immunodiffusion na complement fixation test. *Comparative Immunology and Microbiology Infectious Disease*, v.4, n.5, p .469-481, 1982.

WEISS, M. J., SWEET, R. W., GULATI, S. C., HARTEK, D. H. Nucleic acid sequence relationships among "slow" viruses of sheep. *Virology*, v.71, n.2 ,p.395-401, 1976.

WYAND, M. S.; MANSON, K. H.; GARCIA-MOL, M.; MONTEFIORI, D.; DESROSIERS, R. C. Vaccine protection by a triple deletion mutant of simian immunodeficiency virus. *Journal of Virology*, v.70, n.6, p.3724-3733, 1996.

YAMAMOTO, J. K. ; OKUDA, T.; ACKLEY, C. D.; LOUIE, H.; PEMBROKE, E.; ZOCHLINSKI, H.; MUNN, R. J.; GARDNER, M. B. Experimental vaccine protection against feline immunodeficiency virus. *AIDS Research and Human Retroviruses*, v.7, n.11, p.911-921, 1991.

YANISCH-PERRON, C.; VIEIRA, J. ; MESSING, J. Improved M13 phage cloning vectors and host strains: nucleotide sequences of the M13mp18 and pUC19 vectors. *Gene*, v. 33, n. 1, p.103-119, 1985.

ZHANG, G.; LEUNG, C.; MURDIN, L.; ROVINSKI, B.; WHITE, K. A. In planta expression of HIV-1 p24 protein using an RNA plant virusbased expression vector. *Molecular Biotechnoogyl*, v.14, n.2, p.99-107, 2000.

ZHU, Y. X.; LIU, C.; LIU, X. L.; QIAO, W. T.; CHEN, Q. M.; ZENG, Y.; GENG, Y. Q. Construction and characterization of chimeric BHIV (BIV/HIV-1) viruses carrying the bovine immunodeficiency virus gag gene. *World Journal of Gastroenterology*. v.11, n.17, p.2609-2615, 2005.

ZINK, M. C.; JOHNSON, L. K. Pathobiology of lentivirus infections of sheep and goats. *Virus Research*, v.32, n.2, p. 139-154, 1994.

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

http://www.merck-chemicals.com.br/life-science-research/pet-32b%2B-dna/EMD_BIO-69016/p_2tOb.s1OkacAAAEjWhI9.zLX. Acesso em : 27 set. 2009.

<http://www.fermentas.com/techinfo/nucleicacids/mappuc1819.htm>. Acesso em: 27 set. 2009.

<http://www.promege.com/figures/popup.asp?fn=1473va>. Acesso em: 27 set. 2009.

ANEXOS

Anexo 1- Declaração do Comitê de Ética

UNIVERSIDADE ESTADUAL DO CEARÁ
Comitê de Ética para o Uso de Animais
Paranjana, 1700 - CEP 60740-000
Fone 3101-9890 / ceua_uece@yahoo.com.br

**PARECER**

Processo nº: 06312526-9

Título do projeto: Produção de vacina quimérica contra lentivírus de pequenos ruminantes.

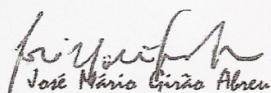
Interessada: Profa. Dra. Maria Fátima da Silva Teixeira

Objetivo do projeto: Produzir um antígeno quimérico para ser utilizado como vacina contra a Artrite Encefalite Caprina.

O projeto apresentado está bem estruturado e fundamentado, seguindo uma metodologia coerente com os objetivos propostos. Como animais experimentais serão utilizados coelhos e cabritos. Do ponto de vista da ética, deve-se destacar que aspectos importantes como condições de manejo alimentar e sanitário dos animais, alojamento dos mesmos, volume de sangue a ser coletado a cada procedimento, vaso a ser puncionado nos cabritos, destino dos coelhos após a utilização deles para a produção de anti-soro, destino dos cabritos do grupo controle e tratado, descarte do material contaminado foram plenamente esclarecidos.

Diante do exposto, declaramos que o projeto está aprovado sem pendências metodológicas.

Fortaleza, 08 de dezembro de 2006.



Presidente do Comitê de Ética para o Uso de Animais
CEUA-UECE

Anexo 2- Declaração do corretor ortográfico

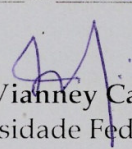
Vianney Mesquita (Reg. Prof. nº CEDU-189JP)

Revisão Gramatical e Estilística de Textos
Docente da Universidade Federal do Ceará
Acad. Titular (Cad nº 37) da Acad. Cearense de Língua Portuguesa

DECLARAÇÃO

Declaro, para constituir prova junto ao (à)
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS
do(a) _____,
que procedi ao trabalho de revisão estilística e gramatical do(a)
TESE intitulado(a) PROTEÍNA RECOMBI-
NANTE DO VÍRUS DA ARTRITE ENCEFALITE
CAPRINA COM POTENCIAL ANTIGÊNICO
_____, da
autoria de TÂNIA VALESKA MEDEIROS DANTAS,
orientado(a) pelo(a) PROF. DR.ª MARIA FÁTIMA DA S. TEIXEIRA,
pelo que assino a presente.

Fortaleza, 06 de JANEIRO ²⁰¹⁰ de ~~2009~~.


Prof. João Vianney Campos de Mesquita
Universidade Federal do Ceará e
Academia Cearense de Língua Portuguesa

Válida somente com a carta anexa.

Vianney Mesquita (Reg. Prof. nº CE0489JP)

Revisão Gramatical e Estilística de Textos
 Docente da Universidade Federal do Ceará
 Acad. Titular (Cad nº 37) da Acad. Cearense de Língua Portuguesa

Fortaleza, 31 de dezembro de 2009

À atenção de
 consulentes, membros de bancas examinadoras,
 orientadores, editores e coordenadores de cursos
 de pós-graduação

Senhoras/Senhores

Antes de analisarem e criticarem as correções procedidas pelos revisores de texto, solicito a gentileza de atentarem para os pontos a seguir alistados.

1. É recomendável, sempre, proceder-se à segunda revisão, máxime se o texto contiver grande quantidade de erros. As impropriedades maiores detectadas na primeira revista, normalmente, escondem as menores, vistas somente após efetuadas as emendas recomendadas pelo revedor. As boas editoras fazem de quatro a oito revisões.
2. Há possibilidade de o estudante de pós-graduação, ou autor qualquer, não proceder às emendas sugeridas a grafite, deixando de fazê-las, por desídia ou mesmo por não aceitá-las, de modo a permanecerem as incorreções indicadas.
3. Podem ocorrer modificações em parte do escrito revisado, a instâncias do orientador ou mesmo ao talante do autor, sem a audiência do revisor, o que o exime — é claro — da responsabilidade sobre a porção alterada.
4. Frequentemente, pessoas envolvidas com o texto (autor, orientador etc) fazem referência a erros "deixados" pelo revisor, porém, em geral, não os indicam. Neste caso, é de bom alvitre a leitura destes pontos, bem como é necessário que apontem claramente ao dono do escrito onde se encontram os defeitos, para que, existindo, sejam sanados.
5. Também é muito recorrente acontecer de o "erro" apontado não se tratar realmente de erro, restando equivocada quem o "encontrou". É preciso entender-se que o Português é uma língua bastante escorregadia — porque riquíssima — e nem todos conhecem seus meandros nem se utilizam dos seus quase ilimitados recursos. A língua culta, em que é vazado o escrito didático-científico, é bem diversa da fala coloquial. Assim, por exemplo, não se há de empregar termos e expressões do jargão popular, admissíveis noutros contextos de fala que não a comunicação científica (estágio, que é treinamento, em vez de estádio, fase, período, quadra); ao invés, que significa ao reverso, ao contrário, ao revés, no lugar de em vez; ótica, palavra vinculada a audição, trocada por óptica, perspectiva, visão, modo de enxergar etc. etc.). Recomendo a leitura de *A Escrita Acadêmica: acertos e desacertos* (BARRETO, J. A. Esmeraldo & MESQUITA, Vianney. Fortaleza: Casa de José de Alencar/UFC, 1997).
 Certifique-se, pois, se existe, na verdade, o erro, se está absolutamente certo do erro indigitado. Manda a prudência: na dúvida, não afirme. Assim, não estará abalando, em vão e desassissadamente, a idoneidade pública do profissional de revisão textual.
6. Muitas vezes, o trabalho chega incompleto para ser revisado, faltando elementos pré e pós-textuais (sumário, resumo, referências bibliográficas etc), de crucial relevância para o acerto do todo, e partes muito passíveis da ocorrência de enganos. Então, acontece de o autor aprestá-los, *a posteriori*, contendo desacertos, imputando-se o agravo ao revisor inculpe.

06-01-2010

Vianney Mesquita (Reg. Prof. nº CED0485JP)

Revisão Gramatical e Estilística de Textos
 Docente da Universidade Federal do Ceará
 Acad. Titular (Cad nº 37) da Acad. Cearense de Língua Portuguesa

7. Convém atentar para o importante fato de que não impende ao revisor, via de regra, abonar conceitos ou falseá-los. Se ele for portador do preparo suficiente para fazê-lo, não há dúvidas de que é excelente auxílio para o autor. Caso não o faça, porém, não se há de inculpá-lo pelos enganos de quem escreveu, pois não tem essa obrigação. Desse modo, chamo à atenção dos produtores de texto, a fim de que procurem, para corrigir seus ensaios e outros escritos, pessoas com a devida prontidão intelectual para opinar desfavoravelmente no tocante a conceitos equivocados, tendo-se sempre em conta a noção de que a responsabilidade total e final sobre a propriedade ou ideação falaciosa é, evidentemente, de quem assinou o texto, bem como de seus orientadores.
 8. O revisor não pode ser responsabilizado pela correção das normas técnicas nem pela propriedade das notações bibliotécnicas (referências, classificação, catalogação na fonte, numeração progressiva etc.), porquanto, legalmente, é defeso a ele fazer este trabalho, privativo que é do profissional bibliotecário; a não ser que ele o seja.
 9. As citações, embora, evidentemente, o revedor seja obrigado a ler (para entender o contexto do escrito e cotejar os dados da menção com os das referências bibliográficas), ele não pode modificar. Sucede, porém, de, não em raras ocasiões, o profissional ser chamado à responsabilidade pelos deslizos dos autores citados, mesmo que, nas mais das vezes, não sejam realmente deslizos. É muito comum, ainda, atribuírem-lhe os erros dos discursos orais — gravados e transcritos — dos sujeitos da pesquisa, o que é um despropósito, mas serve para desabilitar o revisor.
 10. Os revisores textuais, salvo pacto diverso entre estes e os autores, não podem responder por palavras, expressões nem citações maiores expressas em língua estrangeira.
 11. No meu caso (professor Vianney Mesquita), as indicações de emenda são procedidas a grafite, principalmente para oferecer oportunidade de o consultante aceitá-las de pronto ou delas discordar, no momento em que se faz necessária uma audiência dos dois, um *tête-à-tête* para explicação e debate das modificações efetivadas. O conserto direto no disquete ou cd dificulta grandemente este entendimento.
 12. Há mais de vinte anos elaborando trabalhos de correção de textos acadêmicos e outros escritos, tenho por costume justificar minhas intervenções no verso da página escrita, de sorte que, nos ensaios futuros, o consultante possa espelhar-se nessas indicações para conformar seus discursos.
 13. Faço remissão ao item 11 e sugiro, em casos mais comentados e controversos, que o estudante terminal de pós-graduação *lato e stricto sensu*, ou qualquer outra pessoa, seja instado a conduzir a versão corrigida a grafite, a fim de suprimir dúvidas, pois ali estão aduzidos os motivos das correções procedidas.
 14. Expresso, por fim, a probabilidade ampla de o revisor (humano, mortal e imperfeito) falhar nos seus cuidados e deixar, ilesos de conserto, erros e mais erros, do que estão eivadas a vida e a ciência, na visão de que, porém, não se há de fechar a porta a todos os erros sob pena de a verdade também ficar de fora, conforme lembra o poeta indiano Rabindranah Tagore.
- Espero que, após a leitura desses catorze pontos, sejam reduzidos os embaraços e objeções relativos ao assunto, exatamente pela falta deste entendimento.
- Obrigado pela atenção,

Vianney Mesquita

06/01/2010

Anexo 3- Comprovante de aceite do Capítulo I**Ciência Animal**

CIÊNCIA ANIMAL

Fortaleza, 13 de outubro de 2009

DECLARAÇÃO

Comunico que o artigo de revisão de literatura intitulado "**Vacinas contra lentivírus animais**", de autoria de Tânia Valeska Medeiros Dantas, Suzana Aparecida Costa de Araújo, Aracely Rafaelle Fernandes Ricarte, Edmara Chaves Costa, Jean Berg Alves da Silva, Valeska Shelda Pessoa de Melo, Aryana Lushese Vasconcelos de Lima Feitosa & Maria Fátima da Silva Teixeira, foi aceito para publicação na revista *Ciência Animal* em seu volume 19 (ano 2009).

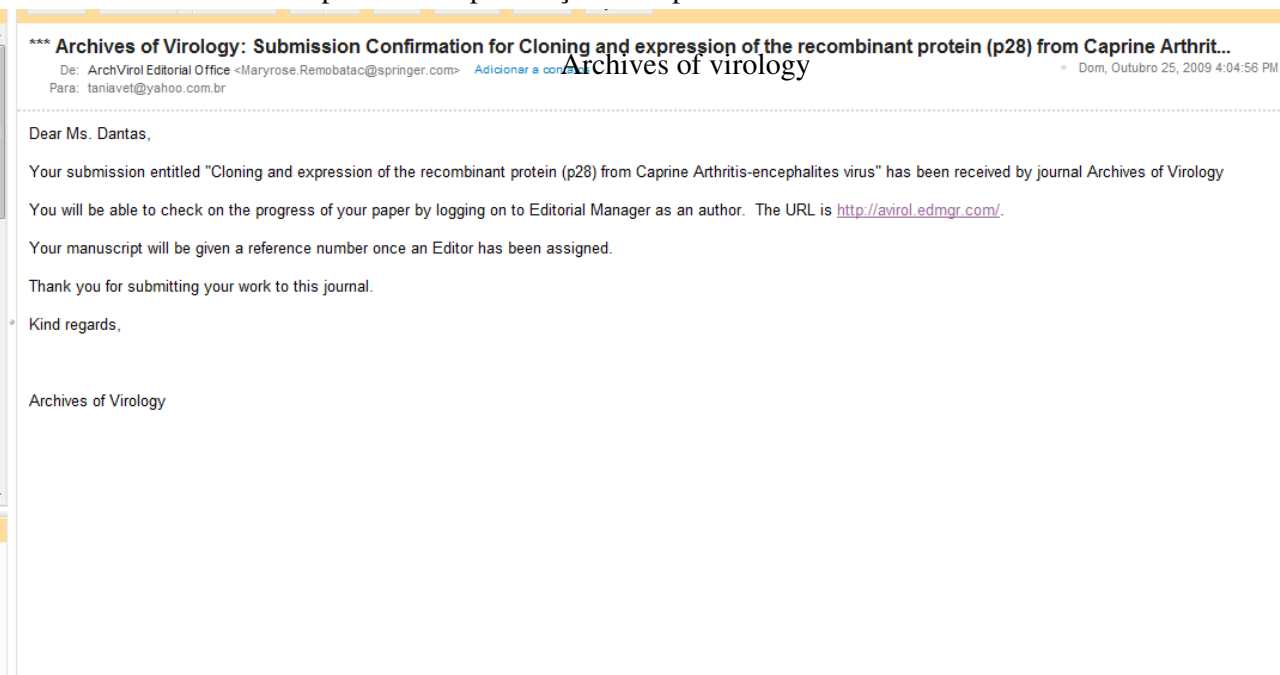


Diana Magalhães de Oliveira

Editora-Chefe – cianimal@uece.br
Ciência Animal (ISSN 0104-3773) – www.uece.br/cienciaanima

REVISTA DA
FACULDADE DE VETERINÁRIA.
UNIVERSIDADE ESTADUAL DO CEARÁ

ANEXO 4- Comprovante de publicação do capítulo II



Editorial Manager(tm) for Archives of Virology

Manuscript Draft

Manuscript Number:

Title: Cloning and expression of the recombinant protein (p28) from Caprine Arthritis-encephalites virus

Article Type: Original Article

Corresponding Author: Ms. Tania Valeska Medeiros Dantas, M.D.

Corresponding Author's Institution: State University of Ceará

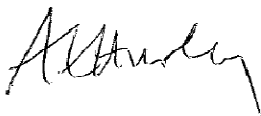
First Author: Tania Valeska Medeiros Dantas, M.D.

Order of Authors: Tania Valeska Medeiros Dantas, M.D.; Rodrigo Maranguape S Cunha, M.D.; Maria Fátima S Teixeira, PhD; Maria Gleiciane Q Martins, student biology; Roberta Lomonte L Brito, M.D.; Aryana L V L Feitosa, M.D.; Suzana A. C Araújo, PhD; Valeska Shelda P Melo, PhD; Cinthia M M Caminha, student veterinary medicine; Igor C Barroso, student veterinary medicine; Apoliana S Rodrigues, Graduated; Daniel Brito, Graduated; Raymundo R Pinheiro, PhD; Alice Andrioli, PhD

Abstract: Caprine Arthritis-Encephalitis virus is lentivirus responsible for causing a chronic, debilitating disease in goats. The objective was production the recombinant protein p28 of caprine lentivirus and expression em E.coli. The gene coding for the major core protein (p28) the caprine lentivirus was subcloned in pET32b plasmid e expression in E. coli BL21 for induction by 0,5, 1 e 3 mM of Isopropyl β -D-1-thiogalactopyranoside for until 5 hours and at 37°C and room temperature. Realized desnaturing electrophoresis and immunoblotting to analised expression. The best condition to expression p28 recombinant was room temperature and 1mM Isopropyl β -D-1-thiogalactopyranoside after 2 hours of induction.

Anexo 5- Comprovante do revisor do inglês

Declaro para os devidos fins que eu, Adrienne Elizabeth Hurley, britânica residente permanente no Brasil, Registro Nacional de Estrangeiro W 671367-I, CPF 869254159-15, efetuei a tradução para a língua inglesa do artigo “Clonagem e expressão da proteína p28 recombinante do vírus da Artrite Encefalite Caprina”, e também o resumo da tese, ambos da autoria da Tânia Valeska Medeiros Dantas.



Adrienne Elizabeth Hurley

12 de janeiro 2010

Rio Verde, GO

Livros Grátis

(<http://www.livrosgratis.com.br>)

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)
[Baixar livros de Matemática](#)
[Baixar livros de Medicina](#)
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)
[Baixar livros de Meteorologia](#)
[Baixar Monografias e TCC](#)
[Baixar livros Multidisciplinar](#)
[Baixar livros de Música](#)
[Baixar livros de Psicologia](#)
[Baixar livros de Química](#)
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)
[Baixar livros de Serviço Social](#)
[Baixar livros de Sociologia](#)
[Baixar livros de Teologia](#)
[Baixar livros de Trabalho](#)
[Baixar livros de Turismo](#)