

Universidade Estadual do Ceará  
Aryana Lushese Vasconcelos Lima Feitosa

# ANÁLISE FILOGENÉTICA DE LENTIVÍRUS DE PEQUENOS RUMINANTES ISOLADOS DO CEARÁ

Fortaleza – Ceará

2007

Universidade Estadual do Ceará  
Aryana Lushese Vasconcelos Lima Feitosa

## ANÁLISE FILOGENÉTICA DE LENTIVÍRUS DE PEQUENOS RUMINANTES ISOLADOS DO CEARÁ

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinária, da Universidade Estadual do Ceará, como requisito parcial para obtenção do grau de mestre em Ciências Veterinárias.  
Área de Concentração: Reprodução e Sanidade em Pequenos Ruminantes.

Orientadora: Diana Célia Sousa Nunes Pinheiro.

Fortaleza – Ceará

2007

**Universidade Estadual do Ceará**  
**Curso de Mestrado Acadêmico em Ciências Veterinárias**

**Título do Trabalho:** Análise Filogenética de Lentivírus de Pequenos Ruminantes isolados do Ceará.

**Autora:** Aryana Lushese Vasconcelos Lima Feitosa

Defesa em 17/12/2007

Conceito obtido: \_\_\_\_\_

**Banca Examinadora**

---

Diana Célia Sousa Nunes Pinheiro  
Orientadora

---

Maria Fátima da Silva Teixeira, Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>.  
Co-Orientadora

---

Raymundo Rizaldo Pinheiro, Prof. Dr.  
Co-Orientador/Examinador

---

Examinador

---

Examinador

Aos meus irmãos  
Luana, Ilana (*in memoriam*), Túlio,  
Marilza e Sócrates

## **AGRADECIMENTOS**

À UECE e ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias que propiciou a realização deste projeto.

À Embrapa e ao Centro Nacional de Pesquisa em Caprinos que disponibilizou as condições técnicas e pessoal para a realização deste trabalho.

Ao Núcleo de Biotecnologia de Sobral, NUBIS-UEVA, que disponibilizou infra-estrutura, reagentes, equipamentos e pessoal.

À CAPES, FUNCAP e ao Banco do Nordeste pelo auxílio financeiro que possibilitou a realização deste trabalho

## AGRADECIMENTOS

A Deus pela força nos momentos difíceis.

Aos meus pais Jauneval e Irlene pelo carinho.

À Profa. Diana Célia Sousa Nunes Pinheiro pela orientação, amizade e exemplo profissional.

À Profa. Maria Fátima Teixeira, pela orientação, confiança e exemplo profissional.

Ao Dr. Raymundo Rizaldo Pinheiro por ter me iniciado na pesquisa e pelos ensinamentos e Dra. Alice Andrioli que juntos me propiciaram imensurável apoio neste trabalho.

Ao Professor Rodrigo Maranguape – NUBIS-UEVA, que disponibilizou infra-estrutura, reagentes e equipamentos, além de transmitir todos os seus conhecimentos de biologia molecular.

Ao Dr. João Paulo Matos – Departamento de Bioquímica da UFC, que me ajudou com as análises de DNA na área de bioinformática

Aos amigos do Labovir Tânia (sempre resolvendo todos os problemas com eficiência), Suzana, Edmara, Valeska, Neilson, Esmale, Cinthia, Aline, Igor pelo auxílio no trabalho e pela amizade.

Aos laboratoristas Osmarilda, Ricardo e Auxiliadora pelo suporte técnico.

Aos colegas de laboratório da Embrapa Caprinos Kelma e Maria Alzira, pela colaboração na realização deste trabalho.

Ao colega do NUGEN, Michel Kamimura pelo apoio no laboratório.

Aos meus irmãos Luana e Túlio pelo carinho.

Ao meu namorado Leonardo Ellery Marinho pelo amor e apoio.

Aos amigos que me acolheram em Fortaleza, Helenira Ellery e João Batista Marinho e em Sobral, Isana Mara, Juracy e Bartolomeu.

Aos meus amigos, Dayane Lima, Mendes Júnior, Germana Ellery, Viviane Saraiva e Dulce Feitosa pelas horas de descontração e amizade.

O meu mais sincero obrigado a vocês.

*Ainda que eu tivesse o dom da profecia, o conhecimento de todos os mistérios e de toda a ciência, ainda que eu tivesse toda a fé, a ponto de transportar montanhas, se não tivesse amor, eu nada seria.*

I Coríntios 13

## RESUMO

CAEV e MVV têm sido considerados geneticamente distintos, mas antígenicamente relacionados como patógenos de caprinos e ovinos. Além disso, foi demonstrado que estes vírus estão constantes e facilmente transgredindo a barreira entre caprinos e ovinos, com lentivirus CAEV infectando ovinos e lentivirus MVV infectando caprinos (Valas et al., 2000; Karr et al., 1996; Shah et al., 2004). Assim como todos os lentivírus, o genoma de CAEV tem uma alta taxa de mutação e o seu grau de heterogeneidade pode estar relacionado com a baixa fidelidade de transcriptase reversa, que carece da atividade de leitura da enzima exonuclease. A análise genética de Lentivírus de Pequenos Ruminantes (LVPRs) poderá ajudar a compreender a genética, proteínas e antigenicidade destes vírus; sua patogênese, epidemiologia, relações filogenéticas e, assim, a sua inclusão nos subgrupos de LVPRs recentemente criado (Shah et al., 2004a). Também pode ser relevante para o desenvolvimento de testes de diagnósticos sensíveis à raça local. A aplicação da análise filogenética para sequências de CAEV e MVV é de crucial importância para a análise epidemiológica de infecções por LVPRs e para estudar possíveis diferenças na virulência entre estirpes de LVPRs circulantes. O principal objetivo deste trabalho foi estabelecer a filogenia de LVPRs como base para futuros estudos em epidemiologia molecular de lentivirais de pequenos ruminantes no Nordeste do Brasil em caprinos de rebanho leiteiro, com particular interesse no acompanhamento dos efeitos dos programas de erradicação em curso e futuros sobre a distribuição linhagens de LVPRs.

Neste estudo, 250 caprinos foram analisados utilizando a técnica de IDGA, a soroprevalência deste rebanho foi de 4,4% de positivos. Seis caprinos positivos por IDGA com ou sem alteração nas articulações foram analisados por PCR, que amplificou parte do gene *gag*. Todos os animais foram positivos, apesar de três deles não terem sinais clínicos ou alteração nas articulações. Nós seqüenciamos o gene *gag* de quatro lentivírus isolados do nordeste do Brasil de caprinos naturalmente infectados. Comparações de pareamentos entre sequências do gene *gag* de linhagens brasileiras com sequências do GenBank demonstraram que nossas sequências estão mais relacionadas com linhagens caprinas que ovinas. Outras análises filogenéticas do gene *gag* confirmaram sua classificação inicial e mostraram que eles constituem o subtipo B1 do grupo de CAEV. A análise das sequências também mostrou que os vírus permaneceram geneticamente estáveis, apesar do tempo de evolução estar estimado em 20 anos. Neste artigo nós também indicamos que futuros estudos filogenéticos devem ser realizados com sequências *pol* ou *env*, pois a região *gag*, por ser altamente preservada, retém menos sinais filogenéticos.



## ABSTRACT

CAEV and MVV have been considered as genetically distinct but antigenically related pathogens of goats and sheep. Indeed, it was demonstrated that these viruses are constantly and easily transgressing the species barrier between goats and sheep ending with sheep harboring CAEV-like lentiviruses and goats infected with MVV-like viruses (Valas et al., 2000; Karr et al., 1996; Shah et al., 2004). Like all lentiviruses, CAEV genome has a high mutation rate and the extent of its heterogeneity may be related to low fidelity of reverse transcriptase which lacks the proof reading exonuclease activity. A genetic analysis of these SRLV may further help to understand the genetic, proteic and antigenic make-up of these viruses; their pathogenesis, epidemiology, phylogenetic relationships; and thus, their allocation into the recently established SRLV groups (Shah et al., 2004a). It may also be relevant for developing local-breed sensitive diagnostic tests. The application of phylogenetic analysis to CAEV and MVV sequences is of pivotal importance for this type of epidemiological analysis of SRLV infections in small ruminants and to study potential differences in virulence between circulating SRLV strains. The principal aim of this work was to establish a SRLV phylogeny as a basis for future studies of the molecular epidemiology of lentiviral infections in Northeast of Brazil dairy goat herds, with particular interest in monitoring the effects of ongoing and future eradication programs on the distribution of SRLV strains.

In this study, one flock of 250 goat was analyzed using AGID, the seroprevalence in these flocks was 4,4% of positive tested sera. Six goats positive to AGID with and without alteration in the knee joint were analyzed using a PCR, which amplifies part of the *gag* gene. All the animals were found to be positive, despite the fact that three no had clinical signs or alteration in the knee joint. We determined the nucleotide sequences of *gag* gene from 4 Brazilian lentivirus isolates from naturally infected goats. Pairwise comparisons between the four *gag* gene sequence Brazil SRLV strains with the GenBank, demonstrating our sequences were closer to the caprine rather than the ovine strains. Further phylogenetic analysis of the proviral *gag* sequences confirmed the initial classification and showed that they constituted the Sbtipo B1 of the CAEV group. The sequence analyses also showed that the virus had remained genetically relatively stable, in spite of the time given for virus evolution, an estimated 20 years. In this paper, we indicate that future phylogenetic studies should rather be done on the *pol* or *env* regions than in the *gag* region, by be highly preserved retains less phylogenetic signal.

---

**LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS**


---

<b>Sigla</b>	<b>Nome</b>
$\mu\text{g}$	Micrograma
$\mu\text{L}$	Microlitro
ADCC	Citotoxicidade celular dependente de anticorpo
Ag	Antígeno
AIEV	Vírus da Anemia Infecciosa Equina
AP	Ativador de proteína
APC	Artrite progressiva caprina
AR	Artrite reumatóide
BIV	Vírus da Imunodeficiência Bovina
C-	Controle Negativo
CA	Proteína do capsídeo
CAE	Artrite Encefalite Caprina
CAEV	Vírus da Artrite Encefalite Caprina
CAEV-Co	Cepa padrão de Caprinos publicada por Cork
CE	Ceará
<i>c-fos</i>	Fator celular presente nos macrófagos que participa da ativação viral
<i>c-jun</i>	Fator celular presente nos macrófagos que participa da ativação viral
CO <sub>2</sub>	Dióxido de carbono
CPE	Efeito Citopático
DNA	Ácido desoxirribonucléico
dNTP	Desoxinucleotídeo trifosfato
dUTPase	Enzima codificada pelo gene <i>pol</i>
ECP	Efeito citopático
EDTA	Ethylenediaminetetraacetic acid
ELISA	Enzyme-linked immunosorbent assay
EMBRAPA	Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária
<i>env</i>	Gene que codifica as proteínas do envelope viral

<b>Sigla</b>	<b>Nome</b>
FIV	Vírus da Imunodeficiência Felina
g	Unidade da força centrífuga relativa
<i>gag</i>	Gene viral que codifica as proteínas interna dos vírus
Genbank	Banco de dados genéticos
gp	Glicoproteína
GM-CSF	Granulocyte macrophage colony-stimulating factor
GSM	Membrana Sinovial Caprina
HCl	Ácido Clorídrico
HIS	Hibridização <i>in situ</i>
HIV	Vírus da Imunodeficiência Humana
HMA	Ensaio de Mobilidade do Heteroduplex
IAC	Índice articular clínico
IDGA	Imunodifusão em gel de Agar
IFN	Interferon
IFN- $\gamma$	Interferon gama
IgG1	Imunoglobulina G1
IL	Interleucina
INT	Integrase
KCl	Cloreto de Potássio
KDa	Kilodaltons
L	Litro
LABOVIR	Laboratório de Virologia
LTNP	Long-term nonprogressor
LTR	Seqüências longas repetidas
LVC	Lentivírus caprino
LVO	Lentivírus ovino
LVPR	Lentivírus de pequenos ruminantes
M	Molar
M1P-1h	Proteína inflamatória do macrófago 1-beta

<b>Sigla</b>	<b>Nome</b>
mA	Mili-Ampére
MA	Proteína da Matriz
MCP-1	Proteína quimiotática do monócito-1
ME	Microscópio eletrônico
MEM	Meio Essencial Mínimo
Mg <sup>2+</sup>	Magnésio
MgCl <sub>2</sub>	Cloreto de magnésio
MHC	Complexo de Histocompatibilidade
MIN	Minuto
mL	Mililitros
mM	mili-molar
MSC	Membrana sinovial caprina
MV	Maedi Visna
MVV	Vírus Maedi-Visna
NaCl	Cloreto de Sódio
NC	Nucleocapsídeo
NC	Proteína do nucleocapsídeo
ng	nanograma
nm	nanômetro
NUBIS	Núcleo de Biotecnologia de Sobral
°C	Graus Celsius
OIE	Organização Internacional de Epizootias
OPPV	Vírus da pneumonia progressiva ovina
ORF	Pequena região do genoma viral
pb	Pares de bases
PBLs	Leucócitos do sangue periférico
PBS	Solução de tampão de fosfato
PBS-T	PBS-Tween-20
PCR	Reação em cadeia da Polimerase

<b>Sigla</b>	<b>Nome</b>
PM	Peso Molecular
<i>pol</i>	Gene que codifica as enzimas virais
PPGCV	Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias
PPO	Pneumonia Progressiva Ovina
Pr	Precursor
RANTES	Ativação regulada, normal T expressada e secretada
<i>rev</i>	Gene de regulação viral
RFLP	Restriction length polymorfism
RIFA	Reação de imunofluorescência Indireta
RIFI	Reação de Imunofluorescência indireta
RNA	Ácido ribonucléico
RNAm	RNA mensageiro
RNAt	RNA transportador
rpm	Rotação por minuto
RT-PCR	PCR utilizando a transcriptase reversa
RU3	Região única não traduzida na extremidade 3'
RU5	Região única não traduzida na extremidade 5'
SFB	Soro fetal bovino
SIV	Vírus da imunodeficiência símia
SNC	Sistema nervoso central
SU	Glicoproteína de superfície
TAE	Tampão Tris-acetato e EDTA
Taq	DNA Taq Polimerase
<i>tat</i>	Gene de regulação viral
Th-1	Linfócitos T auxiliares do subtipo 1
Th-2	Linfócitos T auxiliares do subtipo 2
TM	Glicoproteína transmembrânica
TNF- $\alpha$	Fator de necrose tumoral alfa
TR	Transcriptase reversa
Tris	Trisma

<b>Sigla</b>	<b>Nome</b>
U	Unidade
U3	upstream 3`
UECE	Universidade Estadual do Ceará
UFC	Universidade Federal do Ceará
UV	Ultra-violeta
<i>vif</i>	Gene de regulação viral
VPPO	Vírus da pneumonia progressiva ovina
ZP	Zona Pelúcida

**LISTA DE FIGURAS E TABELAS**

Figura 1	.....	<b>22</b>
Figura 2	.....	<b>24</b>
Figura 3	.....	<b>31</b>
Fig. 1 (Artigo)	.....	<b>52</b>
Fig. 2 (Artigo)	.....	<b>53</b>
Fig. 3 (Artigo)	.....	<b>56</b>
Fig. 4 (Artigo)	.....	<b>56</b>
Tabela 1	.....	<b>51</b>
Tabela 2	.....	<b>59</b>
Tabela 3	.....	<b>59</b>

---

**SUMÁRIO**


---

	<b>RESUMO.....</b>	<b>08</b>
	<b>ABSTRACT.....</b>	<b>09</b>
	<b>LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS.....</b>	<b>10</b>
	<b>LISTA DE FIGURAS E TABELAS.....</b>	<b>15</b>
<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO.....</b>	<b>17</b>
<b>2</b>	<b>REVISÃO DE LITERATURA.....</b>	<b>20</b>
2.1	Histórico .....	20
2.2	Agente Etiológico, Estrutura e Genoma dos vírus.....	21
2.3	Tropismo, Replicação e Infectividade Viral.....	25
2.4	Heterogeneidade Genética.....	32
2.5	Proteoma.....	37
2.6	Epidemiologia.....	39
2.7	Transmissão.....	40
2.8	Diagnóstico Molecular.....	41
2.8.1	Reação em Cadeia de Polimerase (PCR).....	41
2.9	Lentivírus como vetores para transferência de genes.....	43
<b>3</b>	<b>JUSTIFICATIVA.....</b>	<b>44</b>
<b>4</b>	<b>OBJETIVOS.....</b>	<b>45</b>
4.1	Objetivo Geral.....	45
4.2	Objetivos Específicos.....	45
<b>5</b>	<b>CAPÍTULO 1 - Phylogenetic analysis of small ruminant lentiviruses from Northern Brazil.....</b>	<b>46</b>
<b>6</b>	<b>CONCLUSÃO.....</b>	<b>62</b>
<b>7</b>	<b>PERSPECTIVAS.....</b>	<b>63</b>
<b>8</b>	<b>REFERÊNCIAS GERAIS.....</b>	<b>64</b>
<b>9</b>	<b>GLOSSÁRIO.....</b>	<b>83</b>



## 1. INTRODUÇÃO

O fortalecimento da ovinocultura nacional demanda crescentes investimentos e avanços tecnológicos para os seus diversos segmentos, ou seja, produção, sanidade, processamento dos seus produtos e comercialização. Na tentativa de melhorar o rebanho e introduzir animais de alta qualidade, o Brasil teve que importar esses animais. No entanto, a importação de ovinos e caprinos de alta linhagem provocou a introdução e disseminação de Lentivíroses no rebanho nacional, pois alguns países exportadores apresentavam uma alta prevalência desses agentes, provocadores de enfermidades graves, comprometendo o desempenho animal.

Os lentivírus de pequenos ruminantes compreendem, basicamente, dois grupos filogenéticos, cujos protótipos são os vírus Maedi-Visna de ovinos (MVV) e os vírus da artrite encefalite caprina (CAEV).

Os lentivírus acarretam grandes perdas econômicas tanto nos rebanhos ovinos quanto caprinos, afetando animais de diferentes raças, idades e sexo. Os prejuízos econômicos se caracterizam por morte de animais jovens, diminuição da produção láctea e perda de peso dos adultos devido a dificuldades de locomoção. Danos indiretos importantes decorrem da desvalorização dos rebanhos, reposição precoce de animais, despesas com medidas de controle e barreiras comerciais para produtos (matrizes, reprodutores e sêmen). Porém, pouca ênfase é dada ao controle de doenças infecciosas, especialmente Maedi-Visna (MV) e Artrite Encefalite Caprina (CAE). Se por um lado à manutenção de animais infectados no rebanho representa sérios prejuízos econômicos, o sacrifício de todos os animais infectados é, muitas vezes, inviável, pois grande parte do rebanho pode estar acometida, além de representar perda de material genético. Desta forma, tem sido implantados programas de controle visando à obtenção de crias destes animais enfermos antes de descartá-los (GOUVEIA et al., 1994).

Esta doença tem se disseminado pelo país em grande parte devido ao desconhecimento do grau de comprometimento dos rebanhos e da dificuldade de acesso ao diagnóstico. Em levantamento soro epidemiológico utilizando a técnica de IDGA feito por ALMEIDA E TEIXEIRA (1999) mostrou que no rebanho cearense, 31,61% dos animais avaliados foram positivos para o Maedi-Visna.

As resoluções 65/94 e 66/94 do Mercosul obrigam que os países membros do bloco certifiquem-se, em caso de exportação e importação de ovinos e caprinos, que o país de origem dos animais seja livre de MVV e CAEV por pelo menos três anos. Estas normas sanitárias enfatizam a importância econômica de controle e erradicação destas enfermidades (PINHEIRO, 2001).

Ainda não existe tratamento e nem vacina para esta enfermidade. Para o controle dos lentivírus, faz-se necessária a realização periódica de testes nos rebanhos o mais precoce possível, além da separação ou descarte dos animais soropositivos.

Os lentivírus estão amplamente distribuídos entre ovinos e caprinos no mundo. Diferentes formas da doença têm sido descritas entre os pequenos ruminantes infectados com lentivírus. Estes sintomas incluem artrite em caprinos jovens, pneumonia, mamite e recentemente a forma nervosa da doença em ovinos (BENAVIDES et al., 2006).

CAEV e MVV têm sido considerados geneticamente distintos, mas antigenicamente relacionados. Além disso, foi demonstrado que estes vírus estão constantemente transpondo a barreira específica entre caprinos e ovinos, com ovinos sendo infectados com lentivírus CAEV e caprinos com os vírus MVV (VALAS et al., 2000; KARR et al., 1996; SHAH et al., 2004b; GREGO et al., 2002).

De acordo com a nomenclatura proposta recentemente, baseada nas seqüências *gag* e *pol*, os lentivírus estão classificados em quatro grupos equidistantes, A-D (SHAH et al., 2004a). Em relação às diferenças em órgãos alvos, tropismo celular e patogenicidade, comumente encontrado entre CAEV e MVV, ambos têm sido recentemente designados como um simples grupo, os lentivírus de pequenos ruminantes (LVPR).

Entre as duas regiões terminais não-codificantes, altamente conservadas (“long terminal repeats” ou “LTRs”) estão os genes que codificam as proteínas estruturais (*gag*), um precursor que é posteriormente clivado em três proteínas principais: matriz (MA), capsídeo (CA) e nucleocapsídeo (NC) (PEPIN et al., 1998), e o gene (*env*), que codifica as glicoproteínas de superfície (SU) e transmembranária (TM) e enzimas virais.

O gene *pol* codifica as proteínas de atividade enzimática: transcriptase reversa, protease, integrase e dUTPase, além de pequenos ORFs (“open reading frames”) ou fases abertas de leitura, que codificam proteínas que regulam a expressão gênica como os genes

acessórios (*tat*, *vif*), (ou Q) e (*rev*), codificantes de proteínas de regulação da expressão viral (CLEMENTS E PAYNE 1994).

Os genes *gag* e *pol* são os mais conservados, enquanto o gene *env* é altamente heterogêneo (NARAYAN E CLEMENTS, 1989). Como todos os lentivírus, o genoma do CAEV tem uma alta mutação e o grau de sua heterogeneidade pode estar relacionado com a baixa fidelidade da transcriptase reversa que carece da atividade de leitura da enzima exonuclease 3'-5', favorecendo essas mutações.

A análise genética destes LVPR pode ajudar a entender as propriedades genéticas, protéicas e antigênicas desses vírus, sua patogênese, epidemiologia e relacionamento filogenético e, além disso, sua localização nos grupos recentemente estabelecidos (SHAH et al., 2004a). Isto também pode ser relevante para o desenvolvimento de testes de diagnósticos sensíveis em rebanhos locais.

A ampla distribuição destes vírus em certas regiões e as perdas econômicas resultantes têm levado a programas de erradicação com base na segregação dos vírus de caprinos e ovinos em vários países (GREENWOOD et al., 1995; HOUWERS et al., 1987; PERETZ et al., 1994; ROWE and EAST, 1997; SCHEER-CZECHOWSKI et al., 2000). A aplicação da análise filogenética para seqüências de CAEV e MVV é de imensa importância para este tipo de análise epidemiológica de infecções por lentivírus de pequenos ruminantes e também para estudar as diferenças de virulência entre linhagens de LVPR circulantes.

## 2 - REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1 - Histórico

A síndrome Artrite-encefalite caprina (CAE) foi inicialmente descrita nos Estados Unidos da América, sob a forma clínica de leucoencefalomielite em cabritos e o vírus foi isolado em 1980, por CRAWFORD e colaboradores em *explants* de membrana sinovial de um caprino adulto com artrite.

Maedi-Visna (MV) ou Pneumonia Progressiva Ovina (PPO) foi uma das primeiras doenças denominadas como infecção lenta (SIGURDSSON, 1954). Os dois nomes são de origem islandesa: *Maedi*, que significa dispnéia e é caracterizada por pneumonia intersticial progressiva, e *Visna*, que quer dizer “desorientação”, caracterizada por leucoencefalomielite (DAWSON, 1980). Inicialmente Maedi-Visna foi reconhecida como duas entidades distintas.

O primeiro isolado de MVV foi feito por SIGURDSSON et al. (1960) a partir do Sistema Nervoso Central (SNC) de ovinos. Quando as primeiras amostras dos vírus foram isoladas de ovinos infectados com Visna e Maedi (SIGURDARDÓTTIR E THOMAR, 1964), foi observada similaridade entre esses vírus. Posteriormente estudos revelaram que tanto Maedi quanto Visna eram doenças causadas pelo mesmo agente, originando assim a denominação Maedi-Visna ou MV. Os vírus foram introduzidos através da importação, de ovinos Karakul da Alemanha em 1933, para melhorar rebanhos da Islândia, mas esta raça também introduziu a adenomatose pulmonar, paratuberculose e visna.

Os primeiros relatos da doença com sinais clínicos semelhantes à Maedi-Visna ocorreram na África do Sul em 1915 e, posteriormente, nos Estados Unidos em 1923. A doença foi observada, mais tarde, em outras regiões do mundo, sendo a síndrome respiratória de maior prevalência. Na Holanda esta enfermidade recebeu o nome de Zwoergerziekte (DE BÔER, 1975; HOUWERS, 1985), Na África do Sul, recebeu o nome de Jaagsiekte (VERWOERD et al., 1983) e nos Estados Unidos, de Pneumonia Progressiva Ovina (PPO) e Doença Pulmonar da Montanha (CUTLIP E LAIRD, 1976).

## 2.2 - Agente Etiológico, Estrutura e Genoma dos vírus

O Maedi-Visna (MV) é um vírus que afeta ovinos e os vírus da artrite encefalite caprina (CAEV) afeta caprinos, pertencem à família Retroviridae e ao gênero *Lentivirus* (PASICK, 1998). Os outros vírus de interesse veterinário e humano também pertencem a este gênero, como os vírus da Anemia Infecciosa Equina (AIEV), da Artrite Encefalite Caprina (CAEV), da Doença de Jembrana e das imunodeficiências humana (HIV), bovina (BIV), felina (FIV) e símia (SIV). São complexos e não oncogênicos. Esses vírus geralmente limitam a infecção a um simples hospedeiro, levando a sérios problemas ou à morte; multiplicam-se também em células em repouso (não ativadas); infectam monócitos, macrófagos e/ou linfócitos, causando infecção persistente e multi-sistêmica (AIEV, MVV e CAEV), associada a síndrome de imunodeficiência (SIV, HIV e FIV); com altas taxas de mutação, com conseqüente diversidade genotípica, fenotípica e antigênica (CLEMENTS E PAYNE, 1994; GONDA, 1994; REISCHAK, 2000; PINHEIRO, 2001).

De acordo com a nomenclatura proposta recentemente, baseada nas seqüências *gag* e *pol*, os lentivírus estão classificados em quatro grupos equidistantes, A-D (SHAH et al., 2004a). O grupo A pode ser subdividido em sete subtipos A1-A7, onde o subtipo A1 é identificado pelos vírus Maedi-Visna por ser genética e geograficamente heterogêneos e o grupo B, refere-se ao tipo CAEV e compreende apenas dois subtipos distintos, B1 e B2. Os grupos C e D são representados por poucos isolados ou reconhecidos apenas pela seqüência *pol* (SHAH et al., 2004a).

Recentemente, evidências diretas de transmissão natural de ovinos para caprinos e vice-versa, particularmente dos subtipos A4 e B1 dos vírus tem sido relatada (SHAH et al., 2004b; PISONI et al., 2005). Estudos subseqüentes baseados em seqüências parciais dos genes *gag*, *pol* e *env*, mostraram que estes vírus de ovinos e caprinos estão entremeando na árvore filogenética independente do hospedeiro, sugerindo que as infecções interespecies têm ocorrido entre os animais hospedeiros (CHEBLOUNE et al., 1996; LEROUX et al., 1997; ZANONI, 1998; CASTRO et al., 1999; GREGO et al., 2002; ROLLAND et al., 2002; SHAH et al., 2004a;).

Os Vírus da MV e CAE, como os demais lentivírus apresentam-se como vírions envelopados, com diâmetro de 80 a 100 nm, núcleo cônico e denso, contendo duas

moléculas idênticas de RNA fita simples, não complementares, unidas por pontes de hidrogênio, de polaridade positiva, com aproximadamente 9000 a 10000 pares de bases, 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). A matriz (MA) também é outra estrutura presente na partícula viral e esta está situada entre o capsídeo e o envelope (PEPIN et al., 1998). São pleomórficos, esferóides e têm uma densidade buoyant de 1,14 a 1,18 g/mL (CLEMENTS et al., 1980), apresentando uma grande quantidade de ácidos siálicos em sua superfície (HUSO et al., 1988).

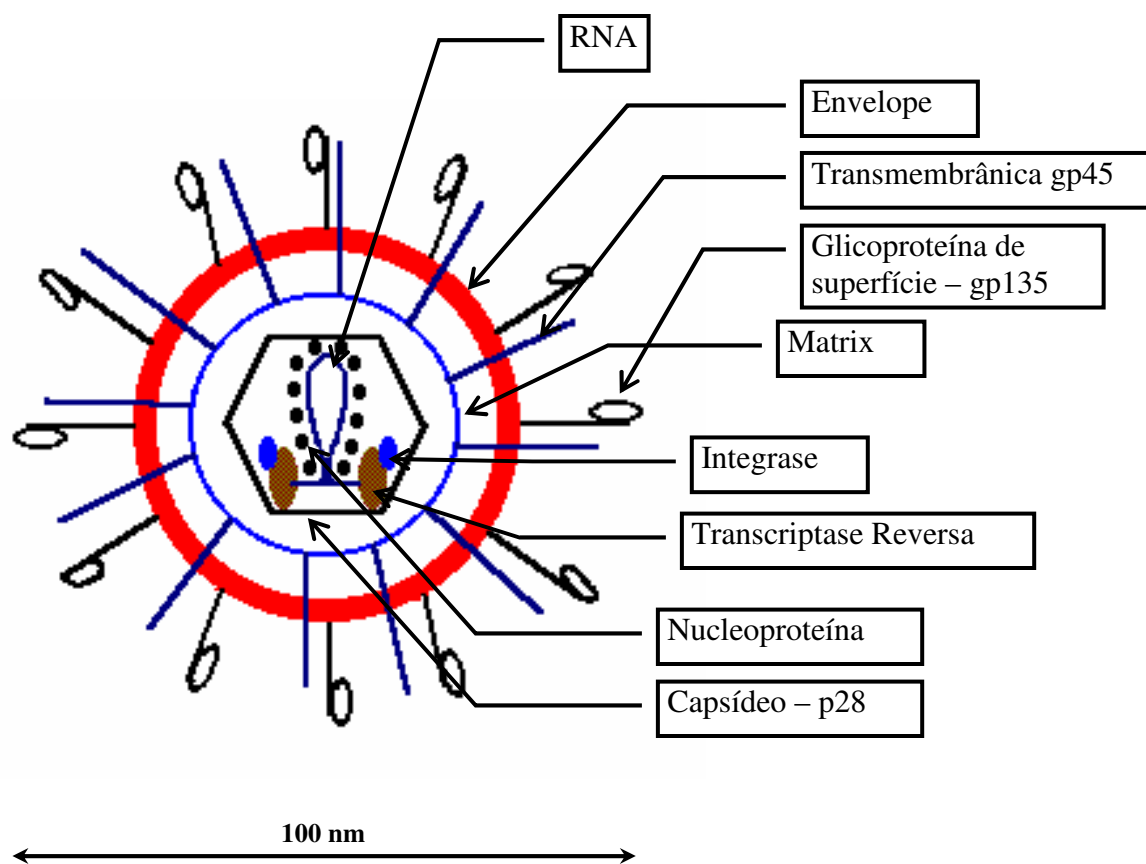


Figura 01 - Estrutura dos vírus da artrite encefalite caprina (COFFIN, 1996). Adaptado por Pinheiro (2001).

O genoma é composto por genes estruturais (*gag*, *env* e *pol*), genes de regulação (*tat*, *rev* e *vif*) e por duas regiões não traduzidas, únicas, situadas nas extremidades 5' (RU5) e 3' (RU3), que apresentam elementos promotores da transcrição do RNA viral. O DNA

proviral resultante da retrotranscrição apresenta duas regiões terminais não codificadoras (LTR – *long terminal repeat*).

Os genes estruturais dispostos da extremidade 5' para 3' do genoma (Figura 2) são *gag*, *pol* e *env*, além de pequenas ORF (*open reading frames*): *tat*, *rev* e *vif* codificadoras para proteínas reguladoras (CLEMENT E PAYNE, 1994; GONDA, 1994).

O genoma completo da linhagem de CAEV-Co dos Estados Unidos é considerado o protótipo de lentivirus caprino, este já foi clonado e a seqüência de DNA proviral foi determinada (SALTARELLI, 1990). Seqüências nucleotídicas completas e parciais de muitos outros lentivírus têm sido recentemente determinadas a partir de isolados de caprinos e ovinos como as do Sul do Brasil, Irlanda, Estados Unidos, Suíça, Grécia, França, Espanha, Itália, Finlândia, Polônia e Noruega (RAVAZZOLO, 2001; ROLLAND, 2002; ABELSON, 2003; HERRMANN et al., 2004; SHAH, 2004; ANGELOPOULOU, 2005; PISONI, 2005; GERMAIN, 2006; REINA, 2006; CONTRERAS, 2006; PISONI, 2006; LAAMANEN, 2007; KUZMAK, 2007; GJERSET et al., 2007).

A transcrição e o genoma viral iniciam um papel crucial no ciclo de vida dos vírus, como prover o molde para a síntese de proteínas estruturais e regulatórias, resultando na geração de novas cópias de RNA viral. A transcrição é regulada pela ligação de várias proteínas celulares à seqüência de DNA. Vários estudos têm demonstrado que AP-1 e AP-4 liga-se a sítios, que estão localizados na região promotora U3 da LTR, tendo um papel central na regulação e transcrição viral (BARROS et al., 2004, 2005; CAMPBELL and AVERY, 1996; GABUZDA et al., 1989; GDOVIN and CLEMENTS, 1992; HESS et al., 1986; SUTTON et al., 1997).

Depois da transcrição reversa mediada pela transcriptase viral, o DNA resultante (provírus) apresenta duas regiões terminais não-codificantes, altamente conservadas (“long terminal repeats” ou “LTRs”) (ZANONI et al., 1992). Entre estas duas regiões não-codificantes estão os genes que codificam as proteínas estruturais (*gag*), um precursor que é posteriormente clivado em três proteínas principais: matriz (MA), capsídeo (CA) e nucleocapsídeo (NC) (PEPIN et al., 1998), e o gene (*env*), que codifica as glicoproteínas de superfície (SU) e transmembranária (TM) e enzimas virais. O gene (*pol*) que codifica as proteínas de atividade enzimática: transcriptase reversa, protease, integrase e dUTPase,

além de pequenos ORFs (“*open reading frames*”) ou fases abertas de leitura, que codificam proteínas que regulam a expressão gênica como os genes acessórios (*tat*, *vif*), (ou Q) e (*rev*), codificantes de proteínas de regulação da expressão viral (CLEMENTS E PAYNE 1994) (Figura 02). Estas proteínas não se encontram nos vírus e somente são traduzidas durante a replicação viral, na qual participam ativamente. Os genes *gag* e *pol* são os mais conservados, enquanto o gene *env* é altamente heterogêneo (NARAYAN E CLEMENTS, 1989).

Estes genes, únicos de lentivírus, apresentam um nucleotídeo ou aminoácido homólogo diferenciando as várias lentiviroses, no entanto, suas funções são preservadas (CLEMENTS E PAYNE, 1994). Os genes estruturais (*gag* e *env*) e enzimáticos (*pol*) são típicos da família Retroviridae.

As proteínas do gene *gag* são originadas de vários polipeptídios intermediários derivados do precursor pr55kDa que origina inicialmente o precursor pr47kDa, de curta duração e dá origem às proteínas: p28, p19 e p16. As proteínas do gene *env* são originadas de uma glicosilação translacional do precursor pr90kDa que dá origem ao precursor pr150kDa, que origina, por um processo de clivagem, as glicoproteínas de superfície (gp135 e/ou gp90) e a transmembrânica (gp45) (CHEEVERS et al., 1988). As enzimas utilizadas na replicação viral são codificadas pelo gene *pol* sendo que a protease é responsável pelas clivagens dos produtos dos genes *gag* e *pol*, a transcriptase reversa é responsável pela transcrição do RNA genômico em DNA fita dupla e a integrase coordena a integração do DNA viral ao genoma da célula hospedeira (TAVARES E PEREIRA, 1999).

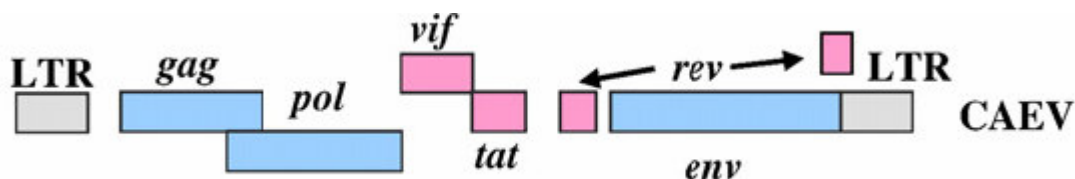


Figura. 02. Representação esquemática da estrutura do provírus de LVPRs. LTR – *long terminal repeat*. Adaptado de BOUZAR et al., 2003.

Uma comparação das seqüências de lentivírus com algumas seqüências encontradas em banco de dados revelou que ao contrário do CAEV, todos os protótipos de MVV contêm uma deleção de seis nucleotídeos na região do gene *gag* resultando na deleção de dois resíduos de aminoácidos na região central do capsídeo. Este deleção poderia ser



utilizada como marcador em análises de LVPRs, especialmente quando se considerar uma possível transmissão de lentivírus entre caprinos e ovinos (RAVAZZOLO, 2001).

### **2.3 - Tropismo, Replicação e Infectividade Viral**

Os lentivírus de pequenos ruminantes têm tropismo para as células da linhagem monocito-fagocitária. Nestas células, a expressão viral está estreitamente associada à diferenciação e maturação dos monócitos em macrófagos (GENDELMAN et al., 1986; NARAYAN et al., 1983).

Os lentivírus infectam células da linhagem dos macrófagos, incluindo microglia, astrócitos, e oligodendrócitos, assim como os tipos I e II de pneumócitos, fibroblastos e células epideliais e endoteliais (SANNA et al., 1999; CARROZZA et al., 2003; CHI et al., 2000).

Células epiteliais do leite de caprinos têm demonstrado susceptibilidade à infecção com CAEV tanto *in vitro* quanto *in vivo* (MSELLI-LAKHAL et al., 1999). Estes vírus podem ser detectados por hibridização *in situ* e ou por métodos de imunohistoquímica em drenagem de nódulos linfáticos, porém a frequência de células infectadas é baixa, sugerindo que apenas a minoria das células são infectadas (BLACKLAWS et al., 1995; CARROZZA et al., 2003; GROSSI et al., 2005; LECHNER et al., 1997; STORSET et al., 1997).

*In vivo*, infectam principalmente células do sistema monócitos-fagocitário, sendo os macrófagos a grande maioria das células infectadas (NARAYAN E CLEMENTS, 1989; LUJÁN et al., 1994; BRODIE et al., 1995; DE LA CONCHA-BERMEJILLO. 1997). A infecção das células depende da presença de receptores para os vírus. Poucos monócitos tem estes receptores, entretanto estes aumentam após sua maturação. (GENDELMAN et al., 1986). Linfócitos também são infectados, entretanto sem multiplicação viral (ZINK E JOHNSON, 1994). Ainda foi detectado o RNA viral em células endoteliais, epiteliais, fibroblásticas, várias células do sistema nervoso (plexo coróide, células microgliais, astrócitos, oligodendrócitos e neurônios) e da glândula mamária (ZINK et al., 1990; BRODIE et al., 1995; SANNA et al., 1999, MSELLI-LAKHAL et al., 1999; LERONDELLE et al., 1999). Os vírus também já foram detectados na medula óssea (fibrócitos, células endoteliais e adipócitos) de

caprinos positivos para CAEV através de imunohistoquímica, porém células hematopoéticas foram negativas (GROSSI et al., 2005).

Nos tecidos-avos, tais como sinóvias, interstício pulmonar, plexo coróide e úbere, a ativação da replicação viral, juntamente com a maturação dos macrófagos, induzem à formação das lesões. Segundo ZINK et al. (1990), outras células podem também servir como áreas de replicação viral, como as células da membrana sinovial, oligodentrócitos (PERK, 1990), as células epiteliais intestinais, células tubulares renais, e células glandulares da paratireóide, adrenais e da tireóide. Contudo, é o tropismo do vírus por células do sistema imune, particularmente monócitos e macrófagos, o principal fator responsável pela habilidade dos lentivírus em causar infecções crônicas, que persistem por toda a vida do animal.

A forma nervosa da doença em ovinos jovens doentes sugere a existência de linhagens de MVV neurotrópicas e altamente neurovirulentas (BENAVIDES et al., 2006). Em outros casos de encefalites lentivirais (O'NEIL et al., 2004) foi afirmado que a progressão da doença está associada com a carga viral e resposta inicial do hospedeira à infecção. Isto também ocorre na infecção por MVV (DAWSON, 1980; HOUWERS, 1990) quando animais jovens infectados, sendo incapazes de uma resposta defensiva, permitiriam que os vírus alcançasse o encéfalo (BENAVIDES et al., 2006).

A detecção de RNA viral e DNA proviral em secções de tecidos caprinos e ovinos infectados, revelou que os LVPRs poderiam entrar em uma gama de tipos celulares como células dendríticas, linfócitos, plasmócitos, células endoteliais e fibroblastos, adipócitos, células microgliais e pericitos, assim como em células epiteliais dos brônquios, alvéolos, glândulas mamárias, folículos teróide e plexo coróide, intestino delgado e túbulos renais e terceira pálpebra (GEORGSSON et al., 1989; ZINK et al., 1990; STASKUS et al., 1991; RYAN et al., 2000; CAPUCCHIO et al., 2003; CARROZZA et al., 2003; PREZIUSO et al., 2004; BIESCAS et al., 2005; ANGELOPOULOU et al., 2006b; BOLEA et al., 2006).

Ainda células endoteliais caprinas podem ser infectadas *in vitro* por transmigração de leucócitos infectados com CAEV (LECHAT et al., 2005). Entretanto a infecção produtiva é restrita às células da linhagem dos macrófagos (DE LA CONCHA-BERMEJILLO, 1997) e da glândula mamária (MSELLI-LAKHAL et al., 1999; LERONDELLE et al., 1999).

Um estudo para determinar a carga viral em áreas selecionadas e a expressão de RNAm de CAEV em caprinos, oito anos após a infecção, demonstrou que os nódulos linfáticos são um importante reservatório viral. A glândula mamária e células do leite são os sítios preferidos para a replicação viral. A carga viral variou significativamente entre os animais, demonstrando a importância da carga genética frente à infecção. Foi encontrada uma associação clara entre a ocorrência de lesões histopatológicas e carga viral em sítios específicos. As análises da expressão de RNAm de várias citocinas não revela diferenças significantes entre animais o que poderiam esclarecer uma considerável variação individual na carga viral observada (RAVAZZOLO et al., 2006).

Recentemente, utilizando a técnica de PCR e imunohistoquímica, os vírus Maedi-visna (MVV) foram indiretamente detectados no fígado e no coração de seis ovinos naturalmente infectados. Além disso, estes testes revelaram antígenos no citoplasma de hepatócitos e cardiomiócitos. Porém exames histopatológicos mostraram níveis leve a moderado de colangi-hepatite e miocardite linfocítica crônica, mas não a presença de pequenos agregados linfóides, as lesões linfoproliferativas típicas de MVV nestes órgãos (BRELLOU et al., 2007).

A evidência de células infectadas com CAEV no útero e no oviduto corroboraram com o achado destas células em secreções genitais pós-parto. Recentemente CAEV proviral foi detectado em tecidos do trato genital: útero, oviduto e ovários. Células da granulosa (LAMARA et al., 2001) e células epiteliais do oviduto (LAMARA et al., 2002a) são completamente susceptíveis à infecção por CAEV *in vitro*.

O DNA proviral de CAEV foi detectado em células do cúmulus oóforos, mas não em oócitos de cabras naturalmente infectadas. Um estudo mostrou que vinte e dois por cento dos oócitos com células do cúmulus intactas foram positivos para a presença de DNA proviral e nenhum dos oócitos em que as células do cúmulus foram removidas mecanicamente foram positivos para o CAEV através de RT-PCR (ALI AL AHMAD et al., 2005). Este resultado contradiz estudos feitos por FIENI et al. (2002, 2003) em que sugerem a presença de CAEV em células infectadas no meio de lavagem do oviduto de cabras infectadas doadoras de embriões e uma potencial transmissão de CAEV para o embrião ou

feto. Este estudo demonstra que oócitos livres de CAEV podem ser obtidos de cabras infectadas.

Estudos *in vitro* mostraram que a zona pelúcida intacta é uma forte barreira que protege o embrião caprino na infecção por CAEV, mas embriões sem zona pelúcida quando incubados com CAEV e lavados extensivamente, poderiam transmitir a infecção para células MSC (LAMARA et al., 2002b). Células embrionárias prematuras caprinas são susceptíveis à infecção por CAEV e a infecção com estes vírus são produtivas, porém, a única barreira natural que pode prevenir a infecção por CAEV de blastômeros caprinos é a presença de uma zona pelúcida intacta (ZP) (ALI AL AHMAD et al., 2006).

*In vitro* os LVPR infectam e replicam em cultivo celulares de macrófagos (NARAYAN et al., 1983), membrana sinovial (NARAYAN et al., 1980; QUÉRAT et al., 1984), glândula mamária (MSELLI-LAKHAL et al., 1999; LERONDELLE et al., 1999), células fetais do plexo coróide (SIGURDSSON et al., 1960), músculo cardíaco (LEROUX et al., 1995), baço, timo, linfonodo escapular (NARAYAN et al., 1980), células da linhagem fibroblástica imortalizadas (TEIXEIRA et al., 1997) e tecido epitelial (LEE et al., 1996). E produzem efeito citopático, que consiste na formação de células gigantes multinucleadas ou sincícios e lise celular (CAREY E DALZIEL, 1983).

Ainda não estão bem elucidados os receptores para a entrada de lentivírus nas células. Provavelmente os LVPRs utilizam uma molécula comum como receptor ou um número de diferentes receptores para entrar nas células e que a molécula MHC classe II provavelmente é o receptor para LVPRs (ZINK E JOHNSON, 1994).

Os macrófagos infectados com LVPRs recrutam linfócitos agindo como apresentador de antígenos às células e posteriormente aos linfócitos T citotóxicos CD8<sup>+</sup> (LEE et al., 1994). Múltiplos órgãos, como cérebro, nódulos linfáticos, baço e medula óssea têm sido os sítios primários da infecção e a replicação serve como reservatório para os vírus infectar células precursoras (na medula óssea), assim como a localização de produção viral, presença de antígeno e a inibição da resposta imune para infecção viral.

A replicação viral e a resposta imune do hospedeiro ocorrem nas primeiras semanas após a infecção dos vírus, embora um longo período para o desenvolvimento da doença seja necessário (NARAYAN E CLEMENTS, 1989). A disseminação viral para os vários órgãos

envolvidos na doença ocorrerá pelos monócitos infectados que não expressam os vírus (CLEMETS E PAYNE, 1994). A replicação ocorre preferencialmente em algumas populações de macrófagos teciduais, resultando na produção e excreção dos vírus infecciosos no leite e provavelmente secreções respiratórias (MARCHESIN et al., 1997).

A baixa susceptibilidade dos linfócitos T dos ovinos e caprinos à infecção pelos LVPR pode explicar, em parte, a ausência de uma síndrome de imunodeficiência nestas espécies. Os lentivírus, embora relacionados entre si, tanto a nível genético como antigênico, evidenciam padrões de replicação *in vitro* muito deferentes (FEVEREIRO E BARROS, 2004). Esta geralmente é limitada por determinados fatores, entre os quais se cita a restrição viral mediada por interferon, produzido por linfócitos ativados durante sua interação com os macrófagos infectados. O interferon inibe a maturação de monócitos, e conseqüentemente a maturação viral (ZINK et al., 1987).

O ciclo de replicação dos lentivírus começa com a ligação específica da glicoproteína de superfície com o respectivo receptor, ocorrendo a fusão do envelope viral com a membrana da célula (GONDA, 1994). Esta fusão é mediada por uma porção hidrofóbica da proteína transmembrânica do envelope que penetra na membrana da célula possibilitando a fusão (OLIVEIRA, 1994) e a penetração do nucleocapsídeo viral no interior da célula hospedeira.

A transcriptase reversa promove a síntese do DNA proviral, copiando o RNA viral e originando DNA que poderá se integrar ao genoma da célula hospedeira pela ação das integrases (INT) e LTRs virais (HAASE et al., 1974) e ser transcrito pela RNA polimerase II. As LTRs são formadas na fase da síntese do DNA pelas seqüências RU3 e RU5, presentes no genoma dos vírus, as quais contêm o sítio de iniciação da transcrição para RNA polimerase II. As longas repetições terminais (LTRs) são regiões não traduzidas, únicas, situadas nas extremidades 5' (RU5) e 3' (RU3), que flanqueiam o DNA proviral e fornecem o sinal requerido para a transcrição, integração e poliadenilação do RNA viral (PÉPIN et al., 1998). Dados sugerem que as LTRs podem estar envolvidas na ativação transcricional dos vírus, podem determinar o tropismo *in vitro* e um importante fator na patogênese dos vírus (HÖTZEL E CHEEVERS, 2002). Esses dados foram também sugeridos por ANGELOPOULOU et al., (2006a) ao verificar que uma deleção específica localizada

dentro das LTRs poderia em parte, estar associadas com baixa patogenicidade de algumas linhagens de lentivírus.

A TR inicia a transcrição com a presença de um RNAt celular, que adiciona nucleotídeos na extremidade 5' e no final transcreve o RNA genômico em DNA de fita dupla (SONIGO et al., 1985). Poucas moléculas de DNA são integradas e este fato é importante para a persistência da infecção (HAASE, 1986). O genoma viral torna-se então parte do DNA celular e é duplicado durante a divisão celular. Portanto, uma vez um animal infectado pelos LVPR, estes permanecem infectados por toda a vida e os lentivírus podem ser isolados de animais soropositivos mesmo anos após a infecção original (DE LA CONCHA-BERMEJILLO, 1997).

O DNA viral integrado pode permanecer latente até que fatores celulares ou virais o ativem. A ação dos fatores celulares dos LVPR pode ocorrer com os fatores *c-jun* e *c-fos*, presentes nos macrófagos ativados, que se ligam às seqüências ativadoras AP (1 e 4) da LTR (HESS et al., 1989; SHIH et al., 1992; GDOVIN E CLEMENTS, 1992; NEUVEUT et al., 1993) ou, ainda, por outro fator celular induzido pelo interferon  $\gamma$ , secretado em resposta a infecção viral, que atua nas LTR extremidade 5' ativando a replicação (TONG-STARKSEN et al., 1996). Vários estudos têm demonstrado que as proteína ativadoras de transcrição, AP-1 e AP-4, ligam-se a sítios, que estão localizados na região promotora U3 da LTR, tendo um papel central na regulação e transcrição viral (BARROS et al., 2004, 2005; CAMPBELL and AVERY, 1996; GABUZDA et al., 1989; GDOVIN and CLEMENTS, 1992; HESS et al., 1986; SUTTON et al., 1997). Porém estudos mais recentes afirmam que as citocinas TNF $\alpha$  e o fator estimulador de colônias de granulócitos-monócitos (GM-CSF) ativam a transcrição e que este efeito ocorre independentemente de AP-1 (MURPHY et al., 2006).

Com relação aos fatores virais é possível que as proteínas *tat*, *rev* e *vif* possam estar envolvidas (GDOVIN E CLEMENT, 1992; CARRUTH et al., 1996). Em lentivírus a replicação viral ocorre quando os monócitos maturam para macrófagos (CLEMENTS E ZINK, 1996).

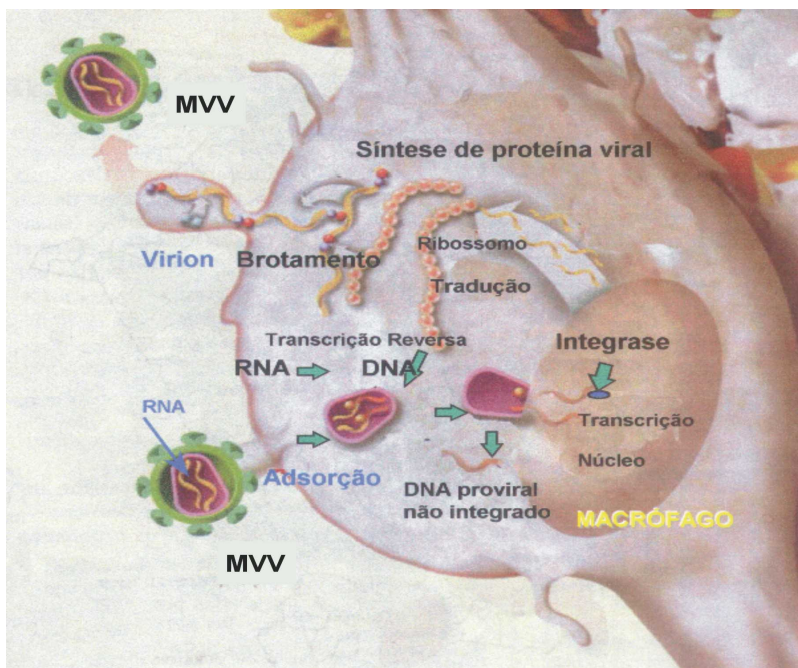


Figura 03. Ciclo de replicação do Maedi-Visna vírus. Pinheiro, 2001.

O DNA proviral utiliza o sistema celular de transcrição para sintetizar RNA genômico ou RNA's mensageiros (RNAm) subgenômicos, através da ação da enzima celular RNA polimerase II. Uma fase inicial é caracterizada pela presença de RNAm responsáveis pela produção dos genes de regulação (*tat* e *rev*) e numa fase tardia, onde ocorre intensa transcrição com a produção de pequenos e grandes RNAm, das proteínas estruturais (*gag* e *env*), das enzimas virais (*pol*) e da proteína de regulação *vif* (VIGNE et al., 1987; SARGAN et al., 1994).

No caso de expressão ativa dos vírus, ocorre a transcrição, com produção de RNAm que migra para o citoplasma da célula, onde ocorre a tradução em proteínas reguladoras. A tradução dos RNAm dos lentivírus é realizada por fatores celulares e leva à fabricação de polipeptídios precursores, estes são clivados por enzimas proteolíticas dando origem às proteínas virais. Os RNAm codificantes para *env* são traduzidos nos polirribossomos associados ao retículo endoplasmático rugoso e o produto fica encostado na membrana celular, enquanto que os RNA completos são traduzidos em precursores *gag* (*pr55kDa*) ou *gag-pol* (*pr170kDa*), nos polirribossomos livres.

No final do ciclo, após a síntese dos componentes virais ocorre a montagem, fenômeno controlado pelo precursor *gag*, com união dos produtos dos genes estruturais,

encapsulação de duas moléculas de RNA genômico, RNAt *primer*, TR e incorporação deste RNA genômico às partículas virais, processamento proteolítico dos polipeptídios precursores, brotamento das partículas virais, que adquirem componentes lipídicos da membrana celular para composição do envelope viral (CLEMENTS E PAYNE, 1994; COFFIN, 1996). Em macrófagos, o envelope é adquirido pelo brotamento de vesículas citoplasmáticas, rompidas com o excesso de partículas virais. Em fibroblastos, os vírus adquirem envelope através do brotamento da membrana plasmática (FIELDS et al., 1996). Após o brotamento existe a maturação viral com a ação de vários processos de clivagem dos precursores (GONDA, 1994).

## 2.4 - Heterogeneidade Genética

Dados de um trabalho baseado em estudos filogenéticos ajudaram a revisar a classificação de lentivírus ovinos e caprinos de acordo com suas espécies hospedeiras (CASTRO et al., 1999; LEROUX et al., 1997; CHEBLOUNE et al., 1996). De acordo com a nomenclatura proposta recentemente, baseada nas seqüências *gag* e *pol*, os lentivírus estão classificados em quatro grupos equidistantes, A-D (SHAH et al., 2004a). O grupo A pode ser subdividido em sete subtipos A1-A7, onde o subtipo A1 é identificado pelos vírus Maedi-Visna por ser genética e geograficamente heterogêneos e o grupo B, refere-se ao tipo CAEV e compreende apenas dois subtipos distintos, B1 e B2. Os grupos C e D são representados por poucos isolados ou reconhecidos apenas pela seqüência *pol* (SHAH et al., 2004a).

As altas taxas de mutação, de 0,5 a 1 genoma por ciclo de replicação, que são acumuladas, auxiliam à rápida evolução desse grupo de vírus (CASTRO, 1998) e são atribuídos ao fato de que esses vírus de RNA em geral, especialmente os lentivírus, têm altas taxas de erro provocadas pela RNA polimerase e pela falta de um mecanismo de correção (STEINHAEUER E HOLLAND, 1987). Alguns autores relataram que estas mutações decorrem, geralmente, de erros nas polimerizações, durante o ciclo de replicação lentiviral, com substituições de bases, deslocamento de janelas, rearranjo genético, recombinação e hipermutações (COFFIN, 1996; PRESTON E DOUGHERTY, 1996). A transcriptase reversa é a principal responsável por erros e, ao contrário das polimerases celulares, apresenta baixa



fidelidade, devido à ausência da ação da 3' - 5' exonuclease, necessária às correções de erros surgidos durante a polimerização. Porém algumas mutações podem ser causadas durante a replicação do DNA proviral, por erros da DNA polimerase celular, e da RNA polimerase celular II, quando da síntese de RNA a partir do DNA proviral (PRESTON E DOUGHERTY, 1996).

Os LVPR apresentam significativa variabilidade antigênica e genômica alterando as propriedades biológicas do virion, assim como a persistência viral no hospedeiro, o tropismo celular, a taxa de replicação, a citopatogenicidade e o desenvolvimento da doença (LEROUX et al., 1996).

Essa alta variabilidade genética dos lentivírus (CLEMENTS and ZINK,1996; LEROUX et al.,1997), exemplificada pela variação observada nas regiões de LTR do genoma viral, foi associada com a alta capacidade dos LVPRs serem ativados até o nível transcricional em muitos ambientes celulares diferentes. Isto pode favorecer a seleção de vírus que podem replicar em células e órgãos particulares, portanto afetando diretamente o tropismo celular e a patogenicidade dos vírus (CLEMENTS and PAYNE, 1994; AGNARSDOTTIR et al., 2000; ANGELOPOULOU et al., 2006a).

Estes lentivírus podem ser classificados conforme suas propriedades biológicas ou fenotípicas. As informações das seqüências genômicas têm promovido alguns indícios sobre as nuances que relacionam o genótipo e o fenótipo (PASICK, 1998).

Para diferenciar os vírus CAEV e MVV, VALAS and GERMAIN (2006) aplicaram o ensaio de mobilidade do heteroduplex (HMA), utilizando seqüências *env* de isolados franceses. Todas as seqüências virais pertenciam aos dois subtipos do grupo B. O resultado foi comparado e confirmado com estudos filogenéticos, provando ser um teste rápido e confiável para esse tipo de diferenciação.

Mundialmente se conhecem apenas as seguintes seqüências genômicas completas de LVPRs, as estirpes Islandesas em K1514 e KV1772 (ANDRÉSSON et al., 1993; SONIGO et al., 1985), CAEV Cork (SALTARELLI et al., 1990), os vírus Sul Africano em (SA-OMVV) (QUERAT et al., 1990) e britânico (EV-1) (SARGAN et al., 1991), todos eles do tipo rápido/alto. Os LVPRs podem ser classificados como rápido/alto ou baixo/lento de acordo com sua replicação *in vitro*. A linhagem do tipo rápida/alta replica rapidamente, induzindo

a lise celular e alcançando altos títulos, enquanto o tipo baixo/lento cresce lentamente e apresenta baixos títulos (BARROS et al., 2004; LAIRMORE et al., 1987; QUERAT et al., 1984; WOODWARD et al., 1995).

LEROUX et al (1997) sugere que as cepas K1514, SA-OMVV e EV1 tenham uma origem comum, talvez a Alemanha. As seqüências nucleotídica desses lentivírus encontram-se registradas em bancos de dados internacionais (Genbank) (MARCHESIN et al., 1997).

Em 2004, FEVEREIRO e colaboradores através de uma análise filogenética baseada nos alinhamentos das seqüências nucleotídicas dos genes *pol* e *env* revelaram uma nova cepa do MVV, denominada P1OLV, em Portugal. Este é, até o momento, o único lentivírus ovino com padrão de replicação do tipo lento/baixo cujo genoma foi totalmente seqüenciado.

Estudos subseqüentes baseados em seqüências parciais dos genes *gag*, *pol* e *env*, mostraram que estes vírus de ovinos e caprinos estão entremeando na árvore filogenética independente do hospedeiro, sugerindo que as infecções interespecies têm ocorrido entre os animais hospedeiros (CHEBLOUNE et al., 1996; LEROUX et al., 1997; ZANONI, 1998; CASTRO et al., 1999; GREGO et al., 2002; ROLLAND et al., 2002; SHAH et al., 2004a;).

O genoma completo da linhagem de CAEV-Co dos Estados Unidos é considerado o protótipo de lentivirus caprino, este já foi clonado e a seqüência de DNA proviral foi determinada (SALTARELLI, 1990). Seqüências nucleotídicas completas e parciais de muitos outros lentivírus têm sido recentemente determinadas a partir de isolados de caprinos e ovinos como as do Brasil, Irlanda, Estados Unidos, Suíça, Grécia, França, Espanha, Itália, Finlândia, Polônia e Noruega (MARCHESIN, 1997; RAVAZZOLO, 2001; ROLLAND, 2002; ABELSON, 2003; HERRMANN et al., 2004; SHAH, 2004; ANGELOPOULOU, 2005; PISONI, 2005; GERMAIN, 2006; REINA, 2006; CONTRERAS, 2006; PISONI, 2006; LAAMANEN, 2007; KUZMAK, 2007; GJERSET et al., 2007).

Análises Filogenéticas utilizando as seqüências *gag/pol* revelaram a presença dos subtipos de LVPRs do grupo A em diferentes países da Europa, incluindo França, Itália, Portugal, Espanha e Suíça (BARROS et al., 2004; GREGO et al., 2002; LEROUX et al., 1997; SHAH et al., 2004a).

Embora a classificação filogenética de LVPRs esteja correta quando algumas seqüências de isolados são avaliadas para mais de um gene (ZANONI, 1998), tais como a caracterização das seqüências *gag* e *pol*, nenhuma caracterização para as seqüências *env* está completa. Este gene codifica glicoproteínas do envelope que iniciam um papel central no hospedeiro, na infectividade e na progressão da doença. Vários estudos demonstraram que as linhagens de lentivírus podem diferir em suas propriedades biológicas, incluindo efeito citopático e tropismo *in vitro* (BARROS et al., 2004; BRUETT and CLEMENTS, 2001; HÖTZEL and CHEEVERS, 2001; LAIRMORE et al., 1987; QUERAT et al., 1984).

No Brasil, MARCHESIN (1997) estudou cinco isolados brasileiros de CAEV analisando parte do gene *gag*. Os resultados evidenciaram diferenças entre os isolados brasileiros permitindo separá-los em três grupos distintos de acordo com o perfil da digestão enzimática.

CASTRO (1998) amplificou e seqüenciou parte do gene *pol* e o gene *tat* de isolados de CAEV dos estados de Minas Gerais e Pernambuco. A análise filogenética das seqüências destes genes indicou que o isolado de Pernambuco foi estreitamente relacionado ao isolado islandês MVV K1514, enquanto os isolados de Minas Gerais foram mais relacionados ao CAEV.

REISCHAK (2000) estudando três isolados caprinos e um isolado ovino do Rio Grande do Sul verificou que dois destes apresentavam características líticas nos cultivos celulares secundários e de linhagem, indicando diversidade quanto ao ciclo de replicação viral *in vitro* destes isolados.

Estudos de caracterização molecular e isolamento de parte do gene *gag* já foram realizados em isolados nos Estados de Minas Gerais e Rio Grande do Sul (MARCHESIN et al., 1997). Em Minas Gerais cinco amostras de CAEV isolados de animais soropositivos foram comparadas com outros lentivírus existentes no GenBank e revelaram-se únicas e distintas das demais amostras de LVPR com maior identidade com amostras de CAEV do que com a de MVV. Entretanto, no Rio Grande do Sul, cinco amostras de CAEV isolados de animais infectados foram comparados com as seqüências de seis lentivírus de pequenos ruminantes, permitindo separar as amostras em três grupos distintos.

Uma comparação das seqüências de lentivírus com algumas seqüências encontradas em banco de dados, revelou que em contraste com o CAEV, todos os protótipos de MVV contêm uma deleção de seis nucleotídeos na região do gene *gag* resultando na deleção de dois resíduos de aminoácidos na região central do capsídeo. Esta deleção pode ser utilizada como marcador na análise de LVPRs, especialmente quando se considerar uma possível transmissão de lentivírus entre caprinos e ovinos (RAVAZZOLO, 2001).

Com o passar dos anos, estudos de epidemiologia molecular têm mostrado que CAEV e MVV estão relacionados, mas são vírus geneticamente distintos e que pertencem a dois conjuntos filogenéticos principais (ROLLAND et al., 2002; SHAH et al., 2004a; ZANONI, 1998). Os pequenos ruminantes são reservatórios de lentivírus com uma linha filogenética própria e os dendogramas inferidos a partir das seqüências dos genes *gag*, *pol* e *env* de vários lentivírus de ovinos e caprinos, sugerem que o CAEV teve origem no MVV (VALAS et al., 1997). À medida que um maior número de seqüências de lentivírus forem incorporadas ao Genbank, será possível avaliar se os perfis observados estão mais relacionados com CAEV do que com MVV.

Trabalhos baseados em estudos filogenéticos têm ajudado na classificação de lentivirus caprino e ovino de acordo com seus hospedeiros. Foi demonstrado que estes vírus estão constantes e facilmente transgredindo a barreira entre caprinos e ovinos (SHAH, 2004). Dados de análise filogenética mostraram também que seqüências de lentivírus caprino/ovino estão frequentemente dispersos dentro de árvores filogenéticas, indicando assim várias transmissões entre caprinos e ovinos e vice-versa e que as regiões *pol* e *env* podem ser mais informativas que a região *gag* (ROLLAND, 2002).

Além disso, os ensaios de infecção experimental e a análise filogenética dos LVPR sugerem que a transmissão de lentivírus entre ovinos e caprinos deva ocorrer com frequência na natureza (BANKS et al., 1983; SHAH et al., 2004b), devendo isto ser levado em consideração nos estudos epidemiológicos e nos planos de erradicação das infecções por LVPR.

## 2.5 – Proteoma

Através do estudo proteômico dos lentivírus, os testes de diagnóstico podem tornar-se específicos para cada região. Devido à ampla distribuição destes vírus em certas regiões e as perdas econômicas resultantes, vários países têm adotado programas de erradicação com base na segregação dos vírus de caprinos e ovinos (GREENWOOD et al., 1995; HOUWERS et al., 1987; PERETZ et al., 1994; ROWE and EAST, 1997; SCHEER-CZECHOWSKI et al., 2000).

O seqüenciamento de diferentes isolados de CAEV definiu cinco regiões variáveis (V1-V5) de SU (VALAS et al., 2000). Uma destas regiões, V4, sobrepõe um domínio de neutralização de MVV SU (SKRABAN et al., 1999), sugerindo que algumas variações nas seqüências de SU em CAEV dependem do hospedeiro durante a infecção persistente (HÖTZEL et al., 2002).

Porém um estudo realizado por HÖTZEL et al., (2002) sugere que essas regiões variáveis não são importantes na persistência da infecção *in vivo*, pois a maioria das substituições de aminoácidos e todas as deleções e inserções estão presentes em duas regiões discretas designadas HV1 e HV2. A região HV2 foi variável em todas as seqüências provirais da maioria dos animais. Esta região sobrepõe o domínio V4 de SU em CAEV e foi mais bem relatado em lentivírus Maedi-visna ovino. HV1 foi localizado numa região de SU estritamente conservada em todos os LVPRs, exceto em CAEV-63, clonagem feita por CRAWFORD et al. (1980), podendo sim, estas duas regiões, serem importantes na interação virus-hospedeiro.

Estudos na Finlândia comparando o protótipo de CAEV com MVV, observou-se uma inserção de sete aminoácidos (181–187) na linhagem K15114 de MVV na região C-terminal da MA e uma deleção de dois aminoácidos (entre 283 e 284) na região N-terminal do CA. Na região SU/TM, as diferenças entre os aminoácidos dos vírus da Finlândia foram concentradas em regiões variáveis, identificadas como V4 por VALAS et al., (2000). Somente algumas poucas substituições foram vistas em/ou perto da região variável, identificada como V5. A seqüência RKKR, que foi hipotetizada por ser um sítio proteolítico entre SU e TM, foi inteiramente conservada entre os vírus. As mudanças de aminoácidos foram vistas especialmente em um segmento curto (suprimidas na linhagem

K1514) posicionadas dentro de uma região previamente definida em MVV, como o maior epitopo de neutralização (aminoácidos 566-598 na linhagem K1514) por SKRABAN et al. (1999).

A similaridade entre as seqüências de lentivírus caprino e ovino foi maior na região N-terminal que na região C-terminal das proteínas analisadas do capsídeo. Interessantemente, a maior região de homologia foi menos conservada que a região N-terminal do capsídeo, demonstrando diferenças entre LVPRs de ovinos e caprinos (RAVAZZOLO, 2001). Embora o domínio C-terminal das proteínas do capsídeo lentiviral tenha sido mostrado por serem crucial para a montagem dos vírus (FREED, 1998), dados indicam que a região N-terminal também pode ser importante para a montagem e liberação dos vírus (LI et al., 1997; WANG et al., 1998). O modelo baseado na estrutura de cristal da p26 (capsídeo) de lentivírus eqüino propõe que o domínio N-terminal inicia um papel essencial na maturação do core (JIN et al., 1999).

Um peptídeo de cinco aminoácidos LYPNL (Motif III), encontrado em todas as estirpes de MVV isoladas na Polônia, mas não nas estirpes padrão, pode ser utilizado como um marcador para distinguir estirpes de vírus (PISONI, 2006). Um segundo peptídeo KNLTPEESNKQDFMSL (Motif II), foi especificamente relacionado com a estirpe de CAEV. Em contraste, 6/16 mudanças de aminoácidos (Q - - - - - TS - RE - A - -) foram específicas para todas as estirpes de MVV.

As mudanças similares de aminoácidos foram observadas em dois isolados italianos de ovinos, geograficamente distantes, anteriormente classificados no grupo de ovinos e genotipicamente como CAEV (GREGO et al., 2005). Esses peptídeos foram considerados como uma das principais regiões imunodominantes da matriz. Assim, ambos os peptídeos (Motif II e III), podem ser utilizados em testes de diagnóstico para distinguir infecção com os vírus MVV e CAEV. Isto seria importante para análise de lentivírus de ovinos e caprinos que vivem em rebanhos mistos e aqueles em contato direto, o que pode elucidar os acontecimentos da transmissão cruzada destes vírus após o salto da barreira entre espécies (KUZMAK, 2007).

Isolados da Noruega apresentaram na seqüência SU, de 30 a 35 aminoácidos a menos e altamente variáveis na parte C-terminal quando comparado com seqüências SU de

LVPRs padrões (GJERSET et al., 2006; KNOWLES et al., 1991; SALTARELLI et al., 1990; SONIGO et al., 1985; VALAS et al., 1997, 2000).

Ainda assim, só um pequeno número de LVPR foi totalmente seqüenciado o que tem dificultado a comparação e caracterização das regiões conservadas e variáveis do genoma deste vírus. O conhecimento da diversidade genética destes vírus contribuirá para uma melhor compreensão dos mecanismos de evolução molecular, proporcionando o aprofundamento nos conhecimentos sobre a heterogeneidade epidemiológica da infecção. O pequeno número de seqüências genômicas MVV disponíveis nas bases de dados internacionais tem sido um obstáculo ao conhecimento mais aprofundado da epidemiologia molecular e patogênese dos vírus, bem como ao aperfeiçoamento das técnicas de detecção dos vírus por PCR.

A erradicação completa de lentivírus que infectam populações de caprinos e ovinos só será possível apenas quando forem obtidas informações sobre a variabilidade viral dentro de regiões geográficas, em rebanhos infectados e em animais individuais tornarem-se amplamente disponível (PISONI et al., 2005).

## **2.6 – Epidemiologia**

Os vírus Maedi-Visna, assim como outros lentivírus são distribuídos amplamente no mundo, causando grandes perdas econômicas.

No Brasil, por meio de isolamento em células infectadas de ovinos soropositivos, que foram submetidas à microscopia eletrônica, foi concluído o primeiro isolamento deste vírus no país (MOOJEN et al., 1986) nos Estados do Rio Grande do Sul, Rio de Janeiro, Minas Gerais, e por ABREU e colaboradores no ano de 1998 em Pernambuco.

No Ceará, 31,61% dos animais avaliados foram positivos para o Maedi-Visna, através de levantamento soro epidemiológico utilizando a técnica de IDGA feito por ALMEIDA E TEIXEIRA (1999).

## 2.7 – Transmissão

Evidências diretas de transmissão natural de ovinos para caprinos e vice-versa, particularmente dos subtipos A4 e B1 dos vírus têm sido relatadas (SHAH et al., 2004b; PISONI et al., 2005). Até agora, os subtipos B1 e B2 assim como quatro de sete subtipos do grupo A (A1, A3, A4 e A6) foram isolados de ambos, caprinos e ovinos, sugerindo os subtipos são particularmente propensos a atravessar a barreira entre espécies (VALAS and GERMAIN, 2006).

O fato de alguns lentivírus terem sido isolados de caprinos e ovinos indica que a transmissão interespecie deve ter ocorrido pelo menos uma vez em cada um dos subtipos, embora a frequência e direção da transmissão permaneçam desconhecidas (LEROUX et al., 1997; RAVAZZOLO et al., 2001; ROLLAND et al., 2002; ZANONI, 1998).

A principal forma de infecção de rebanhos livres se dá por meio da introdução de animais portadores oriundos de rebanhos contaminados. A transmissão ocorre por meio de secreções ou excreções ricas em células do sistema monocítico-fagocitário, principalmente macrófagos. A transmissão horizontal ocorre pela inalação de líquidos respiratórios contendo os vírus ou células infectadas e a vertical, através da ingestão de leite e colostro contendo macrófagos infectados (ZINK E JOHNSON, 1994).

A infecção via leite/colostro é a principal via de transmissão em cabritos seguido da transmissão horizontal através de secreções infectadas, (PETERHANS et al., 2004; BLACKLAWS et al., 2004; HERRMANN-HOESING, 2007),

A via digestiva, geralmente ocorre no período neonatal, através do leite e/ou colostro de mães infectadas (ROWE et al., 1992), onde os vírus podem se encontrar tanto livre como em células somáticas. Porém outros autores indicam que a transmissão de cordeiro para cordeiro pode contribuir mais para a transmissão total de MVV que a transmissão de MVV de ovelha para cordeiro pela amamentação (ALVAREZ et al., 2005, 2006).

Estudos recentes sugerem que a depuração de células associadas à lentivírus na circulação após a transferência passiva de anticorpos via colostro pode ocorrer após 32 semanas em respostas ao provírus e a anticorpos anti-VPPO e estes permanecem não detectáveis até os quatro anos de idade (HERRMANN-HOESING, 2007).



GUEDES (1999) verificou que em ovinos, em regime de criação intensivo, existem evidências da transmissão do MVV via secreção respiratória ou aerossóis (HOUWERS E VAN DER MOLEN, 1987).

Em relação à transmissão sexual, estudos mostraram que a infecção corrente ou inflamação nos testículos induz a liberação do MVV no sêmen. Porém, carneiros infectados com MVV utilizados para procriação com ovelhas não infectadas, e alojadas separadamente, não causou soroconversão nas mesmas, isto sugere que caprinos também sejam suscetíveis ao CAEV por esta mesma via de transmissão (LAMARA et al., 2002a).

A evidência de células infectadas com CAEV no útero e no oviduto corroboram com o achado destas células em secreções genitais pós-parto. Recentemente CAEV proviral foi detectado em tecidos do trato genital: útero, oviduto e ovários. Células da granulosa (LAMARA et al., 2001) e células epiteliais do oviduto (LAMARA et al., 2002a) são completamente susceptíveis à infecção por CAEV *in vitro*.

Experimentos recentes usando inoculações de MVV intranasal e intratecal em ovinos têm mostrado que a rota intratecal, em infecções experimentais, é mais eficiente que a rota de transmissão intranasal (TORSTEINSDOTTIR, 2003). Além das vias de infecção devem-se levar em conta os fatores que afetam o risco de transmissão como estresse, imunossupressão, dose do vírus e rota de infecção, cepa do vírus, aumento da idade, alta densidade e aumento da duração de exposição aos vírus (BLACKLAWS et al., 2004).

## **2.8 – Diagnóstico Molecular**

### **2.8.1 - Reação em Cadeia de Polimerase (PCR)**

A detecção de DNA proviral pode ser feita também através da PCR. Esta é sensível na detecção de pequenas quantidades de ácidos nucleicos virais e é utilizada para demonstrar a presença de DNA proviral tanto *in vivo*, como *in vitro*.

Vários trabalhos têm demonstrado, com sucesso, o uso da técnica de PCR na detecção do DNA proviral dos LVPR. A PCR permite por amplificação direta de parte do ácido nucleico viral específica de fluidos e tecidos de um animal infectado (ZANONI et al., 1990; REDDY et al., 1993; RIMSTAD et al., 1993; WAGTER et al., 1998). DNA proviral

pode ser detectado em células mononucleares e granulócitos presentes no soro de leite, inferindo que o soro lácteo pode ser infectante, difundindo, conseqüentemente, os vírus (RUSSO et al., 1997).

As variações de PCR já estão sendo aplicadas, tais como PCR quantitativa, desenvolvida por ZHANG et al (2000), real-time PCR que foi desenvolvida e caracterizada *in vitro* (GUDMUNDSSON et al., 2003) e semi-nested PCR utilizando primers degenerados, desenvolvida por ELTAHIR et al. (2006).

REDDY et al. (1993) verificaram também que três animais negativos por IDGA foram positivos por PCR, enquanto dois animais positivos por IDGA apresentaram resultado negativo por PCR.

Devido à alta variabilidade genômica dos lentivírus, a escolha dos *primers* em genes relativamente conservados como *pol*, *gag* e da LTR, combinado a com as condições de reação para a máxima sensibilidade é decisiva para detecção de um grande espectro de cepas de campo de ambos CAEV e MVV (ZANONI, 1998).

WAGTER e colaboradores (1998) através de PCR, utilizando um *mix* de seis *primers* de três cepas de lentivírus ovino e um de caprino da região conservada do gene *gag*, encontraram resultados discordantes com quantidades diferentes de amostras de sangue (monócitos) demonstrando que a sensibilidade do teste é limitada ao tamanho da amostra. Verificaram que quando amostraram 1 mL de sangue de seis animais nenhum reagiu positivamente, entretanto quando aumentaram a alíquota para 5 mL, cinco dos seis animais foram positivos e quando utilizaram 10 mL de sangue todos os animais foram positivos. De 60 animais soropositivos pela IDGA, o PCR do sangue detectou somente 53. Observaram, também, que a resposta sorológica pode ser bem lenta até 18 meses após a detecção pelo PCR ou até mesmo não soroconverter e que o PCR é mais eficiente em detectar DNA no sangue nos estágios iniciais da doença. A detecção de infecção por LVPR através de PCR é indicativa de uma infecção persistente e é dependente da quantidade amplificada da seqüência alvo e da especificidade do *primer*.

Entretanto esta técnica poderá ser utilizada em programas de erradicação, quando estiver disponível rotineiramente, para identificar os animais não diagnosticados por sorologia. É recomendado que esta técnica seja empregada para esclarecer resultados

sorológicos indeterminados ou negativos, devido ao alto custo e aos resultados discordantes entre testes sorológicos e PCR (KNOWLES, 1997).

## 2.9 - Lentivírus como vetores para transferência de genes

A capacidade dos lentivírus para integrar seu genoma dentro do cromossomo de células diferenciadas faz deles candidatos atrativos como vetores para genes terapêuticos (BUKRINSKY et al., 1993; VIGNA and NALDINI, 2000). Lentivírus são retrovírus complexos que expressam genes com um potencial para interromper a função celular e eles mesmos são responsáveis pela patologia (AMADO and CHEN, 1999; BUCHSCHACHER and WONG-STAAAL, 2000).

Outros vetores lentivirais têm sido desenvolvidos a partir dos vírus da imunodeficiência símia (SIV; NÈGRE and COSSET, 2002; MANGEOT et al., 2002), vírus da imunodeficiência felina (FIV; POESCHLA et al., 1998; WANG et al., 1999); vírus da anemia infecciosa equina (EIAV; O'ROURKE et al., 2002), dos vírus Maedi visna (MVV, BERKOWITZ et al., 2001), e dos vírus da artrite encefalite caprina (CAEV, MSELLI-LAKHAL et al., 1998; MSELLI-LAKHAL et al., 2006).

Alguns vetores lentivirais derivados dos vírus da imunodeficiência humana (HIV-1) têm se mostrado como marcadores genéticos ou por transferir genes terapêuticos eficientemente *in vivo* para alvos tais como células do sistema nervoso central (NALDINI et al., 1996a,b; BLÖMER et al., 1997), retina (MYOSHI et al., 1997), fígado e músculo esquelético (PARK et al., 2000).

Vetores lentivirais têm sido eficientes na entrega de genes em células troncos (SUTTON et al., 1998, 1999) e em células cancerígenas (PANG et al., 2001; SOLLY et al., 2003). Para uma potencial terapia humana é preferível evitar o uso de vetores lentivirais derivados de um vírus que cause doença letal e severa como o da imunodeficiência. Entre as várias espécies de lentivírus animais, CAEV tem o genoma relativamente simples, sendo ideal para ser utilizado como vetor (MSELLI-LAKHAL et al., 2006).

### 3. JUSTIFICATIVA

O pequeno número de seqüências genômicas de LVPRs disponíveis nas bases de dados internacionais tem sido um obstáculo ao conhecimento mais aprofundado da epidemiologia molecular e patogênese dos vírus, bem como ao aperfeiçoamento das técnicas de detecção dos vírus por PCR. Esta doença tem se disseminado pelo país em grande parte devido ao desconhecimento do grau de comprometimento dos rebanhos e da dificuldade de acesso ao diagnóstico. A erradicação completa de lentivírus que infectam populações de caprinos e ovinos só será possível apenas quando forem obtidas informações sobre a variabilidade viral dentro de regiões geográficas, em rebanhos infectados e em animais individuais tornarem-se amplamente disponível (PISONI et al., 2005).

Ainda assim, só um pequeno número de LVPR foi totalmente seqüenciado o que tem dificultado a comparação e caracterização das regiões conservadas e variáveis do genoma destes vírus. O conhecimento da diversidade genética destes vírus contribuirá para uma melhor compreensão dos mecanismos de evolução molecular, proporcionando o aprofundamento nos conhecimentos sobre a heterogeneidade epidemiológica da infecção.

## **4. OBJETIVOS**

### **4.1 Geral**

- Analisar filogeneticamente as amostras lentivirais isoladas de animais naturalmente infectados no Ceará

### **4.2 Específicos**

- Isolar as cepas nativas de lentivírus de Pequenos Ruminantes no Ceará;
- Seqüenciar o gene *gag* de Lentivírus de Pequenos Ruminantes;
- Analisar filogeneticamente as amostras virais isoladas.

# Phylogenetic analysis of small ruminant lentiviruses from Northern Brazil

Aryana Lushese Vasconcelos Lima Feitosa<sup>a</sup>,  
 Maria Fátima da Silva Teixeira<sup>a</sup>, Raymundo Rizaldo Pinheiro<sup>b</sup>, Alice Andrioli<sup>b</sup>, Rodrigo  
 Maranguape Silva da Cunha<sup>c</sup>, João Paulo Matos Santos Lima<sup>d</sup>,  
 Tânia Valeska Medeiros Dantas<sup>a</sup>, Maria Alzira do Carmo Aragão<sup>a</sup>, Suzana Aparecida Costa  
 de Araújo<sup>a</sup>, Benedito Neilson Rolim<sup>a</sup>, Valeska Shelda Pessoa de Melo<sup>a</sup>, Aracely Rafaele  
 Fernandes Ricarte<sup>a</sup>, Edmara Chaves Costa<sup>a</sup>, Diana Célia Sousa Nunes Pinheiro<sup>a</sup>.

*a* Laboratory of Virology and Immunology - Veterinary Faculty UECE - Universidade Estadual do Ceará, Fortaleza, CEP, Brazil

*b* National Goat Research Center, Embrapa

*c* Center of Biotechnology of Sobral, NUBIS

*d* Laboratory of Bioinformatics – Universidade Federal do Ceará - UFC

## Abstract

CAEV and MVV are considered to be genetically distinct but antigenically related pathogens of goats and sheep. Indeed, it has been demonstrated that these viruses constantly and easily transgress the species barrier between goats and sheep leading to sheep harboring CAEV-like lentiviruses and goats infected with MVV-like viruses (Valas et al., 2000; Karr et al., 1996; Shah et al., 2004). Like all lentiviruses, CAEV genome has a high mutation rate and the extent of its heterogeneity may be related to low fidelity of reverse transcriptase which lacks proof reading exonuclease activity. A genetic analysis of these SRLV may further help to understand the genetic, proteic and antigenic make-up of these viruses; their pathogenesis, epidemiology, phylogenetic relationships; and thus, their allocation into the recently established SRLV groups (Shah et al., 2004a). It may also be relevant for developing local-breed sensitive diagnostic tests. The application of phylogenetic analysis to CAEV and MVV sequences is of pivotal importance for this type of epidemiological analysis of SRLV infections in small ruminants and for the study of potential differences in virulence between circulating SRLV strains. The principal aim of this work was to establish a SRLV phylogeny as a basis for future studies of the molecular epidemiology of lentiviral infections in dairy goat herds in Northeast Brazil, with particular interest in monitoring the effects of ongoing and future eradication programs on the distribution of SRLV strains.

In this study, one flock of 250 goats was analyzed using AGID, and the level of seroprevalence observed was 11 animals (4.4%) of positive tested sera. Six goats positive to AGID with and without alteration in the knee joint were analyzed using a PCR, which amplifies part of the *gag* gene. All the animals were found to be positive, despite the fact that three of them did not present any clinical signs or alteration in the knee joint. The nucleotide sequences of *gag* gene were determined from four Brazilian lentivirus isolates from naturally infected goats. The four *gag* gene sequences Brazilian SRLV strains were compared to GenBank strains, and the results demonstrated that these sequences were more related to the caprine rather than the ovine strains. Further phylogenetic analysis of the proviral *gag* sequences confirmed the initial classification and showed that they constituted sbtipo B1 of the CAEV group. The analyses of the sequences also showed that the viruses were genetically stable. The ancestors of these animals may have been infected for more 20 ago, the time estimated for the virus to evolve. The results of this study indicate that future studies should concentrate on the *pol* or *env* regions than the *gag* region, as this is highly preserved and retains less phylogenetic signals.

*Keywords:* Small ruminant lentiviruses; CAEV; MVV; Phylogeny; *gag*.

## Introduction

The phylogenetic relationships of the SRLVs were first defined with full-length genome sequences of the MVV prototype strains by Sonigo et al. in 1985. Since then they have also been defined by Querat et al. (1990) and Sargan et al. (1991). The relationships with sequences of the CAEV were first defined by Saltarelli et al. in 1990. SRLV are distributed worldwide among sheep and goats. Different clinical forms of the disease have been described in this country among SRLV-infected small ruminants. These include arthritis in goats, and forms which attack the pulmonary, mammary and nervous systems in sheep (Benavides et al., 2006). CAEV and MVV are considered to be genetically distinct, but antigenically related pathogens of goats and sheep. Indeed, it has been demonstrated that these viruses constantly and easily transgress the species barrier between goats and sheep leading to sheep harboring CAEV-like lentiviruses and goats infected with MVV-like viruses (Valas et al., 2000; Karr et al., 1996; Shah et al., 2004).

The data from recent works based on phylogenetic studies has helped to revise the classification of ovine/ caprine lentiviruses according to host species (Castro et al., 1999; Leroux et al., 1997; Chebloune et al., 1996). According to a recently proposed nomenclature based on 1.8 kb gag-pol and 1.2 kb pol sequences, the SRLVs are classified into four equidistantly related groups, A–D (Shah et al., 2004a). Group A can be further divided into at least seven subtypes, A1–A7, where the subtype A1 is identified by the genetically and geographically heterogeneous MVVs; and group B refers to the CAEV type and comprises only two distinct subtypes, B1 and B2. Groups C and D are represented by few isolates or recognized only by pol sequence (Shah et al., 2004a). Recently, direct evidence for natural sheep-to-goat and goat-to-sheep transmissions of particular subtypes (A4 and B1) of the virus has been reported (Shah et al., 2004b; Pisoni et al., 2005). However subsequent studies based on partial regions within *gag*, *pol* and *env* genes have shown, that viruses of ovine and caprine origin are interspersed in the phylogenetic tree irrespective of the host, suggesting that interspecies infections occur between the host animals (Leroux et al., 1997; Zanoni, 1998; Rolland et al., 2002). The high heterogeneity of nucleotide and amino acid sequences in lentiviruses may determine their antigenicity, virulence and growth; and may affect their persistence and escape from the immune system.

In spite of differences in target organs, cell tropism and pathogenicity, commonly found between the Caprine Arthritis Encephalitis virus (CAEV) and the ovine Maedi Visna virus (MVV), both viruses have recently been assigned to a single group, small ruminant lentiviruses (SRLV). The genome organization of CAEV is typical of simple lentiviruses and contains gag, pol, env, vif, rev and vpr-like genes between the two long terminal repeats (LTR). The gag, pol and env genes are encoded for structural and enzymatic proteins, whereas vif and rev genes are encoded for regulatory proteins, and the vpr-like gene for accessory proteins (Villet et al., 2003). Like all lentiviruses, CAEV genome has a high mutation rate and the extent of its heterogeneity may be related to low fidelity of reverse transcriptase which lacks the proof reading exonuclease activity. A genetic analysis of these SRLV may further help to understand the genetic, proteic and antigenic makeup of these viruses; their pathogenesis, epidemiology, phylogenetic relationships; and thus, their allocation into the recently established SRLV groups (Shah et al., 2004a). It may also be relevant for developing local-breed sensitive diagnostic tests. The application of phylogenetic analysis to CAEV and MVV sequences of vital importance for this type of epidemiological analysis of SRLV infections in small ruminants and for studying potential differences in virulence between circulating SRLV strains.

The main aim of this work was to establish a SRLV phylogeny as a basis for future studies of the molecular epidemiology of lentiviral infections in Northeast Brazil dairy goat herds, with particular interest in monitoring the effects of ongoing and future eradication programs on the distribution of SRLV strains. The resulting nucleotide sequences were aligned with those from other ovine/caprine lentivirus isolates.

## **2. Material and methods**

### **2.1. Animals and AGID**

Two hundred and fifty naturally infected goats of the breeds Saanen and Anglo-nubiana were selected from a dairy flock belonging to National Goat Research Center (CNPC), where, according to a previous serological survey, there was a known chronic infection of goats with CAEV. Seroprevalence was determined by directed antibodies against the major Gag capsid protein of both MVV and CAEV using the AGID for



detection<sup>1</sup>. The flock was located in Northeast Brazil. Readings were made after 24 and 48 h of incubation. Precipitin lines of identity and lines of no-identity were evaluated accordingly. Some animals showed clinical signs specific for CAEV.

## **2.2. Isolation of PBLs**

Ten millilitres of blood from each animal were collected in 2mM EDTA vacutainers. The peripheral blood leukocytes (PBLs) were isolated from the blood by centrifugation at 1500rpm for 10 min. Erythrocytes were haemolyzed three times by osmotic shock by centrifugation at 1500rpm for 5 min with 8 ml of ammonia acetate 0,84%. Following two washes with 1ml of PBS by centrifugation under the same previous conditions, the cell pellets were used for co-culture in goat sinovial membrane (GSM).

## **2.3. Co-Culture**

Cells derived from synovial membrane goats (GSM) were used to propagate in microtiter plate cells in six wells as monolayer cultures. The cells were first washed twice in PBS plus 1ml minimum essential medium (MEM), less fetal bovine serum (FBS). The medium was changed until there was a monolayer of semiconfluent cells (90%). Leukocytes were isolated from each AGID positive animal presenting non-lytic effects, and 200 µl were placed in maintenance medium and added to each well, together with 500 µl of MEM less SBF. The culture plate remained in the CO<sub>2</sub> (5%) incubator for one hour. A solution of the 1 ml of MEM with FBS (5%) was then added to the wells and left until there were cytopathic effects (CPE) characteristic of viruses.

## **2.4. DNA Preparation**

The culture plate containing the viruses infected by cell culture was frozen at -80°C and thawed at room temperature three times. The wells were washed with 5ml of PBS and centrifuged at 1000 rpm for 1 min. The pellet was resuspended in 2 ml of hypertonic buffer for 2 min at room temperature followed by centrifugation at 2500 rpm for 10 min. The pellet cell was resuspended in 2 ml of PBS followed by centrifugation at 2500 rpm for 10 min. The proviral DNA was extracted from 1ml of the pellet with 250 µl PCR buffer and

---

<sup>1</sup> American Kit

homogenized. Then the cells were incubated at 56°C for 60 min with 2.5 µl of proteinase K buffer on a waterbath. The proteinase K was digested at 95 °C for 10 min. The purified DNA stocks were stored at -20 °C until used.

## 2.5. Nested PCR and quantification of DNA

Two rounds of PCR amplification (nested-PCR) were applied to detect the 187 bp fragment of proviral DNA, corresponding to the leader *gag* sequence of the CAEV genome. All primers were selected on the basis of published sequence of CAEV-Co strain, according to the previously published data (Saltarelli et al., 1990). The primers GEX5 (5'-CAAGCAGCAGGAGGGAGAAGCTG-3') and GEX3 (5'-TCCTACCCCCATAATTTGATCCAC-3') were used for the first amplification, corresponding to bases 953–975 and the complement of 1249–1226, respectively. Primers GIN5 (5'-GTTCCAGCAACTGCAAACAGTAGCAATG-3') and GIN3 (5'-ACCTTTCTGCTTCTTCATTTAATTTCCC-3') were used for the second amplification, corresponding to bases 997-1024 and the complement of 1181–1154, respectively. The primers used were based on CAEV-Co *gag*. Amplification was performed using a BioRad Thermal Cycler under the following thermal conditions: 5 min at 94°C, 1 min at 94°C, 1 min at 56°C, 45 s at 72°C; after the last cycle, the samples were incubated at 72°C for 7 min. The first and the second rounds of PCR were performed in 35 cycles using the same conditions. The PCR mix consisted of 34,6 µl of water without DNA, 5 µl 10X buffer (Tris HCl 10 mM, KCl 50 mM, MgCl<sub>2</sub> 1,5 mM), 1 µl 100mM each dNTP (Gibco BRL), 2µl 20 pmol of each primer, 0,4 µl 2U of Taq and 5 µl of DNA for the first round and 1µl for the second round. For each amplification, a positive control of CAEV-Co and negative control (without DNA) were run in parallel with all specimens. After amplification, PCR products from each sample were separated by electrophoresis on 2,5% agarose gel containing ethidium bromide (2,5µl in 50ml) in 1X TAE buffer. The concentrations of solutions of isolated DNAs were determined following UV spectrophotometry examination of the optical density at 260nm. Samples were stored at -20°C until their use for DNA sequencing.

## 2.6. DNA sequencing and sequence analysis

The products of PCR amplification from the first round were submitted to DNA sequencing using Mega Bace 7.0. The sequencing was performed using primers externals

GEX5 (5'-CAAGCAGCAGGAGGGAGAAGCTG-3') and GEX3 (5'-TCCTACCCCCATAATTTGATCCAC-3').

Sequence data were basecalled using Phred version: 0.020425 (Ewing et al, 1998A e B) and subsequently, the sequence reads were aligned and a single consensus sequence was assembled with Phrap version 0.990329 (Phil Green, University of Washington).

All positions with ambiguous codes or alignment gaps were excluded from the analyses. The editor program Consed version 16.0 (GORDON et al., 1998) was used to prepare the final version of the obtained consensus sequences.

Pairwise genetic distances were calculated by using MEGA version 4.0 (Tamura et al., 2007) with the Tamura-Nei (NJ) substitution model. The phylogenetic tree was determined using the neighbor joining (NJ) method (Saitou and Nei, 1987) implemented in MEGA, the Tamura-Nei gamma distance (Tamura and Nei, 1993). The statistical confidence of the topologies was assessed with 100 bootstrap replicates (Felsenstein, 1985).

The four Brazilian SRLV strain were compared to the strains were compared to the Strains K1514-MVV (Sonigo et al., 1985), EV-1 MVV (Sargan et al., 1991), SA-OMVV (Querat et al., 1990), P1OLV (Barros et al., 2004), CAEV (Saltarelli et al., 1990), BR/MG (Drumond E Resende, 2001) and BR/UFRGS (Ravazzolo et al., 2001) with GenBank accession nos. M60609, S51392, M31646, AF479638, M33677, AF402668 and AJ305040, respectively (Table 1).

**Table 1**  
Lentivirus nucleotide sequences analyzed in this study

Virus strain	GeneBank accession number	Reference
K1514 MVV	M60609	SONIGO et al., 1985
EV-1 MVV	S51392	SARGAN et al., 1991
SA-OMVV	M31646	QUERAT et al., 1990
P1OLV	AF479638	BARROS et al., 2004
CAEV-Co	M33677	SALTARELLI et al., 1990
BR/MG	AF402668	DRUMOND E RESENDE, 2001.
BR/UFRGS	AJ305040	RAVAZZOLO et al., 2001
BR/CNPC-G1	EU300976	This study
BR/CNPC-G2	EU300977	This study
BR/CNPC-G3	EU300978	This study
BR/CNPC-G4	EU300979	This study

### 3. Results

#### 3.1. Serology and Co-Culture

The results of the AGID test showed that 11 (4.4%) of 250 goats were AGID positive for SLRVs. Between 14 and 21 days after infection, the characteristic CPE with nuclei per giant cell was observed and syncytium was formed, confirming the presence of small ruminant lentiviruses. The cell cultures were examined by light microscopy for syncytium search. The presence of small ruminant lentiviruses in goat synovial membrane cells was confirmed by detection of a *gag* fragment by nested-PCR.

#### 3.3 Nested-PCR

DNA proviral samples of cells, derived from synovial membrane goats (GSM) from six naturally infected animals from Northeast Brazil were subjected to nested-PCR using primers that amplify a 187-nucleotide region of the *gag* SRLV gene (997-1181) chosen as being representative of PCR positive goats.

For six of the naturally infected animals, a 187-nucleotide region of the *gag* SRLV gene (997-1181) was detected by electrophoretic analysis of nested PCR products (Fig.1). Amplification products were sequenced and denoted as BR/CNPC-G1, BR/CNPC-G2, BR/CNPC-G3, BR/CNPC-G4, (CNPC: Centro Nacional de Pesquisa em Caprinos; G: goat).

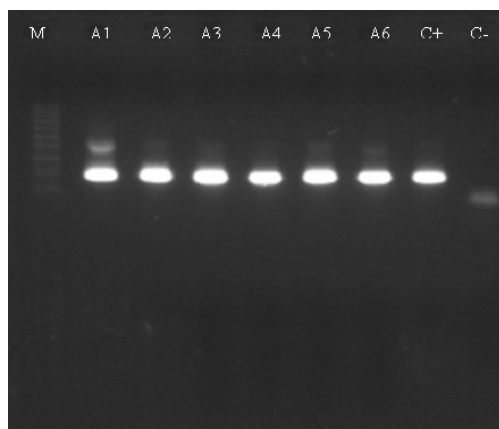


Fig.1 - Electrophoretic analysis of nested PCR products (187 bp) for the detection of a 187-nucleotide region of the *gag* SRLV gene (997-1181) of six animals naturally infected SRLVs, using total DNA extracts from separated peripheral blood mononuclear cells (PBLs) (lanes A1-A6). Lane C+: positive control (CAEV-Co strain), lane C-: negative control, M: 100 bp DNA marker.

#### 3.4 DNA sequencing and Phylogenetic analysis

Phylogenetic analysis revealed that the Brazilian viruses formed a cluster of identical or highly related sequences within the genetically heterogeneous CAEV-Co group. A phylogenetic tree (Fig.2) was obtained by NJ method with *gag* nucleotide

sequences, which showed the relationship between Brazilian and other known SRLV strains. Bootstrap values derived from 100 bootstrap replicates indicating the confidence of the branching pattern are shown above the respective branches. All analyses preferences were standard. The analyses also showed a close relationship between the CAEV-Co (the prototype strain) and the two Brazilian strains, CAEVBrUFRGS and the CAEVBR-MG (Fig. 3).

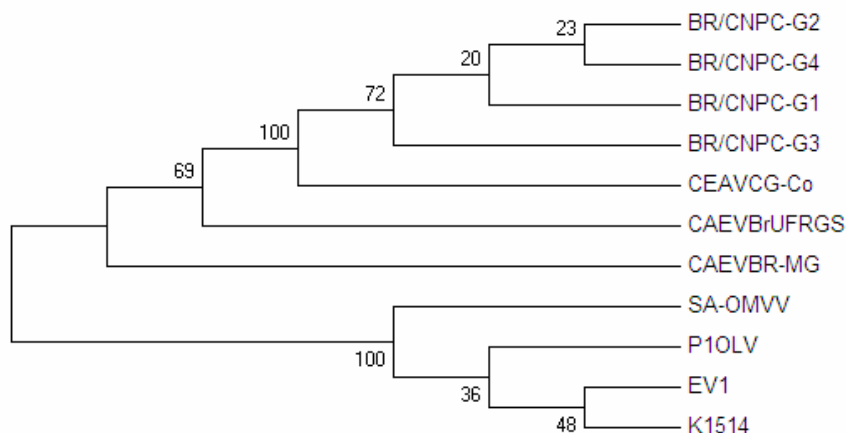


Fig. 2. In the phylogenetic tree a group identified by the prototype MVVs was clearly distinguished from the CAEVs with a high bootstrap value of 100.

All the four SRLV Brazilian strains showed TTG trinucleotide similar at positions 19–21 of the *gag* gene and different in the CAEV-Co strain, resulting in translation of a different amino acid, isoleucine in CAEV-Co and leucine in four SRLV Brazilian strains (Figs. 3 and 4).

Pairwise distance calculations were obtained by comparing nucleotides and amino acids sequences among the four Brazilian SRLV strains and known SRLV strains. The values closest to zero show the strains which are most similar (Table 2 and 3).

BR/CNPC-G2	-----TTCCTATCCCC-----	12
BR/CNPC-G3	-----TTCCTA--CCCC-----	10
BR/CNPC-G1	-----AATCCTA--CCCC-----	11
BR/CNPC-G4	-----TTCCTA--CCCC-----	10
CEAVCGCo	ACTGGAACAAGAGGAAAAGAAGAACAAAAGAGAAAAGGAAAGAGAGTGTCTT-----	939
CAEVBRMG	-----	
CAEVBrUFRGS	-----	
EV-1MVV	ACAGGAGAATAAGGAGGAAAAGGAGAAAAGGTAGAACAACTCTACCCTAATTTAGAGAA	921
SA-OMVV	ACACGAAAAACAGGAGGATAAAGAAAAGAGGTAGAACAACTCTACCCAACTTGGAAAA	932
P10LV	TCAAGAAAAACAAGAGGAGAAAAGAAAAGAAAATAGAACAAATTGTATCCTAATTTAGAGAC	910
K1514MVV	ACAAGAAAATAAGGAGGCCAAGGGGAGAAAGGTAGAGCAACTCTACCCCACTTAGAGAA	902



```

BR/CNPC-G2      AGTGGATCAAATTATGGGGGTAGGAA----- 325
BR/CNPC-G3      AGTGGATCAAATTATGGGGGTAGGAAA----- 324
BR/CNPC-G1      AGTGGATCAAATTATGGGGGTAGGAA----- 324
BR/CNPC-G4      AGTGGATCAAATAATGGGGGTAGGAA----- 323
CEAVCGCo       AGTGGATCAAATTATGGGGGTAGGACAAACAAATCAAGCAGCAGCACAAAGCTAACATGGA 1284
CAEVBRMG       AGTGGATCAAATTATGGGGGTAGGACAAACAAATCAAGCAGCGGCACAGGCTAACATGGA 333
CAEVBrUFRGS    AGTGGATCAAATTATGGGGATAGGACAAACAAATCAAGCAGCAGCACAAAGCTAACATGGA 305
EV-1MVV        GGTGGATCAAATCATGGGAGTAGGACAAACAAATCAACAGGCATCACAGGCTAATATGGA 1275
SA-OMVV        TGTGGATCAGATTATGGGAGTCGGACAAACAAATCAACAGGCATCGCAAGCTAATATGGA 1286
P10LV          AGTGGATCAAATTATGGGAGTGGACAAACAAATCAACAAGCTTCACAGGCTAATATGGA 1261
K1514MVV       GGTGGATCAAATAATGGGAGTGGACAAACCAATCAGCAAGCATCTCAAGCCAATATGGA 1256
                ***** * * ***** * * *

```

Fig. 3. Alignment of nucleotide sequences from the *gag* region of SRLV strains. Asterisks indicate identity among the strains.

```

BR/CNPC-G3      -----LIHQAGGRSWKAVDSVMFQQLQTVAMQHGLVSEDF 36
BR/CNPC-G4      -----LIHQAGGRSWKAVDSVMFQQLQTVAMQHGLVSEDF 36
BR/CNPC-G2      -----LIHQAGGRSWKAVDSVMFQQLQTVAMQHGLVSEDF 36
BR/CNPC-G1      -----LIHQAGGRSWKAVDSVMFQQLQTVAMQHGLVSEDF 36
CAEVBRMG       -----QAAGGRSWKAVDSVMFQQLQNVAMQHGLVSEDF 33
CEAVCGCo       MKDGLLEQEEKKEDKREKEESVFPPIVVQAAGGRSWKAVDSVMFQQLQTVAMQHGLVSEDF 180
CAEVBrUFRGS    -----AVDAVMFQQMQTVAMQHGLVSEDF 24
                *****:*****:*_******

```

```

BR/CNPC-G3      ERQLAYYATTWTSKDILEVLAMMPGNRAQKELIQGKLNEEAERWRRNPPPPAGGGLTVD 96
BR/CNPC-G4      ERQLAYYATTWTSKDILEVLAMMPGNRAQKELIQGKLNEEAERWRRNPPPPAGGGLTVD 96
BR/CNPC-G2      ERQLAYYATTWTSKDILEVLAMMPGNRAQKELIQGKLNEEAERWRRNPPPPAGGGLTVD 96
BR/CNPC-G1      ERQLAYYATTWTSKDILEVLAMMPGNRAQKELIQGKLNEEAERWRRNPPPPAGGGLTVD 96
CAEVBRMG       ERQLAYYATTWTSKDILEVLAMMPGNRAQKELIQGKLNEEAERWRRNPPPPAGGGLTVD 93
CEAVCGCo       ERQLAYYATTWTSKDILEVLAMMPGNRAQKELIQGKLNEEAERWRRNPPPPAGGGLTVD 240
CAEVBrUFRGS    ERQLAYCATTWTSKDILEVLAMMPGNRAQKELIQGKLNEEAERWRRNPPPPQGGGLTVD 84
                ***** *****:*****_*_******

```

Fig.4. Alignment of deduced amino acid sequences from the capsid protein of SRLV strains. Asterisks indicate identity between the strains.

### 3.5 Nucleotide sequence accession number

All new sequences were entered in the GenBank database and are available under check number EU300976, EU300977, EU300978, EU300979.

## Discussion

Two samples failed in the sequencing. A thymine in position 84, only found in sample BR/CNPC-G4 suggest that there may be errors and failures in the sequencing, which could be minimized by cloning these sequences. A cocktail of high fidelity enzymes was also used, but failed when amplified by PCR. The alternative to minimize the errors caused by the sequencing was to sequence in duplicates, repeating many times and changing sequencing parameters such as the time and speed of the push.

The four *gag* gene sequences Brazilian SRLV strains were compared to GenBank strains, and the results demonstrated that these sequences were more related to the caprine rather than the ovine strains. Further phylogenetic analysis of the proviral *gag* sequences

confirmed the initial classification and showed that they constituted sbtipo B1 of the CAEV group. The analyses of the sequences also showed that the viruses were genetically stable. The ancestors of these animals may have been infected for more twenty years ago, the time estimated for the virus to evolve. The results of this study indicate that future studies should concentrate on the *pol* or *env* regions rather than the *gag* region, as this is highly preserved and retains less phylogenetic signals.

All the four SRLV strains Brazilian showed TTG trinucleotide similar at positions 19–21 of the capsid peptide and different in CAEV-Co, resulting in translation of a different amino acid, isoleucine in CAEV-Co and leucine in four Brazilian SRLV strains (Figs. 3 and 4).

There was an absence of transversion, however transitions were observed. The results indicate that more studies should be conducted in this area of the genome in animals of Northeast Brazil. The cloning of this region would be ideal to confirm whether this triplet of nucleotides really exists or if it was just a sequencing error.

This region of the genome may be used to differentiate virus strains with infected animals from others and provide more specific diagnostic tests for local breeds, and establish eradication programs according to the distribution of lineages of LVPR and set the foundations for the development of reagents for the diagnosis of greater specificity and sensitivity in local cattle.

The great similarity between the four sequences from Northeast Brazil and the CAEV-Co may be explained by the vertical transmission of positive females over the generations. Animals from France were subjected to two tests of AGID with intervals of sixty days, and kept in isolation until the results of serology when know, and then be included in the herd. The negative results may mean that the animals were already infected prior to the tests and had not produced antibodies to detect the test used.

Contribution of false-negative results, may have occurred during of the period of immune window, which emphasizes the need for more sensitive and specific diagnostic tests for this stage of infection and for the establishment of more efficient control programs and sanitation barriers.



Tests such as RT-PCR would be ideal for the direct detection of viral RNA. This flock remained isolated for more than 20 years, minimizing the chances of infection by horizontal transmission.

To-date, only a small number of SRLVs has been completely sequenced, which has hindered the comparison and characterization of conserved and variable regions of the genome of these viruses. Knowledge of the genetic diversity of these viruses contributes to a better understanding of the molecular mechanisms of evolution, and heterogeneity epidemiological of infection.

This work may also contribute to a better understanding of the variability of SRLVs. It could also be a useful tool for SRLV diagnosis, eradication purposes and epidemiological investigations worldwide. It may also help in the development of diagnostic tests sensitive to local breeds and an effective vaccine for small ruminants.

**Table 2**

Nucleotide sequence diversity between Brazilian and prototypic SRLV strains

	CAEV-Co	BR/CNPC -G1	BR/CNPC -G2	BR/CNPC -G3	BR/CNPC -G4	CAEVBR- MG	CAEVBrUFR GS	EV1	SA-OMVV	P1OLV	K151 4
CAEV-Co	-										
BR/CNPC-G1	0.004										
BR/CNPC-G2	0.004	0.00									
BR/CNPC-G3	0.004	0.00	0.000								
BR/CNPC-G4	0.008	0.004	0.004	0.004							
CAEVBR-MG	0.056	0.060	0.060	0.060	0.064						
CAEVBrUFRGS	0.068	0.072	0.072	0.072	0.077	0.085					
EV1	0.197	0.20	0.203	0.203	0.203	0.198	0.218				
SA-OMVV	0.199	0.204	0.204	0.204	0.210	0.175	0.216	0.142			
P1OLV	0.204	0.210	0.210	0.210	0.215	0.209	0.221	0.169	0.161		
K1514	0.189	0.195	0.195	0.195	0.189	0.206	0.222	0.116	0.142	0.133	-

Pairwise distance calculation were obtained by comparisons of nucleotide sequences between the four Brazilian SRLV strains and known SRLV strains (GenBank accession numbers are shown in Table 1). Substitution Model: Maximum Composite Likelihood. Substitutions to Include: Transitions + Transversions

**Table 3**

Amino acid sequence diversity between Brazilian and prototypic SRLV strains

	BR/CNPC- G1	BR/CNPC- G2	BR/CNPC- G3	BR/CNPC- G4	CAEV-Co	CAEV BRMG	CAEV BRS	CAC44470	CAC44469	CAC44468	AAG48628	NP_040938	AAX81905	AAA91825	P33458
BR/CNPC-G1	-														
BR/CNPC-G2	0.000														
BR/CNPC-G3	0.000	0.000													
BR/CNPC-G4	0.000	0.000	0.000												
CAEV-Co	0.000	0.000	0.000	0.000											
CAEVBRMG	0.023	0.023	0.023	0.023	0.023										
CAEVBRBRS	0.047	0.047	0.047	0.047	0.047	0.071									
CAC44470	0.035	0.035	0.035	0.035	0.035	0.058	0.011								
CAC44469	0.011	0.011	0.011	0.011	0.011	0.035	0.058	0.047							
CAC44468	0.047	0.047	0.047	0.047	0.047	0.071	0.000	0.011	0.058						
AAG48628	0.095	0.095	0.095	0.095	0.095	0.108	0.134	0.121	0.095	0.134					
NP_040938	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.023	0.047	0.035	0.011	0.047	0.095				
AAX81905	0.011	0.011	0.011	0.011	0.011	0.035	0.047	0.035	0.023	0.047	0.108	0.011			
AAA91825	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.023	0.047	0.035	0.011	0.047	0.095	0.000	0.011		
P33458	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.023	0.047	0.035	0.011	0.047	0.095	0.000	0.011	0.000	-

Pairwise distance calculation were obtained by comparisons of amino acid sequences between the four Brazilian SRLV strains and known SRLV strains (GenBank accession numbers are shown in Table 1). Substitution Model: Poisson correction. Substitutions to Include: all

## Acknowledgements

Laboratory of Virology and Laboratory of Immunology - Veterinary Faculty UECE - Universidade Estadual do Ceará; Laboratory of Bioinformatics – Universidade Federal do Ceará (UFC), Fortaleza, Brazil; National Goat Research Center (CNPQ-Embrapa); Center of Biotechnology of Sobral (NUBIS); CAPES, FUNCAP and Banco do Nordeste.

## References

- BARROS, S.C., RAMOS, F., DUARTE, M., FAGULHA, T., CRUZ, B., FEVEREIRO, M., 2004. Genomic characterization of a slow/low Maedi visna virus. *Virus Genes* 29, 199–210.
- BENAVIDES, J., GOMEZ, N., GELMETTI, D., FERRERAS, M.C., GARCIA-PARIENTE, C., FUERTES, M., GARCIA-MARIN, J.F., PEREZ, V., 2006. Diagnosis of the nervous form of Maedi-visna infection with a high frequency in sheep in Castilla y Leon, Spain. *Vet. Rec.* 158 (7), 230–235.
- CASTRO RS, GREENLAND T, LEITE RC, GOUVEIA A, MORNEX JF, CORDIER G. Conserved sequence motifs involving the *tat* reading frame of Brazilian caprine lentivirus indicate affiliations to both caprine arthritis-encephalitis virus and visna-Maedi virus. *J Gen Virol* 1999;80(Pt7):1583–9.
- CHEBLOUNE Y, KARR B, SHEFFER D, LEUNG K, NARAYAN O. Variations in lentiviral gene expression in monocyte-derived macrophages from naturally infected sheep. *J Gen Virol* 1996;77 (Pt9):2037–51.
- CRAWFORD, T. B., ADAMS, D. S., CHEEVERS, W. P., AND CORK, L. C. (1980) Chronic arthritis in goats caused by a retrovirus. *Science* 207, 997–999.
- DRUMOND, B. P.; RESENDE, M. Phylogenetic analysis of small ruminant lentiviruses in naturally infected goats, based on sequence of capsid protein gene. In: 4o Encontro de Virologia do Mercosul e 12o Encontro Nacional de Virologia, 2001, Caldas Novas - GO. *Virus reviews and Research*, 2001. v. 06. p. 172-172.
- EWINGa, B. e GREEN, P. Base calling of automated sequencer traces using phred. II. Error probabilities. *Genome Research*, v. 8, n. 186-194, p. 1998.
- EWINGb, B., HILLER, L., WENDL, M. C. e GREEN, P. Base-calling of automated sequencer traces using phred. I. Accuracy assessment. *Genome Research*, v. 8, n., p. 175-185. 1998.
- FELSENSTEIN, J., 1985. Confidence limits on phylogenies: an approach using bootstrap. *Evolution* 39, 783– 791.
- GORDON, D.; ABAJIAN, C.; & GREEN, P. Consed: A graphical tool for sequence finishing. *Genome Research* v. 8, p. 195-202. 1998.
- KARR BM, CHEBLOUNE Y, LEUNG K, NARAYAN O. Genetic characterization of two phenotypically distinct North American ovine lentiviruses and their possible origin from caprine arthritisencephalitis virus. *Virology* 1996;225(1):1–10.

- LEROUX C, CHASTANG J, GREENLAND T, MORNEX J. Genomic heterogeneity of small ruminant lentiviruses: existence of heterogenous populations in sheep and of the same lentiviral genotypes in sheep and goats. *Arch Virol* 1997;142(6):1125–37.
- NARAYAN, O., CLEMENTS, J. E., STRANDBERG, J. D., CORK, L. C., AND GRIFFIN, D. E. (1980). Biological characterization of the virus causing leukoencephalitis and arthritis in goats. *J. Gen. Virol.* 50, 69– 79.
- PETERHANS, E., GREENLAND, T., BADIOLA, J., HARKISS, G., BERTONI, G., AMORENA, B., ELIASZEWICZ, M., JUSTE, R.A., KRASSNIG, R., LAFONT, J.P., LENIHAN, P., PETURSSON, G., PRITCHARD, G., THORLEY, J., VITU, C., MORNEX, J.F., PEPIN, M., 2004. Routes of transmission and consequences of small ruminant lentiviruses (SRLVs) infection and eradication schemes. *Vet. Res.* 35, 257–274.
- PISONI, G., QUASSO, A., MORONI, P., 2005. Phylogenetic analysis of small-ruminant lentivirus subtype B1 in mixed flocks: Evidence for natural transmission from goats to sheep. *Virology* 339, 147–152.
- QUERAT, G., AUDOLY, G., SONIGO, P., VIGNE, R., 1990. Nucleotide sequence analysis of SA-OMVV, a visna-related ovine lentivirus: phylogenetic history of lentiviruses. *Virology* 175, 434–447.
- RAVAZZOLO, A.P., REISCHAK, D., PETERHANS, E., ZANONI, R., 2001. Phylogenetic analysis of small ruminant lentiviruses from Southern Brazil. *Virus Res.* 79 (1– 2), 117– 123.
- ROLLAND, M., MOONEY, J., VALAS, S., PERRIN, G., MAMOUN, R.Z., 2002. Characterisation of an Irish caprine lentivirus strain-SRLV phylogeny revisited. *Virus Res.* 85, 29–39.
- SAITOU, N., NEI, M., 1987. The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol. Biol. Evol.* 4, 406–425.
- SALTARELLI, M., QUERAT, G., KONINGS, D.A., VIGNE, R., CLEMENTS, J.E., 1990. Nucleotide sequence and transcriptional analysis of molecular clones of CAEV which generate infectious virus. *Virology* 179, 347–364.
- SARGAN, D.R., BENNET, I.D., COUSENS, C., ROY, D.J., BLACKLAWS, B.A., DALZIEL, R.G., WATT, N.J., MCCONNELL, I., 1991. Nucleotide sequence of EV1, a British isolate of Maedi-visna virus. *J. Gen. Virol.* 72, 1893–1903.
- SHAH, C., BONI, J., HUDER, J.B., VOGT, H.R., MUHLHERR, J., ZANONI, R., MISEREZ, R., LUTZ, H., SCHUPBACH, J., 2004A. 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* 319 (1), 12–26.
- SHAH, C., HUDER, J.B., BONI, J., SCHONMANN, M., MUHLHERR, J., LUTZ, H., SCHUPBACH, J., 2004B. Direct evidence for natural transmission of small-ruminant lentiviruses of subtype A4 from goats to sheep and vice versa. *J. Virol.* 78(14), 7518–7522.

- SONIGO, P., ALIZON, M., STASKUS, K., KLATZMANN, D., COLE, S., DANOS, O., RETZEL, E., TIOLLAIS, P., HAASE, A., WAIN-HOBSON, S., 1985. Nucleotide sequence of the visna lentivirus: relationship to the AIDS virus. *Cell* 42, 369–382.
- TAMURA K, DUDLEY J, NEI M E KUMAR S (2007) MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0. *Molecular Biology and Evolution* 24:1596-1599. (Publication PDF at <http://www.kumarlab.net/publications>).
- TAMURA, K., NEI, M., 1993. Estimation of the number of nucleotide substitutions in the control region of mitochondrial DNA in humans and chimpanzees. *Mol. Biol. Evol.* 10, 512– 526.
- VALAS S, BENOIT C, BAUDRY C, PERRIN G, MAMOUN RZ. Variability and immunogenicity of caprine arthritis-encephalitis virus surface glycoprotein. *J Virol* 2000;74(13):6178–85.
- VILLET S, BOUZAR BA, MORIN T, VERDIER G, LEGRAS C, CHEBLOUNE Y. Maedi-visna virus and caprine arthritis encephalitis virus genomes encode a Vpr-like but not Tat protein. *J Virol* 2003;77(17): 9632–8.
- ZANONI, R.G., 1998. Phylogenetic analysis of small ruminant lentiviruses. *J. Gen. Virol.* 79, 1951–1961.

## 6. CONCLUSÃO

Os alinhamentos de nossas seqüências com outras já disponíveis em bancos de dados genéticos revelaram que nossas linhagens estão mais relacionadas com CAEV que MVV. A classificação mostrou que estas linhagens pertencem ao subtipo B1 do grupo de CAEV.

A região *gag* não é ideal para avaliar os sinais genéticos uma vez que é uma região altamente conservada.

Os animais positivos eram descendentes de outros animais infectados que vieram para o Brasil da França em 1986, nossos resultados mostram a importância da barreira sanitária entre países exportadores.

## **7. PERSPECTIVAS**

Estabelecer programas de erradicação de acordo com a distribuição das linhagens de LVPR, além do que poderá fundamentar o desenvolvimento de reagentes para diagnóstico de maior especificidade e sensibilidade do que os atualmente disponíveis no mercado em rebanhos locais. A aplicação da análise filogenética para seqüências de CAEV e MVV é de imensa importância para este tipo de análise epidemiológica de infecções por lentivírus de pequenos ruminantes e também para estudar as potenciais diferenças de virulência entre linhagens de LVPR circulantes, ajudando a entender as propriedades genéticas, protéicas e antigênicas desses vírus, sua patogênese, epidemiologia e relacionamento filogenético e poderão ainda ser estudados possíveis antígenos vacinais.

## 8. REFERÊNCIAS GERAIS

- ABELSON, M. L. and SCHOBORG, R. V. Characterization of the caprine arthritis encephalitis virus (CAEV) *rev* N-terminal elements required for efficient interaction with the RRE. 2003. *Virus Research* 92, 23-35
- ABREU, F.T. Isolamento de um vírus sincicial caprino (amostra RPE-03) e comparação da sensibilidade e especificidade relativas do antígeno Maedi-Visna frente ao antígeno AEC (amostra Cork) em teste de IDGA. Recife, PE: UFRPE - Departamento de Medicina Veterinária. 1996, 45p. Dissertação (Mestrado).
- ABREU, S. R. O., CASTRO, R. S., NASCIMENTO, S. A., (1998). Produção de antígeno nucleoprotéico dos vírus da artrite encefalite caprina e comparação com os vírus Maedi-visna para imunodifusão em ágar-gel. *Pesq. Vet. Bras.* 18:57-60.
- ADAMS, D. S., KLEVJER-ANDERSON, P., CARLSON, J.L., McGUIRE, T.C., GORHAM, J. R. Transmission and control of caprine arthritis-encephalitis virus. *Am. J. Vet. Res.*, v. 44, n. 9, p.1670-1675, 1983.
- ADAMS, D.S., GORHAM, J.R. The gp135 of caprine arthritis encephalitis virus affords greater sensitivity than the p28 in immunodiffusion serology. *Res. Vet. Sci.*, v. 40, n. 2, p. 157-160, 1986.
- AGNARSDOTTIR, G., THORSTEINSDOTTIR, H., OSKARSSON, T., MATTHIASDOTTIR, S., St HAFLIDADOTTIR, B., ANDRESSON, O. S. and ANDRESDOTTIR, V. (2000). The long terminal repeat is a determinant of cell tropism of Maedi-visna virus. *Journal of General Virology*, 81,1901-1905.
- ANDRESDOTTIR, V., TANG, X., AGNARSDOTTIR, G., ANDRESSON, O.S., GEORGSSON, G., SKRABAN, R., TORSTEINSDOTTIR, S., RAFNAR, B., BENEDIKTSDOTTIR, E., MATTHIASDOTTIR, S., ARNADOTTIR, S., HOGNADOTTIR, S., PALSSON, P.A., PETURSSON, G., 1998. Biological and genetic differences between lung- and brain-derived isolates of Maedi-visna virus. *Virus Genes* 16, 281–293.
- AHMAD, R., SINDHU, S.T.A.K., TOMA, E., MORRISSET, R., VINCELETTE, J., MENEZES, J., AHMAD, A., 2001. Evidence for a correlation between antibody-dependent cellular cytotoxicity-mediating anti-HIV-1 antibodies and prognostic predictors of HIV infection. *J. Clin. Immunol.* 21, 227–233.
- ALI AL AHMAD, M.Z., FIENI, F., GUIGUEN, F., LARRAT, M., PELLERIN, J.L., ROUX, C., CHEBLOUNE, Y., 2006. Cultured early goat embryos and cells are susceptible to infection with caprine encephalitis vírus. *Virology* 353, 307–315
- ALI AL AHMAD, M.Z., FIENI, F., MARTIGNAT, L., CHATAGNON, G., BARIL, G., BOUVIER, F., CHEBLOUNE, Y., 2005. Proviral DNA of caprine arthritis encephalitis vírus (CAEV) is detected in cumulus oophorus cells but not in oocytes from naturally infected goats. *Theriogenology* 64, 1656–1666.
- ALMEIDA, N. C. Isolamento e identificação dos vírus Maedi-Visna através de microscopia eletrônica de transmissão de animal comprovadamente soropositivo pelo IDGA. Fortaleza, 2003. 68p. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal) – Faculdade de veterinária, Universidade Estadual do Ceará.
- ALMEIDA, N. C.; TEIXEIRA, M. F. S. Levantamento sorológico de lentivírus ovino em animais destinados ao abate na região metropolitana de Fortaleza. *Anais da IV Semana Universitária da UECE, Fortaleza: Universidade Estadual do Ceará, 1999, v.1, p. 300-300.*



- ALVAREZ, V., ARRANZ, J., DALTABUIT, M., LEGINAGOIKOA, I., JUSTE, R.A., AMORENA, B., de ANDRES, D., LUJAN, L.L., BADIOLA, J.J., BARRIATUA, E., 2005. Relative contribution of colostrum from Maedi-visna virus (MVV) infected ewes to MVV-seroprevalence in lambs. *Res. Vet. Sci.* 78, 237–243.
- ALVAREZ, V., DALTABUIT-TEST, M., ARRANZ, J., LEGINAGOIKOA, I., JUSTE, R.A., AMORENA, B., de ANDRES, D., LUJAN, L.L., BADIOLA, J.J., BARRIATUA, E., 2006. PCR detection of colostrum-associated Maedi-Visna virus (MVV) infection and relationship with ELISA-antibody status in lambs. *Res. Vet. Sci.* 80, 226–234.
- AMADO, R.G., CHEN, I.S., 1999. Lentiviral vectors the promise of gene therapy within reach? *Science* 285, 674–676.
- ANDRESSON OS, ELSER JE, TOBIN GJ, GREENWOOD JD, GONDA MA, GEORGSSON G, ANDRESDOTTIR V, BENEDIKTSDOTTIR E, CARLSDOTTIR HM, MANTYLA EO, RAFNAR B, PALSSON PA, CASEY JM, PETURSSON P. Nucleotide sequence and biological properties of a pathogenic proviral molecular clone of neurovirulent visna virus. *Virology* 1993;193:89±105.
- ANGELOPOULOU K, KARANIKOLAOU K, PANASTASOPOULOU M, KOUMPATI-ARTOPIOU M, VLEMMAS I, PAPADOPOULOS O, et al. First partial characterization of small ruminant lentiviruses from Greece. *Vet Microbiol* 2005;109(1–2):1–9.
- ANGELOPOULOU, K., BRELLOU, G. D. and VLEMMAS, I. (2006b). Detection of Maedi-visna virus in the kidneys of naturally infected sheep. *Journal of Comparative Pathology*, 134, 329-335.
- ANGELOPOULOU, K., BRELLOU, G. D., GREENLAND, T. and VLEMMAS, I. (2006a). A novel deletion in the LTR region of a Greek small ruminant lentivirus may be associated with low pathogenicity. *Virus Research*, 118, 178-184.
- BANKS, K. L.; ADAMS, D. L.; McGUIRE, T. C.; JAM, N; CARLSON, B. S. Experimental infection of sheep by caprine arthritis-encephalitis virus and goats by progressive pneumonia virus. *American Journal Veterinary Research*, v. 44. n. 2, p. 2307-2310, 1983.
- BARROS, S.C., ANDRESDOTTIR, V., FEVEREIRO, M., 2005. Cellular specificity and replication rate of Maedi visna virus *in vitro* can be controlled by LTR sequences. *Arch. Virol.* 150, 201–213.
- BARROS, S.C., RAMOS, F., DUARTE, M., FAGULHA, T., CRUZ, B., FEVEREIRO, M., 2004. Genomic characterization of a slow/low Maedi visna virus. *Virus Genes* 29, 199–210.
- BENAVIDES, J., GARCÍA-PARIENTE, C., FERRERAS, M. C., 2006. Diagnosis of clinical cases of the nervous form of Maedi-Visna in 4 - and 6-month-old lambs.. *The Veterinary Journal*, Short communication.
- BENAVIDES, J., GOMEZ, N., GELMETTI, D., FERRERAS, M.C., GARCIA-PARIENTE, C., FUERTES, M., GARCIA-MARIN, J.F., PEREZ, V., 2006. Diagnosis of the nervous form of Maedi-visna infection with a high frequency in sheep in Castilla y Leon, Spain. *Vet. Rec.* 158 (7), 230–235.
- BERKOWITZ, R.D., ILVES, H., PLAVEC, I., VERES, G., 2001. Gene transfer systems derived from visna virus: analysis of virus production and infectivity. *Virology* 279, 116–129.
- BERRIATUA, E., ALVAREZ, V., EXTRAMIANA, B., GONZALEZ, L., DALTABUIT, M., JUSTE, R., 2003. Transmission and control implications of seroconversion to Maedi-visna virus in Basque dairy-sheep flocks. *Prev. Vet. Med.* 60, 265–279.

- BERTONI, G., HERTIG, C., ZAHNO, M.L., VOGT, H.R., DUFOUR, S., CORDANO, P., PETERHANS, E., CHEEVERS, W.P., SONIGO, P., PANCINO, G., 2000. B-cell epitopes of the envelope glycoprotein of caprine arthritis–encephalitis virus and antibody response in infected goats. *J. Gen. Virol.* 81, 2929–2940.
- BERTONI, G., ZAHNO, M. L., ZANONI, R., VOGT, H. R., PETERHANS, E., RUFF, G., CHEEVERS, W. P., SONIGO, P., PANCINO, G. Antibody reactivity to the immunodominant epitopes of the caprine arthritis-encephalitis virus gp38 transmembrane protein associates with development of arthritis. *J. Virol.*, v. 68, n. 11, p. 7139-7147, 1994.
- BERTONI, G., ZAHNO, M.-L., ZANONI, R., VOGT, H.R., PETERHANS, E., RUFF, G., CHEEVERS, W.P., SONIGO, P., PANCINO, G., 1994. Antibody reactivity to the immunodominant epitopes of the caprine arthritis–encephalitis virus gp38 transmembrane protein associates with the development of arthritis. *J. Virol.* 68, 7139–7147.
- BIESCAS, E., PREZIUSO, S., BULGIN, M. and DEMARTINI, J. C. (2005). Ovine lentivirus-associated leucomyelitis in naturally infected North American sheep. *Journal of Comparative Pathology*, 132,107-116.
- BJERRUM, O.J., HEEGAARD, N. H. H. *Handbook of Immunoblotting of Proteins: technical descriptions.* v. 1, Florida: CRC Press, 1988. 265p
- BLACKLAWS, B.A., BERRIATUA, E., TORSTEINSDOTTIR, S., WATT, N.J., de ANDRES, D., KLEIN, D., HARKISS, G.D., 2004. Transmission of small ruminant lentiviruses. *Vet. Microbiol.* 101, 199–208.
- BLACKLAWS, B.A., BIRD, P., ALLEN, D., ROY, D.J., MACLENNAN, I.C.M., HOPKINS, J., SARGAN, D.R., MCCONNELL, I., 1995. Initial lentivirus-host interactions within lymph nodes: a study of Maedi-Visna virus infection in sheep. *J. Virol.* 69, 1400–1407.
- BLACKLAWS, B.A., BIRD, P., MCCONNELL, I. Pathogenesis and immunity in lentivirus infections of small ruminants. In: GODDEERIS, B.M.L. E MORRISON, W.I. *Cell-Mediated Immunity in Ruminants.* Boca Raton: CRC Press, 1994. 250p.
- BLÖMER, U., NALDINI, L., KAFRI, T., TRONO, D., VERMA, I.M., GAGE, F.H., 1997. Highly efficient and sustained gene transfer in adult neurons with a lentivirus vector. *J. Virol.* 71, 6641–6649.
- BOLEA, R., MONLEON, E., CARRASCO, L., VARGAS, A., de ANDREC, D., AMORENA, B., BADIOLA, J. J. and LUJAN, L. (2006). Maedi-visna virus infection of ovine mammary epithelial cells. *Veterinary Research*, 37,133-144.
- 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. 2003. Specific G2 arrest of caprine cells infected with a caprine arthritis encephalitis virus expressing *vpr* and *vpx* genes from simian immunodeficiency virus. *Virology* 309, 41–52
- BRELLOU, G.D.; ANGELOPOULOU, K; POUTAHIDIS, T.; VLEMMAS, T. 2007. Detection of Maedi-Visna Virus in the Liver and Heart of Naturally Infected Sheep. *J. Comp. Path.*, Vol.136, 27-35.
- BRODIE, S. J., de la CONCHA – BERMEJILLO, A., SNOWDER, G. D., DE MARTINI, J. C. Current concepts in the epizootiology, diagnosis, and economic importance of ovine progressive pneumonia in North America: A review. *Small Ruminant Research*, v.27, p.1-17, 1998.

- BRODIE, S., PEARSON, L., ZINK, M., BICKLE, H., ANDERSON, B., MARCOM, K., DEMARTINI, J. Ovine lentivirus expression and disease. Virus replication, but not entry, is restricted to macrophages of specific tissues. *Am. J. Pathol.*, v.146, p.250-263, 1995.
- BROWN, C. In situ hybridization with riboprobes: an overview for veterinary pathologists. *Vet. Pathol.*, v. 35, n.3., p.159-167, 1998.
- BRUETT, L., CLEMENTS, J.E., 2001. Functional murine leukaemia virus vectors pseudotyped with the visna virus envelope show expanded visna virus cell tropism. *J. Virol.* 75, 11464–11473.
- BUCHSCHACHER JR., G.L., WONG-STAAAL, F., 2000. Development of lentiviral vectors for gene therapy for human diseases. *Blood* 95, 2499–2504.
- BUDHIA, S., HARING, L.F., MCCONNELL, I., BLACKLAWS, B.A., 2006. Quantitation of ovine cytokine mRNA by real-time RT-PCR. *Journal of Immunological Methods* 309, 160–172.
- BUKRINSKY, M.I., HAGGERTY, S., DEMPSEY, M.P., SHAROVA, N., ADZHUBEL, A., SPITZ, L., LEWIS, P., GOLDFARB, D., EMERMAN, M., STEVENSON, M., 1993. A nuclear localization signal within HIV-1 matrix protein that governs infection of non-dividing cells. *Nature* 365, 666–669.
- CAMPBELL, B.J., AVERY, R.J., 1996. Sequence analysis and transcriptional activity of the LTR of OLV-CU1, a North American ovine lentivirus. *J. Gen. Virol.* 77, 2999–3004.
- CAPUCCHIO, M.T., SANNA, E., SANNA, M. P., FARIGU, S., MINELLI, R. and GUARDA, F. (2003). Maedi-visna virus detection in ovine third eyelids. *Journal of Comparative Pathology*, 129, 37-43.
- CAREY, N.; DALZIEL, R. G. The biology of Maedi-visna virus. An overview. *Brazilian Veterinary Journal*, v. 149, p., 437-454, 1983.
- CARROZZA, M.L., MAZZEI, M., BANDECCHI, P., ARISPICI, M., TOLARI, F., 2003. In situ PCR-associated immunohistochemistry identifies cell types harbouring the Maedi-Visna virus genome in tissue sections of sheep infected naturally. *J. Virol. Methods* 107, 121–127.
- CARRUTH, L.M., MORSE, B.A, CLEMENTS, J.E. The leucine domain of the visna Tat protein mediates targeting to an AP-1 site in viral long terminal repeat. *J. Virol.*, v.70, p.4338-4344, 1996.
- Castro, R. S., (1998). *Lentivírus de pequenos ruminantes: ensaios imunoenzimáticos, Perfil sorológico e inferências filogenéticas*. Belo Horizonte. MG: UFMG – Escola de Veterinária. 132p. Tese (Doutorado).
- CASTRO, R.S., GREENLAND, T., LEITE, R.C., GOUVEIA, A., MORNEX, J.F., CORDIER, G., 1999. Conserved sequence motifs involving the *tat* reading frame of Brazilian caprine lentiviruses indicate affiliations to both caprine arthritis-encephalitis virus and visna-Maedi virus. *J. Gen. Virol.* 80, 1583–1589.
- CHEBLOUNE, Y., KARR, B., SHEFFER, D., LEUNG, K., NARAYAN, O. Variation in lentiviral gene expression in monocyte-derived macrophages from naturally infected sheep. *J. Gen. Virol.*, v.77, p.2037-2051, 1996.
- CHEBLOUNE, Y., KARR, B., SHEFFER, D., LEUNG, K., NARAYAN, O., 1996. Variations in lentiviral gene expression in monocyte-derived macrophages from naturally infected sheep. *J. Gen. Virol.* 77, 2037–2051.
- CHEBLOUNE, Y., SHEFFER, D., KARR, B.M., STEPHENS, E., NARAYAN, O. Restrictive type of replication of Ovine/Caprine lentiviruses in ovine Fibroblast Cell Cultures. *Virology*, v.222, p.21-30, 1996.

- CHEEVERS, W. P., McGUIRE, T. C. The lentiviruses: MAEDI/VISNA, Caprine Arthritis-encephalitis and Equine Infectious Anemia. *Adv. Virus Res.*, v. 34, p. 189-215, 1988.
- CHEEVERS, W. P., McGUIRE, T. C., NORTON, L., CORDERY-COTTER, R., KNOWLES, D. P. Failure of neutralizing to regulate CAE lentivirus expression *in vivo*. *Virology*, v.196, p.835-839, 1993.
- CHEEVERS, W.P., BEYER, J.C., KNOWLES, D.P., 1997. Type 1 and type 2 cytokine gene expression by viral gp135 surface protein-activated T lymphocytes in caprine arthritis-encephalitis lentivirus infection. *J. Virol.* 71, 6259– 6263.
- CHEEVERS, W.P., SNEKVIK, K.R., TRUJILLO, J.D., KUMPULA-MCWHIRTER, N.M., PRETTY ON TOP, K.J., KNOWLES, D.P., 2003. Prime-boost vaccination with plasmid DNA encoding caprine arthritis-encephalitis lentivirus *env* and viral SU suppresses challenge virus and development of arthritis. *Virology* 306, 116– 125.
- CHI, D., HENRY, J., KELLEY, J., THORPE, R., SMITH, J.K., KRISHNASWARNY, G., 2000. The effects of HIV infection on endothelial functions. *Endothelium* 7, 223–242.
- CLEMENTS, J. E. and PAYNE, S. L. (1994). Molecular basis of the pathobiology of lentiviruses. *Virus Research*, 32, 97-109.
- CLEMENTS, J. E. and ZINK, M. C. (1996). Molecular biology and pathogenesis of animal lentivirus infections. *Clinical Microbiology Reviews*, 9,100-117.
- CLEMENTS, J.E., NARAYAN, O., CORK, L.C. Biochemical characterization of the virus causing leucoencephalitis and arthritis in goats. *J. Gen. Virol.*, v. 50, p. 423-427, 1980.
- COFFIN, J. M. Retroviridae: the virus their of replication. In: FIELDS, B. N.; KNIPE, D. M.; HOWLEY, P. M.; CNANOCK, R. M.; MELNICK, J. L.; MONATH, T. P.; ROIZMAN, B.; STRAUS, S. E. 3 ed. *Fields Virology*, Philadelphia, Lippincoh-Raven, p. 1767-1847, 1996.
- CONCHA-BERMEJILLO, A. Maedi-visna and ovine progressive pneumonia. *Vet. Clin. North Am.: Food Anim. Pract.*, v. 13, n. 1, p. 13-33, 1997.
- CONSTABLE, P. D.; MEIER, W. A.; FOLEY, G. L.; MORIN, D.; CUTLIP, R. C.; ZACHARY, J. F. Visna-like disease in a ram with chronic demyelinating encephalitis. *Journal American Veterinary Medicine Association*. v. 208, p. 117-120, 1996.
- CONTRERAS, A. et al. Molecular characterization and phylogenetic study of Maedi Visna and Caprine Arthritis Encephalitis viral sequences in sheep and goats from Spain. 2006. *Virus Research* 121, 189–198.
- CRAWFORD, T.B., ADAMS, D.S., CHEEVERS, W.P., CORK, L.C., 1980. Chronic arthritis in goats caused by a retrovirus. *Science* 207, 997–999.
- CUTLIP, R. C., LAIRD, G. A. Isolation and characterization of a virus associated with progressive pneumonia (Maedi) of sheep. *American Journal Veterinary Research*, v. 37, p. 1377-1382, 1976.
- CUTLIP, R.C., LEHMKUHL, D., SCHMERR, M.J.F., BROGDEN, K.A. Ovine progressive pneumonia (Maedi-visna) in sheep. *Vet. Microbiol.*, v.17, p. 237-250, 1988.
- DAHLBERG, J. E., GASKIN, J. M., PERK, K. Morphological and immunological comparison of caprine arthritis encephalitis and ovine progressive pneumonia viruses. *J. Virol.*, v. 39, n. 3, p. 914-919, 1981.
- DAWSON, M. Caprine arthritis-encephalitis and Maedi-visna: complex disease syndromes associated with lentivirus infections of goats and sheep. *Goat Vet. Society J.*, v. 4, n. 2, p. 25-28, 1983.
- DAWSON, M., 1980. Maedi/visna: a review. *Veterinary Record* 106, 212–216.

- DAWSON, M., BIRONT, P., HOUWERS, D.J. Comparison of serological tests used in three state veterinary laboratories to identify Maedi-visna virus infection. *Vet. Rec.*, v. 111, n. 19, p. 432-434, 1982.
- DE ANDRÉS, D., KLEIN, D., WATT, N.J., BERRIATUA, E., TORSTEINSDOTTIR, S., BLACKLAWS, B. A., HARKISS, G.D., 2005. Diagnostic tests for small ruminant lentiviruses. *Veterinary Microbiology* 107, 49–62.
- DE BÔER, G. F. Zwoergerziekte virus, the causative agent for progressive intestinal pneumonia (Maedi) and meningo-leucoencephalitis (visna) in sheep. *Research Veterinary Science*, v. 18, p. 15-25, 1975.
- DE LA CONCHA – BERMEJILLO, A., BRODIE, S. J., MAGNUS – CORRAL, S., BOWEN, R. A., DEMARTINI, J. C.,(1995). Pathologic and serological responses of isogeneic twin lambs to phenotypically distinct lentiviruses . *J. Acquir. immune defice. syndr. human retrovirol.* 8: 116-123, 1995.
- DANTAS, T.V.M.; Desenvolvimento e padronização de ELISA Indireto para diagnóstico de Maedi-Visn Vírus de ovinos. Fortaleza:UECE, 2004. 77p. Dissertação de Mestrado.
- 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, p. 29-40,1999.
- ELLIS, T.M. Blood leukocyte infection rates in caprine arthritis-encephalitis virus infected goats. *Aust. Vet. J.*, v. 67, n.8, p.302-303, 1990.
- ELLIS, T.M., ROBINSON, W., WILCOX, G. Effect of colostrum deprivation of goat kids on the natural transmission of caprine retrovirus infection. *Aust. Vet. J.*, v.60, p.326-329, 1983.
- ELLIS, T.M., ROBINSON, W., WILCOX, G. The pathology and aetiology of lung lesions in goats infected with caprine arthritis-encephalitis virus. *Aust. Vet. J.* , v. 65, n.3, p.69-73, 1988.
- ELLIS, T.M., WILCOX, G. E., ROBINSON, W. F. Antigenic variation of caprine arthritis encephalitis virus during persistent infection of goats. *J. Gen. Virol.*, v. 63, n. 12, p. 3145-3152, 1987.
- ELTAHIR, Y. M., DOVAS, C.I., PAPANASTASSOPOULOU, M., KOUMBATI, M., GIADINIS, N., VERGHESE-NIKOLAKAKI, S., KOPTOPOULOS, G., 2006. Development of a semi-nested PCR using degenerate primers for the generic detection of small ruminant lentivirus proviral DNA. *Journal of Virological Methods* 135, 240–246.
- EMBRAPA. Relatório de Consultoria - Programa de Controle da Artrite Encefalite Caprina a Vírus (PCAEV) (subprojeto N° 06.0.94.102-01). Centro Nacional de Pesquisa de Caprinos.1994, 125p.
- ERIKSSON, K.; MCINNES, E.; RYAN, S.; TONKS, P.; MCCONNELL, I.; BLACKLAWS, B. 1999a. CD4+ T-Cells Are Required for the Establishment of Maedi-visna Virus Infection in Macrophages but Not Dendritic Cells *in vivo*. *Virology* 258, 355-364.
- ERIKSSON, K., MCINNES, E., RYAN, S., TONKS, P., MCCONNELL, I., BLACKLAWS, B., 1999b. *In vivo* depletion of CD8. cells does not affect primary Maedi visna virus infection in sheep . *Veterinary Immunology and Immunopathology.* 70, 173±187
- FEVEREIRO, M. T. AND BARROS, S.S., 2004. Caracterização biológica e molecular de um lentivírus de ovino isolado em Portugal. *RPCV*, 99 (549) 27-39.

- 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, p. 101-108, 1999.
- FIELDS, B. N.; KNIPE, D. M.; HOWLEY, P. M.; CHANOCK, R. M.; MELNICK, J. L.; MONATH, T. P.; ROIZMAN, B.; STRAUS, S. E. *Retroviridae: The viruses and their replication*. IN. *Fields Virology*. Ed. Lippincott-Raven, 3 ed., v. 1, p. 1767-1847, 1996.
- FIENI, F., ROWE, J., VAN HOOSEAR, K., BURUCOA, C., OPPENHEIM, S., ANDERSON, G., MURRAY, J., BONDURANT, R., 2002. Presence of caprine arthritis-encephalitis virus (CAEV) infected cells in flushing media following oviductal-stage embryo collection. *Theriogenology* 57, 931–940.
- FIENI, F., ROWE, J., VAN HOOSEAR, K., BURUCOA, C., OPPENHEIM, S., ANDERSON, G., MURRAY, J., BONDURAN, R., 2003. Presence of caprine arthritis-encephalitis virus (CAEV) proviral DNA in genital tract tissues of superovulated dairy goat does. *Theriogenology* 59, 1515-1523
- FREED, E.O., 1998. HIV-1 Gag proteins: diverse functions in the virus life cycle. *Virology* 251, 1–15.
- GABUZDA, D.H., HESS, J.L., SMALL, J.A., CLEMENTS, J., 1989. Regulation of the visna virus long terminal repeat in macrophages involves cellular factors that bind sequences containing AP-1 sites. *Mol. Cell Biol.* 9, 2728–2733.
- GANGOPADHYAY, A., JOLLY, P.E., 2003. Lack of enhancement of caprine arthritis encephalitis virus infection in monocyte-derived macrophage cultures by sera from goats that developed severe arthritis after vaccination and virus challenge. *Cell. Mol. Biol.* 49 (7), 1177–1182.
- GDOVIN, S., CLEMENTS, J., 1992. Molecular mechanisms of visna virus *tat*: identification of the targets for transcriptional activation and evidence for a post-transcriptional effect. *Virology* 188, 438–450.
- GENDELMAN, H. E., NARAYAN, O., KENNEDY-STOSKPF, S., KENNEDY, P. G. E., GHOTBI, Z., CLEMENTS, J. E., STANLEY, J., PEZESHKPOUR, G. Tropism of sheep lentivirus for monocytes: susceptibility to infection and virus gene expression increase during maturation of monocytes to macrophages. *Journal Virology*. n. 58, v. 1, p. 67-74, 1986.
- GEORGSSON, G., HOUWERS, D. J., PALSSON, P. A. and PETURSSON, G. (1989). Expression of viral-antigens in the central nervous system of visna-infected sheep: an immunohistochemical study on experimental visna induced by virus strains of increased neurovirulence. *Acta Neuropathologica*, 77, 299-306.
- GERMAIN, K.; VALAS, S. Distribution and heterogeneity of small ruminant lentivirus envelope subtypes in naturally infected French sheep. 2006. *Virus Research* 120, 156–162
- GJERSET, B., JONASSEN, C.M., RIMSTAD, E., 2007. Natural transmission and comparative analysis of small ruminant lentiviruses in the Norwegian sheep and goat populations. *Virus Research* 125, 153–161.
- GJERSET, B., STORSET, A.K., RIMSTAD, E., 2006. Genetic diversity of small-ruminant lentiviruses: characterization of Norwegian isolates of Caprine arthritis encephalitis virus. *J. Gen. Virol.* 87, 573–580.
- 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. *J. Gen. Virol.*, v. 66, p. 1233-1240, 1985.

- GONDA, M. A. Molecular biology and virus-host interactions of lentiviruses. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, v. 724, p.22-42, 1994.
- GONDA, M. A.; BRAUM, M. J.; CLEMENTS, J. E.; PYPER, 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 National Academy Science. USA*, v. 83, p. 4007-4011, 1986.
- GONZÁLEZ, B., REINA, R., GARCÍA, I., ANDRÉS, S., GLARIA, I., ALZUETA, M., MORA, M.I., JUGO, B.M., ARRIETA-AGUIRRE, I., DE LA LASTRA, J.M.P., RODRÍGUEZ, D., RODRÍGUEZ, J.R., ESTEBAN, M., GRILLO, M.J., BLACKLAWS, B.A., HARKISS G.D., CHEBLOUNE, Y., LUJÁN L., DE ANDRÉS, D., AMORENA, B., 2005. Mucosal immunization of sheep with a Maedi-Visna virus (MVV) *env* DNA vaccine protects against early MVV productive infection. *Vaccine* 23, 4342–4352.
- GOUVEIA, A. M., SANTA ROSA, J., PINHEIRO, R. R., ALVES, F. S. F., VIDAL, C. E. S. Implantação de um programa de controle da CAEV em sistemas epidemiológicos distintos. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE MED. VETERINÁRIA, 23, Recife-PE. Anais... Recife: 1994. p. 102. Resumo.
- GREENWOOD, P.L., NORTH, R.N., KIRKLAND, P.D., 1995. Prevalence, spread and control of caprine arthritis–encephalitis virus in dairy goat herds in New South Wales. *Aust. Vet. J.* 72, 341– 345.
- GREGO, E., BERTOLOTTI, L., CARROZZA, M.L., PROFITI, M., MAZZEI, M., TOLARI, F., ROSATI, S., 2005. Genetic and antigenic characterization of the matrix protein of two genetically distinct ovine lentiviruses. *Vet. Microbiol.* 106, 179–185.
- GREGO, E., PROFITI, M., GIAMMARIOLI, M., GIANNINO, L., RUTILI, D., WOODALL, C., ROSATI, S., 2002. Genetic heterogeneity of small ruminant lentiviruses involves immunodominant epitope of capsid antigen and affects sensitivity of single-strain-based immunoassay. *Clin. Diagn. Lab. Immunol.* 9, 828–832.
- GROSSI, P., GIUDICE, C., BERTOLETTI, I., CIOCCARELLI, G., BROCCHI, E., CAMMARATA, G., GELMETTI, D., 2005. Immunohistochemical detection of the p27 capsid protein of caprine arthritis–encephalitis virus (CAEV) in bone-marrow cells of seropositive goats. *J. Comp. Pathol.* 133, 197–200.
- GUDMUNDSSON, B., BJARNADOTTIR, H., KRISTJANSDOTTIR, S., JONSSON, J.J., 2003. Quantitative assays for Maedi-visna virus genetic sequences and RNAs based on RT-PCR with real-time FRET measurements. *Virology* 307, 135–142.
- GUEDES, M.I.M.C. Infecção experimental pelos vírus da artrite encefalite caprina em cabritos de nove a vinte e sete dias de idade. Belo Horizonte, MG: UFMG - Escola de Veterinária, 1999. 59p. Dissertação (Mestrado).
- GUIGUEN, F., MSELLI-LAKHAL, L., DURAND, J., DU, J., FAVIER, C., FORNAZERO, C., GREZEL, D., BALLEYDIER, S., HAUSMANN, E., CHEBLOUNE, Y., 2000. Experimental infection of Mouflon-domestic sheep hybrids with caprine arthritis–encephalitis virus. *Am. J. Vet. Res.* 61, 456–461.
- HAASE, A. T., Pathogenesis lentivirus infection. *Nature*, v. 322, n. 10, p. 130-136 1986.
- HAASE, A. T.; GARAPIN, A. C.; FARAS, A. J.; VARMUS, H. E., BISHOP, J. M., Characterization of nucleic acid of the visna virus RNA dependent DNA polymerase. *Virology*, v. 57, p. 251-258, 1974.
- HERRMANN, L. M., HÖTZEL, I., CHEEVERS, W.P., TOP, K.P.O., LEWIS, G.S., KNOWLES, D.P., 2004. Seven new ovine progressive pneumonia virus (OPPV) field

- isolates from Dubois Idaho sheep comprise part of OPPV clade II based on surface envelope glycoprotein (SU) sequences . *Virus Research* 102, 215–220.
- HERRMANN-HOESING, L. M., PALMER, G. H., KNOWLES, D. P. (2007) Evidence of proviral clearance following postpartum transmission of an ovine lentivirus. *Virology* 362, 226–234
- HESS, J.L., PYPHER, J.M., CLEMENTS, J.E., 1986. Nucleotide sequence and transcriptional activity of the caprine arthritis encephalitis virus long terminal repeat. *J. Virol.* 60, 385–393.
- HESS, J.L., SMALL, J.A., CLEMENTS, J.E. Sequences in the Visna virus Long Terminal Repeat that control transcriptional activity and respond to viral trans-activation: Involvement of AP-1 sites in basal activity and trans-activation. *J. Virol.*, v. 63, n.7, p. 3001-3015, 1989.
- HOFMANN-LEHMANN, R., VLASAK, J., RASMUSSEN, R.A., JIANG, S., LI, P.L., BABA, T.W., MONTEFIORI, D.C., BERNACKY, B.J., RIZVI, T.A., SCHMIDT, R., HILL, L.R., KEELING, M.E., KATINGER, H., STIEGLER, G., CAVACINI, L.A., POSNER, M.R., RUPRECHT, R.M., 2002. Postnatal pre-and postexposure passive immunization strategies: protection of neonatal macaques against oral simian–human immunodeficiency virus challenge. *J. Med. Primatol.* 31, 109–119.
- HÖTZEL, I., CHEEVERS, W.P., 2001. Host range of small ruminant lentivirus cytopathic variants determined with a selectable caprine arthritis-encephalitis virus pseudotype system. *J. Virol.* 75, 7384–7391.
- HÖTZEL, I., KUMPULA-MCWHIRTER, N., CHEEVERS, W. P., 2002. Rapid evolution of two discrete regions of the caprine arthritis-encephalitis virus envelope surface glycoprotein during persistent infection. *Virus Research* 84, 17–25.
- HÖTZEL. I., AND CHEEVERS, W.P., 2002. Differential Receptor Usage of Small Ruminant Lentiviruses in Ovine and Caprine Cells: Host Range but not Cytopathic Phenotype Is Determined by Receptor Usage. *Virology* 301, 21–31.
- HOUWERS, D. J. Experimental Maedi-visna control in the Netherlands. In Sharp J. M. Holf-Jorgensen T (eds). *Slow virus in sheep, goats and cattle*, Luxembourg. Commission of the European Communities, p. 115 – 121, 1985.
- HOUWERS, D.J., 1990. Economic importance, epidemiology and control. In: Pétursson, G., Hoff-Jørgensen, R. (Eds.), *Maedi-Visna and Related Diseases*. Kluwer Academic Publishers, Boston, pp. 83–117.
- HOUWERS, D.J., KONIG, C.D., BAKKER, J., de BOER, M.J., PEKELDER, J.J., SOL, J., VELLEMA, P., de VRIES, G., 1987. Maedi– visna control in sheep: III. Results and evaluation of a voluntary control program in The Netherlands over a period of four years. *Vet. Q.* 9, 29S–36S.
- HUSO, L.D., NARAYAN, O., HART, W.G. Sialic acids on the surface of caprine arthritis-encephalitis virus define the biological properties of the virus. *J. Virol.*, v.62, p.1974-1980, 1988.
- JAN, C. L., GREENLAND, T., GOUNEL, F., BALLEYDIERS, S., MORNEIX, J. F. Activation of small ruminant aortic endothelial cells after *in vivo* infection by caprine arthritis encephalitis virus. *Research Veterinary Science*, v. 69, n. 3, p. 225-231, 2000.
- JIN, Z., JIN, L., PETERSON, D.L., LAWSON, C.L., 1999. Model for lentivirus capsid core assembly based on crystal dimers of EIAV p26. *J. Mol. Biol.* 286, 83–93.



- KARR, BM, CHEBLOUNE Y, LEUNG K, NARAYAN O. Genetic characterization of two phenotypically distinct North American ovine lentiviruses and their possible origin from caprine arthritis-encephalitis virus. *Virology* 1996;225(1):1–10.
- KENNEDY-STOSKOPF, S., NARAYAN, O. Neutralizing antibodies to visna lentivirus: mechanisms of action and possible role in virus persistence. *J. Virol.*, v.59, p.37-44, 1986.
- KLEIN, J.R., MARTIN, J., GRIFFING, S., NATHANSON, N. Precipitating antibodies in experimental visna and natural progressive pneumonia of sheep. *Res. Vet. Sci.*, v. 38 p. 129-133, 1985.
- KNOWLES, D.P. Laboratory diagnostic tests for Retrovirus infections of small ruminants. *Vet. Clin. North Am.: Food Anim. Pract.*, v. 13, p.1-11 , 1997.
- KNOWLES, D.P., CHEEVERS, W.P., MCGUIRE, T.C., BRASSFIELD, A.L., HARWOOD, W.G., STEM, T.A., 1991. Structure and genetic variability of envelope glycoproteins of two antigenic variants of caprine arthritis-encephalitis lentivirus. *J. Virol.* 65, 5744–5750.
- KNOWLES, 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. *J. Clin. Microb.* v. 32, n. 1, p. 243-245, 1994.
- KNOWLES, D.P.JR., CHEEVERS, W.P., MCGUIRE, T.C., BRASSFIELD, A.L., HARWOOD, W.G. E STEM, T.A., (1991). Structure and genetic variability of envelope glycoproteins of two antigenic variants of caprine arthritis-encephalitis lentivirus. *J. Virol.* 65:5744-5750.
- KUZMAK J, et al. Molecular characterization of lentiviruses from goats from Poland based on... *Comparat Immunol Microbiol Infect Dis.* (2007), doi:10.1016/j.cimid.2007.01.001
- LAAMANEN, I. et al., Genetic characterization of Maedi-visna virus (MVV) detected in Finland, *Vet. Microbiol.* (2007), doi:10.1016/j.vetmic.2007.02.002.
- LAIRMORE, D.P., AKITA, G.Y., RUSSELL, H.I., DEMARTINI, J.C., 1987. Replication and cytopathic effects of ovine lentivirus strains in alveolar macrophages correlate with *in vivo* pathogenicity. *J. Virol.* 61, 4038–4042.
- LAMARA, A., FIENI, F., MSELLI-LAKHAL, L., CHATAGNON, G., BRUYAS, J.F., TAINTURIER, D., BATTUT, I., FORNAZERO, C., CHEBLOUNE, Y., 2002b. Early embryonic cells from *in vivo*-produced goat embryos transmit the caprine arthritis-encephalitis virus (CAEV). *Theriogenology* 58 (6), 1153–1163.
- LAMARA, A., FIENI, F., MSELLI-LAKHAL, L., TAINTURIER, D., CHEBLOUNE, Y., 2001. Efficient replication of caprine arthritis-encephalitis virus in goat granulosa cells. *Virus Res.* 79, 165–172.
- LAMARA, A., FIENI, F., MSELLI-LAKHAL, L., TAINTURIER, D., CHEBLOUNE, Y., 2002a. Epithelial cells from goat oviduct are highly permissive for productive infection with caprine arthritis-encephalitis virus (CAEV). *Virus Res.* 87, 69–77.
- LECHAT, E., MILHAU, N., BRUN, P., BELLATON., C., GREENLAND, T, MORNEX, J. F., LE JAN, C., 2005. Goat endothelial cells may be infected *in vitro* by transmigration of caprine arthritis-encephalitis virus-infected leucocytes. *Veterinary Immunology and Immunopathology* 104, 257–263.
- LECHNER, F., VOGT, H.R., SEOW, H.F., BERTONI, G., CHEEVERS, W.P., VON BODUNGEN, U., ZURBRIGGEN, A., PETERHANS, E., 1997. Expression of cytokine RNAm in lentivirus-induced arthritis. *Am. J. Pathol.* 151 (4), 1053–1065.

- LECHNER, F., VOGT, H.R., SEOW, H.F., VON BODUNGEN, U., BERTONI, G., ZURBRIGGEN, A., PETERHANS, E., 1996. Expression of TNF alpha in arthritis caused by caprine arthritis encephalitis virus. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 54 (1–4), 281–289.
- LEE, W. C.; McCONNEL, I., BLACKLAWS, B. A. Cytotoxic activity against Maedi-visna virus – infected macrophages. *Journal Virology*, v. 68, p. 8331-8338, 1994.
- LEE, W. C.; McCONNEL, I., BLACKLAWS, B. A. Electron microscope studies of the replication of a British isolate of Maedi-visna virus in macrophages and skin cell lines. *Veterinary Microbiology*, v. 43, p. 93-104, 1996.
- LERONDELLE, C., GODET, M., MORNEX, JF. Infection of primary cultures of mammary epithelial cells by small ruminant lentiviruses. *Vet. Res.*, n.30, v.5, p.467-474, 1999.
- LEROUX, C., CHASTANG, J., GREENLAND, T. and MORNEX, J. F. (1997). Genomic heterogeneity of small ruminant lentiviruses: existence of heterogeneous populations in sheep and of the same lentiviral genotypes in sheep and goats. *Archives of Virology*, 142,1125-1137.
- LEROUX, C., GREENLAND, T., MORNEX, J.F. Molecular characterization of field isolates of lentiviruses of small ruminants. *AIDS Res. Human Retrovir.*, v. 12, n. 5, p. 427-429, 1996.
- LI, X., YUAN, B., GOFF, S.P., 1997. Genetic analysis of interactions between Gag proteins of Rous Sarcoma virus. *J. Virol.* 71, 5624–5630.
- LOUIE, K. A.; DADGARI, J. M.; DEBOER, B. M.; WEISBUCH, et al.; 2003. Caprine arthritis-encephalitis virus-infected goats can generate human immunodeficiency virus-gp120 cross-reactive antibodies. *Virology* 315, 217–223.
- LUJÁN, L., BEGARA, I., COLLIE, D.D.S., WATT, N.J. Ovine lentivirus (Maedi-visna virus) protein expression in sheep alveolar macrophages. *Vet. Pathol.*, v.31 , p.695-703, 1994.
- MacKENZIE, R. W., OLIVER, R. E., ROOKEN, J. P., KAGEY, H. A successful attempt to raise goat kids free of infection with Caprine Arthritis-encephalitis virus in an endemically infected goat herd. *N. Zeal. Vet. J.*, v. 35, n. 11, p. 184-196, 1987.
- MANGEOT, P.E., DUPERRIER, K., NÈGRE, D., BOSON, B., RIGAL, D., COSSET, F.L., DARLIX, J.L., 2002. High level of transduction of human dendritic cells with optimized SIV vectors. *Mol. Ther.* 5, 283–290.
- MARCHESIN, D.M. Caracterização molecular de parte do gene *gag* dos lentivírus artrite-encefalite caprina (CAEV) e Maedi-visna dos ovinos (MVV), isolados de animais naturalmente infectados do Rio Grande do Sul, Brasil. Porto Alegre, RS: UFRGS - Faculdade de Veterinária, 1997. 111p. Dissertação (Mestrado- Ciências Veterinárias).
- 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. *J. Clin. Microbiol.*, v. 29, n. 7, p.1472-1479, 1991.
- MASCOLA, J.R., LEWIS, M.G., STIEGLER, G., HARRIS, D., VANCOTT, T.C., HAYES, D., LOUDER, M.K., BROWN, C.R., SAPAN, C.V., FRANKEL, S.S., LU, Y., ROBB, M.L., KATINGER, H., BIRX, D.L., 1999. Protection of macaques against pathogenic simian/human immunodeficiency virus 89.6PD by passive transfer of neutralizing antibodies. *J. Virol.* 73, 4009–4018.
- MASLAK, D.M., SCHMERR, M.J. Antigenic relatedness between ovine progressive pneumonia virus (OPPV) and HIV-1. *Comp. Immunol. Microbiol. Infect. Dis.* v. 16, n. 2, p. 103-111, 1993.

- McGUIRE, T. C. The immune response to viral antigens as a determinant of arthritis in Caprine Arthritis-encephalitis infection. *Vet. Immunol. Immunopathol.*, v. 17, p. 465-470, 1987.
- MILCZEWSKI, V., SOTOMAIOR, C., REISCHAK, D., VON GROLL, A. Relato do primeiro isolamento dos vírus Maedi-visna no estado do Paraná. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE MEDICINA VETERINÁRIA, 25, 1997, Gramado-RS. Anais... Gramado: 1997, p. 179. Resumo.
- MOOJEN, V. Caracterização de isolados de lentivírus de pequenos ruminantes naturalmente infectados, do Rio Grande do Sul, Brasil. Rio de Janeiro: FIOCRUZ, 1996. 247p. Tese (Doutorado).
- MOOJEN, V., SOARES, H.C., RAVAZZOLO, A.P., PIZZOL, M., GOMES, M. Evidência de infecção pelo lentivirus (Maedi-visna/artrite encefalite caprina) em caprinos no Rio Grande do Sul, Brasil. *Arq. Fac. Med. Vet. UFRGS*, v. 14, p.77-78, 1986.
- MOSSER, D.M., 2003. The many faces of macrophage activation. *J. Leukoc. Biol.* 73 (2), 209–212.
- MSELLI-LAKHAL, L., FAVIER, C., DA SILVA TEIXEIRA, F., CHETTAB, A., MORNEX, J.F., CHEBLOUNE, Y., 1998. Defect in RNA transport and packaging are responsible for low transduction efficiency of CAEV-based vectors. *Arch. Virol.* 143, 681–695.
- MSELLI-LAKHAL, L., GUIGUEN, F., FORNAZERO, C., DU, J., FAVIER, C., DURAND, J., et al., 1999. Goat milk epithelial cells are highly permissive to CAEV infection *in vitro*. *Virology* 259, 67–73.
- MSELLI-LAKHAL, L., GUIGUEN, F., GREENLAND, T., MORNEX, J.F., CHEBLOUNE, Y., 2006. Gene transfer system derived from the caprine arthritis-encephalitis lentivirus. *Journal of Virological Methods* 136, 177–184.
- MURPHY, B., JASMER, D. P., WHITE, S. N., KNOWLES, D., 2007. Localization of a TNF-activated transcription site and interactions with the gamma activated site within the CAEV U3 70 base pair repeat. *Virology* 364, 196–207
- MURPHY, B.G., HOTZEL, I., JASMER, D.P., DAVIS, W.C., KNOWLES, D., 2006. TNFalpha and GM-CSF-induced activation of the CAEV promoter is independent of AP-1. *Virology* 352 (1), 188–199.
- MYOSHI, H., BLOMER, U., TAKAHASHI, M., GAGE, F.H., VERMA, I.M., 1998. DEVELOPMENT OF SELF-INACTIVATING LENTIVIRUS VECTORS. *J. VIROL.* 72, 8150–8157. KAFRI, T., BLÖMER, U., PETERSON, D.A., GAGE, F.H., VERMA, I.M., 1997. Sustained expression of genes delivered directly into liver and muscle by lentiviral vectors. *Nat. Genet.* 17, 314–317.
- NALDINI, L., BLÖMER, U., GAGE, F.H., TRONO, D., VERMA, I.M., 1996B. Efficient transfer, integration, and sustained long-term expression of the transgene in adult rat brains injected with a lentiviral vector. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 93, 11382–11388.
- NALDINI, L., BLÖMER, U., GALLAY, P., ORY, D., MULLIGAN, R., GAGE, F.H., VERMA, I.M., TRONO, D., 1996A. *In vivo* gene delivery and stable transduction of nondividing cells by a lentiviral vector. *Science* 272, 263–267.
- NARAYAN, O., CLEMENTS, J. E., STRANDBERG, J. D., CORK, L. C., GRIFFIN, D. E. Biological characterization of the virus causing leucoencephalitis and arthritis in goats. *J. Gen. Virol.*, v. 50, n. 1, p. 69-79, 1980.
- NARAYAN, O., CLEMENTS, J.E. Biology and pathogenesis of lentiviruses. *J. Gen. Virol.*, v.70, p.1617-1639, 1989.

- NARAYAN, O., KENNEDY-STOSKOPF, S., SHEFFER, D., GRIFFIN, D.E., CLEMENTS, J.E. Activation of caprine arthritis-encephalitis virus expression during maturation of monocytes to macrophages. *Infect. Immun.*, v. 41, n. 1, p. 67-73, 1983.
- NARAYAN, O.; CLEMENTS, J. E.; STRANBERG, J. D.; CORK, L. C.; GRIFFIN, D. E. Biological characterization of virus causing leukoencephalitis and arthritis in goats. *Journal Genetic Virology*, v. 50, p. 69-79, 1980.
- NÈGRE, D., COSSET, F.L., 2002. Vectors derived from simian immunodeficiency virus (SIV). *Biochimie* 84, 1161–1171.
- NEUVEUT, C., VIGNE, R., CLEMENTS, J.E., SIRE, J. The visna transcriptional activator *tat*: effects on the viral LTR and on cellular genes. *Virology*, v.197, p.236-244, 1993.
- NORMAN, S., SMITH, M.C. Caprine arthritis encephalitis: review of the neurologic form in 30 cases. *J. Am. Vet. Med. Assoc.*, v. 182, n.12, p. 1342-1345, 1983.
- O'NEIL, S.P., SUWYN, C., ANDERSON, D.C., NIEDZIELA, G., BRADLEY, J., NOVEMBRE, F.J., HERNDON, J.G., MCCLURE, H.M., 2004. Correlation of acute humoral response with brain virus burden and survival time in pig-tailed macaques infected with the neurovirulent simian immunodeficiency virus SIVsmmFGb. *American Journal of Pathology* 164, 1157–1172.
- O'ROURKE, J.P., NEWBOUND, G.C., KOHN, D.B., OLSEN, J.C., BUNNELL, B.A., 2002. Comparison of gene transfer efficiencies and gene expression levels achieved with equine infectious anemia virus- and human immunodeficiency virus type 1-derived lentivirus vectors. *J. Virol.* 76, 1510–1515.
- OIE, 2004. *Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals*, 5th ed. OIE, Paris, France, pp. 615–622.
- OLIVEIRA, L.H.S. *Virologia Humana*. Rio de Janeiro: Cultura Médica, 1994. 368p.
- OLIVER, R.E., GORHAM, J.R., PARISH, S.F., HADLOW, WJ., NARAYAN, O. Ovine progressive pneumonia: pathologic and virologic studies on the naturally occurring disease. *Am. J. Vet. Res.*, v. 42, n. 9, p. 1554-1559, 1981.
- PANG, S., KANG, M.K., KUNG, S., YU, D., LEE, A., POON, B., CHEN, I.S., LINDEMANN, B., PARK, N.H., 2001. Anticancer effect of a lentiviral vector capable of expressing HIV-1 Vpr. *Clin. Cancer Res.* 7, 3567–3573.
- PARK, F., OHASHI, K., CHIU, W., NALDINI, L., KAY, M.A., 2000. Efficient lentiviral transduction of liver requires cell cycling *in vivo*. *Nat. Genet.* 24, 49–52.
- PASICK, J. Maedi-visna virus and caprine Arthritis-Encephalitis virus: Distinct species or quasispecies and its implications for laboratory diagnoses *Canada Journal Veterinary*, v. 62, p. 241- 244, 1998.
- PASICK, J. Maedi-visna virus and caprine Arthritis-Encephalitis virus: Distinct species or quasispecies and its implications for laboratory diagnoses *Canada Journal Veterinary*, v. 62, p. 241- 244, 1998.
- PÉPIN, M., VITU, C., RUSSO, P., MORNEX, J.F., PETERHANS, E., 1998. Maedi-visna virus infection in sheep: a review. *Vet. Res.* 29, 341–367.
- PERETZ, G., BUGNARD, F., CALAVAS, D., 1994. Study of a prevention programme for caprine arthritis– encephalitis. *Vet. Res.* 25, 322– 326.
- PERK, K. Presence of viral particles in neural cells of goats with caprine arthritis encephalitis. *Res. Vet. Sci.*, v. 49, n.3, p. 367-369, 1990.
- PERK, K. Ungulate lentiviruses: Pathogenesis and relationship to AIDS. *Adv. Vet. Sci. Comp. Med.*, v. 32, p. 97-127, 1988.

- PERRY, L.L., WILKERSON, M.J., HULLINGER, G.A., CHEEVERS, W.P., 1995. Depressed CD4+ T lymphocyte proliferative response and enhanced antibody response to viral antigen in chronic lentivirus-induced arthritis. *J. Infect. Dis.* 171, 328–334.
- PETERHANS, E., GREENLAND, T., BADIOLA, J., HARKISS, G., BERTONI, G., AMORENA, B., ELIASZEWICZ, M., JUSTE, R.A., KRASSNIG, R., LAFONT, J.P., LENIHAN, P., PETURSSON, G., PRITCHARD, G., THORLEY, J., VITU, C., MORNEX, J.F., PEPIN, M., 2004. Routes of transmission and consequences of small ruminant lentiviruses (SRLVs) infection and eradication schemes. *Vet. Res.* 35, 257–274.
- PHELPS, S.L., SMITH, M. Caprine arthritis-encephalitis virus infection. *J. Am. Vet. Med. Assoc.*, v. 203, n.12, p. 1663-1666, 1993.
- PINHEIRO, R.R., SANTA ROSA, J., ALVES, F.S.F. Parâmetros clínicos, exame do líquido sinovial e hemograma da artrite-encefalite caprina viral. *Rev. Bras. Med. Vet.*, v.22, n. 3, p. 128-130, 2000a.
- PINHEIRO, R.R., Vírus da artrite encefalite caprina: Desenvolvimento e padronização de ensaios imunoenzimáticos (ELISA e Dot-Blot) e estudo epidemiológico no Estado do Ceará. Belo Horizonte: UFMG, 2001. 115p. Tese (Doutorado) – Escola de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais.
- PISONI G, BERTONI G, BOETTCHER P, PONTI W, MORONI P. Phylogenetic analysis of the *gag* region encoding the matrix protein of small ruminant lentiviruses: comparative analysis and molecular epidemiological applications. *Virus Res* 2006;116(1–2):159–67.
- PISONI, G., QUASSO, A., MORONI, P., 2005. Phylogenetic analysis of small-ruminant lentivirus subtype B1 in mixed flocks: Evidence for natural transmission from goats to sheep. *Virology* 339, 147–152.
- POESCHLA, E.F., WONG-STAAAL, D.J., LOONEY, L., 1998. Efficient transduction of nondividing human cells by feline immunodeficiency virus lentiviral vectors. *Nat. Med.* 4, 354–357.
- PRESTON, B., DOUGHERTY, J. P. Mechanisms of retroviral mutation. *Trends Microbiology*, v. 4, p. 16-21, 1996.
- PREZIUSO, S., RENZONI, G., ALLEN, T. E., TACCINI, E., ROSSI, G., DEMARTINI, J. C. and BRACA, G. (2004). Colostral transmission of Maedi visna virus: sites of viral entry in lambs born from experimentally infected ewes. *Veterinary Microbiology*, 104, 157-164.
- QUÉRAT, G., AUDOLY, G., SONICO, P., VIGNE, R. Nucleotide sequence analysis of SA-OMW, a visna-related ovine lentivirus: phylogenetic history of lentiviruses. *Virology*. v. 175, p. 434-447, 1990.
- QUERAT, G., BARBAN, V., SAUZE, N., FILIPPI, P., VIGNE, R., RUSSO, P., VITU, C., 1984. Highly lytic and persistent lentiviruses naturally present in sheep with progressive pneumonia are genetically distinct. *J. Virol.* 52, 672–679.
- RAVAZZOLO, A. P.; NENCI, C.; VOGT, H. R.; WALDVOGEL, A.; OBEXER-RUFF, G.; PETERHANS, E.; BERTONI, G. 2006. Viral load, organ distribution, histopathological lesions, and cytokine RNA expression in goats infected with a molecular clone of the caprine arthritis encephalitis virus. *Virology* 350, 116–127.
- RAVAZZOLO, A.P., REISCHAK, D., PETERHANS, E., ZANONI, R., 2001. Phylogenetic analysis of small ruminant lentiviruses from Southern Brazil. *Virus Res.* 79 (1–2), 117–123.
- REDDY, P.G., SAPP, W.J., HENEINE, W. Detection of caprine arthritis-encephalitis virus by polymerase chain reaction. *J. Clin. Microbiol.*, v. 31, n. 11, p. 3042-3043, 1993.

- REINA, R., MORA, M.I., GLARIA, I., GARCÍA, I., SOLANO, C., LUJÁN, L., BADIOLA, J.J., CONTRERAS, A., BERRIATUA, E., JUSTE, R., MAMOUN, R.Z., ROLLAND, M., AMORENA, B., DE ANDRÉS, D., 2006. Molecular characterization and phylogenetic study of Maedi Visna and Caprine Arthritis Encephalitis viral sequences in sheep and goats from Spain. *Virus Research* 121, 189–198.
- REISCHAK, D. Lentivirus de pequenos ruminantes imunofluorescência utilizando isolados brasileiros para diagnosticar sorológico de infecção em ovinos e caprinos. Porto Alegre, 2000. 132p. Dissertação de Mestrado- Universidade Federal do Rio Grande do Sul.
- REYBURN, T.H., ROY, J.D., BLACKLAWS, A.B., SARGAN, R. WATT, J.N., McCONNELL, I. Characteristics of the T cell-mediated immune response to Maedi-Visna virus. *Virology*, v.191, p. 1009-1012, 1992.
- RIMSTAD, E., EAST, N.E., TORTEN, M., HIGGINS, J., DeROCK, E., PEDERSEN, N.C. Delayed seroconversion following naturally acquired caprine arthritis-encephalitis virus infection in goats. *Am. J. Vet. Res.*, v. 54, n. 11, p. 1858-1862. 1993.
- ROBERSON, S.M., McGUIRE, T.C., KLEVJER-ANDERSON, P., GORHAM, J.R., CHEEVERS, W.P. Caprine arthritis-encephalitis virus is distinct from visna and progressive pneumonia viruses as measured by genome sequence homology. *J. Virol.* v. 44, n. 2, p. 755-758, 1982.
- ROITT, I., BROSTOFF, J., MALE, D. *Immunology*. 5.ed. London: Mosby, 1998. 423p.
- ROLLAND, M., MOONEY, J., VALAS, S., PERRIN, G., MAMOUN, R.Z., 2002. Characterisation of an Irish caprine lentivirus strain-SRLV phylogeny revisited. *Virus Res.* 85, 29–39.
- ROWE, J.D., EAST, N. E., THUNNOND, M.C., FRANTI, C. E., PEDERSEN, N.C., 1992. Cohort study of natural transmission and two methods for control of caprine arthritis-encephalitis virus infection in goats on a California dairy. *Am J. Vet Res.*, 53, 2386-95.
- ROWE, J.D., EAST, N.E., 1997. Risk factors for transmission and methods for control of caprine arthritis– encephalitis virus infection. *Vet. Clin. North Am., Food Anim. Pract.* 13, 35–53
- RUSSO, P., VITU, C., BOURGOGNE, A., VIGNONI, M., ABADIE, G., DAVID, V., PÉPIN, M. Caprine arthritis-encephalitis virus: detection of proviral DNA in lactoserum cells. *Vet. Rec.*, v. 140, n. 18, p. 483-484, 1997.
- RYAN, S.,TILEY, L., McCONNELL, I. and BLACKLAWS, B. (2000). Infection of dendritic cells by the Maedi-visna lentivirus. *Journal of Virology*, 74,10096-10103.
- SALTARELLI, M., QUERAT, G., KONINGS, D.A., VIGNE, R., CLEMENTS, J.E., 1990. Nucleotide sequence and transcriptional analysis of molecular clones of CAEV which generate infectious virus. *Virology* 179, 347–364.
- SANNA, E., SANNA, M.P., VITALI, C.G., RENZONI, G., SANNA, L., SPANO, S., ROSSI, G., LEONI, A., 1999. Proviral DNA in the brains of goats infected with caprine arthritis-encephalitis virus. *J. Comp. Pathol.* 121, 271–276.
- SARGAN, D.R., BENNET, I.D., COUSENS, C., ROY, D.J., BLACKLAWS, B.A., DALZIEL, R.G., WATT, N.J., McCONNELL, I. Nucleotide sequence of EV1, a British isolate of Maedi-visna virus. *J. Gen. Virol.*, v. 72, p. 1893-1903, 1991.
- SARGAN, D.R., ROY, D.J., DALZIEL, R.G., WATT, N.J., McCONNELL, I. A temporal study of RNAs produced in Maedi, visna virus infection of choroid plexus cells. *Vet. Microbiol.*, v.39, p. 369-378, 1994.
- SCHADE, K. H. *Light Microscopy: technology and application*. 2.ed. Munchen: Verag moderne industrie, 1995, 70 p.

- SCHEER-CZECHOWSKI, P., VOGT, H.R., TONTIS, A., PETERHANS, E., ZANONI, R., 2000. Pilot project for eradicating Maedi –visna in Walliser blacknose sheep. *Schweiz. Arch. Tierheilkd.* 142, 155–164.
- SEPP, T., TONG-STARKSEN, S.E., 1997. STAT1 pathway is involved in activation of caprine arthritis–encephalitis virus long terminal repeat in monocytes. *J. Virol.* 71 (1), 771–777.
- SHAH, C., BONI, J., HUDER, J.B., VOGT, H.R., MUHLHERR, J., ZANONI, R., MISEREZ, R., LUTZ, H., SCHUPBACH, J., 2004a. 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* 319 (1), 12–26.
- SHAH, C., HUDER, J.B., BONI, J., SCHONMANN, M., MUHLHERR, J., LUTZ, H., SCHUPBACH, J., 2004b. Direct evidence for natural transmission of small-ruminant lentiviruses of subtype A4 from goats to sheep and vice versa. *J. Virol.* 78 (14), 7518–7522.
- SHIH D.S., CARRUTH, L.M., ANDERSON, M., CLEMENTS, J.E. Involvement of Fos and Jun in the activation of visna virus gene expression in macrophages through an AP-1 site in the viral LTR. *Virology*, v. 190, p.84-91, 1992.
- SIGURDARDÓTTIR, B., THORMAR, H. Isolation of a viral agent from the lungs of sheep affected with Maedi. *J. Infec. Dis.*, v. 114, n. 1, p. 55-60, 1964.
- SIGURDSSON, B. Maedi, a slow progressive pneumonie of sheep: an epizootiological and pathological study. *Br. Vet. J.*, v.110, p.225-270, 1954.
- SIGURDSSON, B.; THORMAR, H.; PALSSON, P. A. Cultivation of visna virus in tissue culture. *Archives Gesante Virusforsch*, v. 10, p. 368-381, 1960.
- SIHVONEN, L. Early immune responses in experimental Maedi. *Research in Veterinary Science*, v.30, p.217-222, 1981.
- SINGH, I., MCCONNELL, I., DALZIEL, R., BLACKLAWS, B.A., 2006. Serum containing ovine IgG2 antibody specific for Maedi visna virus envelope glycoprotein mediates antibody dependent cellular cytotoxicity. *Veterinary Immunology and Immunopathology* 113, 357–366.
- SKRABAN, R., MATTHÍASDÓTTIR, S., TORSTEINSDÓTTIR, S., AGNARSDÓTTIR, G., GUDMUNDSSON, B., GEORGSSON, G., MELOEN, R.H., ANDRÉSSON, O.S., STASKUS, K.A., THORMAR, H., ANDRÉSDÓTTIR, V., 1999. Naturally occurring mutations within 39 amino acids in the envelope glycoprotein of Maedi-visna virus alter the neutralization phenotype. *J. Virol.* 73, 8064–8072.
- SMITH, M.C., SHERMAN, D.M. *Goat Medicine*. Philadelphia: Lea E Febiger, 1994. 620 p.
- SOLLY, S.K., TRAJCEVSKI, S., FRISEN, C., HOLZER, G.W., NELSON, E., CLERC, B., ABORDO-ADESIDA, E., CASTRO, M., LOWENSTEIN, P., KLATZMANN, D., 2003. Replicative retroviral vectors for cancer gene therapy. *Cancer Gene. Ther.* 10, 30–39.
- SONIGO, P., ALIZON, M., STASKUS, K., KLATZMANN, D., COLE, S., DANOS, O., RETZEL, E., TIOLLAIS, P., HAASE, A., WAIN-HOBSON, S., 1985. Nucleotide sequence of the visna lentivirus: relationship to the AIDS virus. *Cell* 42, 369–382.
- STASKUS, K. A., COUCH, L., BITTERMAN, P., RETZEL, E. F., ZUPANCIC, M., LIST, J. and HAASE, A.T. (1991). In situ amplification of visna virus-DNA in tissue-sections reveals a reservoir of latently infected-cells. *Microbial Pathogenesis*, 11, 67-76.
- STEINHAEUER, D.A., HOLLAND, J.J. Rapid evolution of RNA viruses. *Ann. Rev. Microbiol.*, v. 41, p.409-433, 1987.

- STORSET, A.K., EVENSEN, O., RIMSTAD, E., 1997. Immunohistochemical identification of caprine arthritis–encephalitis virus in paraffin-embedded specimens from naturally infected goats. *Vet. Pathol.* 34, 180–188.
- STORSET, A.K., TEIG, A., RIMSTAD, E. Detection of caprine arthritis-encephalitis virus RNA in macrophages by in situ hybridization using fluorescein-labelled single-stranded RNA probes. *Vet. Microbiol.*, v. 52, p. 25-35, 1996.
- STOTT, D. I. Immunoblotting and dot blotting. *J. Immunol. Methods*, v. 119, p. 153-187, 1989.
- SUTTON, K., LIN, C.-T., HARKISS, G., MCCONNELL, I., SARGAN, D., 1997. Regulation of the long terminal repeat in visna virus by a transcription factor related to the AML/PEBP2/CBF superfamily. *Virology* 229, 240–250.
- SUTTON, R.E., REITSMA, M.J., UCHIDA, N., BROWN, P.O., 1999. Transduction of human progenitor hematopoietic stem cells by human immunodeficiency virus type 1-based vectors is cell cycle dependent. *J. Virol.* 73, 3649–3660.
- SUTTON, R.E., WU, H.T., RIGG, R., BOHNLEIN, E., BROWN, P.O., 1998. Human immunodeficiency virus type 1 vectors efficiently transduce human hematopoietic stem cells. *J. Virol.* 72, 5781–5788.
- TAVARES, L., PEREIRA, J.M. Importância das infecções por retrovírus da sub-família lentivirinae no homem e nos animais. *Rev. Port. Cien. Vet.*, v. XCIV n. 529, p. 9-27, 1999.
- TEIXEIRA, M. F. S.; VERONIQUE, L.; MSEBLI-LAKAHL, L.; CHETTAB, A., CHEBLOUNE, Y.; MORNEX, J. F. Immortalization of caprine fibroblasts permissive for replication of small ruminant lentiviruses. *American Journal Veterinary Research*, v.58 n6, p. 579-584, 1997.
- TESORO-CRUZ, E., HERNÁNDEZ-GONZÁLEZ, R., KRETSCHMER-SCHMID, R., AGUILAR-SETIÁN, A., 2003. Cross-Reactivity Between Caprine Arthritis-Encephalitis Vírus and Type 1 Human Immunodeficiency Vírus. *Archives of Medical Research* 34, 362–366.
- TIZARD, I. *Introdução á Imunologia veterinária*. 2ed., Roca, São Paulo, 1998. p.545.
- TOFT, N., ÅKERSTEDT, J., THARALDSEN, J., HOPP, P., 2007. Evaluation of three serological tests for diagnosis of Maedi-Visna virus infection using latent class analysis. *Veterinary Microbiology* 120, 77–86
- TONG-STARKSEN, S.E., SEPP, T., PAGTAKHAN, A.S., 1996. Activation of caprine arthritis–encephalitis virus long terminal repeat by gamma interferon. *J. Virol.* 70 (1), 595–599.
- TORSTEINSDOTTIR, S., MATTHIASDOTTIR, S., VIDARSDOTTIR, N., SUASSON, V., PÉTURSSON, S. Intratracheal inoculation as na efficient crouete of experimental infection with Maedi visna virus. *Research Veterinary Science*. v.75, p.245-247, 2003.
- TRUJILLO, J. D., HÖTZEL, K. J., SNEKVIK, K. R., CHEEVERS, W. P. 2004. Antibody response to the surface envelope of caprine arthritis-encephalitis lentivirus: disease status is predicted by SU antibody isotype. 325, 129– 136.
- TURIN, L., PISONI, G., GIANNINO, M.L., ANTONINI, M., ROSATI, S., RUFFO, G., MORONI, P., 2005. Correlation between milk parameters in CAEV seropositive and negative primiparous goats during an eradication program in Italian farm. *Small Ruminant Research* 57, 73–79
- VALAS, S. and GERMAIN, K. 2006. Distribution and heterogeneity of small ruminant lentivirus envelope subtypes in naturally infected French sheep. *Virus Research* 120, 156–162



- VALAS, S., BENOIT, C., BAUDRY, C., PERRIN, G., MAMOUN, R.Z., 2000. Variability and immunogenicity of caprine arthritis-encephalitis virus surface glycoprotein. *J. Virol.* 74, 6178–6185.
- VALAS, S., BENOIT, C., GUIONAUD, C., PERRIN, G., MAMOUN, R.Z., 1997. North American and French caprine arthritis-encephalitis viruses emerge from ovine Maedi-visna viruses. *Virology* 237, 307–318.
- VERWOERD, D. W.; PAYNE, A. L.; YORK D. F.; MYER, M. S. Isolation and preliminary characterization of the Jaagsiekte retrovirus (JSRV). *Onderstepoort Journal Veterinary Research*, v.50, p. 309-316, 1983.
- VIGNA, E., NALDINI, L., 2000. Lentiviral vectors: excellent tools for experimental gene transfer and promising candidates for gene therapy. *J. Gene. Med.* 2, 308–316.
- VIGNE, R., BARBAN, V., QUÉRAT, G., MAZARIN, V., GOURDOU, I. Transcription of visna virus during its lytic cycle: evidence for a sequential early and late gene expression. *Virology*, v. 161, p.218-227, 1987.
- WAGTER, L.H.A., JANSEN, A., BLEUMINK-PLUYM, J.A., LENSTRA, J.A., HOUWERS, D.J. PCR detection of lentiviral *gag* segment DNA in the white blood cells of sheep and goats. *Vet. Res. Commun.*, v.22, p.355-262, 1998.
- WANG, C., LAI, H., LI, J., 1998. Analysis of minimal human immunodeficiency virus type 1 *gag* coding sequences capable of virus-like particle assembly and release. *J. Virol.* 72, 7950–7959.
- WANG, G., SLEPUSHKIN, V., ZABNER, J., KESHAVJEE, S., JOHNSTON, J.C., SAUTER, S.L., JOLLY, D.J., DUBENSKY, T.W., DAVIDSON, B.L., MCCRAY, P.B., 1999. Feline immunodeficiency virus vectors persistently transduce nondividing airway epithelia and correct the cystic fibrosis defect. *J. Clin. Invest.* 104, R55–R62.
- WEINHOLD, E. Visna-virus-ähnliche partikel in der kultur von plexus chorioideuszellen einer ziege mit visna-symptomen. *Zentralblatt für Veterinärmedizin B.*, v. 21, p. 32-36, 1974.
- WOODWARD, T.M., CARLSON, J.O., DE LA CONCHA-BERMEJILLO, A., DEMARTINI, J.C., 1995. Biological and genetic changes in ovine lentivirus strains following passage in isogeneic twin lambs. *J. Acquir. Immune Defic. Syndr. Hum. Retrovirology* 8, 124–133.
- XU, W., HOFMANN-LEHMANN, R., MCCLURE, H.M., RUPRECHT, R.M., 2002. Passive immunization with human neutralizing monoclonal antibodies: correlates of protective immunity against HIV. *Vaccine* 20, 1956–1960.
- ZANONI, R., PAULI, LT., PETERHANS, E. Detection of caprine arthritis-encephalitis and Maedi-visna viruses using polymerase chain reaction. *Experientia*, v. 46, p. 316-319, 1990.
- ZANONI, R.G., 1998. Phylogenetic analysis of small ruminant lentiviruses. *J. Gen. Virol.* 79, 1951–1961.
- ZANONI, R.G., NAUTA, I.M., KUHNERT, P., PAULI, U., POHL, B., PETERHANS, E., 1992. Genomic heterogeneity of small ruminant lentiviruses detected by PCR. *Vet. Microbiol.* 33, 341–351.
- ZHANG, Z., WATT, N.J., HOPKINS, J., HARKISS, G., WOODALL, C.J., 2000. Quantitative analysis of Maedi-visna virus DNA load in peripheral blood monocytes and alveolar macrophages. *J. Virol. Methods* 86, 13–20.
- ZINK, M.C., JOHNSON, L.K. Pathobiology of lentivirus infections of sheep and goats. *Virus Res.*, v.32, p. 139-154, 1994.

ZINK, M.C., NARAYAN, O., KENNEDY, P.G.E., CLEMENTS, J.E. Pathogenesis of visna-Maedi and caprine arthritis-encephalitis: new leads on the mechanism of restricted virus replication and persistent inflammation. *Vet. Immun. Immunopathol.*, v.15, p.1671-80, 1987.

ZINK, M. C., YAGER, J. A. and MYERS, J.D. (1990). Pathogenesis of caprine arthritis-encephalitis virus. Cellular localization of viral transcripts in tissues of infected goats. *American Journal of Pathology*, 136, 843-854.

## 9. GLOSSÁRIO

**AP proteína.** abrev. para ativador de proteína, um dos dois **fatores de transcrição**; AP1, um produto de *c-jun*, interage com Fos (produto de *c-fos*) para formar um dímero. Tem dois domínios funcionais, um responsável pela ligação ao DNA e um para ligação à Fos, e inclui o zíper de leucina. AP2 interage com elementos virais e celulares estimulando a transcrição de genes selecionados.

**CD4+.** Sinalização e co-receptor de adesão na ativação de linfócitos T induzida por antígeno restrita ao MHC Classe II (liga-se a molécula da classe II do MHC); desenvolvimento dos timócitos; receptor primário pra retrovírus HIV.

**CD8+.** Sinalização e co-receptor de adesão na ativação de linfócitos T induzida por antígeno restrita ao MHC Classe I (liga-se a molécula da classe I do MHC); desenvolvimento dos timócitos.

**GM-CSF** é uma citocina fabricada pelas células T ativadas, macrófagos, células endoteliais e células do estroma da medula óssea que atuam nos progenitores da medula óssea para aumentar a produção de leucócitos inflamatórios. O GM-CSF promove a maturação de células da medula óssea em células dendríticas e monócitos.

**IL-12p40.** Produzida pelos fagócitos mononucleares e células dendríticas que serve de mediador da resposta imune inata aos microrganismos intracelulares e é um indutor-chave das resposta imunes mediadas por células a estes microrganismos. A IL-12 ativa as células NK, promove a produção de IFN- $\gamma$  pelas células NK e células T, aumenta a atividade citolítica das células NK e CTLs e promove o desenvolvimento das células Th1.

**IL-1 $\beta$ .** Produzida principalmente pelos fagócitos mononucleares ativados cuja função principal é mediar as respostas inflamatórias do hospedeiro na imunidade inata.

**Motif.** (em relação à estrutura da proteína) 1. uma região ordenada localmente com o core hidrofóbico de uma molécula de proteína globular, formado por interações tridimensionais entre dois ou três segmentos da estrutura secundária (uma hélice e/ou linha b) que está próximo de um ou outra cadeia polipeptídica. Os tipos mais importantes são ( $\alpha\alpha$ ), ( $\alpha\beta$ ), ( $\beta\beta$ ), e ( $\beta\alpha\beta$ ). 2. ou **domínio** aminoácido formando parte da seqüência primária de uma proteína, capaz de estar alinhado em certas posições que são invariáveis ou conservadas, que está associada com uma função particular.

**RRE.** A proteína Rev-C que é regulada pela expressão de Gag, Pol e Env ao transportar seus mRNAs para o citoplasma. A transativação de Rev requer a ligação do polipeptídeo Rev na estrutura do RNA, chamada de Elemento de Resposta a Rev (RRE-C).

**TNF $\alpha$  citocina.** Produzida principalmente por fagócitos mononucleares ativados que funciona para estimular o recrutamento de neutrófilos e de monócitos para sítios de infecção e para estimular essas células a erradicarem os microrganismos.