



RENORBIO

Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia

**ANTICORPOS MONOCLONAIS PARA O VÍRUS DA ARTRITE-
ENCEFALITE CAPRINA**

Camila Fonseca Lopes Brandão

Salvador – Bahia

2013



Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia
Universidade Federal da Bahia

ANTICORPOS MONOCLONAIS PARA O VÍRUS DA ARTRITE- ENCEFALITE CAPRINA

Camila Fonseca Lopes Brandão

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia da Rede Nordeste de Biotecnologia (RENORBIO) como parte dos requisitos para obtenção do Título de Doutora em Biotecnologia.

Orientadora: Silvia Inês Sardi

Co-orientador: Gúbio Soares Campos

Salvador – Bahia

2013

**Ficha catalográfica elaborada pela Biblioteca Universitária de Saúde,
SIBI - UFBA.**

B817 Brandão, Camila Fonseca Lopes
Anticorpos monoclonais para o vírus da artrite-encefalite
caprina / Camila Fonseca Lopes Brandão. – Salvador, 2013.
129 f.

Orientadora: Prof^a Dr^a Silvia Inês Sardi.

Tese (Doutorado) – Universidade Federal da Bahia.
Instituto de Ciências da Saúde, 2013.

1. CAEV. 2. Anticorpos Monoclonais. 3. Agentes
Desnaturantes. I. Sardi, Silvia Inês. II. Universidade Federal da
Bahia. III. Título.

CDU 616.993.161



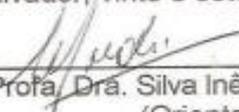
Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia

Universidade Federal da Bahia
 Programa de Pós Graduação em Biotecnologia
 Av. Miguel Calmon, s/n – Vale do Canela
 40110-100, Salvador-BA - Telefone: (71) 3283-8921 - E-mail: renorbio@ufba.br

ATA – DEFESA DE TESE

Ata de Defesa de Tese de Doutorado da aluna **Camila Fonseca Lopes Brandão**. Aos vinte e sete dias do mês de setembro do ano de dois mil e treze, às quatorze horas no Auditório III segundo andar no Instituto de Ciências da Saúde (ICS-UFBA) se reúne em sessão pública, a Banca Examinadora de Defesa de Tese composta pelos Professores: Profa. Dra. **Silva Inês Sardi** orientadora, Prof. Dr. **Roberto Soares de Castro**, Prof. Dr. **Joselito Nunes Costa**, Profa. Dra. **Soraya Castro Trindade**, Profa. Dra. **Lilia Ferreira de Moura Costa** perante o qual a Doutoranda **Camila Fonseca Lopes Brandão**, aluno regularmente matriculado no Curso de Doutorado em Biotecnologia da Rede Nordeste de Biotecnologia – RENORBIO, Ponto Focal Bahia, defendeu, para preenchimento do requisito de Doutor, sua tese intitulada "ANTICORPOS MONOCLONAIS PARA O VÍRUS DA ARTRITE-ENCEFALITE CAPRINA". A defesa da referida tese ocorreu, das quatorze horas às 16:30, tendo a Doutoranda sido submetido à sabatina, dispondo cada membro da Banca do tempo para tal. Finalmente, a Banca reuniu-se em separado e concluiu por considerar a Doutoranda APROVADA por sua tese e sua defesa terem, por unanimidade, recebido o conceito SATISFATORIO.

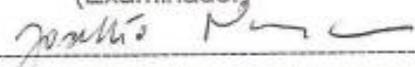
Eu, Silva Inês Sardi, que presidi a Banca de Tese, assino a presente Ata, juntamente com os demais membros e dou fé. Em Salvador, vinte e sete de setembro de 2013.



 Profa. Dra. Silva Inês Sardi – UFBA
 (Orientadora)



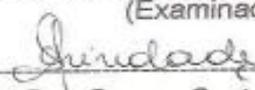
 Prof. Dr. Roberto Soares de Castro - UFRPE
 (Examinador)



 Prof. Dr. Joselito Nunes Costa – UFBA
 (Examinador)



 Profa. Dra. Lilia Ferreira de Moura Costa – UFBA
 (Examinadora)



 Profa. Dra. Soraya Castro Trindade – UEFS
 (Examinadora)

Aos meus avós (*in memoriam*): Benedito Nascimento Lopes, Maria Fonseca Lopes, Maria de Lourdes Costa e Antônio Francisco Brandão por terem edificado e me presenteado com uma família maravilhosa.

AGRADECIMENTOS

A Deus pela vida, pela saúde, pelas pessoas maravilhosas que põe no meu caminho e pelas graças que tem me concedido a cada dia.

A minha mãe, Sandra Lopes, pelo cuidado, paciência, amizade e pelo seu amor. Ao meu pai, Humberto Brandão, pelos ensinamentos e pelo exemplo de honestidade. Meu irmão, Tony Brandão, pela amizade e incentivo.

Aos meus avós (*in memorian*). Sei que mesmo fisicamente ausentes, continuam a olhar por mim.

A minha madrinha e segunda mãe, Nilzeth, pela presença e ajuda de sempre. Aos meus tios e familiares, em especial Virgínia e Gilson, pelo apoio dado.

A Sérgio, pela força e incentivo, sempre de fundamental importância nos momentos difíceis. Sei que estará sempre disposto a me apoiar e ver o meu crescimento. Obrigada pelo carinho, companheirismo e pelo seu amor.

A minha orientadora Profa. Dra. Silvia Sardi. Agradeço pelos ensinamentos, paciência, confiança, incentivo, atenção, pelo apoio profissional, pela amizade... Ao meu co-orientador Gúbio Campos, pela orientação, pelos valiosos conhecimentos e amizade.

Aos amigos do Laboratório de Virologia: Julianna, Dellane, Patrícia, Michael (*in memorian*), Fabiana, Aryane, Isabela e aos que por ventura eu não tenha citado.

Aos meus amigos, pelo apoio e compreensão.

Ao curso de Doutorado em Biotecnologia, a todos os professores, funcionários e colegas, pelos momentos de descontração e aprendizado.

A Jussi pela disponibilidade, pela boa vontade e auxílio sempre que solicitada.

A Agência de Defesa Agropecuária da Bahia (ADAB), aos veterinários e técnicos pelo auxílio.

Ao Banco do Nordeste e FAPESB pelo financiamento do projeto.

A Universidade Federal da Bahia – UFBA, pela disponibilização da infra-estrutura necessária para a realização deste trabalho.

Ao NIT, pela ajuda com o pedido do processo de patente.

Ao Instituto Federal de Educação Ciência e Tecnologia Baiano (IF Baiano), pelo apoio, sempre que necessário.

A todos aqueles que auxiliaram e/ou participaram direta ou indiretamente do desenvolvimento deste trabalho, meus agradecimentos.

“Um homem pode ser tão grande quanto ele queira ser, pode ter os sonhos que quiser ter e desde que acredite em si mesmo, tenha coragem, determinação e dedicação, tudo será possível.”

bem no alto da ladeira
 numa casa de reboco
 na rede me balanço
 fico besta a admirar

mesmo seca és queria
 mas se desse uma chovida
 todo mundo pinotava
 lá daquele pé de ingá

com o sol desabrochando
 o orvalho já secando
 os cavalos vão chegando
 pra mais logo nós muntá

no curral ali do lado
 os bezerro abarrotado
 tão tudinho abafado
 doidinho pra mamar

num tamborete bem baixinho
 o vaqueiro de mansinho
 faz o laço com carinho
 pra formosa num amuá

pega o copo com cuidado
 já leva bem adoçado
 vai chegando de fininho
 que é pro leite não cortar

lá no fundo do quintal
 o bater da colher de pau
 e leite coalhado é um sinal
 tem manteiga pra lavar

com o tibungar do pote
 eu corro dou um pinote
 o Vêi Béta da um grito
 o café já tá na mesa

cabaça de tapioca
 um saco de poca-poca
 o povo fazendo graça
 brigando de pirraça
 só pra vê se o Vêi reprova

com essa rima entortada
 muita gente atrapalhada
 vai ficar sem entender nada
 pensando ser coisa de maluco
 esse menino desaprendeu a escrever

sem saber toda essa gente
 pra quem foi toda essa prosa
 tem gente fazendo verso
 só pra gente ajuntá

a saudade nos aperta
 a lembrança nos alegre
 Bença Voinho ou Painho é uma reza
 que nunca vou deixá de rezar

Antonio F Brandão Neto

SUMÁRIO

1. CAPÍTULO 1

INTRODUÇÃO	20
------------------	----

2. CAPÍTULO 2

REVISÃO DE LITERATURA.....	22
----------------------------	----

2.1 HISTÓRICO.....	22
--------------------	----

2.2 VÍRUS DA ARTRITE-ENCEFALITE CAPRINA.....	23
--	----

2.2.1 CLASSIFICAÇÃO.....	23
--------------------------	----

2.2.2 CARACTERÍSTICAS MORFOLÓGICAS.....	23
---	----

2.2.3 CICLO DE REPLICAÇÃO VIRAL.....	26
--------------------------------------	----

2.2.4 CÉLULAS HOSPEDEIRAS DO VÍRUS.....	32
---	----

2.2.5 RESTRIÇÃO DA REPLICAÇÃO VIRAL.....	33
--	----

2.2.6 PATOGENIA.....	34
----------------------	----

2.2.7 ASPECTOS CLÍNICOS E PATOLÓGICOS.....	35
--	----

A) Forma Artrítica.....	35
-------------------------	----

B) Forma Encefálica.....	36
--------------------------	----

C) Forma Mamítica.....	37
------------------------	----

D) Forma Respiratória.....	37
----------------------------	----

2.2.8 ASPECTOS IMUNOLÓGICOS.....	38
----------------------------------	----

2.2.8.1 Resposta imune humoral	38
--------------------------------------	----

2.2.8.2 Resposta imune celular.....	39
-------------------------------------	----

2.2.9 TRANSMISSÃO.....	40
------------------------	----

2.3 DIAGNÓSTICO	42
-----------------------	----

2.3.1 CLÍNICO.....	42
--------------------	----

2.3.2	DETECÇÃO SOROLÓGICA PARA CAEV.....	43
	A) Imunodifusão em Gel de Agarose.....	43
	B) ELISA (Técnica Imunoenzimática).....	45
	C) Imunofluorescência Indireta (IFI).....	45
	D) Western Blotting.....	46
2.3.3	Detecção do Vírus ou Componentes Virais.....	47
	A) Isolamento Viral.....	47
	B) Reação em Cadeia da Polimerase (PCR).....	47
2.4	CONTROLE E PROFILAXIA.....	48
2.5	SITUAÇÃO NO BRASIL.....	49
2.6	ANTICORPOS	51
2.6.1	DEFINIÇÕES.....	51
2.6.2	ESPECIFICIDADE, AFINIDADE E AVIDEZ.....	55
2.6.3	PRODUÇÃO DE ANTICORPOS.....	54
2.7	ANTICORPOS POLICLONAIS.....	56
2.8	ANTICORPOS MONOCLONAIS.....	58
2.8.1	CARACTERIZAÇÃO DOS AcM.....	58
2.8.2	INTERAÇÃO AcM-ANTIGENO.....	59
2.9	AcM vs AcP.....	60
2.10	APLICAÇÕES DOS AcM.....	61
2.11	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	64
3.	CAPÍTULO 3	
	OBJETIVOS.....	89
3.1	OBJETIVO GERAL.....	89
3.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	89

4. CAPÍTULO 4	
MANUSCRITO 1.....	91
5. CAPÍTULO 5	
MANUSCRITO 2.....	98
6. CAPÍTULO 6	
DEPÓSITO DE PATENTE.....	117
7. CAPÍTULO 7	
CONCLUSÕES.....	126
8. CAPÍTULO 8	
APÊNDICES.....	128

LISTA DE ABREVIATURAS

AcM	Anticorpos monoclonais
AcP	Anticorpos policlonais
AEC	Artrite Encefalite Caprina
BIV	<i>Bovine immunodeficiency virus</i>
CA	Capsídeo
CAEV	<i>Caprine Arthritis-Encephalitis Virus</i>
DICT₅₀	Dose Infectante em Cultura de Tecidos
DNA	<i>Deoxyribonucleic acid</i>
EIAV	Virus da Anemia Infecciosa Equina
ELISA	<i>Enzyme-linked immunosorbent assay</i>
FIV	<i>Feline immunodeficiency virus</i>
HIV	<i>Human Immunodeficiency Virus</i>
IDGA	Imunodifusão em Gel de Agarose
IFI	Imunofluorescência Indireta
IN	Inegrase
LVPR	Lntivírus de Pequenos Ruminantes
MA	Matriz ou Proteína Associada a Membrana
MSC	Membrana Sinovial Caprina
MVV	Virus Maedi-Visna
NC	Nucleocapsídeo ou Nucleoproteína Ligada ao Acido Nucléico

OIE	<i>World Organisation for Animal Health</i>
PCR	<i>Polymerase chain reaction</i>
PNSCO	Programa Nacional de Sanidade de Caprinos e Ovinos
PR	Protease
RIA	Radioimunoensaio
RIPA	Radioimunoprecipitação
RNA	<i>Ribonucleic acid</i>
SIV	<i>Simian immunodeficiency virus</i>
SU	Glicoproteína de Superfície
TM	Glicoproteína Transmembrana
TR	Transcriptase Reversa

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1: Representação esquemática da estrutura dos Retrovírus.....	28
FIGURA 2: Representação esquemática dos genes do CAEV.....	29
FIGURA 3 : Ciclo de replicação dos Retrovírus	30
FIGURA 4 : Efeito citopático do CAEV em MSC	31
FIGURA 5: Prova de Imunodifusão em Gel de Ágar (IDGA).....	44
FIGURA 6: Estrutura da molécula de anticorpo.....	52
FIGURA 7: Regiões hipervariáveis na molécula de Ig.....	54
FIGURA 8: Esquema da produção de Ig a partir da hiperimunização de camundongo com o antígeno.....	57

RESUMO

ANTICORPOS MONOCLONAIS PARA O VÍRUS DA ARTRITE ENCEFALITE CAPRINA (CAEV). [CAMILA FONSECA LOPES BRANDÃO]

O CAEV, membro da família *Retroviridae*, gênero *Lentivirus*, causa doença progressiva e debilitante em caprinos. É um vírus envelopado cujo genoma codifica a poliproteína precursora p55^{gag} que, após clivagem proteolítica, gera as proteínas do core. Este último é formado por uma tripla camada protéica, dentro da qual se encontra a p28, proteína de maior número de unidades repetidas e com importante papel na produção de resposta imune. Na infecção, a resposta de anticorpos é lenta e em alguns casos a soroconversão pode ocorrer após vários meses. O teste de Imunodifusão em Gel de Agarose (IDGA) para a detecção de anticorpos possui uma baixa sensibilidade, principalmente nos estágios iniciais da infecção, o que tem estimulado a busca por técnicas mais sensíveis e que possam detectar precocemente a infecção. Muitas técnicas sorológicas utilizam Anticorpos Monoclonais (AcM), com especificidade única e que consistem em ferramentas de grande uso para fins diagnósticos ou de pesquisa para agentes virais. Neste trabalho, foram produzidos e caracterizados AcM para o CAEV com potencial aplicação no estudo e diagnóstico. Dentre as características imunológicas, foi demonstrado que todas as imunoglobulinas foram do tipo IgG1, de cadeia leve κ , sem atividade precipitante segundo o IDGA, o que evidencia a sua monovalência. Segundo a técnica de Western-blot, a atividade destes AcM está direcionada para a proteína da cápside (p28) de CAEV, contra o precursor p55^{gag} e os produtos intermediários da clivagem, p44, p36 e p22. O sítio de ligação dos AcM na p28 é um epítopo linear ou contínuo e sem pontes dissulfeto intramoleculares e nas

proteínas precursoras da cápside (p55^{gag}, p36 e p22), o epítipo está associado em proteínas diméricas ou que apresentam regiões com pontes dissulfeto, provavelmente ricas em resíduos Cys. A monoespecificidade da detecção da proteína viral foi observada usando células de Membrana Sinovial Caprina (MSC) infectadas, através da Imunofluorescência Indireta (IFI), onde todos os AcM tiveram sinal detectável para o vírus. Os AcM tiveram baixos títulos no Elisa Indireto, e os resultados foram melhorados na técnica de *Dot-Blot*, onde cinco AcM (G7, B9, A9, H9 e C7) detectaram o CAEV numa concentração proteica igual a 2,675 µg, enquanto que o AcM F12 detectou apenas 5,35 µg. Ao combinar os AcM na técnica de ELISA Combinado, observou-se uma melhor detecção do CAEV e desta forma, pode-se sugerir o uso combinado de alguns AcM, tais como o AcM A9 com o G7, C7 e o F12. A especificidade demonstrada pelos AcM para reconhecimento antigênico em ensaios imunoenzimáticos, principalmente quando enfrentados com proteínas virais e proteínas celulares, como no caso da IFI, permitiu o desenvolvimento de um processo de detecção de antígeno do Vírus da Artrite-Encefalite Caprina (CAEV) em células do leite de cabras infectadas. Estes resultados levaram a um pedido de patente.

Palavras-chave: CAEV, Anticorpos Monoclonais, p28, p55^{gag}, Agentes Desnaturantes, Caracterização, Imunofluorescência Indireta, Diagnóstico Precoce.

ABSTRACT

MONOCLONAL ANTIBODIES FOR CAPRINE ARTHRITIS-ENCEPHALITIS VIRUS (CAEV). [CAMILA FONSECA LOPES BRANDÃO]

Caprine arthritis-encephalitis virus (CAEV), a member of the *Lentivirus* genus in the *Retroviridae* family, causes progressive and debilitating diseases in dairy goats. CAEV is an enveloped virus, and its genome encodes the polycistronic precursor protein p55^{gag}. Proteolytic cleavage of p55^{gag} generates viral core proteins. The core proteins consist of a triple layer that includes p28, which is a major core protein containing the highest number of repeating units and plays an important role in developing the immune response. During primary infection, development of neutralizing antibody responses is slow and, in some cases, seroconversion may occur several months after infection. The agar gel immunodiffusion (AGID) test for antibody detection has low sensitivity, especially in the early stages of infection; this has prompted the search for high-sensitive techniques that may be useful for early detection of infection. Many serological techniques use highly specific monoclonal antibodies (MAbs), which are very useful diagnostic tools for infectious diseases, as well as for research on viral agents. In this study, MAbs against CAEV were produced and characterized, and their potential applications in research and diagnosis were examined. The immunological characteristics of MAbs examined by AGID revealed that they were IgG1 immunoglobulins containing κ -type light chains, with no precipitation activity detected; this finding highlights their monovalency. Western blot analysis showed that MAbs that were directed against the capsid protein (p28) of CAEV were also reactive against the p55^{gag} precursor and the intermediate products of proteolytic cleavage (p44, p36,

and p22). The binding site of MAbs in p28 was found to be a linear or continuous epitope with no intramolecular disulfide bonds, whereas that in the capsid protein precursor p55^{gag} or the intermediate proteins p36 and p22 was found to be associated with proteins that are dimeric or that contain disulfide bonds, which are probably rich in Cys residues. Monospecificity in the detection of viral proteins of CAEV was observed using infected goat synovial membrane cells, by indirect immunofluorescence (IIF), wherein all MAbs could detect the virus. Low titers of MAbs were detected using the indirect ELISA, and the results but were improved using the dot-blot method, where five MAbs (G7, B9, A9, H9 and C7) showed signal up to or equal to 2,675 µg protein, while the MAb F12 detected only 5,35 µg of protein. By using a combination of MAbs in the combined ELISA method, a higher detection rate of CAEV was achieved, and thus, the use of a combination of some MAbs such as the A9 MAb with G7, C7, and F12 MAbs is suggested. The specificity exhibited by MAbs for antigen recognition in immunoenzymatic assays, particularly when reacted with viral proteins or cell proteins as in the case of IIF, enables detection of the CAEV antigen in the secretory cells of infected goats. This finding has led to a patent application.

Keywords: CAEV, Monoclonal Antibodies, p28, p55^{gag}, Denaturing Agents, Characterization, Indirect Immunofluorescence, Early Diagnosis

CAPÍTULO 1

1. INTRODUÇÃO

O Virus da Artrite-Encefalite Caprina (CAEV) pertence a família *Retroviridae*, sub-família *Lentivirinae* e gênero *Lentivirus*, (CALLADO et al., 2001; GOFF, 2006), é um vírus envelopado que se caracteriza por apresentar um Ácido Ribonucleico (RNA) diplóide (GOFF, 2006; HUSO et al., 1988) o qual está protegido por uma tripla camada protéica: a matriz ou proteína associada a membrana (MA), a proteína do capsídeo (CA), e a nucleoproteína ligada ao ácido nucléico (NC) (GOFF, 2006; MURPHY et al., 1999). Recobrando o capsídeo encontramos o envelope viral no qual se projetam as glicoproteínas de superfície (SU), responsáveis pelo reconhecimento dos receptores de superfície celular (GOFF, 2006; HUSO et al., 1988). A resposta de anticorpos contra o CAEV em animais infectados é dirigida principalmente para SU (gp 135) e para CA (p28) (resposta de maior intensidade) (DE LA CONCHA-BERMEJILLO, et al., 1995).

A infecção por CAEV causa doença degenerativa, crônica, com quadros principalmente de artrite, encefalite, mastite ou inflamações pulmonares (NARAYAN & CORK, 1985). A Artrite-Encefalite Caprina (AEC), leva a grandes perdas econômicas que se caracterizam por morte de animais jovens, diminuição da produção láctea, perda de peso dos animais adultos, além de perdas indiretas como a desvalorização do rebanho (CALLADO et al., 2001; COFFIN, 2001; PINHEIRO et al., 2001).

A via mais comum de transmissão do CAEV é a digestiva, através da ingestão de vírus livre ou de células infectadas contidos no colostro ou leite de fêmeas infectadas. Também são importantes vias de transmissão do vírus o contato direto entre os animais, bem como toda forma de contato indireto com os líquidos corporais (principalmente o sangue) (EAST et al., 1993, FRANKE, 1998; MSELLI-LAKHAL et al., 1999; REILLY et al., 2004).

Segundo a *World Organization for Animal Health* (OIE), o método mais utilizado para diagnosticar infecções por CAEV é a Imunodifusão em Gel de Agradose (IDGA).

Todavia, o diagnóstico sorológico desta doença tem algumas limitações, como a soroconversão que pode ocorrer após meses, fazendo com que alguns caprinos permaneçam soronegativos e/ou com baixos títulos no rebanho, bem como a negativação transitória de alguns animais. Estes caprinos infectados, porém assintomáticos e soronegativos (portadores sadios), podem disseminar o vírus através do leite e de secreções. (DE LA CONCHA-BERMEJILLO, 1998; RIMSTAD et al., 1993; KNOWLES et al., 1997). Técnicas sorológicas tais como o imunoenensaio enzimático (ELISA), radioimunoprecipitação (RIPA), radioimunoensaio (RIA), Western-Blot e Imunofluorescência Indireta (IFI) também são utilizadas para o diagnóstico da AEC (DE ANDRÉS et al., 2005).

Para melhorar a sensibilidade e reprodutibilidade dos testes, atualmente utiliza-se uma mistura de Anticorpos Monoclonais (AcM) (BERZOFSKY et al 2003), que tem especificidade única, são derivados de um único clone de células B e respondem a um único epítipo. Desde que Köhler e Milstein desenvolveram a tecnologia da produção dos AcM (KÖHLER; MILSTEIN, 1975), estes rapidamente se tornaram uma das ferramentas chaves da imunologia, revolucionando a ciência biológica por constituir reagentes homogêneos e altamente específicos (COLFOR; HALL, 1995; NELSON et al., 2000). Os Anticorpos Policlonais (AcP), variedade de moléculas de anticorpos com diferentes especificidades e afinidades, também tem sido utilizados em diversos testes sorológicos pela sua simplicidade e baixo custo de produção, quando comparados aos Anticorpos Monoclonais (AcM) (NELSON et al., 2000).

A região Nordeste ocupa o primeiro lugar no número de animais do rebanho nacional de caprinos e a Bahia, especificamente, ocupa o primeiro lugar, sendo o estado com o maior rebanho de caprinos do país (IBGE, 2010). Esta criação, juntamente com a de ovinos, merece especial atenção pela importância socioeconômica, principalmente na região semiárida, e devido a isso, a caprino/ovinocultura constitui a base de programas governamentais que tentam fixar o homem no campo. Dada a importância desta virose para a caprino/ovinocultura, a proposta deste trabalho foi a produção e a caracterização de anticorpos monoclonais específicos para o CAEV, bem como sua utilização no estudo do agente viral e diagnóstico da doença.

CAPÍTULO 2

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 HISTÓRICO

A doença artrite-encefalite caprina (AEC) foi reconhecida clinicamente, pela primeira vez, em 1959, na Suíça, onde se observou artrite crônica em caprinos adultos (STÜNZI et al., 1964). Inicialmente, a AEC foi caracterizada por artrite progressiva em animais adultos e encefalomielite desmielinizante em cabritos de menos de seis meses (CORK et al., 1974).

O reconhecimento da AEC como uma virose ocorreu em 1980, após a identificação do agente, classificado como um lentivírus da família *Retroviridae*, denominado Virus da Artrite Encefalite Caprina (CAEV). O CAEV foi isolado pela primeira vez nos Estados Unidos da América (EUA), em 1979, da membrana sinovial e do líquido cefalorraquidiano de caprinos infectados (CRAWFORD et al., 1980, NARAYAN et al., 1980).

No Brasil, a primeira descrição sobre AEC foi feita por Moojen et al. (1986), no Rio Grande do Sul, seguido de Fitterman (1988) na Bahia, Pinheiro et al. (1989) em Pernambuco, Assis & Gouveia (1994) no Ceará. Segundo Saraiva Neto (1994), a doença introduziu-se no Brasil através da importação de animais puros de raças leiteiras, provenientes de rebanhos europeus e americanos.

A doença encontra-se distribuída em quase todos os países do mundo, apresentando elevada prevalência na caprinocultura leiteira, onde o regime de criação intensiva e a proximidade dos animais favorece a disseminação da doença (NORMAN & SMITH, 1983), acarretando morte de animais jovens e grandes perdas econômicas que se caracterizam por diminuição da produção láctea e perda de peso dos animais, devido a dificuldades de locomoção (MODOLO et al., 2003). Algumas perdas indiretas importantes são

constantemente observadas, como a desvalorização dos rebanhos, matrizes e reprodutores, uma vez que o proprietário terá que repor precocemente seus animais e o aumento das despesas em função das medidas de controle (MODOLO et al., 2003).

2.2 VÍRUS DA ARTRITE-ENCEFALITE CAPRINA

2.2.1 CLASSIFICAÇÃO

O CAEV pertence a família *Retroviridae*, subfamília *Lentiviridae* e gênero *Lentivirus*. Este vírus se caracteriza por causar doenças degenerativas crônicas, com períodos de incubação prolongados, persistência e replicação viral na presença de resposta imune específica. Neste gênero, encontramos outros vírus de importância para animais domésticos, tais como o vírus Maedi-Visna (MVV) de ovinos, o Vírus da Anemia Infecciosa Equina (EIAV), o Vírus da Imunodeficiência Bovina (BIV), Vírus da Imunodeficiência Felina (FIV) e para o homem, o vírus da Imunodeficiência Humana do tipo I e do tipo II (HIV-1 e HIV-2) (COFFIN, 2001; GOFF, 2006; SMITH; CUTLIP, 1993; NARAYAN et al., 1980). O CAEV e o MVV são geneticamente e antigenicamente relacionados, sendo comumente denominados Lentivírus de Pequenos Ruminantes (LVPR) (ZANONI, 1998; GOFF, 2006).

2.2.2 CARACTERÍSTICAS MORFOLÓGICAS

O CAEV apresenta-se como um vírion envelopado de 80 a 100 nm de diâmetro contendo uma tripla camada de proteínas estruturais envolvendo duas moléculas idênticas de ácido ribonucléico (RNA). O nucleocapsídeo, camada proteica mais interna e intimamente associada ao RNA, está inserido em um capsídeo icosaédrico de aproximadamente 60 nm de diâmetro, e recobrando este capsídeo encontra-se o envelope viral, onde há projeções de glicoproteínas (Figura 1). O vírus apresenta uma grande quantidade de ácido siálico na superfície, o que lhe confere um importante grau de resistência para a degradação pelas

enzimas proteolíticas do hospedeiro e para a neutralização viral por anticorpos (COFFIN, 2001; GOFF, 2006; HUSO et al., 1988). Estudos filogenéticos realizados com amostras de LVPR indicam que estes vírus compartilham características genéticas, morfológicas, patogênicas e apresentam a possibilidade de infecção cruzada entre caprinos e ovinos (PAISICK, 1998; LIMA et al., 2004). Estes LVPR originam quasispécies virais, que ocorrem principalmente devido as altas taxas de mutações resultantes da falta de mecanismos corretores da enzima RNA polimerase e como resultado, há produção de numerosas partículas diferentes. Esta variabilidade auxilia na evasão do sistema imune, na indução de infecção persistente e na capacidade de atravessar as barreiras espécie-específicas (CHEEVERS et al 1993; STEINHAEUER; HOLLAND, et al 1987; PASICK, 1998).

O genoma do CAEV consiste de duas moléculas idênticas de RNA, lineares, de fita simples, não complementares e de polaridade positiva, com um tamanho aproximado de 7 a 11 kb de comprimento, incluindo o *cap* na região 5' e a poliadenilação na região 3'. É característico dos retrovírus apresentar um RNA transportador específico, cuja função é de iniciador da replicação e uma enzima exclusiva, a Transcriptase reversa (TR), que atua como ácido desoxirribonucléico (DNA) polimerase RNA dependente. (SALTARELLI et al, 1990; COFFIN, 2001; GOFF, 2006; MURPHY et al, 1999).

Três genes estruturais (*gag*, *pol* e *env*) fazem parte do genoma do vírus e originam polipeptídios precursores, que após clivagem pós-traducional dão origem às proteínas do vírion (CHEEVERS *et al.*, 1988) (Figura 2). Esta clivagem é análoga a que ocorre em MVV, antigenicamente relacionado com o CAEV, e em outros retrovírus, nos quais a formação das proteínas estruturais envolve a síntese e processamento de vários precursores polipeptídicos (VIGNE *et al.*, 1982).

O gene *gag* (Group- specific Antigens) está localizado mais próximo a região 5' e codifica as proteínas do core do vírion, as quais são formadas a partir de um precursor policistrônico primário comum de 51kDa a 55 kDa, denominado Pr51^{gag}-Pr55^{gag} (SCHOBORG et al., 2002; CHEEVERS et al., 1988). Este produto primário do gen *gag* é subsequentemente clivado em 3 proteínas estruturais principais: a MA (15 kDa a 18 kDa), a CA (21 kDa a 30 kDa), e a NC (13 kDa a 14 kDa) (CHEEVERS et al., 1981; ADAMS et al., 1985; GOGOLEWSKI et al., 1985; NARAYAN et al., 1997; MURPHY et al., 1999; SCHOBORG et al., 2002; GOFF, 2006).

O gene *pol* apresenta um grande número de sequências conservadas, sendo frequentemente utilizado para a comparação entre diferentes lentivírus. Ele codifica três proteínas que contêm atividade enzimática indispensável durante a multiplicação viral: a Transcriptase reversa (TR), a Integrase (IN) e a Protease (PR). A TR tem atividade enzimática para converter uma fita simples de RNA em uma molécula de DNA de fita dupla, a IN é necessária para ligar covalentemente o DNA proviral ao DNA da célula hospedeira, formando o “provírus” e a PR é responsável pelas clivagens dos produtos dos genes *gag* e *pol* no precursor comum (GOFF, 2006; MURPHY et al, 1999).

O gen *env* codifica duas glicoproteínas do envelope viral: a maior delas (135 kDa), a SU, responsável pelo reconhecimento dos receptores de superfície celular e a menor (90 kDa), a transmembrana (TM), que ancora o complexo glicoprotéico ao envelope viral e contém domínios responsáveis pela fusão do vírus à membrana celular. A SU é formada pelo processamento e clivagem de um precursor glicosilado de 150 kDa (gPr150^{env}), derivado de um polipeptídeo de 90Kd codificado pelo gen *env* (CHEEVERS et al., 1988; KNOWLES et al., 1991).

Um polipeptídeo não glicosilado de 150 kDa, denominado Pr150^{gag-pol}, corresponde provavelmente ao precursor comum das proteínas relacionadas ao gen *gag* e da TR, encontrada em todos os retrovírus (VIGNE et al.,1982). Os papéis dos precursores intermediários na formação das proteínas do core não estão claros (CHEEVERS et al., 1988).

Adicionalmente aos genes *gag*, *pol* e *env*, comuns a todos os retrovírus, os vírus pertencentes ao gênero *Lentivirus* codificam vários outros genes, referidos como genes acessórios. Esses incluem o gen *tat*, que codifica um potente transativador que associado a fatores da célula infectada, aprimora a eficiência da transcrição pela RNA polimerase celular; o gen *rev*, que codifica a proteína que é envolvida na transcrição do RNA viral e seu transporte do núcleo para o citoplasma, corrigindo RNAm na tradução; o gen *nef*, que é essencial para replicação do vírus em macrófagos, regula a expressão de CD4 e IL-2 e pode também alterar o estado de ativação de células alvo *in vivo*; e o gen *vif*, que está associado com a infectividade viral (GOFF, 2006; MURPHY et al., 1999) e tem sido associado *in vivo* ao estabelecimento da infecção persistente e patogênese da doença e *in vitro* a produção eficiente do vírus durante os estágios da replicação viral. (HARMACHE et al, 1995, HARMACHE et al, 1996).

2.2.3 CICLO DE REPLICAÇÃO VIRAL

O ciclo de replicação do CAEV se inicia com a interação entre a molécula receptora na superfície celular e a SU na superfície do vírus (Figura 3). A interação é complexa, envolvendo uma ligação inicial vírus-receptor, a drástica mudança conformacional nas proteínas do envelope, a indução da fusão das membranas celular e viral e a subsequente internalização do core do vírion no citoplasma. Em alguns casos a entrada do vírus pode ocorrer por endocitose celular. (HULINGUER *et al.*, 1993; HARKISS, WATT, 1990; GOFF, 2006; MURPY *et al.*, 1999). Pouco se sabe sobre quais são os receptores celulares para os LVPR, sabendo-se apenas que são proteicos e se encontram amplamente difundidos em células de diferentes espécies animais (LYALL *et al.* 2000). Células cronicamente infectadas, não podem ser infectadas por outro vírus que utilize o mesmo receptor celular, devido a fatores que envolvem a união intracelular dos produtos de *env* expressos e destes receptores. Este fenômeno é chamado de interferência viral ou de resistência a superinfecção (GOFF, 2006).

Além da interação direta vírus-célula, a disseminação da infecção também pode ocorrer via contato célula-célula, através da fusão celular induzida pelo vírus. Embora ambos os mecanismos citados possam ocorrer “*in vitro*”, a transmissão do vírus através da fusão célula-célula tem indicativo de ser mais importante “*in vivo*” (HARKISS, WATT, 1990; GOFF, 2006; MURPY *et al.*, 1999).

A transcrição reversa normalmente se inicia após a entrada do core do vírion no citoplasma da célula infectada. O sinal para a síntese do DNA não é conhecido, podendo ser desencadeado por uma simples exposição do core viral a altos níveis de desoxirribonucleotídeos presentes no citoplasma. Após isto, a TR inicia a transcrição reversa do ácido ribonucléico (RNA) viral, sintetizando um ácido desoxirribonucléico (DNA) de fita dupla. O capsídeo é removido e uma vez que o DNA viral já está no núcleo, enzimas especializadas, incluindo a IN, fazem uma inserção randômica desse DNA no genoma da célula hospedeira, compondo o *provírus*. Este, uma vez integrado ao DNA celular é estável, e durante replicação celular é transmitido à progênie como parte do genoma celular (GOFF, 2006). Na forma de *provírus*, o vírus pode permanecer no núcleo celular por meses ou anos (HARKISS, WATT, 1990). A integração do DNA linear retroviral, bem como a transcrição

reversa são etapas cruciais no ciclo de replicação dos retrovírus. A integração é requerida para uma replicação eficiente, já que estudos com cepas mutantes que não se integram, não estabelecem uma infecção persistente (GOFF, 2006).

Em condições adequadas à replicação, o DNA proviral é transcrito em RNA genômico viral e RNA mensageiro. Este último é traduzido nos ribossomos para a síntese de proteínas virais. O RNA genômico viral e as proteínas estruturais são montadas e a partícula viral recém formada “brota” através da membrana celular (HARKISS, WATT, 1990; GOFF, 2006; MURPHY, *et al.*, 1999). No CAEV a montagem e o brotamento são concomitantes (HAZIZA *et al.*, 2001).

Após o brotamento, as proteínas *gag*, *pol* e *env* que haviam sido sintetizadas juntas, são processadas e reorganizadas pela PR, modificando a estrutura do vírus, tornando-o uma partícula madura. O vírus liberado na matriz extracelular é capaz de infectar outras células para iniciar um novo ciclo viral (HARKISS, WATT, 1990; GOFF, 2006; MURPHY, *et al.*, 1999).

Alguns retrovírus não são citopáticos e não alteram dramaticamente o metabolismo da célula infectada; outros, replicam apenas em células em divisão, incluindo os do gênero *Lentivirus*, que podem causar morte celular, formação de sincícios e apoptoses (Figura 4). A infecção por retrovírus geralmente não é lítica, porém diversos mecanismos como: (1) morte celular mediada pelo sistema imune; (2) toxicidade direta por produtos dos genes virais; (3) replicação intensiva do vírus levando a uma opressão das funções necessárias à sobrevivência da célula, e (4) efeitos indiretos dos produtos dos genes virais nas interações celulares necessárias às suas funções e sobrevivência podem levar a destruição celular (MURPHY, *et al.*, 1999).

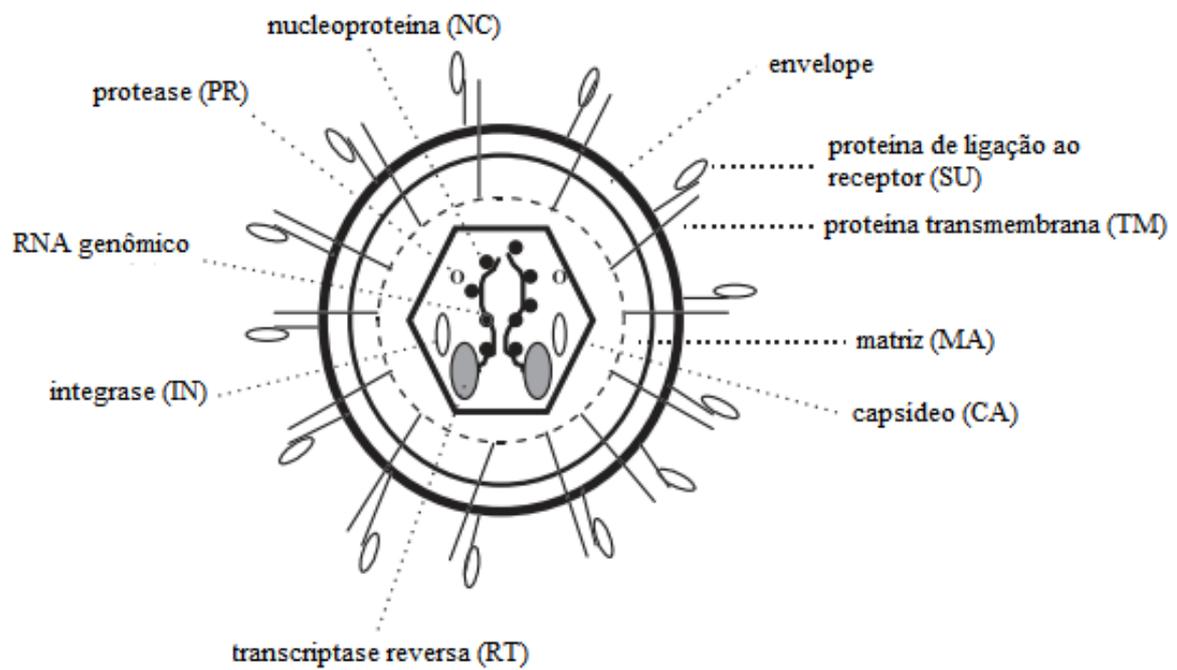


Figura 1: *Representação esquemática da estrutura dos Retrovírus (Adaptado de Goff, 2006).*

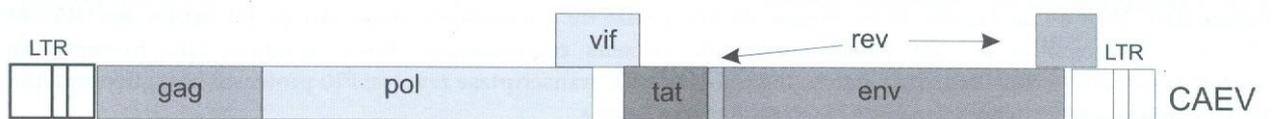


Figura 2: *Representação esquemática dos genes do CAEV.* LTR- *long terminal repeat*. Gene *gag* codifica 3 proteínas principais: MA, CA e NC. Gene *pol* codifica enzimas: TR e IN. Gene *env* codifica as GP SU e TM. Genes *vif*, *tat*, e *rev* codificam proteínas reguladoras. (FLORES, 2007)

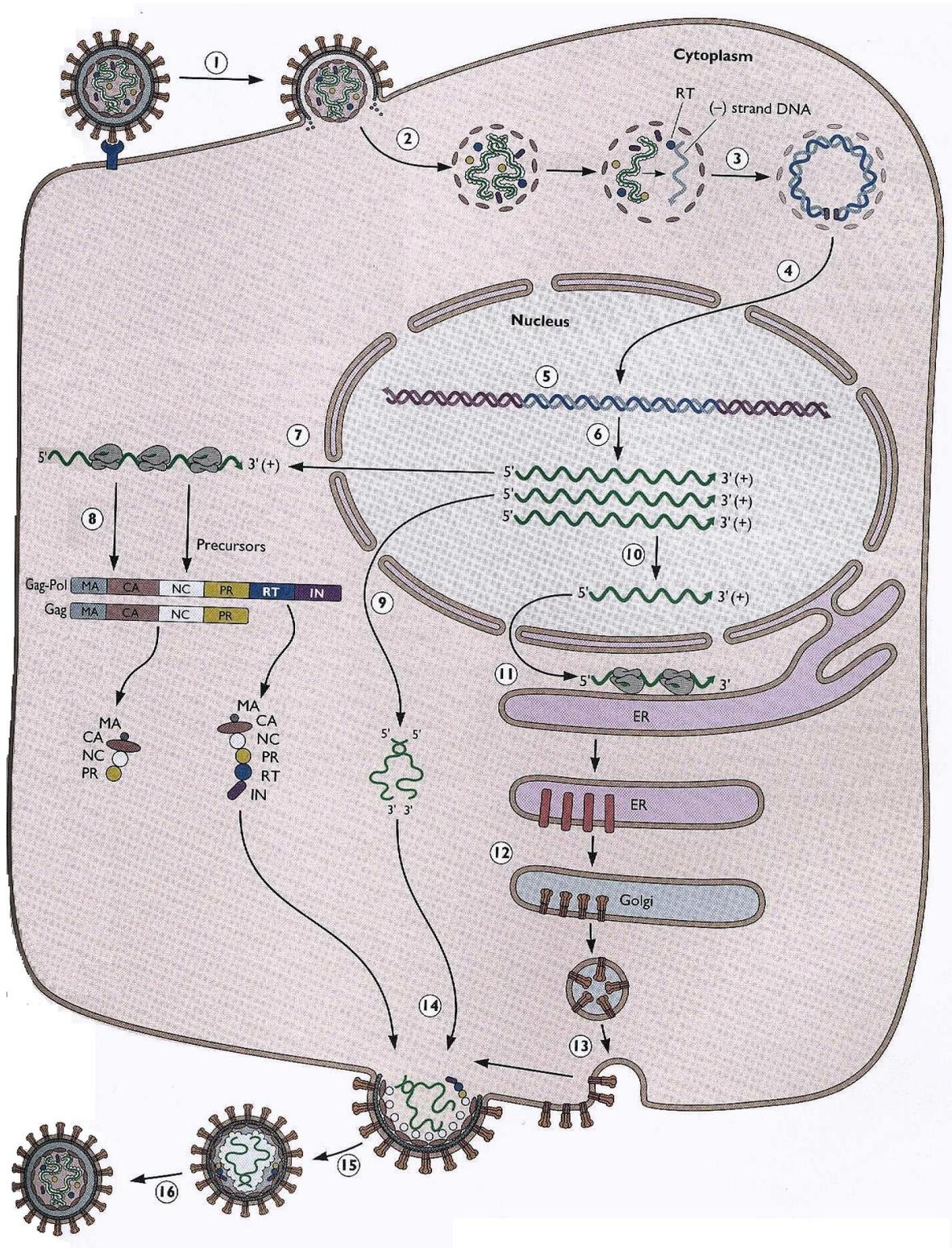


Figura 3: Ciclo de replicação dos Retrovírus. Os números de 1-16 indicam os estágios do ciclo de replicação dos Retrovírus. (FLINT et al, 2004).

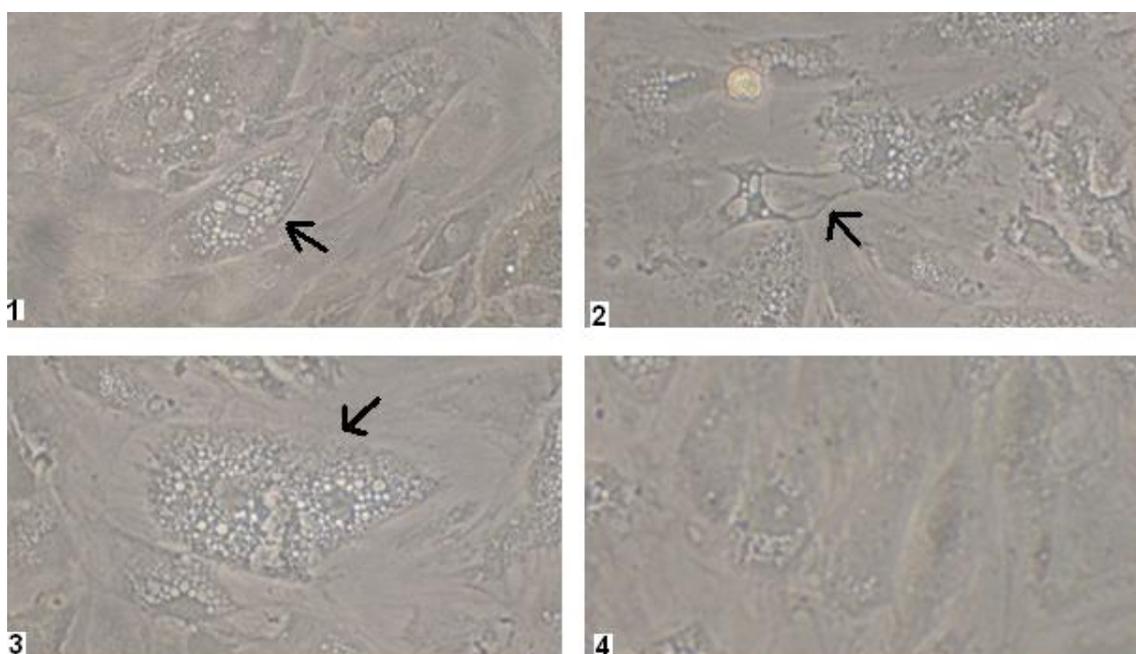


Figura 4. *Efeito citopático do CAEV em MSC:* Células de MSC infectadas com CAEV. As setas indicam a vacuolização citoplasmática (1), formação de “pontes” intercelulares (2) e fusão celular induzida pelo vírus (3). Células de MSC não infectadas (4). Aumento: 400x.

2.2.4 CÉLULAS HOSPEDEIRAS DO VÍRUS

O CAEV, assim como outros lentivírus, é conhecido por causar uma infecção persistente com um longo período de latência que pode se estender por toda a vida do animal. As células da linhagem monócito-macrófago são as principais células hospedeiras do vírus, e a replicação viral e expressão de vírus infeccioso é dependente do nível de maturação/diferenciação da célula monocítica (restrição da replicação viral) (MURPHY, *et al.*, 1999; PHELPS, SMITH, 1993; NARAYAN, *et al.*, 1982). Os macrófagos são a principal fonte do vírus em animais experimental ou naturalmente infectados, porém não é visível nenhuma alteração celular enquanto acontece a replicação viral (NARAYAN *et al.*, 1982).

O genoma e/ou proteínas virais tem sido detectados *in vivo* ou *in vitro* em células com função macrofágica no pulmão, baço e linfonodos; em células de revestimento das veias do cérebro e sinoviais; células epiteliais dos pulmões, da tireóide, dos túbulos renais, dos folículos tireoidianos, das glândulas mamárias, dos ovidutos, das criptas intestinais; e em células da camada granulosa dos ovários. (ZINK *et al.*, 1990; PHELPS, SMITH, 1993; MSELLI-LAKHAL *et al.*, 1999; LAMARA *et al.*, 2001; LAMARA *et al.*, 2002; FIENI *et al.*, 2003).

Estudos demonstraram que o CAEV pode passar diretamente de macrófagos com infecção produtiva para outras células não infectadas por fusão celular, sem a necessidade de receptores celulares específicos. A presença de transcritos virais em células epiteliais sugere que essas células podem ser infectadas por fusão randômica com macrófagos infectados de tecidos. A possibilidade de penetração dos lentivirus em células infectadas tanto por endocitose mediada por receptores específicos, quanto por fusão, permite um tropismo mais amplo de células hospedeiras (ZINK *et al.*, 1990).

Portanto, a replicação do CAEV em células epiteliais de uma variedade de tecidos, inclusive nas células epiteliais do leite de cabras, sugere o conceito de que o tropismo celular dos lentivírus pode estender-se além do estreito limite de linfócitos e macrófagos (ZINK *et al.*, 1990; MSELLI-LAKHAL *et al.*, 1999).

2.2. 5 RESTRIÇÃO DA REPLICAÇÃO VIRAL

Estudos demonstraram que os monócitos têm uma capacidade reduzida de suportar a replicação viral, que permanece nos estágios iniciais, até que haja a maturação dessas células em macrófagos, completando assim o ciclo de replicação. Este fenômeno, conhecido como *restrição da replicação*, é um mecanismo que permite ao vírus permanecer nos monócitos por períodos prolongados e indetectável para outras células do sistema imune (GENDELMAN et al., 1986; ZINK et al., 1987; ZINK et al., 1990; BRODIE et al. 1995; MURPY et al., 1999).

Em fases mais avançadas do ciclo de replicação viral, outro tipo de restrição ocorre em macrófagos maduros infectados, no qual o ciclo de multiplicação viral é interrompido em um estágio entre a transcrição e a maturação viral. Isto tem sido correlacionado aos efeitos de um tipo de interferon induzido por *Lentivirus* (IFN-LV) que é produzido durante a interação celular entre o macrófago infectado e o linfócito T. O IFN-LV é capaz inicialmente de inibir a proliferação de monócitos *in vitro* e a maturação de monócitos em macrófagos, reduzindo indiretamente a replicação viral. Essa citocina também apresenta um efeito inibitório direto sobre expressão dos genes virais nos macrófagos já maduros, bloqueando a replicação na etapa de transcrição. Outro efeito do IFN-LV demonstrado *in vitro* foi o bloqueio da fusão entre macrófagos infectados e células de membrana sinovial permissíveis a infecção pelo CAEV (NARAYAN et al., 1982; ZINK et al., 1987; ZINK et al., 1990).

A clivagem errônea da SU também demonstrou ser capaz de restringir a replicação do vírus em cultivos de fibroblastos infectados com CAEV (CHEBLOUNE et al., 1996). A falta de um receptor adequado e funcional na superfície da célula hospedeira impede a penetração do vírus, funcionando assim como uma forma de restrição a replicação, desde que não haja caminhos alternativos para a entrada.

Pode-se observar que após a integração do DNA viral na célula hospedeira, o ciclo viral pode ser interrompido em diferentes estágios, demonstrando que muitas células podem conter o genoma proviral, mas não expressar o RNA viral. Isto pode explicar, em parte, a latência da doença clínica e a persistência da resposta imune, uma vez que as proteínas virais

incorretamente processadas podem estimular e manter uma resposta imune ao vírus (MSELLI-LAKHAL et al. 2000).

2.2. 6 PATOGENIA

Os vírus da família *Retroviridae* caracterizam-se por um longo período de incubação, por isso a denominação de *slow vírus* (GOFF, 2006). Vários meses podem passar entre a infecção e a detecção de anticorpos, o que ainda não está bem elucidado; porém, sabe-se que existe uma associação entre a carga viral e gravidade das lesões (HANSON et al., 1996; RAVAZZOLO, et al, 2006)

O CAEV tem tropismo por células da linhagem monócito-fagocitário, induzindo a infecção persistente, apesar da produção de anticorpos pelo hospedeiro . O leite e o colostro de fêmeas infectadas, por serem ricos dessas células, são os principais veículos de transmissão do vírus, sendo o trato intestinal de cabritos a principal porta de entrada para o vírus. Essa entrada ocorre pela absorção direta de macrófagos infectados através das vilosidades intestinais ou pela infecção das células intestinais por vírus liberados de macrófagos previamente digeridos por enzimas proteolíticas (HUSO, et al, 1988, BRODIE et al. 1995).

Após penetrar no organismo, a “restrição da replicação” permite que o vírus permaneça latente nos monócitos do hospedeiro e não detectável pelo sistema imune. Como mecanismo de persistência viral, cita-se a presença do provírus DNA; replicação viral que aguarda a diferenciação de monócitos em macrófagos nos tecidos; baixa concentração de anticorpos neutralizantes e mutação viral de genes *env*, que gera variações nas proteínas do envelope e permite o escape ao sistema imune (REILLY et al., 2004).

Macrófagos infectados pelo CAEV estimulam de forma anormal os linfócitos, induzindo a uma hiper-proliferação e reatividade linfocitária inespecífica, o que justifica os danos imunomediados que caracterizam a evolução das lentivirose clássicas. No caso da AEC, esses danos vão se localizar nas articulações nos animais adultos e no sistema nervoso central, nos animais jovens (GARCIA, 1993).

Processos inflamatórios nos tecidos recrutam macrófagos, que podem conter o genoma viral, facilitando a disseminação do vírus para tecidos alvo, como cérebro, medula espinhal, glândula mamária e membrana sinovial, o que aumenta a carga viral nos tecidos inflamados (ZINK, et al.,1990).

2.2. 7 ASPECTOS CLÍNICOS E PATOLÓGICOS

A infecção por CAEV é geralmente persistente, podendo causar infecção multissistêmica, de evolução crônica, com agravamento progressivo das lesões, perda de peso e debilidade até a morte (NARAYAN; CORK, 1985). A enfermidade se caracteriza por uma paralisia ascendente afebril em cabritos e artrite crônica em animais adultos (GARCIA, 1993). A grande maioria dos animais infectados permanece assintomática (REILLY *et al.*, 2004), porém dependendo do vírus e de fatores genéticos do hospedeiro, aproximadamente um terço dos animais infectados com os LVPR podem desenvolver os sintomas da doença (RAVAZZOLO, et al., 2006).

Do ponto de vista clínico e anatomo-histopatológico, as manifestações clínicas das infecções por CAEV têm sido classificadas em quatro formas principais: artrítica, neurológica, respiratória e mamária. Dentre essas formas, a mais comumente observada é a artrítica, acometendo animais adultos (NARAYAN; CORK, 1985).

A) Forma Artrítica

Essa manifestação clínica geralmente acomete cabras, com mais de oito meses de idade. As articulações carpianas são as freqüentemente envolvidas, porém, outras articulações podem também ser atingidas, como a atlanto-occipital, do jarrete e da tuberosidade isquiática, além das bursas atlântica e supra-espinhal (CRAWFORD; ADAMS, 1981). As manifestações observadas nesta forma resultam da distensão da cápsula articular e proliferação do tecido peri-articular, com conseqüente aumento do diâmetro das articulações

envolvidas e com variáveis níveis de manqueira. No estágio inicial, a tumefação articular pode ser intermitente e a claudicação mínima. (PHELPS; SMITH, 1993; FRANKE, 1998; REILLY et al., 2004).

A evolução da doença é variável; alguns animais decaem após alguns anos e outros permanecem inalteráveis durante vários anos. A medida que a doença evolui, os animais tornam-se claudicantes ou se posicionam em decúbito e se debilitam. Um agravamento de artrite em cabras ocorre, geralmente, a partir da terceira lactação (FRANKE, 1998; REILLY, et al., 2004).

Após situações de prolongado estresse, a artrite pode se manifestar de forma aguda, impedindo a locomoção dos animais. Os animais em fase avançada da artrite emagrecem, apesar do apetite inalterado, sua pelagem torna-se ressecada, com produção de leite diminuída e podem apresentar claudicação. Os problemas de locomoção e a diminuição da produtividade geralmente levam ao abate precoce dos animais (FRANKE, 1998).

B) Forma Encefálica

A forma neurológica da AEC acomete cabritos com 1 a 4 meses de idade e, ocasionalmente, adultos. Ela se apresenta como uma leucoencefalomielite progressiva, associada com uma paralisia ascendente afebril (FRANKE, 1998; GARCIA, 1993). Os achados mais frequentes são ataxia secundária e paresia nos membros posteriores que evolui para tetraparesia. Depressão, torcicolo e andar em círculo são sintomas indicativos de lesão cerebral (CORK 1974; NORMAN; SMITH, 1983).

Inicialmente os animais apresentam fraqueza e andar inseguro e, a medida que a doença evolui os cabritos tornam-se cegos, apresentam rotação e desvio da cabeça, paralisia facial e opistótono. O apetite e o estado de consciência permanecem inalterados até o final da evolução do quadro clínico, que pode demorar de 1 a 2 semanas. Os animais afetados devem ser sacrificados para evitar um sofrimento prolongado (PHELPS; SMITH, 1993; FRANKE, 1998; REILLY, et al., 2004).

C) Forma Mamítica

A inflamação da glândula mamária é frequente, levando ao comprometimento da produção leiteira e predisposição a infecções secundárias, o que tem grande significado econômico em caprinos leiteiros. Esta forma clínica caracteriza-se por: a) mamite intersticial, provocando o endurecimento e a atrofia da glândula mamária atingida, sem alteração macroscópica do leite, mas com redução da produção láctea, de forma gradativa, atingindo o grau máximo de agalaxia; b) mamite difusa, que acontece por ocasião do parto que leva ao rápido descarte dos animais em propriedades de leite pela baixa rentabilidade; e c) mamite nodular, que é uma forma crônica, o leite tem aspecto normal, mas tem sua produção progressivamente reduzida e há presença de nódulos na glândula mamária. A mamite é mais perceptível em cabras a partir da terceira lactação (FRANKE, 1998).

D) Forma Respiratória

A apresentação da forma pulmonar é incomum e de pouca gravidade. Em caprinos adultos, há o aparecimento de pneumonia intersticial que evolui para pneumonia broncointersticial, provavelmente pela invasão pulmonar por agentes bacterianos secundários. Os sinais clínicos são tosse, perda de peso, dispnéia, secreção nasal após exercícios físicos, taquipnéia, macicez pulmonar, estertores úmidos e diminuição do murmúrio vesicular à auscultação (SERAKIDES et al., 1996; REILLY, et al., 2004).

2.2.8 ASPECTOS IMUNOLÓGICOS

2.2.8.1 Resposta imune humoral

O tempo entre o início da infecção e o aparecimento de anticorpos no sangue varia de semanas a meses, o que presumivelmente, resulta do nível de replicação viral em cada animal. A imunidade passiva adquirida pelos anticorpos presentes no colostro persiste em níveis detectáveis no soro de cabritos por até 6 meses (ADAMS, et al 1983; HARKISS; WATT, 1990; RIMSTAD, et al 1993).

A resposta de anticorpos contra o CAEV em animais infectados é detectada em torno da terceira semana após a infecção, e dirigida principalmente à proteína CA; e na quinta semana são produzidos anticorpos para as demais proteínas (NC, MA, TM e SU) (CONCHA-BERMEJILLO, et al 1995).

O papel dos anticorpos no controle de infecções por LVPR é controverso. Apesar de a resposta imune humoral ser direcionada para várias proteínas virais, a resposta contra as glicoproteínas do envelope se mantém durante todo o curso da infecção e está associada com a artrite grave, já que os anticorpos tendem a ser pouco neutralizantes ou não neutralizantes e geram mecanismos imunopatológicos que contribuem com a doença induzida pelo vírus (KNOWLES, et al 1990; BERTONI, et al 2000; BERTONI, 2007).

Huso et al (1988) demonstraram que a superfície externa das partículas infecciosas de CAEV é recoberta com ácido siálico, o que confere uma notável resistência a neutralização por anticorpos, facilitando o escape viral à resposta imune humoral. Esta resistência a neutralização gera variantes virais que têm sido detectadas em cabras infectadas, sugerindo que os anticorpos impõem no vírus uma forte pressão seletiva (CHEEVERS, et al 1993; ELLIS, et al 1987).

2.2.8.2 Resposta imune celular

A resposta imune de células T desempenha um papel crucial no controle da infecção viral aguda e persistente (KELENERMAN, 2005). A resposta imune celular contra o CAEV é caracterizada pela redução na proporção de monócitos do sangue periférico, diminuição de linfócitos T CD4⁺ e discreto aumento de linfócitos T CD8⁺ (JOLLY, et al 1997; LICHTENSTEIGER, et al 1993). Esta resposta conduz a infiltração mononuclear de vários tecidos do organismo, em particular para a articulação do joelho. Durante a infecção pelo CAEV, o número de monócitos está reduzido e a qualidade resposta de células T *helper* pode ser afetada (PERRY, et al 1995; JOLLY, et al 1997; LECHNER, et al 1997).

A resposta celular T CD4 tipo 2 (Th2) para as proteínas traduzidas a partir do gene *env* é caracterizada por uma resposta de interleucina 4 (IL4) dominante e uma reduzida expressão de interferon γ (IFN γ), segundo descrito em cabras infectadas que tiveram o desenvolvimento do processo de artrite clínica. Inversamente, animais infectados e assintomáticos, mostraram uma forte resposta IFN γ sobre a estimulação antigênica das proteínas produzidas pelo gene *env*, demonstrando o efeito da resposta de linfócitos T *helper* 1 (Th1) no controle da carga viral (CHEEVERS et al 1997).

Células T CD8⁺ tem sido detectadas em cabras e ovelhas infectadas, e são consideradas importantes para o sucesso no controle da carga viral de animais persistentemente infectados (LICHTENSTEIGER, et al 1993; BIRD, et al 1993; BLACKLAWS et al 1994; BLACKLAWS et al 1995). Da mesma forma, foi observado que em humanos infectados com HIV-1 referidos como controladores de HIV (HIC), o controle da replicação viral tem sido associado com uma resposta de célula T CD8 específica, caracterizada por um fenótipo HLA-DR alto e CD-38 baixo. Os indivíduos HIC tem alta frequência de células T CD8 específicas para HIV secretando IFN γ (SÁEZ-CIRON et al 2007).

Os padrões de expressão de citocinas na AEC também foram similares aos achados na artrite reumatóide humana, com poucas células expressando as citocinas derivadas dos leucócitos - interferon γ (IFN γ) e interleucina 2 (IL-2) – e mais células expressando proteínas quimioatraentes de monócitos (MCP-1), IL-6 e fator de necrose tumoral (TNF) – alfa. Nenhum IFN γ ou células expressando o vírus foram achadas nas articulações

inflamadas (processo agudo), mas ambos foram detectados em cabras com artrite grave (LECHNER, et al 1997).

Lechner *et al* (1997) concluíram que na infecção pelo CAEV, macrófagos infectados respondem diferentemente de células não infectadas para estímulos exógenos, sugerindo que esse vírus pode modular as funções acessórias desses macrófagos, como mudar o padrão de expressão de citocinas ou a resposta imune antiviral *in vivo*.

2.2. 9 TRANSMISSÃO

Os caprinos infectados de forma persistente atuam como reservatório e fonte de infecção do CAEV; dessa forma, os portadores saudáveis, representam um importante elo na transmissão da doença, pois aparentemente sadios, eliminam o vírus, disseminando a infecção para outros animais (GARCIA, 1993). A transmissão ocorre por meio de secreções ou excreções ricas em células do sistema monocítico-fagocitário infectadas, principalmente macrófagos (ROWE *et al.*, 1997).

A principal via de transmissão é a digestiva, geralmente, no período neonatal, através da ingestão de colostro ou leite de fêmeas infectadas, onde o vírus pode se encontrar tanto livre como em células somáticas (FRANKE, 1998; MURPY, *et al*, 1999; MSELLI-LAKHAL *et al.*, 1999; REILLY, *et al.*, 2004). Pouco se sabe sobre o mecanismo pelo qual essas células migram através da barreira do epitélio intestinal e infectam células sanguíneas. É sugerido que células epiteliais liberadas no leite eliminam um grande número de partículas vesiculares contendo o vírus infeccioso, que atravessariam o epitélio intestinal. A transmissão do CAEV pode ser mais eficiente quando ocorre entre células homólogas, como células epiteliais do leite e células epiteliais intestinais (MSELLI-LAKHAL *et al.*, 1999).

Pesquisas demonstraram que somente uma exposição oral com leite contendo 2×10^7 DICT₅₀ resultou na infecção dos animais. A transmissão do vírus através de ordenha mecânica também tem sido demonstrada, sugerindo que as máquinas utilizadas para ordenhar os animais podem servir como reservatório de vírus e um possível mecanismo para introduzir o vírus na glândula mamária. A infecção experimental através de uma infusão

mamária de 2×10^7 DICT₅₀ do CAEV resultou na soroconversão de 100% das fêmeas soronegativas (EAST *et al.*, 1993).

Apesar da via digestiva ser responsável por mais da metade das infecções, o CAEV pode ser transmitido por outras vias, o que resulta em um significativo aumento da soroconversão dos animais com o passar da idade (ROWE, *et al.*, 1997).

O vírus pode estar presente em todos os líquidos e secreções corporais, e por este motivo o contato direto entre os animais, bem como toda a forma de contato indireto com os fluidos corporais (principalmente sangue), também são importantes meios de transmissão do vírus (FRANKE, 1998). Também é relatada a transmissão do CAEV pelo contato prolongado, que é favorecido pelo tempo de exposição e alta densidade de animais infectados (EAST *et al.* 1993; PHELPS; SMITH, 1993). Transcritos de CAEV detectados por hibridização *in-situ* foram observados por Zink *et al.* (1990) em criptas intestinais e túbulos renais de animais soropositivos, o que indica que o vírus pode estar presente em fezes e na urina destes animais. Agulhas, seringas, tatuadores, instrumentos cirúrgicos e aplicadores de brincos, entre outros, podem favorecer o contágio do CAEV, e por isso não podem ser reutilizados sem a anterior descontaminação (GARCIA, 1993; FRANKE, 1998).

A via aerógena apesar de pouco descrita, pode ser viável, principalmente em caprinos com regime de criação intensivo, uma vez que macrófagos alveolares apresentaram imunomarcagem positiva em inoculação experimental por via intranasal (GUEDES *et al.* 2001).

Apesar do líquido seminal não ser considerado uma fonte potencial de infecção, a transmissão do vírus por esta via é possível, podendo o contágio ocorrer por meio da monta natural ou por inseminação artificial a partir de reprodutores infectados. A transmissão do CAEV é potencializada pela presença de infecções ou inflamações testiculares, resultando no maior fluxo do vírus para o sêmen (FRANKE, 1998; ANDRIOLI, *et al.* 2006). O contato com secreções vaginais durante a monta natural também tem importância na disseminação do vírus. As células epiteliais do oviduto, utilizadas para o desenvolvimento de embriões em sistemas de fertilização *in vitro* permitem a replicação do vírus. Isto sugere que a utilização destas células e de sêmen provenientes de animais com sorologia desconhecida para CAEV, podem representar um sério risco de transmissão durante a técnica de fertilização *in vitro* e inseminação artificial (FRANKE, 1998; LAMARA *et al.* 2002).

A transmissão vertical não é bem compreendida, mas evidências moleculares, histológicas e estudos sugerem a passagem transplacentária do vírus. Adams, *et al* (1983) demonstraram que cabritos filhos de mães soropositivas, nascidos através de cesárea, apesar de separados e de não ingerir o colostro, tornaram-se soropositivos. A cirurgia teria eliminado possibilidade de transmissão durante a passagem do cabrito pelo canal do parto e pelo contato com secreções maternas, sugerindo assim que a transmissão do vírus pode ter sido transplacentária. Além disto, através de técnicas de biologia molecular, demonstrou-se a presença de células infectadas pelo CAEV no canal vaginal de cabras (FIENI, *et al* 2003) e no muco vaginal de fêmeas (EAST *et al* 1993) e evidências histológicas demonstraram alterações microscópicas similares às descritas para AEC no endométrio de fêmeas infectadas (ALI, 1987).

Além das vias de infecção, deve-se levar em conta os fatores que afetam o risco de transmissão, como estresse, infecções bacterianas e virais concomitantes, imunossupressão, dose viral, rota de infecção, cepa do vírus, dentre outros (ZINK, *et al* 1987; CHEEVERS, *et al* 1988, EAST, *et al* 1993)

2.3 DIAGNÓSTICO

2.3.1 CLÍNICO

O diagnóstico clínico não é suficiente para um diagnóstico definitivo da AEC pela variação do seu quadro clínico e frequente desenvolvimento sub-clínico da doença. A manifestação clínica mais frequente é a artrite, fato que incentivou a formulação de um índice clínico cujo cálculo comporta a medida da circunferência do joelho mais grosso e da canela mais fina (metacarpo). Quando o resultado dessa diferença é igual ou superior a 7, é considerado como artrite positiva. Todavia, este índice não indica se o animal está infectado com o CAEV, ele informa apenas de forma imprecisa que o animal está com artrite, sendo que esta pode ser causada por uma série de agentes infecciosos (tal como o *Mycoplasma*), fatores nutricionais ou traumáticos (GARCIA, 1993).

2.3.2 DETECÇÃO SOROLÓGICA PARA CAEV

Quando o diagnóstico de infecção para LVPR busca a presença de anticorpos, um resultado negativo deve ser avaliado com cautela, pois é importante considerar que a soroconversão pode demorar e/ou pode resultar em uma baixa concentração de anticorpos (HANSON *et al.*, 1996; FRANKE, 1998).

A) Imunodifusão em Gel de Agarose (IDGA)

É o teste sorológico oficialmente reconhecido pela OIE para o CAEV (OIE, 2010) e baseia-se na difusão do antígeno e anticorpo, onde a reação antígeno-anticorpo forma uma linha de precipitação visível a olho nu no gel de agarose (Figura 5).

Vários protocolos de IDGA já foram desenvolvidos usando diferentes antígenos, volumes de reagentes, formulações de géis e tipos de molde para perfuração dos poços no gel (de ANDRÉS *et al.*, 2005; ARRUDA *et al.*, 2011). Comumente a técnica é realizada em placas de Petri e o modelo de molde predominante é o de formato hexagonal com poços de igual diâmetro e equidistantes, sendo um poço central, onde se coloca o antígeno, e a distribuição periférica de forma alternada, os soros de referência e os soros a serem testados. O tempo de leitura definitiva das placas de IDGA é de 48 a 72 horas (ADAMS & GORHAM, 1986; ABREU *et al.*, 1998).

No Brasil, Abreu *et al.* (1998) desenvolveram um protocolo de IDGA, que foi aperfeiçoado e encontra-se comercialmente disponível (Biovetech - Recife, PE, Brasil). Para estes autores, é recomendável a produção e utilização de Ag glicoprotéicos e nucleoprotéicos a partir do CAEV (preferencialmente de amostras isoladas no Brasil).

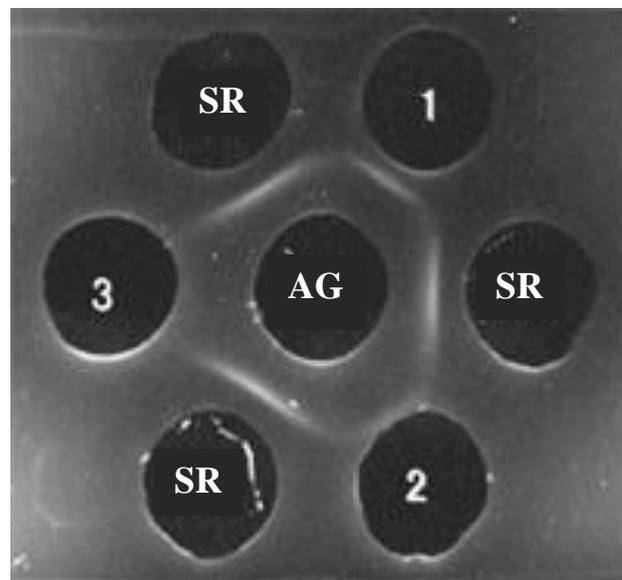


FIGURA 5. Prova de Imunodifusão em Gel de Agarose (IDGA): Antígeno viral (AG); Soro-Referencia Positivo (SR); Soro positivo, (1); Soro fraco positivo, (2) Soro negativo (3) (National Institute of Animal Health, Japan, 2005).

B) ELISA (Técnica Imunoenzimática)

É uma técnica de grande sensibilidade, especificidade, e permite o processamento e automação de um grande número de amostras. Esta técnica se baseia no uso de antígeno, anticorpos e de anti-imunoglobulinas marcadas com uma enzima, apresentando tanto atividade biológica quanto enzimática (HARKISS; WATT, 1990). Pode-se utilizar diferentes antígenos para a pesquisa de anticorpos para o CAEV, tais como a proteína CA, antígeno protéico total do vírus e proteína recombinante TM (CLAVIJO; THORSEN, 1995; BABA *et al.*, 2000; SIMARD *et al.*, 2001; TORRES *et al.*, 2009; SARDI *et al.*, 2012).

Foi relatado por Michal, Wojciech (2001), que a aplicação de testes sorológicos como ELISA e métodos de biologia molecular dão um resultado seguro ao diagnóstico da AEC.

O teste de ELISA tem sido utilizado em programas de controle da AEC em alguns países, tais como a Noruega, Nova Zelândia, Alemanha e Canadá, para enquetes sorológicas e erradicação desta enfermidade (MACKENZIE *et al.*, 1987; KRIEG; PETERHANS, 1990; BÉLANGER; LEBOEUF, 1993; NORD *et al.*, 1998).

C) Imunofluorescência Indireta (IFI)

A técnica IFI tem sido empregada para o diagnóstico sorológico da infecção por HIV desde a primeira caracterização deste agente (GALLO 1986), sendo utilizada, rotineiramente, em laboratórios de referência no Brasil (DAHER *et al.* 1999). Apesar de sua vasta utilização na pesquisa de anticorpos, são escassos os registros de emprego desta técnica em estudos com LVPR (DAWSON *et al.* 1982, MIYAZAWA *et al.* 1998, CAVIRANI *et al.* 1998).

A IFI é recomendada pela OIE no diagnóstico da infecção e em condições experimentais tem apresentado potencial como teste alternativo e complementar ao

diagnóstico da AEC, e sua sensibilidade e especificidade podem ser comparadas ao o ELISA e *Western Blot* (LARA et al., 2002; REISCHAK et al., 2002).

Os ensaios de IFI consistem em tornar visível a reação antígeno/anticorpo nos tecidos ou em suspensões celulares por meio de uma antiimunoglobulina marcada com fluorocromos que absorvem luz e a emitem num determinado comprimento de onda. Os fluoróforos, depois de excitados por um comprimento de onda específico (espectro de absorção), emitem fluorescência (fótons de luz) a um comprimento de onda superior (espectro de emissão). Por exemplo, a fluoresceína isocianetada (FITC) tem um comprimento de onda máximo de excitação a 496 nm (azul a caminho do verde) e uma emissão de fluorescência máxima a 520 (o chamado verde fluorescente) (MADRUGA et al., 2001).

D) *Western- Blot*

Para a detecção qualitativa de anticorpos contra as principais proteínas virais, tem-se recomendado a técnica de *Western-blot* (HARKISS; WATT, 1990). Esta técnica tem sido utilizada comumente como padrão ouro, em padronizações e validações de testes de ELISA para diagnóstico de LVPR e também como ferramenta na análise da resposta imunológica de animais natural e experimentalmente infectados com LVPR (HOUWERS; NAUTA, 1989; ZANONI et al., 1989; KAJIKAWA et al., 1990; ROSATI et al., 1995; OLIVEIRA et al., 2008).

Para a execução do *Western-blot*, é necessária a prévia separação de proteínas virais por eletroforese em gel da poliacrilamida sulfato dodecil sódio (SDS), e em seguida transferência para uma membrana de nitrocelulose sob ação de corrente eletroforética (MADRUGA, et al., 2001; KURIEN; SCOFIELD, 2006). Esta técnica é uma ferramenta de grande utilidade que permite detectar, caracterizar e quantificar múltiplas proteínas, principalmente aquelas que estão em baixas concentrações em determinada amostra. Como vantagens da técnica, pode-se observar: proteínas imobilizadas na membrana são rapidamente e uniformemente acessíveis a diferentes ligantes; armazenamento da amostra transferida pode ser prolongado, e ser usada para múltiplas análises sucessivas. Além disso,

este método é considerado altamente sensível e específico em estudos relacionados à detecção de anticorpos e proteínas de agentes infecciosos (KURIEN; SCOFIELD, 2006).

2.3.3 DETECÇÃO DO VÍRUS OU COMPONENTES VIRAIS

A) Isolamento viral

O isolamento do vírus em cultivos celulares é uma técnica diagnóstica sensível, entretanto é um diagnóstico demorado e, bastante dispendioso.

O isolamento viral a partir de células do sangue se torna uma alternativa para o diagnóstico dos *Lentivírus*. Para o isolamento do CAEV, pode-se obter células mononucleares do sangue periférico que, ao serem cultivadas *in vitro*, ativam sua diferenciação em macrófagos e a replicação viral ocorre. Este cultivo de monocitos/macrófagos é logo co-cultivado com células susceptíveis, como as da membrana sinovial caprina (MSC). O vírus presente nos monócitos/macrófagos infecta às células da MSC, que tipicamente formam abundantes estruturas sinciciais (aproximadamente 15 dias após a infecção) (Figura 4) (TIGRE et al., 2002).

B) Reação em cadeia de polimerase (PCR)

A detecção do ácido nucléico de CAEV pode ser por duas formas: a detecção do provírus (DNA proviral) integrado ao genoma celular ou detecção do vírus livre no sangue (RNA viral). A metodologia utilizada é a técnica de reação em cadeia de polimerase (PCR), ferramenta amplamente utilizadas para o diagnóstico de infecções virais (HARKISS; WATT, 1990; TIGRE et al., 2002; TIGRE et al., 2006).

A PCR é um método diagnóstico que combina sensibilidade e especificidade, consegue identificar animais em estágios recentes de infecção ou que ainda não

soroconverteram (REILLY, et al., 2004; TIGRE et al., 2002; TIGRE et al., 2006). Tigre et al (2002), utilizando a técnica de PCR com células mononucleares do sangue periférico (CMSP), detectaram a presença de DNA do CAEV em animais soronegativos, sugerindo a importância desta metodologia na detecção precoce de animais portadores sadios.

A técnica pode ser aplicada com sucesso na detecção precoce, resolvendo o problema da permanência no rebanho de animais falso-negativos em decorrência de baixos títulos de anticorpos, reações intermitentes de soropositividade e soroconversão tardia (EAST, et al., 1993; PHELPS; SMITH, 1993; CLAVIJO; THORSEN, 1995; HANSON, et al., 1996).

A PCR é um método rápido, sensível e específico que detecta sequências específicas do ácido nucléico viral, apesar de que o êxito na amplificação para CAEV, provavelmente dependa da carga viral ou número de células infectadas no sangue. Esta técnica tem algumas desvantagens, como não ser viável para o processamento de um grande número de amostras e de necessitar de pessoal especificamente treinado (HARKISS; WATT, 1990; CLAVIJO; THORSEN, 1995).

2.4 CONTROLE E PROFILAXIA

Infelizmente até o momento não existe possibilidade de prevenção por vacinas para a AEC. Algumas já foram testadas, mas não conferiram proteção quando os animais foram desafiados com vírus infeccioso. Caprinos vacinados desenvolvem inclusive a doença mais grave que os animais não-vacinados (RUSSO et al., 1993; REILLY, et al., 2004).

Atualmente, os programas de controle ou erradicação do CAEV têm sido adotados em vários países, baseando-se em testes periódicos dos animais, separação ou eliminação dos positivos, e uso de certas práticas de manejo para prevenção da disseminação do agente (OIE/FAO, 2010). O efeito de medidas preventivas só pode ser observado após um ano de aplicação, por causa do longo tempo entre a contaminação e a detecção de soroconversão (PERETZ et al., 1994).

Como medidas para o controle; separar as crias imediatamente após o nascimento, evitando o contato com secreções e isolá-las dos adultos; administrar colostro termicamente

tratado (56°C, +/- 2°C durante 60 minutos) de fêmeas não infectadas ou de vaca, alimentar as crias com substitutos do leite; adotar linha de ordenha; controlar a monta com reprodutores positivos; e uso de material estéril, como seringas e agulhas, instrumentos cirúrgicos, tatuador entre outros. Desde que possível, exigir atestados negativos para a AEC nas transações comerciais de animais (CALLADO et al, 2001; ELLIS et al., 1983; FRANKE, 1998; GARCIA, 1993; HANSON et al., 1996; NORD et al., 1998; PERETZ et al., 1994; REILLY, et al., 2004).

O programa de controle da AEC também envolve a incorporação de reprodutores soropositivos ou do seu sêmen, nos casos de propriedades que utilizam a inseminação artificial (PINHEIRO et al., 2001).

No Brasil, foi aprovado o Regulamento Técnico do Programa Nacional de Sanidade dos Caprinos e Ovinos (PNSCO) objetivando o controle e erradicação das doenças de caprinos e ovinos, por meio de ações sanitárias e de vigilância epidemiológica. Este foi implementado através da Instrução Normativa Nº 87 da Secretaria de Defesa Agropecuária, de 10 de dezembro de 2004. No estado da Bahia, dada a importância da caprinoovinocultura na região a Agência Estadual de Defesa Agropecuária (ADAB) aderiu-se ao Programa Nacional e criou em 2010 o Programa a Estadual de Sanidade de Caprinos e Ovinos (PESCO). Este programa envolveu vários estratos relacionadas a carprinoovinocultura do estado (produtores, veterinários, pesquisadores , etc) com o objetivo de elaborar as normas que visem controlar e/ou erradicar ou prevenir a introdução ou reintrodução de enfermidades de caprinos e ovinos, reduzindo o risco da disseminação de doenças, principalmente aquelas que são exóticas ao estado.

2.5 SITUAÇÃO NO BRASIL

Os LVPR encontram-se difundidos mundialmente, sendo mais prevalentes em países europeus (França, Suíça, Alemanha, Holanda, Inglaterra) e da América do Norte (Estados Unidos e Canadá) com sistemas intensivos de produção caprina e ovina (ROWE; EAST, 1997; DE LA CONCHA-BERMEJILLO, 1997). Até o desenvolvimento da caprinocultura leiteira nacional, quadros clínicos sugestivos de AEC não haviam sido descritos no Brasil. A

importação de caprinos por diversos estados seguido da movimentação interna entre os mesmos, pode ter servido como vias de contaminação dos plantéis.

No Brasil, a infecção por LV em caprinos tem sido relatada em diversos rebanhos, sendo primeiramente detectada no Rio Grande do Sul em 1986 (MOOJEN et al, 1986). Entretanto, em um inquérito sorológico realizado no Rio de Janeiro, demonstrou-se que o CAEV já estava presente no país desde 1982 (CUNHA; NASCIMENTO, 1995).

Em 1989 foi descrito o primeiro isolamento do vírus no Brasil, que ocorreu no Rio Grande do Sul, a partir de MSC de um animal clínica e sorologicamente positivo a infecção por LVPR (HOTZEL et al., 1993). Na Bahia, Tigre et al (2002) descreveram o primeiro isolamento viral, realizado através do cultivo de macrófagos e cultivos primários de células de membrana sinovial.

Estudos soropidemiológicos têm demonstrado a ocorrência dos LVPR em vários estados brasileiros, tais como Pernambuco, Paraíba e Rio Grande do Norte, Ceará, Santa Catarina, Rio de Janeiro, dentre outros. Alguns relatos em rebanhos caprinos leiteiros, mostra que a frequência de animais soropositivos é maior nos animais puros do que nos mestiços, e que animais adultos também apresentam uma prevalência maior da enfermidade que os jovens., (MELO & FRANKE, 1997; SELL et al, 2000; PINHEIRO et al., 2001; ALMEIDA et al., 2003; MOREIRA et al., 2007; BANDEIRA et al., 2008; SOBRINHO et al., 2010; MARTINEZ et al., 2011; ARRUDA, et al 2011; LIMA, 2012). Oliveira et al. (2008) em um estudo feito em Pernambuco, não observaram diferença estatisticamente significativa entre as variáveis sexo e faixa etária quanto a positividade para LVPR.

Na Bahia, foi relatada pela primeira vez a presença de animais soropositivos para CAEV por Fitterman em 1988, mas os estudos foram descontinuados. A presença de animais sorologicamente positivos para o CAEV no estado foi descrita por diversos autores e dados do ano de 2001 apontam uma prevalência de 13,4%. Estudos recentes mostram uma prevalência de 8,75 - 26 % de CAEV em rebanhos caprinos na Bahia (ASSIS; GOUVEIA, 1994; ALMEIDA et al., 2001; EDEWEIS et al., 2001; TIGRE et al., 2002; TIGRE et al., 2006; TORRES et.al, 2009).

Cientes da importância que tem a Bahia como portador de um dos rebanhos caprinos mais numerosos, o Laboratório de Virologia- ICS-UFBA, criado em 1997 e único na sua especialidade na UFBA e no Estado da Bahia, juntamente com a Agencia Estadual de

Defesa Agropecuária da Bahia (ADAB), tem realizado palestras e/ou divulgação de conhecimento em reuniões com produtores ou veterinários, gerando um estímulo para que os interessados na área de caprinovinocultura ajudem na prevenção e controle dos LVPR no estado. Paralelamente, vários estudos abordando CAEV foram realizados, onde se mostrou que a infecção pelo CAEV tem uma incidência de aproximadamente 25% nos rebanhos caprinos da região do recôncavo e proximidades; realizou, de forma pioneira na Bahia, o isolamento do vírus circulante a campo utilizando o co-cultivo de macrófagos-MS; desenvolveu uma técnica de PCR para detecção precoce do CAEV em sangue e leite, demonstrando que animais sorologicamente negativos eram portadores do vírus; padronizou um teste sorológico (ELISA indireto) mais sensível que o atual para detecção de anticorpos para CAEV e produziu AcM para o CAEV a serem utilizados com fins diagnósticos e de estudo do vírus (TIGRE et al 2002; TIGRE et al., 2003; SARDI et al., 2006; CAMPOS et al., 2007; TORRES et al., 2009; SARDI et al., 2012; BRANDÃO et al., 2013).

2.6 ANTICORPOS

2.6.1 DEFINIÇÕES

Anticorpos ou imunoglobulinas (Ig) são proteínas encontradas no plasma e fluidos extracelulares produzidas nos vertebrados pelos linfócitos B em resposta a exposição a estruturas estranhas conhecidas como antígenos, com finalidade de neutralizar e/ou eliminar moléculas e organismos (ROITT, 2003; ABBAS; LICHTMAN; PILLAI, 2008).

A molécula de Ig (Figura 6) é uma estrutura simétrica complexa formada por quatro cadeias de polipeptídeos, duas cadeias pesadas idênticas de imunoglobulina (IgH) e duas cadeias leves idênticas de imunoglobulina (IgL). Estas cadeias contêm unidades homólogas repetidas, que se dobram independentemente e são conhecidas como domínios de Ig. Cada molécula de Ig contêm domínios constantes, responsáveis pelas funções efetoras, e domínios variáveis, que se ligam ao epítipo antigênico (ROITT, 2003; ABBAS; LICHTMAN; PILLAI 2008). A maior parte das diferenças nas sequências entre os diversos anticorpos está confinada a três pequenas extensões nas regiões variáveis das cadeias pesadas e leves,

chamadas de segmentos hipervariáveis. Na molécula de anticorpo, as três regiões hipervariáveis das cadeias leves e pesadas se aproximam, na sua estrutura tridimensional, para formar uma superfície de ligação de antígenos, complementar a estrutura tridimensional do antígeno que é ligado (Figura 7) (ABBAS; LICHTMAN; PILLAI 2008). A caracterização da estrutura dos anticorpos e de seus genes, são a base para a sua engenharia (BERZOFSKY *et al* 2003).

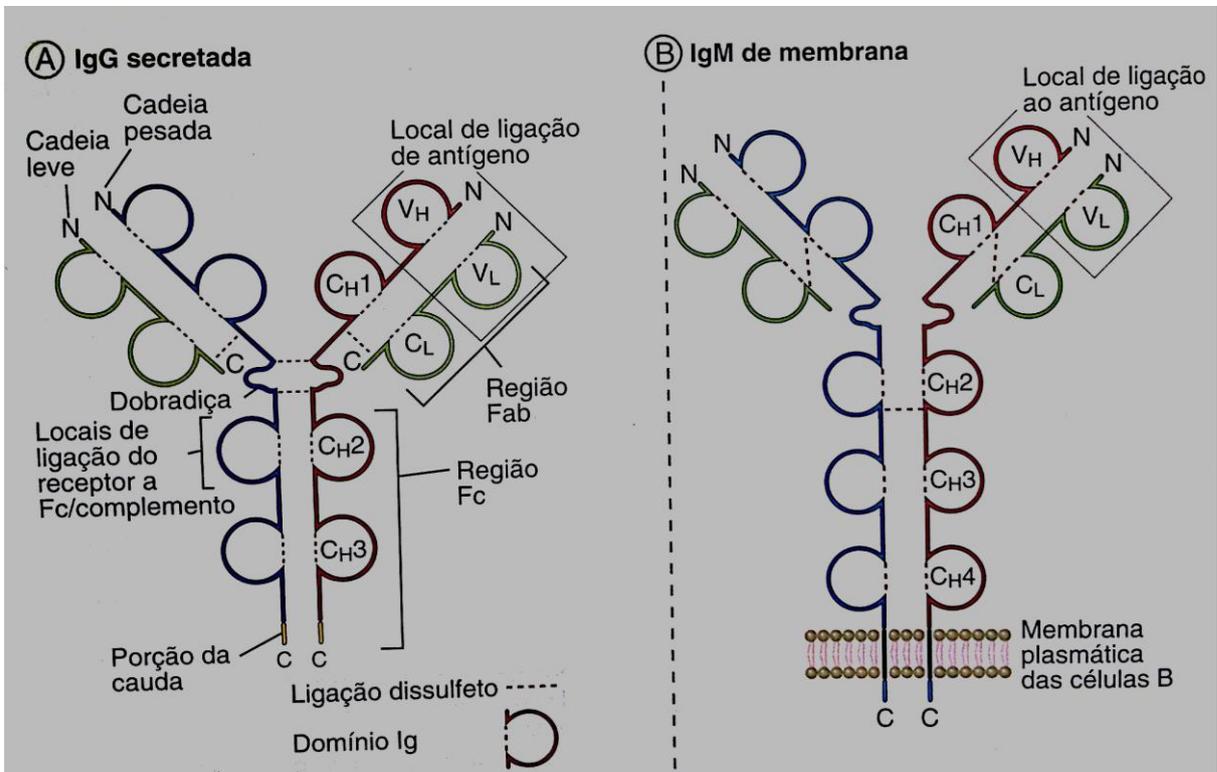


Figura 6 – Estrutura da molécula de anticorpo. A. Diagrama esquemático de uma molécula de IgG secretada. As regiões de ligação de antígeno são formadas pela justaposição dos domínios variáveis das cadeias leves (V_L) e pesada (V_H). As regiões constantes (C) das cadeias pesadas terminam em uma cauda. B. Diagrama esquemático de uma molécula de IgM ligada a membrana na superfície de um linfócito B. A molécula de IgM tem um domínio C (C_H) a mais na cadeia pesada do que a IgG, e sua forma ligada a membrana apresenta porções C terminal transmembrana e citoplasmática que ancoram a molécula na membrana plasmática (ABBAS; LICHTMAN; PILLAI 2008).

As moléculas de anticorpos podem ser divididas em classes e subclasses distintas com base nas diferenças na estrutura das regiões constantes das cadeias pesadas. As classes das moléculas de anticorpos também são chamadas de isotipos e são denominadas IgA, IgD, IgE, IgG e IgM. Os isotipos IgA e IgG podem ainda ser subdivididos em subclasses, ou subtipos que, em humanos, são conhecidos como IgA1 e IgA2, e IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4. É possível observar nas Ig duas classes de isotipos de cadeias leves, chamadas de κ e λ , que se diferem na região carboxiterminal das regiões constantes. Cada Ig tem duas cadeias leves κ ou duas cadeias leves λ , mas nunca uma de cada tipo (MARGNI, 1996; ABBAS; LICHTMAN; PILLAI 2008; JANEWAY *et al.*, 2010).

Os anticorpos são capazes de manifestar uma especificidade marcante e também de distinguir pequenas diferenças na sequência primária dos aminoácidos nos antígenos protéicos (ROITT, 2003; ABBAS; LICHTMAN; PILLAI 2008)

Antígeno é qualquer substância não reconhecida, estranha ao organismo. Possui uma região denominada determinante antigênico ou epítipo, onde ocorre a ligação com o anticorpo. Os antígenos podem ser compostos por vários epítipos distintos que possibilitam a ligação com anticorpos específicos para cada um deles. Os anticorpos são capazes de reconhecer uma grande variedade de moléculas biológicas antigênicas como determinados polissacarídeos, hormônios e proteínas (MARQUES, 2005). Epítipos formados por vários aminoácidos adjacentes são chamados de determinantes lineares. Se determinantes antigênicos lineares aparecerem na superfície externa ou em uma região de conformação prolongada na proteína nativa dobrada, eles podem ser acessíveis a anticorpos. Geralmente, os determinantes lineares podem ser inacessíveis na conformação nativa e aparecer somente quando a proteína é desnaturada. Em contraste, os determinantes conformacionais são formados por aminoácidos que não estão em sequência, mas se tornam espacialmente justapostos na proteína dobrada (ABBAS; LICHTMAN; PILLAI 2008).

Anticorpos específicos para certos determinantes lineares e anticorpos específicos para determinantes conformacionais podem ser usados para determinar se uma proteína está desnaturada ou se está em sua conformação nativa, respectivamente (ABBAS; LICHTMAN; PILLAI 2008). É possível distinguir anticorpos que interagem com epítipos contendo uma única fita contígua de aminoácidos (um epítipo contíguo) de outros que se ligam a epítipos formados a partir de segmentos separados da cadeia polipeptídica (epítipos descontínuos). Os anticorpos que se ligam aos epítipos descontínuos frequentemente não se ligam a

antígenos desnaturados, e, devido a isso, não são observados resultados positivos, por exemplo, na técnica de Western Blot. (ROITT, 2003)

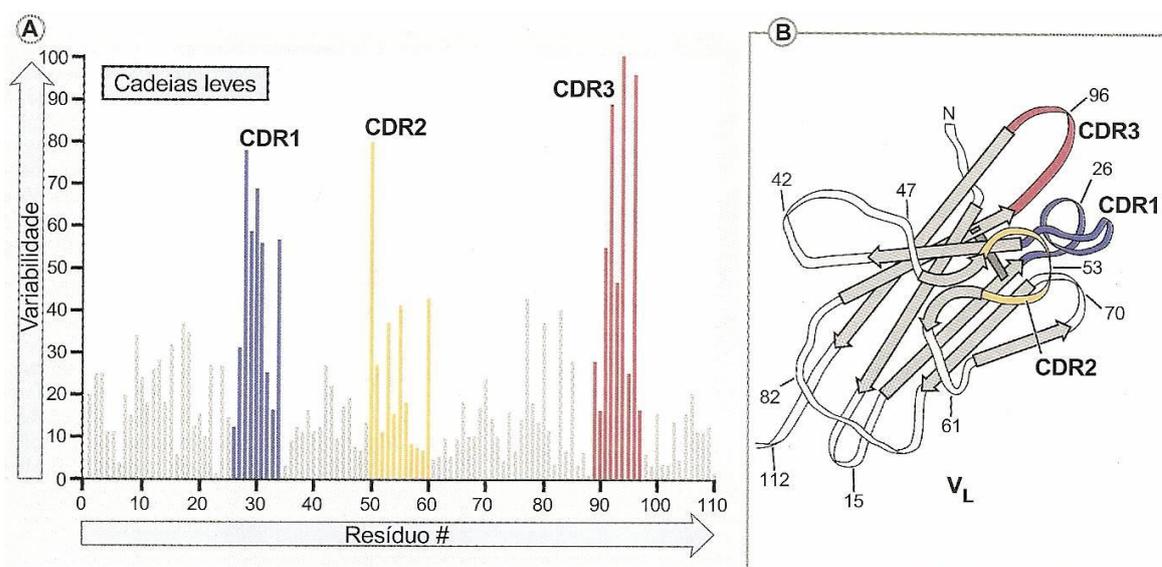


Figura 7 – Regiões hipervariáveis nas moléculas de Ig. A. Gráfico Kabat-Wu da variabilidade de aminoácidos nas moléculas de Ig. Os histogramas demonstram a extensão da variabilidade definida como o número de diferenças em cada aminoácido em várias cadeias leves sequenciadas de forma independente em relação ao número de aminoácido medido partindo da porção aminoterminal. Este método de análise indica que as sequências de aminoácidos mais variáveis estão agrupadas em três regiões “hipervariáveis”, que aqui aparecem em azul, amarelo e vermelho e correspondem as regiões CDR1, CDR2 e CDR3, respectivamente. B. Visão tridimensional das alças hipervariáveis CDR em um domínio variável de uma cadeia leve, que é mostrada com as alças CDR1, CDR2 e CDR3, em azul, amarelo e vermelho, respectivamente. Essas alças correspondem as regiões hipervariáveis mostradas no gráfico em A. As cadeias pesadas também apresentam três regiões hipervariáveis e todas as seis alças justapostas na molécula do anticorpo formam a superfície de ligação com o antígeno (ABBAS; LICHTMAN; PILLAI 2008).

2.6.2 ESPECIFICIDADE, AFINIDADE E AVIDEZ

A especificidade dos anticorpos se aplica ao reconhecimento de diferentes tipos de moléculas. Por exemplo, os anticorpos podem distinguir entre dois determinantes lineares proteicos cuja única diferença é uma única substituição de um aminoácido que tem pouco efeito na sua estrutura secundária. Como os constituintes bioquímicos dos organismos vivos são fundamentalmente semelhantes, é necessário esse alto grau de especificidade para que os anticorpos gerados em resposta aos antígenos de um microrganismo em geral não reajam com moléculas do hospedeiro estruturalmente semelhante ou com antígenos de outros microrganismos. (ABBAS; LICHTMAN; PILLAI 2008)

Afinidade do anticorpo é a força de ligação de um único local de ligação de um anticorpo com um epítipo. Uma constante de dissociação (K_d) normalmente representa a afinidade, e indica a facilidade de separação de um complexo antígeno-anticorpo. Baixa K_d indica uma mais alta afinidade. Anticorpos com alta afinidade se ligam a quantidades maiores de antígenos com uma melhor estabilidade em menos tempo do que os que apresentam afinidade baixa e são os preferíveis para técnicas imunológicas. (LIPMAN, 2005)

A força com que um anticorpo multivalente liga-se a um antígeno multivalente (com múltiplos epítopos) é denominada de avides. Enquanto a afinidade reflete sua energia de ligação um único epítipo, a avides reflete a intensidade de todas as ligações entre anticorpos e um antígeno multivalente. (ABBAS; LICHTMAN; PILLAI 2008)

2.6.3 PRODUÇÃO DE ANTICORPOS

Diante do estímulo com um imunógeno, um animal responde produzindo uma grande variedade de anticorpos dirigidos contra diferentes componentes do antígeno inoculado e contra os distintos epítopos de cada um desses componentes. Cada epítipo, por sua vez, poderá ser reconhecido por mais de um anticorpo, com diferentes afinidades (MARGNI, 1996).

Para a produção de anticorpos (Figura 8), inicialmente, seleciona-se o antígeno, estabelece-se a dosagem e a via de inoculação mais adequada, de acordo com o modelo animal escolhido, e injeta-se no animal selecionado repetindo-se o procedimento por duas ou três vezes aproximadamente, com intervalos de 14 dias entre cada inoculação. Cobaias, coelhos, camundongos, cavalos, entre outros, são os mais utilizados para a produção de anticorpos, sendo o camundongo o mais comumente empregado para a produção dos anticorpos monoclonais. Finalmente, cerca de 30 a 45 dias após a primeira inoculação, o animal é sangrado e no seu soro estarão presentes os anticorpos que irão reconhecer o antígeno previamente aplicado, sendo denominados policlonais. Os anticorpos produzidos desse modo constituem uma mistura heterogênea de imunoglobulinas específicas para diferentes epítomos de um único antígeno e para diferentes epítomos de diferentes antígenos (SILVERTON, 1977; ROQUE, 2004 Apud MARQUES, 2005).

2.7 ANTICORPOS POLICLONAIS

Os anticorpos policlonais são anticorpos derivados de diferentes linhagens de células B. Eles são uma mistura de moléculas de Ig secretadas contra um antígeno específico, detectando assim uma multiplicidade de epítomos. O reconhecimento de diferentes antígenos tem grande importância, por exemplo, em testes onde a multivalência dos anticorpos é essencial para a reação antígeno-anticorpo (imunoprecipitação). (MARGNI, 1996; ABBAS; LICHTMAN; PILLAI 2008).

Reagentes policlonais são relativamente simples e baratos de produzir quando comparados com reagentes monoclonais. Além disso, o uso de animais para a produção de soro, como cavalo, cabra e coelho permite a recuperação de grandes volumes de soro rico em imunoglobulinas específicas. Contudo, existem diferenças na reatividade e títulos dos anticorpos, e sofrem geralmente falhas na reprodutibilidade, devido à heterogeneidade própria dos anticorpos policlonais (NELSON et al., 2000).

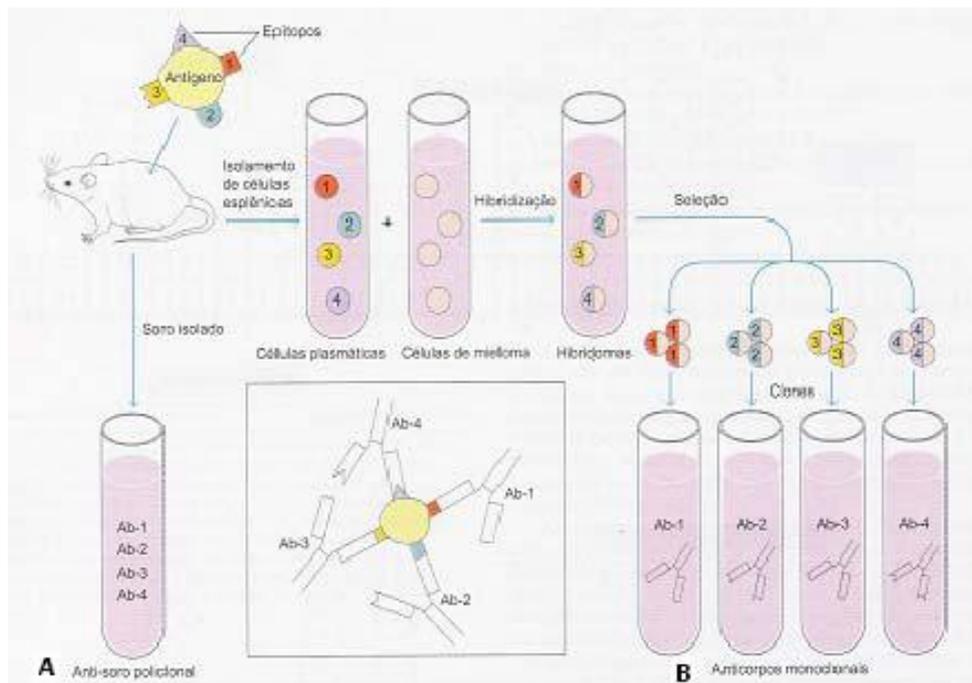


Figura 8 - Esquema da produção de Ig a partir da hiperimunização de camundongo com o antígeno. A – Produção de Anticorpos Policlonais. B – Produção de Anticorpos monoclonais após hibridização de células esplênicas e células de mieloma e seleção dos hibridomas produtores (Kuby, 2002).

2.8 ANTICORPOS MONOCLONAIS

Anticorpos Monoclonais (AcM) são anticorpos de especificidade única, derivados de um único clone de células B e que respondem a um único epítipo.

Após o desenvolvimento da tecnologia da produção dos AcM, em 1975, por Georges Köhler e Cesar Milstein, os AcM tornaram-se rapidamente uma das ferramentas chaves da imunologia (KÖHLER; MILSTEIN, 1975), sendo amplamente utilizados na medicina e nas pesquisas biomédicas básicas no diagnóstico de doenças e no tratamento de diversos problemas, tais como infecções e câncer (COLFOR; HALL, 1995; COOK; SELF, 1995).

A produção de AcM requer imunização de um animal, normalmente camundongos, obtendo células B produtoras de anticorpos e a fusão destes linfócitos B, que vivem poucos dias em cultura *in vitro*, com uma única célula de mieloma que tem a propriedade da imortalidade, gerando o hibridoma, que pode secretar anticorpos da especificidade desejada e viver por tempo ilimitado (KÖHLER; MILSTEIN, 1975).

A cultura contínua de hibridomas produtores de AcM oferece como vantagens um suplemento inesgotável de imunoglobulinas com altos títulos e alta reprodutibilidade. Conseqüentemente, o AcM permite o desenvolvimento de imunoenaios padronizados e seguros. Logo, AcM servem como poderosas ferramentas para a investigação de macromoléculas e células, e têm provido reagentes efetivos em termos de especificidade para testes diagnósticos clínicos (NELSON et al., 2000). Inúmeros AcM encontram-se em fase de testes para a liberação do seu uso para fins diagnósticos e terapêuticos. Entretanto, o custo da sua produção, a ocorrência de alguns relatos de toxicidade durante a sua utilização terapêutica e o funcionamento apenas sob determinadas condições, como a preservação dos epítopos a serem reconhecidos pelos anticorpos, ainda são problemas a serem superados. (GLENNIE; JOHNSON, 2000).

2.8.1 Caracterização dos AcM

A caracterização de um AcM promove a análise do anticorpo produzido pelo hibridoma, em termos de reatividade e especificidade. Para tanto, é essencial a reclonagem

dos hibridomas para evitar dados ambíguos, resultando em anticorpos de diferentes classes, especificidade e afinidade. Assim, a determinação do isotipo torna-se essencial para a identificação de misturas e eliminar das culturas possíveis isotipos indesejáveis. A caracterização das imunoglobulinas também permite testar a reação dos AcM com uma grande variedade de antígenos ou preparações tissulares, bem como avaliar o seu uso em diferentes técnicas moleculares e imunológicas (NELSON et al, 2000; TIMONS; DUMBAR, 1990; DUMBAR; SKINNER, 1990).

Imunoensaios tem fornecido um sistema sensível, reprodutível, convincente e frequentemente aplicável na mensuração de moléculas de interesse biológico (PARKER, 1990). O perfil do AcM para diferentes tipos de ensaios é um aspecto extremamente relevante durante a caracterização. Isso é especialmente pertinente para o potencial do anticorpo como reagente diagnóstico, já que alguns AcM reagem adequadamente em alguns sistemas mas não em outros. Esse fenômeno, chamado de “restrição de ensaio”, define como um anticorpo reconhece um epítipo alvo no contexto do tipo de ensaio usado, considerando que os epítipos poderão sofrer desnaturação ou tornar-se inacessíveis. Por isso, deve-se testar o AcM em diferentes ensaios imunológicos (NELSON et al., 2000).

É notável que, embora um hibridoma seja o produto da fusão de uma única célula B e produza um AcM de excelente especificidade, esse mesmo anticorpo pode ter reação cruzada com outros antígenos ou exibir dupla especificidade. Isto pode ser devido ao reconhecimento de sítios combinados mais do que um determinante antigênico, por alguma similaridade na forma ou composição química. Consequentemente, uma rigorosa avaliação de um dado AcM e seus epítipos alvo se faz necessária (NELSON et al., 2000).

Desta forma, a caracterização deve fornecer informação sobre aspectos bioquímicos, biológicos e imunológicos dos AcM.

2.8.2 Interação AcM - Antígeno

Imunoglobulinas se ligam especificamente a um ou a alguns epítipos proximamente relacionados. Cada imunoglobulina liga-se a um determinante antigênico específico. A ligação antígeno - anticorpos é a função primária dos anticorpos e pode resultar em proteção

do hospedeiro. A valência do anticorpo refere-se ao número de determinantes antigênicos que uma molécula individual de anticorpo pode se ligar. A valência dos anticorpos é, com frequência, pelo menos duas e em alguns casos, mais (MAYER, 2009).

AcM são frequentemente utilizados para o desenvolvimento de imunoenaios específicos, porém, sua monoespecificidade pode ser uma desvantagem do ponto de vista da sensibilidade do teste. A estabilidade do complexo antígeno-anticorpo é aumentada se o antígeno bem como o anticorpo são operacionalmente multivalentes, permitindo reações cruzadas e a formação de redes. A reação proteína-ligante é melhor descrita por uma constante global de avidez (K_{av}), a qual é afetada, por sua vez, pelos valores de K_a dos sítios de combinação dos anticorpos com seu epítipo individual e pela habilidade de diferentes anticorpos participarem juntos de uma ligação. Para evitar a perda de multivalência, com AcM em proteínas com ausência de epítopos repetitivos, podem ser utilizadas misturas de AcM que reconhecem diferentes determinantes antigênicos no antígeno (PARKER, 1976; PARKER, 1990).

2.9 AcM vs AcP

Os anticorpos são gerados pelo sistema imune diante de um estímulo antigênico após infecção natural ou após imunização. Desta maneira há produção de uma mistura de moléculas de diferentes especificidades e afinidades conhecidas como anticorpos policlonais (AcP). Os AcP detectam uma multiplicidade de epítopos e, portanto, antígenos diferentes, fato importante em testes cuja multivalência é essencial (imunoprecipitação). Além disso, AcP são relativamente simples e baratos de produzir quando comparados com AcM. Além disso, o uso de animais de maior porte como cavalo, cabra e coelho permite a recuperação de grandes volumes de soro rico em imunoglobulinas. Contudo, existem diferenças na reatividade e títulos dos anticorpos, e sofrem geralmente de uma falta de reprodutibilidade, devido à heterogeneidade dos anticorpos (NELSON et al., 2000).

Inicialmente, quando os AcM foram descobertos, acreditava-se que eles seriam superiores aos AcP em todas as situações, mas atualmente sugere-se que isto depende do uso dos anticorpos. AcM quando reagem cruzadamente, não podem ser removidos pela técnica

de adsorção, enquanto que em soros policlonais, cada anticorpo tem distinta gama de reatividade, e em casos de reação cruzada, há a possibilidade de remoção pela técnica de adsorção (BERZOFSKY et al 2003).

Os AcP são mais estáveis as variações de pH e concentração de sais enquanto os AcM podem ser altamente susceptíveis a pequenas alterações em ambas. As principais vantagens dos AcM são especificidade, homogeneidade e o hibridoma é uma fonte constante e renovável enquanto os AcP produzidos para um mesmo antígeno usando diversos animais apresentam diferenças entre animais imunizados, além disso a quantidade destes anticorpos obtidos é limitado pelo tamanho do animal e pelo seu tempo de vida (LIPMAN, 2005).

Atualmente, os reagentes sorológicos, em muitos casos, utilizam uma mistura de AcM, o que pode tornar o ensaio biológico mais sensível, específico e com maior reprodutibilidade que utilizando um soro policlonal (BERZOFSKY et al 2003).

2.10 APLICAÇÕES DOS AcM

A produção fácil e em grande quantidade dos AcM possibilitou seu uso em muitos experimentos ou práticas antes impossíveis.

Anticorpos homogêneos podem ser cristalizados sozinhos ou junto com o antígeno para permitir o estudo estrutural por difração de raio-X, ou podem ser muito valorosos no estudo da diversidade dos anticorpos. Tais análises têm demonstrado sobre os papéis das mutações somáticas, alterações na afinidade, e mudanças na dominância clonal durante as respostas (BERZOFSKY et al 2003).

Além disso, os AcM são muito úteis como reagentes imunobiológicos. Algumas das suas aplicações incluem:

a) Atividade catalítica: AcM tem sido usados como catalisadores químicos, servindo como uma alternativa enzimática que, em alguns casos, pode ser produzida e manipulada facilmente (LERNER et al, 1991).

b) Anticorpos biespecíficos: Várias técnicas tem sido desenvolvidas para preparar anticorpos biespecíficos híbridos com uma larga utilidade, unidos a outros domínios funcionais, tais como toxinas, enzimas ou citocinas, criando assim anticorpos bifuncionais (KRIANKUM et al, 2001).

c) Análise funcional de moléculas de superfície celular e de moléculas secretadas: na pesquisa imunológica, os AcM que se ligam a moléculas de superfície celular e estimulam ou inibem funções celulares; são instrumentos inestimáveis para definir as funções das moléculas de superfície, incluindo os receptores de antígenos (ABBAS et al., 2005)

d) Identificação de marcadores fenotípicos únicos para tipos celulares em particular: A base da classificação moderna dos linfócitos e de outros leucócitos é a ligação da população específica de AcM. Esses têm sido usados para definir “clusters de diferenciação” (marcadores CD) para os vários tipos celulares (NELSON et al., 2000).

e) Imunodiagnóstico: O diagnóstico de doenças infecciosas e sistêmicas baseadas na detecção de antígenos e/ou de anticorpos particulares na circulação ou nos tecidos (COOK; SELF, 1995).

f) Diagnóstico e tratamento de tumores: A produção de AcM contra proteínas presentes na membrana de células tumorais, permite sua utilização para detectar a presença dessas células em um tecido ou órgão ou para eliminá-las (COLFOR; HALL, 1995)

g) Outras aplicações clínicas: Os possíveis usos clínicos dos AcM são variados. Podem ser utilizados em RIA e ELISA para mensurar substâncias em fluidos biológicos, como hormônios e toxinas; AcM conjugados a toxinas tem sido usados na remoção de células T da medula óssea antes de transplantes e também tem sido usados em uma variedade de condições imunológicas, tais como artrite reumatóide, rejeição de transplantes e como reagentes anti-trombolíticos (VALLERA et al., 1983; GLENNIE; JOHNSON, 2000).

Existem limitações para o uso de determinados anticorpos, uma vez que muitos funcionam bem apenas sob determinadas condições de aplicação e de especificidade antigênica. Como exemplo, o sucesso na imunohistoquímica depende da preservação de epítomos reconhecidos pelos anticorpos, o que algumas vezes só é possível com tecidos

criopreservados. Esta necessidade de preservação dos determinantes antigênicos pode limitar o uso desses anticorpos na rotina diagnóstica, onde frequentemente o material é preservado em formalina e embebido em parafina, o que pode ainda impossibilitar estudos retrospectivos com material de arquivos de anatomia patológica. A antigenicidade de muitas proteínas é reduzida ou perdida por fixações com formaldeído, e tratamentos com agentes desnaturantes que mudam a estrutura bioquímica dos antígenos, tornando-os não identificáveis pelos AcM (SHI et al., 1995; BRANDÃO et al., 2013).

2.11. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABBAS, A.K; LICHTMAN, A.H. **Imunologia celular e molecular**. 5^a ed. Rio de Janeiro: **Elsevier**, 2005

ABBAS, A.K; LICHTMAN, A.H.; PILLAI, S. **Imunologia celular e molecular**. 6^a ed. Rio de Janeiro: **Elsevier**, 2008

ABREU, S.R.O.; CASTRO, R.S.; NASCIMENTO, S.A.; SOUZA, M.G. Produção de antígeno nucleoproteico do vírus da artrite-encefalite caprina e comparação com o do vírus Maedi-Visna para utilização em teste de imunodifusão em Agar gel. **Pesq. Vet. Brás.** v.18, n.2,p.57-60, 1998.

ADAMS, D. S., CRAWFORD, T. B. & KLEVJER-ANDERSON, P. A pathogenic study of the early connective tissue lesions of viral caprine arthritis-encephalitis. **American Journal of Pathology** 99, 257-278. 1980.

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, p.1670 – 1675, 1983.

ADAMS, D. S.; GOGOLEWSKI, R. P.; BARBET, A.F.; CHEEVERS, W.P.. Identification of caprine arthritis-encephalitis retrovirus proteins in immunodiffusion precipitin lines. **Journal of General Virology**. 66: 1139- 1143. 1985.

ADAMS D. S.; GORHAM J. R. The gp135 of caprine arthritis-encephalitis virus affords greater sensitivity than the p28 in immunidufision serology. **Research in Veterinary Science**, v.40, p.157-160, 1986.

ALI, O. A. Caprine arthritis-encephalitis related changes in the uterus of a goat. **Veterinary Record**, v. 121, n06, p. 131-132, 1987.

ALMEIDA, M. G. A. R.; ANUNCIACÃO, A. V. M.; FIGUEREDO, A.; MARTINEZ, T.C.N.; LABORDA S. S. Dados sorológicos sobre a presença e distribuição da artrite-encefalite caprina (CAE) no estado da Bahia, Brasil. *Ver. Bras. Saúde Prod. An.*, v.1 (3), p.78-83, 2001.

ALMEIDA N.C., TEIXEIRA M.F.S., FERREIRA R.C.S., CALLADO A.K.C., FROTA M.N.L., MELO A.C.M. & APRIGIO C.J.L. Detecção de ovinos soropositivos para Maedi/Visna destinados ao abate na região metropolitana de Fortaleza. **Veterinária Notícias**. 9(1):59- 63. 2003.

ANDRIOLI, A.; GOUVEIA, A.M.G.; MARTINS, A.S.; PINHEIRO, R.R.; SANTOS, D.O. Fatores de risco na transmissão do lentivírus caprino pelo sêmen. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.41, n. 8, p.1313-1319, 2006.

ARRUDA, E.T.; OLIVEIRA, M. M. M.; NASCIMENTO, S. A.; CAMPOS, A. C.; CASTRO R. S. Avaliação de uma microimunodifusão em gel de ágar para diagnóstico de Lentivírus de Pequenos Ruminantes (LVPR) em caprinos. *Ci. Anim. Bras.*, Goiânia, v.12, n.3, p. 560-565. 2011

ASSIS, A. P.M.V. ; GOUVEIA, A. M.G. Evidência sorológica de *Lentivírus* (Maedi Visna/CAEV) em rebanhos nos Estados de MG, RJ, BA, CE. In: ENCONTRO DE PESQUISA DA ESCOLA DE VETERINÁRIA DA UFMG, 1994, Belo Horizonte, **Anais**. Belo Horizonte, p.46. 1994.

BABA, S.S.; FOTABE, A.I.; BABA, M.M.; RIMSTAD, E. Preliminary survey for antibodies against caprine arthritis-encephalitis virus (CAEV) using recombinant GAG proteins: studies among small ruminant populations in north-eastern Nigeria. **Small Ruminant Research**, v.37, p.137-140, 2000.

BAHIA, portaria nº 207/2012. Estabelece a criação do Programa Nacional de Sanidade dos Caprinos e Ovinos – PNSCO. Publicada no Diário Oficial 09/08/2012. Ano · XCVI · Nº20.920.

BANDEIRA D.A., CASTRO R.S., AZEVEDO E.O., MELO L.S.S. & MELO C.B. Seroprevalence of caprine arthritis–encephalitis virus in goats in the Cariri region, Paraíba state, Brazil. **The Veterinary Journal**. 180(3):399-401. 2008.

BÉLANGER, D. & LEBOEUF, A. CAE virus seroprevalence in a mixed goat herd. *Vet. Rec.*, v.133, n.13, p.328, 1993

BERTONI G, ZAHNO M.L., ZANONI R, VOGT H.R., PETERHANS E., RUFF G., CHEEVERS W.P., SONIGO P. & PACINO G. 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. 1994.

BERTONI, G; HERTIG, C.; ZAHNO, M.L.; VOGT, H.R.; DURFOUR, S.; CORDANO, P.; PETERHANS, E.; CHEEVERS, W.P.; SONIGO, P.; PACINO G. B-cell epitopes of the envelope glycoprotein of caprine arthritis–encephalitis virus and antibody response in infected goats. **J. Gen Virol.**, v.81. p.2929-2940, 2000.

BERTONI, G. Recent advances in goat diseases. **International veterinary information service**. Tempesta M (Ed). Ithaca NY (www.ivis.org), Last updated; 24/07/2007.

BERZOFKY, J.A.; BERKOWER, I.J.; EPSTEIN, S.L.. Antigen-Antibody Interactions and Monoclonal Antibodies. In: PAUL, W. E. **Fundamental Immunology**. Six edition. Wolters Kluwer Health. Lippincott Williams & Wilkins. p.152- 191.2003.

BIRD, P.; BLACKLAWS, B. A.; REYBURN, H. T.; ALLEN, D.; HOPKINS, J.; SARGAN, D. Early events in immune evasion by the lentivirus maedi-visna occurring within infected lymphoid tissue. **J. Virol.**, v.67, p.5187-5197, 1993.

BLACKLAWS, B. A.; BIRD, P.; ALLEN, D.; MCCONNELL, I. Circulating cytotoxic T lymphocyte precursors in maedi-visna virus infected sheep. **J. Gen. Virol.**, v.75, p.1589-1596, 1994.

BLACKLAWS, B. A.; BIRD, P.; ALLEN, D.; ROY, D.J.; MACLENNAN, I.C.M.; HOPKINS, J. Initial lentivirus-host interactions within lymph nodes: a study of maedi-visna virus infection in sheep. **J. Virol.**, 69, p.1400-1407, 1995.

BRANDÃO, C. F. L.; CAMPOS, G. S.; SILVA, A. C. R.; TORRES, J. A.; TIGRE, D. M. T.; SARDI, S.I. Monoclonal Antibodies against Caprine arthritis-encephalitis virus epitopes in the p28 and p55^{gag} viral proteins. **Journal of Virological Methods**. 187, 352-356. 2013.

BRASIL, Instrução Normativa nº 87, de 10 de dezembro de 2004. Aprova o Regulamento Técnico do Programa Nacional de Sanidade dos Caprinos e Ovinos. Publicada no Diário Oficial da União de 20/12/2004, Seção 1, Página 21

BRODIE S.J., 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.** 146:250-263. 1995.

CALLADO, A.K.C.; CASTRO, R.S.; TEIXEIRA, M.F. da S. Lentivírus de pequenos ruminantes (CAEV e Maedi-Visna): revisão e perspectivas. **Pesq. Vet. Brás.** 21 : 87-97, 2001.

CAMPOS, G S ; Freitas,M.M. ; SILVA, A.C.R. ; TORRES, J A ; BRANDAO, C. F. L.; SARDI, S I . Production and characterization of monoclonal antibodies against the Caprine Arthritis-Encephalitis virus and their use for diagnosis. In: **XI congreso Argentino de Microbiologia**. v. 39. p. 141-141. , 2007.

CASTRO, R.S.; LEITE,R.C.; AZEVEDO,E.O. de ;RESENDE, M.; GOUVEIA,A.M.G. Seroconversion and seroreactivity patterns of dairy naturally exposed to caprine arthritis-encephalitis virus in Brazil. **Ciência Rural**, 32: 603-607, 2002.

CAVIRANI S., DONOFRIO G., CHIOCCO D., FONI E., MARTELLI P., ALLEGRI G., CABASSI C.S., DE IACO B. & FLAMMINI C.F. Seroprevalence to bovine immunodeficiency virus and lack of association with leukocyte counts in Italian dairy cattle. *Prev. Vet. Med.* 37:147-157. 1998.

CHEBLOUNE, Y.; SHEFFER, D.; KARR, B. M.; STEPHENS, E.; NARAYAN, O.. Restrictive type of replication of ovine/caprine lentivirus in ovine fibroblast cell cultures. **Virology**. v. 222, p. 21-30. 1996.

CHEEVERS, W. P.; ROBERSON, S.; KLEVJER-ANDERSON, P.; CRAWFORD, T. B.. Characterization of Caprine Arthritis-Encephalitis virus: a retrovirus of goats. **Archives of Virology**. 67: 111-117.1981.

CHEEVERS, W. P.; STEM, T. A.; KNOWLES, D.P.; McGUIRE, T. C.. Precursor Polypeptides of Caprine Arthritis-Encephalitis Lentivirus Structural Proteins. **Journal of General Virology**. 69; 675- 681. 1988.

CHEEVERS, W. P.; KNOWLES, D.P.; NORTON L. K.. Neutralization- resistant antigenic variants of caprine arthritis- encephalitis lentivirus associated with progressive arthritis. **J. Infect. Dis.**, v.164, p.679-685, 1991

CHEEVERS W., McGUIRE T., NORTON L. K., CORDERY-COTTER R., KNOWLES D.. Failure of neutralizing to regulate CAE lentivirus expression in vivo. **Virology**. 196: 835-839. 1993.

CHEEVERS W.; BEYER, J. C.; KNOWLES, D.P.; Type 1 and type 2 cytokine gene expression by viral gp 135 surface protein- activated T lymphocytes in caprine arthritis-encephalitis lentivirus infection. **J. Virol. V.** 71(8), p. 6259-6263. 1997

CLAVIJO A.; THORSEN, J. Chemiluminescent detection of caprine arthritis-encephalitis virus with a PCR – generated single stranded nonradiolabelled probe. **Veterinary Microbiology**, v.43, p.295-305, 1995.

COLFOR, A.;HALL, P.A. Monoclonal antibodies in oncology: diagnostic pathology In LADYMAN &RITTER (Eds.). **Monoclonal Antibodies-** Production, Engineering and Clinical application.. Cambridge: University Press, p. 209-246. 1995

COFFIN, J.M. Retroviridae : the viruses and their replication. In: FIELDS, B. Et al., **Virology**. 4th. ed. Philadelphia: Lippincott-Raven Publishers, v.2, p. 1767-1830. 2001.

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

COOK, D. B.; SELF, C.H. Monoclonal Antibodies in diagnostic immunoassays. In LADYMAN & RITTER (Eds.). **Monoclonal Antibodies** – Production, Engineering and Clinical Application. Cambridge: University Press, p.180-208.1995.

CRAWFORD, T.B.; ADAMS, D.S.; CHEEVERS, W.P; CORK, L.C. Chronic arthritis in goats caused by a retrovirus. **Science.**, v.207, p.997-999, 1980.

CRAWFORD, T.B.; ADAMS, D.S. Caprine arthritis-encephalitis: clinical features and presence of antibody in selected populations. **J.Am. Vet. Med. Assoc.**, v.178, p.713-719, 1981.

CUNHA, R.G.; NASCIMENTO, M. D. do. Ocorrência de anticorpos para o vírus da artrite-encefalite caprina em soros de caprinos do estado do Rio de Janeiro. **R. Bras. Med. Vet.**, v.17, n.2, p.72-75, 1995.

DAHER M.A., ITIAMA H.S., MUKAI M.S., CARNEIRO R.S.A. & KANASHIRO C.K. Perfil do teste de imunofluorescência indireta como exame confirmatório para HIV 1 nos laboratórios do Programa Municipal de DST/AIDS de São Paulo. **Revta Inst. Med. Trop.**, S. Paulo, 41(Supl. 11):S19. 1999.

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.** 111:432-434. 1982.

DAWSON, M.; WILESMITH, J.W. Serological survey of lentivirus (maedi-visna / caprine arthritis-encephalitis) infection in British goat herds, **Vet. Rec.**, v.117, p.86-89, 1985.

DE ANDRÉS, D.; KLEIN, D.; WATT, N.J.; BERRIATUA, E.; TORSTEINSDOTTIR, S.; BLACKLAWS, B.A.; HARKISS, G. D. Diagnostic tests for small ruminant lentiviruses. **Veterinary Microbiology.**, 107, p. 49-62, 2005.

DE LA CONCHA – BERMEJILLO, A., BRODIE, S. J., MAGNUS – CORRAL, S., BOWEN, R. A., DOMARTINI, J. C., Pathologic and serological responses of isogenic twin lambs to phenotypically distinct lentiviruses. **Journal Acquired immune deficient syndrome Human Retrovirol.** v. 8, p. 116-123, 1995.

DE LA CONCHA-BERMEJILLO, A. de la. Maedi-visna and ovine progressive pneumonia. **Vet. Clin. North Am. Food Anim. Pract.**, v.13, p.12-33,1997.

DE LA CONCHA-BERMEJILLO A, ANDERSON NV, BRETZLAF K, ET AL.: Overview of diseases and drug needs for sheep and goats. Veterinarians' and producers' perspectives. *Vet Human Toxicol* 40 Suppl 1:7–12. 1998

DUNBAR, B. S.; SKINNER, S. M. Preparation of Monoclonal Antibodies. . In **Methods in enzymology**. Vol. 182. Guide to Protein Purification. Ed. DEUTSCHER, M. P.. Academic Press, San Diego, 1990.

EAST, N.E.; ROWE, J.D.; DAHLBERG, J.E.; THEILEN, G.H.; PEDERSEN, N.C. Modes of transmission of caprine arthritis-encephalitis virus infection. **Small Ruminant Research**, v.10, p.251-262, 1993

EDELWEIS, G.;TIGRE,D.M.; NORONHA,R.P.; QUEIRÓS, F.M.;CAMPOS,G.S.; SARDI, S. Ocorrência de anticorpos contra o vírus da artrite-encefalite caprina em caprinos jovens de diferentes municípios do estado da Bahia. In: **XXVIII Congresso Brasileiro de Medicina Veterinária**, Salvador. 2001.

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.68, p. 3145-3152, 1987.

FIENI, F.; ROWE, K.; VAN HOOSEAR, K.; BURUCOA, C.; OPPENHEIM, S.; ANDERSON, G.; MURRAY, J.; BONDURANT, R. Presence of caprine arthritis-encephalitis virus (CAEV) proviral DNA in genital tract tissues of superovulated dairy goat does. **Theriogenology**, v. 59, p. 1515-1523, 2003.

FILHO, E. A. S.; VOLPE, P. L. O.. Estudo microcalorimétrico da interação de tensoativos n-Alquil-Sulfato de Sódio com tripsina a 298 K. **Química Nova**. V.20 (2), p. 150-153, 1997.

FILHO, E. A. S.; VOLPE, P. L. O.. Estudo da interação proteína- surfactante pelo método de equilíbrio de diálise. **Química Nova**. V.17 (2), p. 199-1204, 1994.

FITERMAN I.R. Constatação do Complexo Artrite-encefalite em um plantel de caprinos no Estado da Bahia. Congresso Brasileiro de Med. Vet. 21, Salvador, Bahia. **Anais.**, p. 93, 1988.

FONTES, Lia Vale Queirós ; CAMPOS, Gúbio Soares ; BECK, Patrícia Araújo ; BRANDAO, C. F. L. ; SARDI, Silvia Ines . Precipitation of Bovine Rotavirus by Polyethylen Glycol and its application to produce Policlonal and Monoclonal Antibodies. **Journal of Virological Methods**, Inglaterra, v. 123, p. 147-153, 2005.

FRANKE, C.R. In: Controle sanitário da artrite-encefalite caprina. Salvador : **EDUFBA**, 71p. 1998.

GALLO D., DIGGS J.L., SHELL G.R., DAILEY P.J., HOFFMAN M.N. & RIGGS J.L. Comparison of detection of antibody to the acquired immune deficiency syndrome virus by enzyme immunoassay, immunofluorescence, and western blot methods. **J. Clin. Microbiol.** 23:1049-1051. 1986.

GARCIA, M. Artrite-encefalite caprina: uma nova doença no Brasil. **A Hora Veterinária**, 76: 57-59, 1993.

GENDELMAN, H.E.; NARAYAN, O.; KENNEDY-STOSKOPF, S.; KENNEDY, P.G.E.; GHOTBI, Z.; CLEMENTS, J.E.; STANLEY, J.; PEZESHKPOUR, G. Tropismo of

sheep lentiviruses for monocytes: susceptibility to infection and virus genes expression increased during maturation of to macrophages. **J. Virol.**, v.58, n.1, p. 67-74.1986.

GLENNIE MI, JOHNSON PW. Clinical trials of antibody therapy. **Immunol Today**; 21:403-10. 2000.

GOLDSBY, R.A., KINDT, T. J., OSBORNE B .A. **Kuby Imunologia**. 4° ed. Rio de Janeiro: Revinter, 2002.

GOFF, S. P. Retroviridae: the retroviruses and their replication. 2 ed, p. 1999-2069. In: **Fields Virology**, B. N., KNIPE, D. M., HOWLEY, P. N., 5 ed, 2006.

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

GUEDES, M.I.M.C.; SOUZA, J.C.A.; GOUVEIA, A.M.G. Infecção experimental em cabritos pelo vírus da artrite encefalite. **Arq. Brás. Méd. Vet. Zootec.**, v.53, n.1, p.15-22, 2001.

HANSON, J.; HYDBRING, E.; OLSSON, K. A long term study of goats naturally infected with caprine arthritis-encephalitis virus. **Acta. Vet. Scand.**, v.37, p.31-39, 1996.

HARKISS, G.D.; WATT, N.J. Lentivirus infections and their detection. **Goat Vet. Soc. J.**,11 (1): 19-25,1990.

HARMACHE, A., BOUYAC, M., AUDALY, G., HIÉBLOT, C., PEVERI, P., VIGNE, R. and SUZAN, M.. The vif gene is essential for efficient replication of caprine arthritis encephalitis virus in goat synovial membrane cells and affects the late steps of the virus replication cycle. **J. Virol.** 69, 3247-3257. 1995.

HARMACHE, A., RUSSO, P., GUIGUENN,F., VITU,C., VIGNANI, M., BOUYAC, M., HIÉBLOT, C., PÉPIN, M., VIGNE, R and SUZAN, M. Requirement of caprine arthritis encephalitis virus vif gene for in vivo replication. HARMACHE, A., BOUYAC, M., **Virology**, 224, 246-255, 1996.

HAZIZA, B.; CHAUVIN, J. P.; GLUSCHANKOF, P.; SUZAN M.. Caprine Arthritis-Encephalitis virus: Evidence for a B/D-Type Assembly Pathway in a C_Type Lentivirus Replication. **Virology**. 286: 434- 445. 2001.

HENDERSON, L. E.; SOWDER, R. C.; SMYTHERS, G. W.; OROSZLAN, S.. Chemical and immunological characterizations of equine infectious anemia virus gag-encoded proteins. **Journal of Virology**. 61(4): 1116-1124. 1987.

HÖTZEL, I., BASTOS, E.S., RAVAZZOLO, A.P. et al. Caprine arthritis-encephalitis virus: isolation and identification in Rio Grande do Sul, Brazil. *Braz. J. Med. Biol. Res.*, v.26, p.1175-1179, 1993.

HOUWERS, D.J.; NAUTA, I.M. Immunoblot analysis of the antibody response to ovine lentivirus infections. **Veterinary Microbiology**, v.19, p.127-139, 1989.

HULLINGER, G. A.; KNOWLES, D.P.; Mc GUIRE, T. C.; CHEEVERS, W. P. Caprine atrthritis-encephalitis Lentivirus SU is the ligand for infection of caprine synovial membrane cells. **Virology**, v. 192, p.328-331, 1993.

HUSO, L.D.; NARAYAN, O.; HART, W.G. Sialic acid on the surface of caprine arthritis-encephalitis virus define the biological properties of the virus. **J. Virol.**, 72: 1974-1980, 1988.

IBGE. Pesquisa da Pecuária Municipal – Disponível em: <<http://www.ibge.gov.br/home/estatistica/economia/ppm/2010/ppm2010.pdf>>. 2010. Acesso em 09 março de 2014.

JANEWAY C A; TRAVERS, JANEWAY C A; TRAVERS P; WALPOR. **Imunobiologia: o sistema imune na saúde e na doença**. 7 ed. Artmed, 2010.

JOLLY, P.E.; GANGOPADHYAY, A.; CHIEN, S.; REDDY, P.G.; WEISS, H. L.; SAPP, W.J. Changes in the leukocyte phenotype profile of goats infected with the caprine arthritis-encephalitis virus. **Vet. Immunol. Immunopathol.**, v. 56, p.97-106, 1997.

KAJIKAWA, O.; LAIRMORE, M.D.; DEMARTINI, J.C. Analysis of antibody responses to phenotypically distinct lentiviruses. **Journal of Clinical Microbiology**, v.28, p.764-770, 1990.

KARUSH, F. The affinity of antibody: range, variability and the role of multivalence In Comprehensive Immunology. **Immunoglobulins**, ed. G.W. Litman & R.A. Good. New York, Plenum Medical Book. v.5, p. 85-116, 1978.

KLENERMAN, P.; HILL, A.. T cells and viral persistence: lesions from diverse infections. **Nat. Immunol.** V.6, (9); p.873-879. 2005.

KNOWLES, D. P.; CHEEVERS W. P.; McGUIRE, T. C; STEM, T. A. and GORHAM J. R.. Severity of arthritis is predicted by antibody response to gp135 in chronic infection with caprine arthritis-encephalitis virus. **J. Virol.** 64:2396–2398. 1990.

KNOWLES, D. P.; CHEEVERS W. P.; McGUIRE, T. C; BRASSFIELD, A. L; HARWOOD W. G.; STEM T. A.. Structure and genetic variability of envelope glycoproteins of two antigenic variants of caprine arthritis-encephalitis lentivirus. **J. Virol.** 65:5744–5750.1991.

KNOWLES, D.P. Jr.; EVERMANN, J.F.; SHROPSHIRE, C.; VANDERSCHALIE, J.; BRADWAY, D.; GEZON, H.M.; CHEEVERS, W.P. Evaluation of agar gel immunodifusion serology using caprine and ovine lentiviral antigens for detection of antibody to caprine arthritis-encephalitis virus. **Journal of Clinical Microbiology**, v.32, p.243-245, 1994.

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

KÖHLER G, MILSTEIN C. Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity. **Nature**, v. 256, p.495-497, 1975.

KRIANGKUM, J. X.U; NAGATA, L.P, et al. Bispecific and bifunctional single chain recombinant antibodies. **Biomol Eng.** V.18. p.31–40. 2001.

KRIEG, A. & PETERHANS, E. Die Caprine Arthritis-Encephalitis in der Schweiz: epidemiologische und klinische Untersuchungen. *Schweizer Archiv für Tierheilkunde*,v.132, n.7, p.345-352, 1990.

KUBY, J., CAMERON, J., TODD, C., MITCHELL, J. **Kuby Imunologia**. 4ª edição. Rio de Janeiro: Livraria e Editora Revinter Ltda. 2002.

KURIEN, B. T.; SCOFIELD, R. H. **Western blotting. Methods.** San Diego. v.38, p.283-293, 2006.

LADYMAN, H. M.; RITTER, M.A. **Monoclonal Antibodies- Production engineering, and clinical application.** Cambridge University Press. p.480. 1995

LAMARA, A.; FIENI, F.; MSELLI-LAKHAL, L.; TAINTURIER, D.; CHEBLOUE, Y.. Efficient replication of caprine arthritis- encephalitis virus in goat granulose cells. **Virus Research**, v. 79, p. 165-172. 2001.

LAMARA, A.; FIENI, F.; MSELLI-LAKHAL, L.; TAINTURIER, D.; CHEBLOUE, Y.. Epithelial cells from goat oviduct are highly permissive for productive infection with of caprine arthritis- encephalitis virus (CAEV). **Virus Res.**, v. 87, n.1, p. 69-77, 2002.

LARA M.C.C.S.H; BIRGEL JUNIOR, E.H; REISCHAK, D.; MOOJEN, V.; GREGORY, L.; OLIVEIRA, J.C.F.; BIRGEL, E.H. Identificação Imuno-Sorológica de Anticorpos Anti-Vírus da Artrite-Encefalite dos Caprinos: comparação das Técnicas de Imunodifusão em Gel de Ágar, Ensaio Imunoenzimático e Imunofluorescência Indireta. **Arq. Inst. Biol.**, v.69, n.4, p.1-5. 2002

LECHNER, F.; MACHADO, J.; BERTONI, G.; SEOW, H.F.; DOBBELARE, D.A.E.; PETERHANS, E. Caprine arthritis-encephalitis vírus dysregulates the expression of cytokines in macrophages. **Journal of Virology**, v.71, n. 10, p. 7488-7497, 1997.

LERNER, R. A.; BENKOVIC, S. J.; SCHULTZ, P. G.. At the crossroads of chemistry and immunology: catalytic antibodies **Science**, 252, 659. 1991.

LICHTENSTEINGER, C.A. CHEEVERS, W.P.; DAVIS, W.C.. CD8+ cytotoxic T lymphocytes against antigenic variants of caprine arthritis-encephalitis virus. **J. Gen. Virol.**, v.74, p. 2111-2116. 1993.

LIMA, P.P.; ROCHA, M. A.; STANCEK, D.; GOUVEIA, A. M. G.; OLIVEIRA, G.D.R.. Vírus da artrite-encefalite caprina: isolamento e caracterização de parte do gene *gag*. **Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.** v.56, n.2: 135-142. 2004.

LIMA C.C.V. Inquérito soropidemiológico da artriteencefalite caprina na Microrregião de Juazeiro-Bahia e comparação de técnicas imunodiagnósticas. **Dissertação de Mestrado**, Escola de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Federal da Bahia, Salvador. 87f. 2012.

LIPMAN, N.S; JACKSON, L.R; TRUDEL, L.J; WEIS-GARCIA, F. Monoclonal versus policlonal antibodies: Distinguishing characteristics, applications, and information resources. **ILAR Journal.**, v. 46, n 3, 258-268, 2005.

LYALL, J.W.; SOLANKY, N.; TILEY, L. S.. Restricted species tropism of maedi-visna virus strain EV-1 is not due to limited receptor distribution. **Journal of General Virology**, 81, 2919-2927. 2000.

MACKENZIE, R.W.; OLIVER, R.E.; ROONEY, J.P.; KAGEI, H. A successful attempt to raise goat kids free of infection with caprine arthritis encephalitis virus in an endemically infected goat herd. **N. Z. Vet. J.**, v.35, n.11, p.184-186, 1987.

MADRUGA, C.R.; ARAÚJO, F.R.; SOARES, C.O. **Imunodiagnóstico em Medicina Veterinária**. Campo Grande: Embrapa Gado de Corte, 2001.

MARGNI, R. A. **Inmunología e Inmunoquímica** – Fundamentos. 5° Ed. Editora Médica Panamericana. Buenos Aires. p.176-200. 1996.

MARQUES, C.H. Aspectos fundamentais à implantação da tecnologia de produção de anticorpos monoclonais humanizados com potencial, aplicação terapêutica. Rio de Janeiro: **FIOCRUZ**, 2005.

MARTINEZ P.M., COSTA J.N., SOUZA T.S., LIMA C.C.V., COSTA NETO A.O. & PINHEIRO R.R. Prevalência sorológica da maedi visna em rebanhos ovinos da Microrregião de Juazeiro – Bahia por meio do teste de imunodifusão em gel de ágar. **Ciência Animal Brasileira**. 12. 2011.

MAYER, G.. **Imunologia**. University of South Carolina. 2009. Disponível em <<http://pathmicro.med.sc.edu/Portuguese/immuno-port-chapter4.htm>> 24/07/2013

Mc GUIRE, T.C. The immune response to viral antigens as a determinant of arthritis in caprine arthritis-encephalitis virus infection. **Vet. Immunol. Immunopathol.**, 17 : 465-470, 1987.

MELO, A.C.M.; FRANKE, R.F. Soroprevalência da infecção pelo vírus da artrite-encefalite caprina (CAEV) no rebanho caprinos leiteiros da região da grande Fortaleza, Ceará, Brasil. **Ciência Rural**, Santa Maria, v.27, n.1, p.113-117, 1997.

MICHAL R.; WOJCIECH. Preliminary results of comparasion of ELISA and PCR methods in the dianosis of caprine arthritis-encephalitis virus infection. Disponível em: <<http://www.google.com/search?q=cache:M3VLT.../art10500.htm+CAEV+AND+P+CR&HL=P>> Acesso em: 31 de jan. 2001.

MIYAZAWA T., IKEDA Y., MAEDA K., HORIMOTO T., TOHYA Y., MICHIZUKI M., VU D., VU G.D., CU D.X., ONO K., TAKAHASHI E. & MIKAMI T.

Seroepidemiological survey of feline retrovirus infections in domestic and leopard cats in northern Vietnam in 1997. **J. Vet. Med. Sci.** 60: 1273-1275. 1998.

MODOLO, J.R.; STACCHISSINI, A.V.M.; CASTRO, R.S.; RAVAZZOLO, A.P. Planejamento de saúde para o controle da artrite-encefalite caprina. Botucatu: Cultura Acadêmica, 2003.

MOOJEN, V.; SOARES, H.C.; RAVAZZOLO, H.P.; PIZZOL, M.; GOMES, M. Evidência da infecção pelo lentivirus (Maedi/Visna/Artrite-encefalite caprina) em caprinos no Rio Grande do Sul, Brasil. **Arq. Fac. Med. Vet. UFRGS** 1(14), p. 77-78, 1986.

MOREIRA M.C., OELEMANN W.M.R. & LILENBAUM W. Dados sorológicos da artrite-encefalite caprina no estado do Rio de Janeiro (BR) e avaliação do uso do índice clínico como ferramenta de diagnóstico. **Revista Brasileira de Medicina Veterinária.** 29(2):51-53. 2007.

MORRIS, R. J. Antigen-antibody interactions: how affinity and kinetics affect assay design and selections procedures. In: LADYMAN, H. M.; RITTER, M.A. **Monoclonal Antibodies-** Production engineering, and clinical application. Cambridge University Press. p.480. 1995

MSELLI-LAKHAL, L.; GUIGUEN, F.; FORNAZERO, C. DU J.; FAVIER, C.; DURAND, J.; GREZEL, D.; BALLEYDIER, S.; MORNEX, J. F.; CHEBLOUNE, Y.. Goat Milk epithelial cells are highly permissive to CAEV infection *in vitro*. **Virology**, v. 259, p.67-73, 1999.

MSELLI-LAKHAL L., FAVIER C., LEUNG K., GUIGUEN F., GREZEL D., MIOSSEC P., MORNEX J.F., NARAYAN O., QUERAT G. & CHEBLOUNE Y. Lack of functional receptors is the only barrier that prevents caprine arthritis-encephalitis virus from infecting human cells. **Journal of Virology.** 74(18):8343-8348. 2000.

MURPHY, F.A.; GIBBS, E.P.J.; HORZINEK, M.C.; STUDDERT, M.J. Retroviridae. In: **Veterinary Virology**, 3ed. USA: Academic Press, p.363-389. 1999.

NARAYAN, O.; CLEMENTS, J.E.; STRANDBERG, J.D.; CORK, L.C.; GRIFFIN, D.E. Biological characterization of the virus causing leukoencephalitis and arthritis in goats. **J. Gen. Virol.**, v.50, p. 69-79. 1980.

NARAYAN, O.; WOLINSKY, J. S.; CLEMENTS, J.E.; STRANDBERG, J.D.; GRIFFIN, D.E; CORK, L.C.. Slow virus replication: the role of macrophages in the persistence and expression of visna viruses of sheep and goats. **J.Gen. Virol.**, v.59, n.2, p. 345-356, 1982.

NARAYAN, O.; CORK, L.C. Lentiviral diseases of sheep and goats: chronic pneumonia leukoencephalomyelitis and arthritis. **Rev. Infect. Dis.** V.7, p. 89-98. 1985.

NARAYAN, O.; JOAG, S. V., CHEBLOUNE Y. *et al.* Visna-Medi: the prototype lentiviral disease. In: **Viral Viral Pathogenesis**. Nathanson, N. (Coord). P 657-668. 1997.

NATIONAL INSTITUTE OF ANIMAL HEALTH. Development of diagnostic methods for Caprine arthritis-encephalitis. Japan, 2005. Disponível em: <<http://www.niah.affrc.go.jp/research/viral/e-result.html>>. Acesso em: 19 nov. 2008.

NELSON, P. N.; REYNOLDS, G. M.; WALDRON, E. E.; WARD, E.; GIANNOPOULOS, K.; MURRAY, P. G. Monoclonal antibodies. **Journal Clinical of Pathology**, v. 53, p. 111-117, 2000.

NORD, K.; HOLSTAD, G.; EIK, L.O.; GRONSTOL, H. Control of Caprine Arthritis-Encephalitis virus and *Corynebacterium pseudotuberculosis* infection in a Norwegian goat herd. *Acta Vet. Scand.*, v.39, n.1, p.109-117, 1998.

NORMAN, S., SMITH, M.C. Caprine arthritis encephalitis. Review of neurologic form in 30 cases. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, Chicago, v. 182, n. 12, 1983.

OIE. **Organização Mundial de Saúde Animal**, 2010. Disponível em <<http://www.oie.int>>, Acesso em 29 de julho de 2013.

OLIVEIRA, M.M.M.; DE MELO, M.A.; DE ANDRADE, P.P; GOMES, S.M; CAMPOS, A.C.; DO NASCIMENTO, S.A.; DE CASTRO, R.S. Western Blot para o diagnóstico das infecções pelos Lentivírus de Pequenos Ruminantes em Caprinos: um método simples para a produção de antígeno. **Arq. Inst. Biol**, v.75, n.3, p.263-270, 2008.

PAISICK, J.. Maedi-Visna Virus and Caprine Arthritis-EncephalitisVirus: Distinct Species or Quasispécies and its Implications for Laboratory Diagnosis. In: **Can J. Vet Res.**; 62: 241-244. 1998.

PARKER, C. W.. “Radioimmunoassay of Biologically Active Compounds.” Prentice-Hall, Englewood Cliffs, New Jersey, 1976.

PARKER, C.W. Immunoassays. In **Methods in enzymology**. Vol. 182. Guide to Protein Purification. Ed. DEUTSCHER, M. P.. Academic Press, San Diego, 1990.

PERETZ, G.; BUGNARD, F.; CALAVAS, D. Study of prevention programme for caprine arthritis-encephalitis. **Vet. Res.**, v.25, p.322-326, 1994.

PERRY, L.L.; WILKERSON, M.J.; HULLINGER, G. A.; CHEEVERS, W. P. Depressed CD4+ T lymphocyte proliferative responses and enhanced antibody to viral antigen in chronic lentivirus –induced arthritis. **J. Infect. Dis.**, v.171, p. 328-334, 1995.

PINHEIRO, *et al.* Artrite-encefalite caprina viral (CAEV). Sobral, **Com.Tec. EMBRAPA-CNPC**, n.19, p.1-5, 1989.

PINHEIRO, R.R.; GOUVEIA, A.M.G.; ALVES, F.S.F. Prevalência da infecção pelo vírus da artrite encefalite caprina no estado do Ceará, Brasil. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 31, n. 3, p. 449-454, 2001.

PHELPS, S.L.; SMITH, M.S. **Caprine arthritis-encephalitis virus infection**. JAVMA., 203 (12) : 1663 1668, 1993.

RAVAZOLLO, A. P.; NENCI, C.; VOGT, H-R.; WALDVOGEL, A.; OBEXER-RUFF,G.; PETERHANS, E.; BERTONI, G. Virus load, organ distribution, histopathological lesions, and cytokine mRNA expression in goats infected with a molecular clone of the caprine arthritis-encephalitis virus. **Virology**, v.350, p. 116-127, 2006

REILLY, L.K.; BAIRD, A.N.; PUGH, D.G. **Enfermidades do Sistema Musculoesquelético**. In: **Clínica de ovinos e caprinos**. São Paulo: Roca, p.251-286. 2004.

REISCHAK, D.; RAVAZZOLO A. P.; MOOJEN,V. Imunofluorescência utilizando isolados brasileiros no diagnóstico sorológico de infecção por lentivírus em caprinos. **Pesq. Vet. Bras.** vol.22 no.1 Rio de Janeiro Jan. 2002

RIMSTAD, E.; EAST, N.; 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, p.1858-1862, 1993

ROBEY, W.G., *et al.* Project for prevention of human immunodeficiency virus infection: purified 120kDa envelope glycoprotein induces neutralizing antibody. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**. V.83, p. 7023-7027. 1986

ROBEY, W.G., *et al.* Characterization of envelope and core structural gene products of HTLV-III with serum from AIDS patients. **Science**. V.228, p. 583-595.1985

ROBINSON, W.F.; ELLIS, T.M. Caprine arthritis-encephalitis virus infection: from recognition to eradication. **Aust. Vet. J.**, .v **63**: p. 237-241, 1986.

ROITT, I.; BROSTOFF, J.; MALE, D. **Imunologia**. 6 ed. Manole, 2003.

ROSATI, S.; PITTAU, M.; TOLARI, F.; ERRE, G.; KWANG, J. Genetic and antigenic characterization of CAEV (caprine arthritis-encephalitis virus) recombinant transmembrane protein. *Veterinary Microbiology*, v.45, p.363-370, 1995.

ROWE, J.D.; EAST, N.E. Risk factors for transmission and methods for control of caprine arthritis-encephalitis virus infection. **Vet. Clin. North Am.**, v.13, p.34-53, 1997.

RUSSO, P.; VITU, C.; FONTAINE, J.J. VIGNONI, M. Caprine arthritis-encephalitis: trial of an adjuvant vaccine preparation. I. Clinical and virological study. **Comp. Immunol. Microbiol. Infec. Dis.**, v.16, n.2, p.131-136, 1993.

SÁEZ- CIRIÓN, A.; LACABARATZ, C.; LAMBOTTE, O.; VERSMISSE, P.; URRUTIA, A.;BOUFUASSA, F.; BARRÉ-SINOUSSE, F.; DELFRAISSY, J-F.;SINET, M.; PANCINO, G.; VENET, A. HIV controllers exhibit potent CD8 T cell capacity to suppress HIV infection ex vivo and peculiar cytotoxic T lymphocyte activation phenotype, **PNAS**, v. 104, n. 16, 2007.

SALTARELLI, M. QUERAT, G. KONINGS, D. A. M. Nucleotide sequence and transcription analysis of molecular clones of CAEV which generate infectious virus. **Virology**. v. 179: 347-364. 1990.

SARAIVA NETO, A. O. Soroprevalência da artriteencefalite caprina em caprinos leiteiros criados no Estado de Pernambuco. Recife, 1994. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) . **Faculdade de Medicina Veterinária UFRPE**, 1994

SARDI, S I ; SILVA, A.C.R. ; TORRES, J A ; TIGRE, D M. ; BRANDAO, C. F. L. ; CAMPOS, G S . Produção e caracterização de anticorpos monoclonais e policlonais contra o vírus da Artrite Encefalite Caprina.. In: **XXXIII Conbravet - Congresso Brasileiro de Medicina Veterinária**, Cuabá, 2006.

SARDI, S.I.; TORRES, J. A.; BRANDÃO, C. F. L.; TIGRE, D.M.; CAMPOS, G. S.. Early Detection of goats infected with Lentivirus Small Ruminant virus by ELISA assay. **Rev. de Ciências Médicas e Biológicas**. v.11, n.1, p.35-40. 2012

SCHOBORG, R. V.. Analysis of caprine arthritis encephalitis vírus (CAEV) temporal gene expression in infected cells. **Virus Research**. 90: 37-46. 2002.

SELL, B. E. Prevalência de anticorpos para o vírus da artrite-Encefalite Caprina em soros de caprinos no estado de Santa Catarina. 23f. Monografia (especialização em sanidade Animal) – Univesidade do Estado de Santa Catarina Lages, 2000.

SERAKIDES, R.; NUNES, V.A., PEREIRA, M.F. Estudo anatomopatológico e imuno-histoquímico de pulmões de cabras naturalmente infectadas pelo vírus da artrite-encefalite caprina (CAE). **Arq. Brás. Méd. Vet. Zootec**. v.48, n.4, p.415-424, 1996.

SHI, S.R.; IMAM, S.A.; YOUNG, L.; COTE , R.J.; TAYLOR, C.R. Antigen retrieval immunohistochemistry under the influence of pH using monoclonal antibodies. **Journal of Histochemistry & Cytochemistry**. V. 43 (2), p. 193-201.1995.

SILVERTON E. W., NAVIA M. A., DAVIES D. R. Three-dimensional structure of na intact human immunoglobulin. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA**. 74 (11). 1977.

SIMARD, C.; KIBENGE, M.T.; SINGH, P.; DIXON, P. Simple and rapid method for production of whole-virus antigen for serodiagnosis of caprine arthritis-encephalitis virus by enzyme-linked Immunosorbent assay. **C. lin. Diag. Immunol.**, 8 (2) : 352-356. 2001.

SMITH, M. C., CUTLIP, R. Effects of infection with caprine arthritis-encephalitis virus on milk production in goats. **J. Am. Vet. Med. Assoc.**, v. 193, p. 63-7, 1988. B. P. Tratado de medicina veterinária interna de grandes animais. São Paulo: Manole., P.1138-1139.1993.

SOBRINHO P.A.M., RAMOS T.R.R., FERNANDES C.H.C., CAMPOS A.C., COSTA L.M. & CASTRO R.S. Prevalência e fatores associados à infecção por lentivírus de pequenos ruminantes em caprinos no estado do Tocantins. **Ciência Animal Brasileira**. 11(1):117-124. 2010.

STEINHAUER, D.A., HOLLAND, J.J.. Rapid evolutin of RNA viruses. **Ann Rev Microbiol**. v. 41: 409-433. 1987

STÜNZI, H.; BÜCH, H.F.; LE ROY, H.L; LEEMANN, W. Endemische arthritis chronica bei Ziege. **Schweizer Archiv Fürur T-ierärkunden** 106, p. 778-788, 1964.

TIGRE, D.M.; CAMPOS, G.S.; SARDI, S.I. Isolamento do vírus da artrite-encefalite caprina em cabras do estado da Bahia. In: FeSBE, 2002, Salvador. **Anais...** Salvador, 2002.

TIGRE,D.M. Detecção do virus da artrite-encefalite caprina através da técnica de Duple Nested PCR em amostras de sangue e leite. **Dissertação de Mestrado**. Dezembro 2003.

TIGRE, D.M.; CAMPOS, G.S.; SARDI, S.I. Isolamento do vírus da artrite-encefalite caprina a partir do co-cultivo de células mononucleares do sangue com células de membrana sinovial de cabras. **R. Ci. Med. Biol.** 5, 100-108, 2006

TIMMONS T. M.; DUNBAR, B. S..Protein Blotting and Immunodetection. In **Methods in enzymology**. Vol. 182. Guide to Protein Purification. Ed. DEUTSCHER, M. P.. Academic Press, San Diego, 1990.

TORRES, J. A.; CAMPOS, G. S.; FREITAS M. M.; BRANDÃO, C. F. L.; SARDI, S.I..Produção de antígeno viral para o sorodiagnóstico de CAEV utilizando o teste imunoenzimático (ELISA). Aceito para publicação. **Rev. de Ciências Médicas e Biológicas**. V.8, nº especial, 2009.

VALLERA D A, ASH RC, ZANJANI ED, et al. Anti-T-cell reagents for human bone marrow transplantation: ricin linked to three monoclonal antibodies. **Science**;222:512–515. 1983.

VIGNE, R.; FILIPPI, P.; QUÉRAT, G.; SAUZE, N.; VITU, C.; RUSSO, P.; DELORI, P.. Precursor Polypeptides to Structural Proteins of Visna Virus. **Journal of Virology**. 42(3): 1046–1056. 1982.

VOLPE, P. L. O.; PERLES, C. E. Calorimetric study of the antibacterial activity of sodium n-alkylsulfates on the metabolismo of *Chromobacterium violaceu*. **Journal of the Brazilian Chemical Society**. V. 16, n5. 2005

ZANONI, R.; KRIEG, A.; PETERHANS, E. Detection of antibodies to caprine arthritis-encephalitis virus by protein G enzyme-linked immunosorbent assay and immunoblotting. **Journal of Clinical Microbiology**, v.27, p.580-582, 1989

ZANONI, R. G.. Phylogenetic analysis of small ruminant lentiviruses. *J. Gen. Virol.* v. 79, p. 1951-1961, 1998.

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. Immunol. and Immunopathol.**, v.15, p. 167-180, 1987.

ZINK, M. C.; YAGER, J. A.; MYERS, J. D.. Pathogenesis of caprine arthritis-encephalitis virus. Cellular localization of viral transcripts in tissue of infected goats. **Am. J. Pathol.**, v 13, n.4, p 843-854, 1990.

CAPÍTULO 3

3- OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

- Produzir e caracterizar Anticorpos Monoclonais para o CAEV com potencial aplicação no estudo do vírus e diagnóstico viral.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Obter antígeno viral a partir de cultivo primário de células de Membrana Sinovial de Cabra infectadas com CAEV e concentrá-lo utilizando a técnica de precipitação com Polietilenoglicol e posterior sedimentação por ultracentrifugação;
- Obter soro hiperimune (Anticorpos Policlonais) contra o antígeno viral do CAEV;
- Produzir e expandir hibridomas produtores de AcM para CAEV;
- Caracterizar o isotipo da Imnoglobulina dos AcM e titular os mesmos através da técnica do ELISA indireta;

- Detectar o antígeno viral em células de MSC infectadas, através da Imunofluorescência Indireta;
- Determinar a sensibilidade e especificidade dos AcM na detecção do antígeno viral utilizando a técnica de Dot-blot;
- Determinar a reatividade dos AcM contra polipeptídios virais do CAEV através da técnica de Western-blot;
- Caracterizar a estrutura molecular do epítipo reconhecido pelos AcM;
- Potencial uso dos AcM em diagnóstico.

CAPÍTULO 4

MANUSCRITO 1

MONOCLONAL ANTIBODIES AGAINST CAPRINE
ARTHRITIS-ENCEPHALITIS VIRUS EPITOPES IN THE P28
AND P55^{GAG} VIRAL PROTEINS

MONOCLONAL ANTIBODIES AGAINST CAPRINE ARTHRITIS-ENCEPHALITIS VIRUS EPITOPES IN THE P28 AND P55^{GAG} VIRAL PROTEINS

Camila Fonseca Lopes Brandão^{1,2}, Gubio Soares Campos¹, Ana Carolina Requião Silva¹, Juliana Alves Torres^{1,3}, Dellane Martins Tigre^{1,4} and Silvia Ines Sardi^{1*}.

¹ Laboratory of virology , Department of Biointeraction, Health Science Institute, Universidade Federal da Bahia, Av Reitor Miguel Calmon s/n Vale do Canela, Salvador, 40110-100, Bahia, Brazil. Tel.: +55 71 32350937, Fax: +55 71 32350937. *E-mail address*: sissardi@yahoo.com.br (S.I. Sardi).

² Baiano Federal Institute of Education, Science and Technology Ciência e Tecnologia IFBaiano, Santa Inês, Bahia.

³ Sergipe Federal Institute of Education, Science and Technology Ciência e Tecnologia IFSE, Glória, Sergipe.

⁴ State University of Southwest- UESB, Jequié, Bahia.

Corresponding author

Laboratório de Virologia

Instituto de Ciências da Saúde

Universidade Federal da Bahia

Avenida Reitor Miguel Calmon S/N

Vale do Canela 40110-100

Salvador, Bahia, Brazil

Tel.: +55 71 32350937

Fax: +55 71 32350937

E-mail address: sissardi@yahoo.com.br (S.I. Sardi).



Short communication

Monoclonal antibodies against Caprine arthritis-encephalitis virus epitopes in the p28 and p55^{gag} viral proteins

Camila Fonseca Lopes Brandão, Gubio Soares Campos, Ana Carolina Requião Silva, Juliana Alves Torres, Dellane Martins Tigre, Silvia Ines Sardi*

Laboratory of Virology, Department of Biointeraction, Health Science Institute, Universidade Federal da Bahia, Av Reitor Miguel Calmon s/n Vale do Canela, Salvador, 40110-100 Bahia, Brazil

ABSTRACT

Article history:

Received 10 February 2012

Received in revised form 23 October 2012

Accepted 30 October 2012

Available online 17 November 2012

Keywords:

CAEV

Monoclonal antibodies

p28

p55^{gag}

Denaturing agents

The genome of the Caprine Arthritis-Encephalitis Virus (CAEV) encodes the polycistronic precursor protein p55^{gag}. Proteolytic cleavage of p55^{gag} generates the viral core proteins. Some studies suggest that the CAEV p55^{gag} protein contains epitopes or antigenic determinants for these core proteins. This work reinforces this hypothesis and demonstrates that monoclonal antibodies (MAbs) that are directed against the capsid protein (p28) of CAEV are also reactive against the precursor p55^{gag} protein and the intermediate cleavage products, p44, p36 and p22. The major activity of the MAbs was directed against p28. The MAbF12 binding site in p28 was found to be a linear epitope with a structure that is stable after SDS treatment and remains unaltered after β-mercaptoethanol (β-ME) treatment. The MAbF12 binding site in the p55^{gag}, p36 and p22 proteins was found to be a linear epitope with cross-linked sulphide bonds. In conclusion, these findings suggest that the p28 epitope is presented differently from the epitope in the polycistronic precursor protein p55^{gag}. The highly immunogenic p28 contains a linear epitope that is detergent-stable and is not altered by β-ME treatment, whereas the p55^{gag} epitope contains a linear epitope susceptible to denaturing agents.

© 2012 Elsevier B.V. All rights reserved.

Caprine Arthritis-Encephalitis Virus (CAEV), a member of the *Retroviridae* family, genus *Lentivirus*, causes a progressive and debilitating disease in goats that affects the mammary glands, lungs, brain and joints (Goff, 2007).

The CAEV genome comprises two copies of single-stranded RNA that encodes the *gag* (matrix, capsid and nucleoprotein proteins), *env* (envelope glycoproteins) and *pol* (reverse transcriptase, integrase and protease proteins) genes. The *gag* gene is expressed as a Gag polyprotein (p55^{gag} kDa). This polyprotein is cleaved during or shortly after the virion buds from the surface of the cell. Cleavage of the Gag polyprotein yields the capsid protein (CA, p28 kDa), the matrix protein (MA, p19 kDa) and the nucleocapsid protein (NP, p16 kDa) (Gogolewski et al., 1985; Cheevers et al., 1988; Schoborg, 2002; Goff, 2007).

p28 is the most abundant viral capsid protein (60 copies). Its detection is the predominant immunodiagnostic test because it is the first protein that is immunologically recognised by infected animals and typically remains detectable for a long period of time (Cheevers et al., 1988). Recently, some researchers have reported

that p55^{gag} would be a possible candidate for immunodiagnostic assays because it contains p28 and other precursor core protein epitopes (Rosati et al., 1999; Konishi et al., 2010).

MAbs are highly specific reagents that recognise a single epitope; thus, they are useful tools for identifying and characterising viral proteins. The aim of the present study was to investigate the molecular structure of the p28 and p55^{gag} epitopes in CAEV using MAbs and denaturant agents.

A CAEV viral strain (Brazilian isolate; Tigre et al., 2006) was propagated in GSMC (Goat Synovial Membrane Culture) in Eagle's minimal essential medium (E-MEM, Gibco®, MA, USA) supplemented with 2% foetal bovine serum (FBS, Gibco®, MA, USA). The infected cells, which were incubated at 37 °C, were harvested when an 80% cytopathic effect was observed (15 days). The cell culture was cleared of debris by centrifugation at 16,000 × g for 20 min at 10 °C. The supernatant (1000 ml) was recovered, and the resulting pellet (cell-associated viral antigen; AgV) was resuspended in 2.5 ml (1:400) phosphate buffered saline (PBS) and stored at –70 °C. The supernatant (1000 ml) was concentrated by precipitation with PEG 8000 according to Fontes et al. (2005), and the precipitate (virus-PEG-precipitate, VPP) was resuspended in a smaller volume of PBS (1.25 ml, 1:800). Aliquots of this preparation were assayed for viral infectivity in GSMC (10⁵ TCID₅₀/ml) and for protein concentration (Bio-Rad Protein assay, CA, USA).

* Corresponding author. Tel.: +55 71 32350937; fax: +55 71 32350937.
E-mail address: sissardi@yahoo.com.br (S.I. Sardi).

The AgV was submitted to SDS (AgV-SDS) and β -ME treatments (AgV- β -ME). The AgV was incubated for 10 min at room temperature in 0.1% SDS (v/v) (0.28 M), with frequent homogenisations, followed by centrifugation for 15 min at 10,000 \times g. The supernatant was collected and stored at -70°C (AgV-SDS). The AgV was incubated at 37°C for 45 min in 1.2% β -ME (v/v) with brief homogenisation and then stored at -70°C until use (AgV- β -ME) (Harith et al., 1995; Bass et al., 2006).

For hybridoma production, four-week-old BALB/c mice were injected intraperitoneally with 50 μg of VPP emulsified with Freund's complete adjuvant (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA). At two-week intervals, three intraperitoneal injections of 25 μg VPP emulsified with Freund's incomplete adjuvant were performed. One month later, mice were boosted with 25 μg VPP in sterile saline solution (NaCl 0.15 M) and sacrificed 4 days later. Their spleen cells (5×10^6) were fused to SP2/0 myeloma cells (1×10^6) in 1 ml of 50% (w/w) PEG 1540 (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA). After centrifugation, the pellet was resuspended in Iscove's modified medium supplemented with 10% FBS and Hypoxanthine-aminopterin-thymidine (Invitrogen, USA) and distributed into 96-well microplates. An indirect ELISA was used to screen the hybridoma supernatants for reactivity against CAEV (see below). The positive hybridomas were selected and cloned twice by limiting dilution. The positive clones (F12, A9, B9, C7, G7 and H9) were expanded in a culture flask. The cells were injected into pristane-treated BALB/c mice (10^6 cells/mouse) to obtain ascitic fluid for Western blot and ELISA analyses. Isotyping of the MABs was performed using a commercial kit (Bio-Rad, CA, USA) according to the manufacturer's instructions.

Enzyme immunoassay was used for screening hybridoma supernatants. Microtiter plates (NUNC, Maxisorp™) were coated with VPP (3 μg /well) diluted in carbonate buffer (15 mM Na_2CO_3 , 35 mM NaHCO_3 , pH 9.6) and incubated overnight at 4°C . A blocking solution of 5% powdered skim milk in PBS (SM-PBS) was added to each well and incubated for 1 h at 37°C . Wells were washed 5 times with PBS containing 0.05% Tween 20 (PBS-T). Hybridoma supernatants were added to each well, and the plates were incubated overnight at 4°C . After the wells were washed 5 times, they were filled with 100 μl horseradish peroxidase (HRP)-conjugated anti-mouse IgG (1:5000 dilution, Sigma-Aldrich, St. Louis, USA) and incubated for 1 h at 37°C . For colour development, the 3,3',5,5'-tetramethylbenzidine (TMB) (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA) substrate was added. The reaction was allowed to develop for 20 min, and 0.125% hydrofluoric acid (IDDEX Lab, Inc., ME, USA) was added as stop solution. The absorbance values were measured at 630 nm.

Polyclonal antibodies were obtained for comparative analysis with MABs. A six-month-old female New Zealand rabbit weighing 2 kg and seronegative against CAEV was subcutaneously inoculated with 50 μg of VPP emulsified in Freund's complete adjuvant (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA). After 20 days, the rabbit was inoculated with 50 μg of VPP emulsified in Freund's incomplete adjuvant. This procedure was repeated again after 20 days, and a final bleed was performed by cardiac puncture. For comparative analysis with MABs, the polyclonal antiserum was assayed by Western blotting and ELISA.

Analysis of the viral proteins was performed using a 5–15% slab SDS-PAGE. Samples of VPP, AgV, AgV-SDS, AgV- β -ME and mock-infected GSMC (30 μg /well) were heated at 100°C for 3 min in denaturing buffer (30 mM Tris, pH 6.8, 10% 2- β -mercaptoethanol, 2% SDS, 10% glycerol and 0.01% bromophenol blue). Molecular weight markers (Low molecular weight range; Amersham Pharmacia Biotech, Brazil) were included in each run. After electrophoresis, viral proteins were stained with Coomassie brilliant blue or transferred to a nitrocellulose membrane by electroblotting (100V, 1 h). The membrane was cut into strips and blocked with SM-PBS

solution for 1 h at 37°C . Then, the strips were incubated overnight with each MAb (1:10, ascitic fluid) or rabbit polyclonal antiserum (1:500) at 4°C . After the membrane strips were washed 3 times with PBS-T for 10 min, an HRP-conjugated goat anti-rabbit or anti-mouse IgG (1:1000 dilution, Sigma-Aldrich, St. Louis, USA) was added to detect bound antibodies. After a final wash, the colour development was performed using a 3,3 diaminobenzidine (DAB) solution at 10 mg/ml, which was supplemented with fresh hydrogen peroxide to 0.08%. The membrane strips were dried and then photographed.

The indirect ELISA test for MABs was performed as described by Torres et al. (2009) with some modifications. Briefly, the polystyrene plate (NUNC-MAXISORP™) was adsorbed with AgV, AgV-SDS, AgV- β -ME or control uninfected GSMC (3.0 μg /well) in carbonate buffer and incubated at 4°C overnight. The plate was then blocked with SM-PBS solution. Each MAb (ascitic fluid) and the polyclonal antiserum were serially diluted (1:10 to 1:3200) in SM-PBS solution supplemented with 0.3% Tween 20 and incubated overnight. The MABs and the polyclonal antiserum were subsequently incubated with HRP-conjugated goat anti-mouse IgG or HRP-conjugated anti-rabbit IgG (1:10,000, Sigma-Aldrich, St. Louis, USA). For colour development, TMB (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA) substrate was added. The reaction was allowed to develop for 20 min and stopped with 0.125% hydrofluoric acid (IDDEX Lab, Inc., ME, USA). The absorbance values were measured at 630 nm. Data analysis was performed using the SPSS 16.0 software package for Windows (SPSS Inc., Chicago, IL, USA). The Mann-Whitney non-parametric test was used to determine the statistically significance differences between AgV and denaturing treatments assessed using ELISA ($p < 0.05$).

The following six hybridomas against CAEV were obtained: F12, A9, G7, C7, B9 and H9. Isotype determination identified the six MABs as IgG1 kappa chain.

Western-blotting analysis revealed differences in MAB reactivity depending on the antigen preparation method. All of the MABs were reactive against p28 and showed a faint reaction to p36 (36 kDa, intermediate product of p55^{gag} cleavage) with VPP (Fig. 1, Lane 2). However, with AgV, all of the MABs were reactive against p28 and several other proteins, such as p36, p44 and p55^{gag} (Fig. 1, Lane 1). These were all viral-specific bands because cross-reactivity to mock-infected GSMC was not observed with the MABs (Fig. 1, Lane 3).

To characterise the p28 and p55^{gag} epitopes, subsequent studies were performed to analyse AgV after denaturation. First, each antigen preparation was comparatively analysed by protein electrophoresis (Fig. 2). The protein pattern for AgV was identical after SDS treatment. However, after AgV was treated with β -ME, slight differences were observed; specifically, faint protein bands larger than 44 kDa were observed (Fig. 2A, Lines 1, 2 and 3). Second, after denaturing, the reactivity of the MABs against AgV was assessed by Western blot analysis. Fig. 2B, Lane 1 shows the MAB reactivity against AgV. The MABs were reactive against several proteins, such as p55, p44, p36, p28 and p22. After SDS treatment, the reactivity profile of the MABs was the same as that of AgV, except that a weak reaction to p44 was observed (Fig. 2B, Lane 2). A different situation was observed using AgV- β -ME. MAB F12 maintained reactivity only to the p28 and p44 proteins and was weakly reactive to p55^{gag}. The polyclonal antibody reactivity pattern was assessed by Western blot analysis and is shown in Fig. 2C. The polyclonal antibodies more intensely recognised proteins larger than 40 kDa, and the profile of reactivity between AgV and AgV-SDS were not significantly different (not performed with AgV- β -ME).

The comparative immunoreactivity of each MAB to AgV, AgV-SDS and AgV- β -ME was evaluated using ELISA. As shown in Fig. 3, all of the MABs had high titres to AgV ($\geq 1:3200$). Conversely, the titres decreased progressively when exposed to AgV-SDS or AgV- β -ME

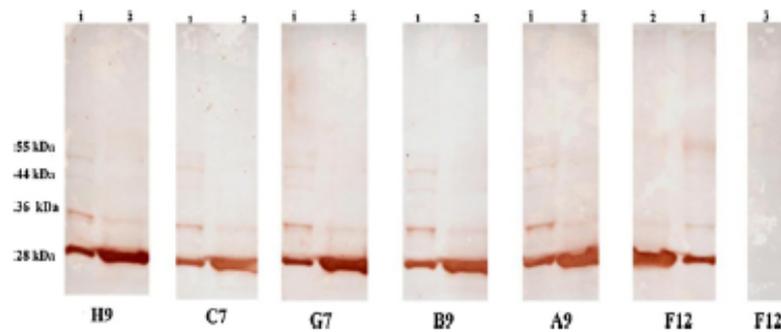


Fig. 1. Western blot analysis of MAb against CAEV. AgV (Lane 1), VPP (Lane 2) and mock-infected GSMC (Lane 3). Each MAb (ascitic fluid) was diluted 1:10, and after overnight incubation, HRP-conjugated goat anti-mouse IgG was added. The molecular weights of the viral proteins are indicated on the left.

($p < 0.05$) with similar patterns of reactivity to AgV-SDS and AgV- β -ME ($p > 0.05$). MAbG7 demonstrated a different profile, showing a similar reactivity pattern to AgV and AgV-SDS and low reactivity to AgV- β -ME ($p < 0.05$). The reactivity pattern for the polyclonal antiserum is also depicted in Fig. 3. The polyclonal antiserum exhibited a similar profile, with high titres to AgV and AgV-SDS ($\geq 1:3200$) (not tested with AgV- β -ME). A cross-reactivity was observed to non-infected GSMC at lowest dilutions.

The present study shows that all MAb obtained against CAEV react strongly to p28, which is the most immunogenic viral core protein, but reactivity was not exclusive to p28. It was demonstrated that the MAb also reacted against p55^{gag}, p44, p36 and p22. The multiple bands that were observed reflect the related antigenicity of all of these proteins. The p44, p36 and p22 viral proteins are thought to be derived after the cleavage of p55^{gag} during viral maturation (Belov and Whalley, 1988; Schoborg, 2002). The role of these intermediary proteins in the formation of the viral core is unknown. Because of the disproportionate abundance of certain proteins in the viral core (60 copies of p28), some authors suggest that cleavage of these intermediates could be involved in the formation of the viral protein core (Cheevers et al., 1988).

Depending on the location of the epitope, protein denaturation sometimes alters the antigen-antibody binding site. Two denaturing agents were used to study the molecular structure of the epitope, an anionic surfactant (SDS), which linearises the protein structure (Filho and Volpe, 1994; Volpe and Perles, 2005), and β -ME, which disrupts the cross-linked disulphide bonds (Cys

residues) (Harith et al., 1995; Bass et al., 2006). When the antigen was subjected to denaturation, the epitope in p28 recognised by the MAbF12 was not disrupted. This was true for both SDS and β -ME treatments. These results suggest that the molecular conformation or structure of the antibody binding site on the CA protein is an epitope that is linear or continuous and does not contain intramolecular disulphide bonds. This result suggests that CAEV p28 resembles the HIV p24 protein binding site (falta bibliografia).

The denaturing treatment altered the recognition of p55^{gag} and the intermediate protein products; specifically, the SDS treatment denatured the epitope in p44. Most likely, the molecular structure of the p44 was linearised by the SDS treatment, and the integrity of the conformation-dependent epitope was compromised. Thus, the MAb cannot bind if the epitope is denatured or fragmented. Treatment with β -ME showed more dramatic results. The epitopes in p55^{gag}, p36 and p22 were not recognised by the MAbF12 after treatment with β -ME. β -ME cleaves disulphide bonds that are formed between Cys residues and denatures the protein (Harith et al., 1995). This finding suggests that the epitope in these three proteins is associated with dimeric proteins or regions that have cross-linked disulphide bonds, most likely in Cys-rich regions.

The binding activity of the MAb after antigen denaturation was also investigated by ELISA. The binding activity decayed with statistically significant differences after the denaturing treatments, and only one MAb (MAbG7) showed a similar profile between AgV

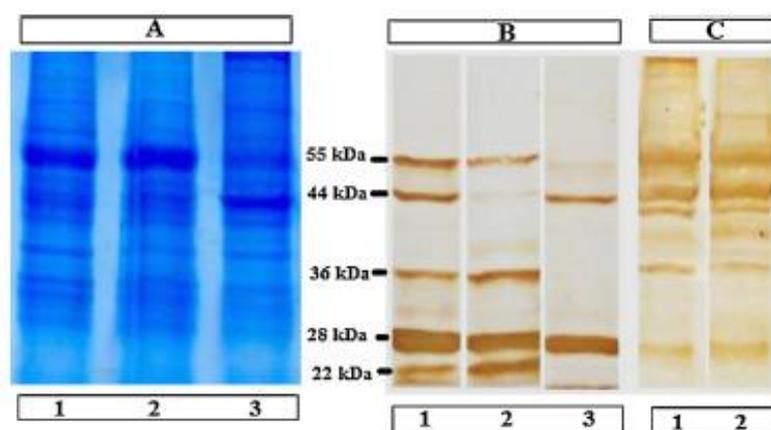


Fig. 2. SDS-PAGE and Western blot analysis. Effect of denaturing treatments on viral proteins. (A) SDS-PAGE 5–15% under reducing conditions stained with Coomassie blue: AgV (Lane 1), AgV-SDS (Lane 2) and AgV- β -ME (Lane 3). (B) Reactivity of MAbF12 (ascitic fluid) by Western blot analysis. Ag-V (Lane 1), AgV-SDS (Lane 2) and AgV- β -ME (Lane 3). (C) Reactivity of polyclonal antiserum by Western-blotting. AgV (Lane 1), AgV-SDS (Lane 2). The molecular weights of the viral proteins are indicated in the centre.

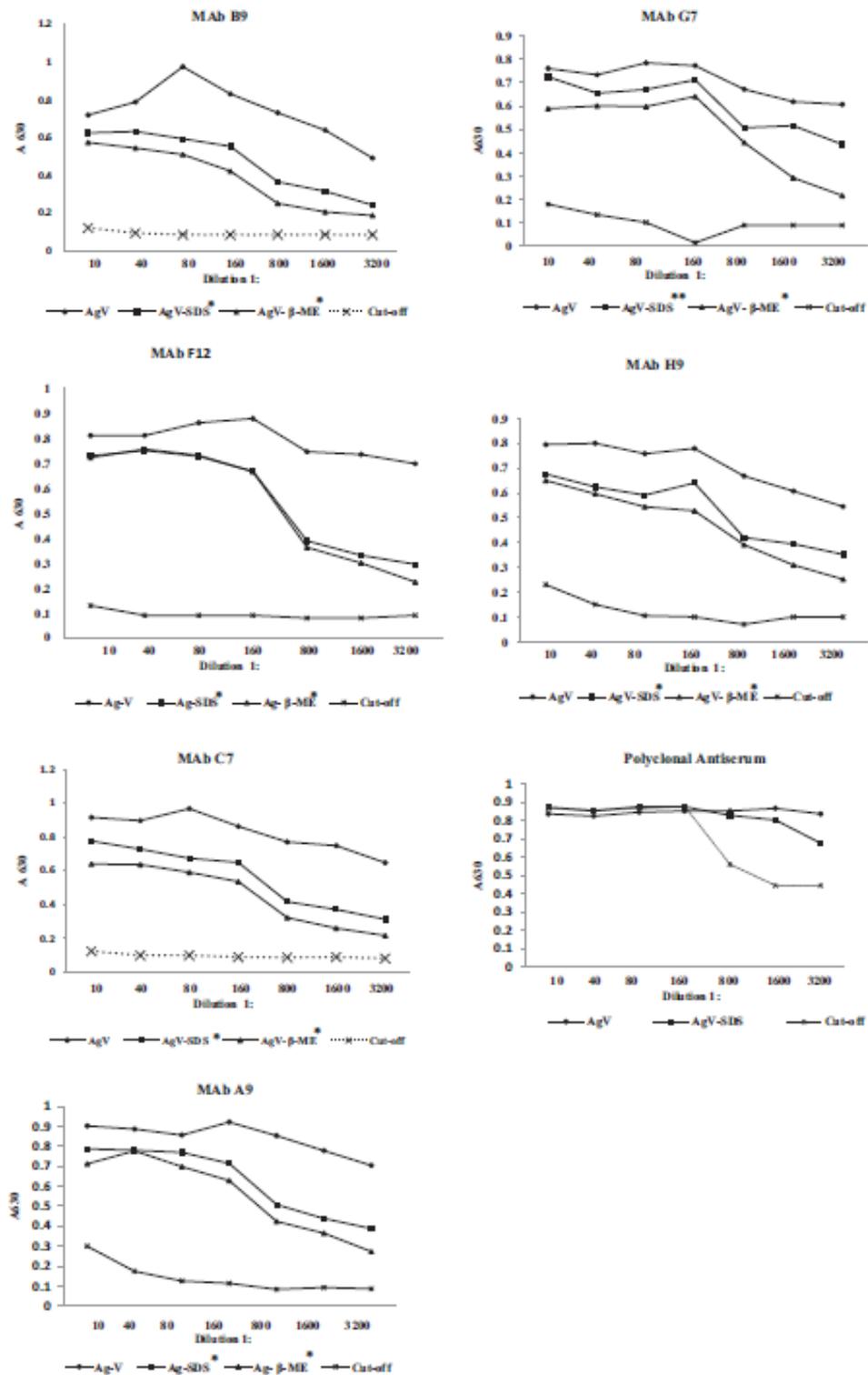


Fig. 3. Binding activity of six MAbs against CAEV by ELISA. The microplates were adsorbed with AgV, AgV-SDS, AgV-β-ME or mock-infected GSMC. Initially, MAbs (ascitic fluid) or polyclonal antiserum was diluted from 1:10 to 1:3200, and after overnight incubation, HRP-conjugated goat anti-mouse IgG or goat anti-rabbit IgG (1:5000) was added. The statistical significance of the differences was tested using the Mann-Whitney test. $p < 0.05$ was considered significant. Asterisks, significant difference between AgV and the denaturing treatment (* $p < 0.05$) (** $p > 0.05$).

and AgV-SDS. Additionally, it was observed that MAbF12 and all of the MABs had a high immunoreactivity against AgV- β -ME. This observation was unexpected considering that the MAbF12 recognised only p28 and p44, as previously determined by Western blot analysis. A possible explanation for this finding is that many proteins undergo adsorption-induced conformational changes when they are adsorbed onto a polystyrene solid (Chen et al., 2004). These changes could interact or promote protein cross-linking that would alter or improve the reactivity of the epitope and could make it accessible for MAb binding. The binding activity of the polyclonal antiserum after antigen denaturation was also investigated by ELISA. Conversely to MABs, showed a similar profile between AgV and AgV-SDS that was likely due to the similar patterns previously demonstrated by Western blotting.

In conclusion, the present work demonstrates that all MABs against CAEV are strongly reactive against p28 and its precursor p55^{pp8}. It was demonstrated with MAbF12 that the highly immunogenic p28 protein contains a linear epitope that is detergent-stable and is not altered by β -ME treatment, unlike the epitope in the polyprotein precursor p55^{pp8}, which is susceptible to denaturing treatments. These findings suggest that the p28 epitope is presented differently from the polyprotein precursor p55^{pp8} epitope. Similar situations have been found for other lentiviruses, such as HIV and Equine Infectious Anaemia Virus (Henderson et al., 1987; Hussain et al., 1988; Truong et al., 1996). However, this report is the first that biochemically characterises the epitopes in the CAEV p28 and p55^{pp8} proteins using denaturing treatments.

Acknowledgments

We are grateful for financial support from FAPESB (Bahia, Brazil), Banco do Nordeste-(FUNDECI) (Ceara, Brazil).

References

- Bass, E.M., Mansour, D., Mutasim, M., Hussein, M., Harith, A., 2006. β -Mercaptoethanol-modified ELISA for diagnosis of visceral leishmaniasis. *J. Med. Microbiol.* 55, 1193–1196.
- Belov, L., Whalley, J.M., 1988. Virus-specific polypeptides of caprine arthritis-encephalitis virus recognized by monoclonal antibodies to Virion Proteins p24 and p14. *J. Gen. Virol.* 69, 1097–1103.
- Cheevers, W.P., Stem, T.A., Knowles, D.P., McGuire, T.C., 1988. Precursor polypeptides of Caprine arthritis-encephalitis lentivirus structural proteins. *J. Gen. Virol.* 69, 675–681.
- Chen, W.L., Huang, H.C., Liu, H.C., Li, W., Mao, S.J.T., 2004. Distinction between dry and raw milk using monoclonal antibodies prepared against dry milk proteins. *J. Dairy Sci.* 87, 2720–2729.
- Filho, E.A.S., Volpe, P.L.O., 1994. Estudo da interação proteína-surfactante pelo método de equilíbrio de dialise. *Quim. Nova* 17, 199–204.
- Fontes, L.V., Campos, S.G., Beck, P.A., Brandão, C.F.L., Sardi, S.I., 2005. Precipitation of bovine rotavirus by polyethylen glycol (PEG) and its application to produce polyclonal and monoclonal antibodies. *J. Virol. Methods* 123, 147–153.
- Goff, S.P., 2007. Retroviridae: the Retroviruses and their replication. In: Knipe, D.M., Howley, P.M. (Eds.), *Fields Virology*. fifth ed. Lippincott, Williams and Wilkins, Philadelphia, pp. 1999–2069.
- Gogolewski, R.P., Adams, D.S., McGuire, T.C., Banks, K.L., Cheevers, W.P., 1985. Antigenic cross-reactivity between Caprine arthritis-encephalitis, Visna and progressive pneumonia viruses involves all virion-associated proteins and glycoproteins. *J. Gen. Virol.* 66, 1233–1240.
- Harith, A.E., Chowdhury, S., Al Massum, A., Samiao-Santos, S., Karim, E., El Safi, S., Haque, I., 1995. Evaluation of cleaving agents other than trypsin in direct agglutination test for further improving diagnosis of visceral leishmaniasis. *J. Clin. Microbiol.* 33, 1984–1988.
- Henderson, L.E., Sowder, R.C., Smythers, G.W., Oroszlan, S., 1987. Chemical and immunological characterizations of equine infectious anemia virus gag-encoded proteins. *J. Virol.* 61, 1116–1124.
- Hussain, K., Issel, C., Rwambo, P.M., Arnizaut, A.B., Ball, J.M., Snorr, K.L., Montelaro, R.C., 1988. Identification of gag precursor of equine infectious anemia virus with monoclonal antibodies to the major viral core protein p26. *J. Gen. Virol.* 69, 1719–1724.
- Konishi, M., Yamamoto, T., Shimada, T., Shirafuji, H., Kameyama, K., Sentsui, H., Murakami, K., 2010. Development of enzyme-linked immunosorbent assay for detection of antibody against Caprine arthritis encephalitis virus using recombinant protein of the precursor of the mayor core protein p55^{pp8}. *J. Vet. Diagn. Invest.* 22, 415–419.
- Rosati, S., Mannelli, A., Merlo, T., Ponti, N., 1999. Characterization of the immunodominant cross-reacting epitope of visna maedi virus and caprine arthritis-encephalitis virus capsid antigen. *Virus Res.* 61, 177–183.
- Schoborg, R.V., 2002. Analysis of Caprine arthritis encephalitis virus (CAEV) temporal gene expression in infected cells. *Virus Res.* 90, 37–46.
- Tigre, D.M., Campos, G.S., Sardi, S.I., 2006. Isolamento do vírus da Artrite-encefalite caprina a partir do co-cultivo de células mononucleares do sangue com células de membrana sinovial de cabras. *R. Ci. Med. Biol.* 5, 100–108.
- Torres, J.A., Campos, G.S., Freitas, M.M., Brandão, C.F.L., Sardi, S.I., 2009. Produção de antígeno viral para o sorodiagnóstico da Artrite encefalite caprina utilizando um teste imunoenzimático (ELISA). *R. Ci. Med. Biol.* 8, 107–114.
- Truong, C., Brand, D., Mallet, F., Roingeard, P., Brunet, S., Barin, F., 1996. Assembly and immunogenicity of chimeric GAG-Env proteins derived from the human immunodeficiency virus type 1. *AIDS Res. Hum. Retroviruses* 4, 291–301.
- Volpe, P.L., Perles, C.E., 2005. Calorimetric study of the antibacterial activity of sodium n-alkylsulfates on the metabolism of *Chromobacterium violaceum*. *J. Braz. Chem. Soc.* 16, 1085–1088.

CAPÍTULO 5

MANUSCRITO 2

CHARACTERIZATION OF MONOCLONAL ANTIBODIES AGAINST CAPRINE ARTHRITIS-ENCEPHALITIS VIRUS (CAEV)

A ser enviado para a revista *Veterinary Immunology and Immunopatology* (ISSN 0165-2427).

CHARACTERIZATION OF MONOCLONAL ANTIBODIES AGAINST CAPRINE ARTHRITIS-ENCEPHALITIS VIRUS (CAEV)

Camila Fonseca Lopes Brandão^{1,2*}, Gubio Soares Campos¹, Julianna Alves Torres^{1,3},
Dellane Martins Tigre^{1,4}, Michael Menezes Freitas^{1†}, Silvia Ines Sardi¹.

¹Universidade Federal da Bahia, Salvador, Bahia

²Instituto Federal de Educação Ciência e Tecnologia Baiano, Santa Inês, Bahia

³Instituto Federal de Educação Ciência e Tecnologia Baiano, Uruçuca, Bahia

⁴Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia, Jequié, Bahia.

† *In memoriam*

Author for correspondence:

Camila Fonseca Lopes Brandão

Laboratory of Virology, Department of Biointeraction, Health Science Institute,

Universidade Federal da Bahia,

Avenida Reitor Miguel Calmon, S/N, Vale do Canela 40110-100

Salvador, Bahia, Brazil

E-mail: mylacamyla@gmail.com (BRANDÃO, C. F. L.).

ABSTRACT

Monoclonal antibodies (MAbs) are important tools for the diagnosis of various diseases. Characterization is important for determining the reactivity, specificity, and sensitivity of MAbs in the antigen detection. In this study, six MAbs against Caprine Arthritis-Encephalitis Virus (CAEV), i.e., F12, A9, C7, G7, H9, and B9, were isotyped and characterized using various methods such as agar gel immunodiffusion, indirect immunofluorescence (IIF), indirect ELISA, Dot-Blot, and combined ELISA. Examination of the immunological characteristics of these MAbs revealed that they are IgG1 immunoglobulins κ -type light chains, and they do not show precipitation activity. IIF analysis showed that all MAbs could detect CAEV in infected goat synovial membrane cells, demonstrating their specificity for detection of the viral protein. Low titers of MAbs were detected using indirect ELISA, however, higher titers were detected with the Dot-Blot method. By using a combination of MAbs in the combined ELISA method, a higher detection rate of CAEV was achieved, suggesting the advantage of using a combination of some MAbs such as A9 with G7, C7, and F12 MAbs. The specificity of MAbs for antigen recognition in immunoenzymatic assays, particularly when reacted with viral proteins and cell proteins as in the case of IIF, suggests its potential use for the detection of CAEV in viral isolates and in animal secretions containing infected cell, such as milk from dairy goats.

Keywords: CAEV, Monoclonal antibodies, p28, Characterization.

INTRODUCTION

The Caprine arthritis-encephalitis virus (CAEV) belongs to the Retroviridae family, Lentiviridae subfamily, and *Lentivirus* genus. CAEV is an enveloped virus characterized by diploid RNA and protected by a triple protein layer consisting of a matrix (MA), the capsid protein (CA), and linked protein to the nucleic acid (NA). The viral envelope involves the capsid and displays glycoproteins that are responsible for the adhesion of the virus to the host cell (Callado et al., 2001; Goff, 2006; Husso et al., 1988; Murphy et al., 1999). CAEV infection induces a slow immune response (Cheevers et al., 1981) and the production of antibodies against CAEV in infected animals mainly targets a CA protein, known as p28 (De La Concha-Bermejillo et al., 1995).

Monoclonal antibodies (MAbs) are homogeneous and highly specific immunological reagents (Nelson et al., 2000) that can be used for diagnostic purposes or to study a specific antigen (Ladyman and Ritter, 1995). The characterization of a MAb involves the analysis of antibodies produced by a hybridoma cell line and the determination of their behavior using different types of assays. MAb characterization is essential because some MAbs react properly under specific conditions and not in others. On the other hand, under certain circumstances, MAbs can cross-react or display dual specificity, which is possibly due to the recognition of different antigens with epitopes showing similar conformations or chemical composition. This aspect is important in determining the potential use of MAbs in diagnostics (Nelson et al., 2000). Characterization of MAbs can also determine whether their combined use in a single assay improves the detection of the target antigen (Parker, 1976, 1990; Margni et al., 1996). Therefore, this study analyzed the immunological characteristics and reactivity of MAbs produced against CAEV through isotyping and immunological techniques such as agarose gel immunodiffusion (AGID), indirect immunofluorescence

(IIF), indirect ELISA, and dot-blot, which determines the reactivity profile of a MAb against the viral antigen.

MATERIAL AND METHODS

Production of the virus. The viral strain DECENTE (Brazilian isolate; Tigre et al., 2006) was propagated in Goat Synovial Membrane (GSM) cell monolayers, in Dulbecco's minimum essential medium (D-MEM, Gibco®MA, USA) supplied with 2% fetal bovine serum (FBS, Gibco®, MA, USA). After the appearance of a viral cytopathic effect (10 to 15 days), the infected cultures were subjected to two cycles of freezing and thawing and centrifuged at 10,000g for 30 min at 4°C. The cell pellet (AgV) was collected and stored at -20°C until analysis. The infectious titer was $10^{4.5}$ TCID₅₀/mL (tissue-culture-infective doses) (Reed and Muench, 1938). The AgV was used as viral antigen in techniques of indirect ELISA, dot-blot, and combined ELISA. The protein concentration of AgV was assessed by using a commercial kit based on the Lowry method (BIORAD, USA, Inc), in accordance with the manufacturer's instructions. The protein concentration was found to be 1.0 mg/mL. Uninfected GSM cells was also propagated and subjected to two cycles of freezing and thawing with subsequent centrifugation. The cell pellet was used as a negative control.

Monoclonal and polyclonal antibodies against CAEV. Six MAbs (F12, A9, B9, C7, G7, and H9) were used in the form of ascitic fluid and polyclonal antibodies (PAb) (Brandão et al., 2013) were used for comparative analysis with MAbs.

Characterization of MAbs against CAEV. To characterize MAbs, isotyping, AGID, IIF, indirect ELISA, and dot-blot analyses were conducted. The isotype of the MAbs

was determined using a commercial kit (Bio-Rad, Brazil), which was based on an indirect ELISA technique, in accordance with the manufacturer's instructions.

The titration of MAbs was determined by indirect ELISA using flat-bottom polystyrene microplates (NUNC) coated with AgV (3 µg/well) that was diluted in 0.05 M carbonate-bicarbonate buffer (Na₂CO₃, 1.7g/L; NaHCO₃, 2.86 g/L) at pH 9.6, and subsequently incubated overnight at 4°C. A blocking solution of 5% powdered skim milk in PBS (0.5% milk-PBS) was added to each well and incubated for 1 h at 37 °C. The plates were then incubated with increasing dilutions of MAbs (1:10, 1:40, 1:80, 1:160, 1:800, 1:1,600, and 1:3,200) overnight at 4°C. Subsequently, the plates were incubated with peroxidase-conjugated mouse anti-IgG antibody (SIGMA), diluted to 1:5,000 in 0.05% PBS-milk, for 1 h at 37°C. The reaction was developed with a 3,3',5,5'-tetramethylbenzidine (TMB) solution (Sigma Chemical Co., Brazil). The reaction was allowed to develop for 10 min, and sulphuric acid (H₂SO₄ 0.5 mol/L) was added as stop solution. The plates were read in a spectrophotometer (Microplate Reader BIO-RAD Model 550) at a wavelength of 490 nm.

The reactivity of the MAbs was assessed by using a commercial AGID kit (Biovetech-Brazil). This test uses the p28 capsid protein as an antigen specific for CAEV. The first reading was taken after 24 h, whereas the confirmatory reading was recorded after 48 h. The results were interpreted based on the presence or absence of lines of precipitation between the MAbs and the viral antigen.

For IIF, GSM cells were grown on coverslips, infected with CAEV, and fixed in acetone for 10 min at -20°C immediately after the appearance of a cytopathic effect. The coverslips were incubated overnight at 4°C in a humidified incubator with each MAb (undiluted), washed with PBS (137 mM NaCl, 10 mM phosphate; 2.7 mM KCl; pH 7.4),

and incubated with a FITC-labeled mouse anti-IgG antibody (Sigma Chemicals Co.) (1:20) for 1 h at 37°C. The coverslips were then washed with PBS, subsequently counterstained with 0.01% Evans blue, and examined under fluorescence optics.

The sensitivity of MAbs in detecting the viral antigen was determined using the dot-blot technique, where different concentrations of AgV (21.4 µg, 10.7 µg, 5.35 µg, and 2.67 µg) were laid over a nitrocellulose membrane using the dot-blot multi-filter. The strips were blocked with a solution of 5% skimmed milk in PBS (5% milk-PBS) to mask non-specific sites. Then, 1:5 diluted MAb (v/v 0.5% milk-PBS) was incubated overnight at room temperature followed by 1:1,000 mouse anti-IgG peroxidase-labeled antibody (v/v PBS)(Sigma Chemical Co.) incubation for 1 h at 37°C. The strips were developed with 3,3'-diaminobenzidine solution (DAB) (Sigma Chemical Co.) (10 mg/10 mL) in the presence of 0.015% hydrogen peroxide, 30 vol.

Combined use of MAb:ELISA. The ability of MAb to detect CAEV was assessed using the technique of combined ELISA. The plates were coated with the viral antigen (AgV) that was diluted in carbonate-bicarbonate buffer and incubated overnight at 4°C in a humidified incubator. The next day, the plates were blocked with a solution of 5% milk-PBS and incubated for 1 h at 37°C. Each MAb (F12, A9, B9, C7, G7, and H9) was diluted 1:20 (v/v 0.5% milk-PBS). Each well received 50 µL of the testing MAb (1/20) and 50 µL of the combined MAb (1/20). The controls were prepared using 50 µL of the testing MAb and 50 µL of 0.5% milk-PBS (MAb control). All wells had a final volume of 100 µL. The plates were incubated overnight at 4°C in a humidified incubator and peroxidase-labeled mouse anti-IgG antibody (Sigma Chemical Co.; dilution: 1:5,000) was added and incubated at 37°C for 1 h. Finally, the plates were washed and developed with a TMB solution in the

presence of hydrogen peroxide and after 15 min, H₂SO₄ (0.5 mol/L) was added to stop the reaction. The plates were read in a spectrophotometer at a wavelength of 490 nm.

RESULTS AND DISCUSSION

In this study, six MAbs against CAEV presented similar immunochemical profiles.

Isotype determination identified the presence of a specific immunoglobulin in all MAbs: IgG1 kappa chain (Table 1). The sole presence of IgG class antibodies is due to short-term consecutive immunizations as the generation of a response characterized by a relatively limited clonal expansion with IgM antibodies and the absence of cells memory development observed only with the first immunization. However, re-exposure to the same antigen leads to the induction of memory B cells and a consequent change of IgM for IgG (secondary immune response) (Ladyman and Ritter, 1995).

The capacity of MAbs to immunoprecipitate was analyzed by using the AGID test. However, in this case, it was not possible to visualize the precipitation formed due to binding between the antigen and the antibody. The absence of precipitation lines, visible to the naked eye and reflecting the antigen-antibody reaction in the form of immunoprecipitation, suggests that the MAbs were not multivalent. Multivalency is a property that antibodies should have for cross-reactions and formation of precipitating complexes, which make visualization possible during immunoprecipitation (Margni, 1996; Parker, 1976). Therefore, MAbs are often used to develop specific immunoassays; however, multivalency is essential for tests that require cross-reactions and formation of precipitating complexes such as the AGID test (Parker, 1976, 1990).

The specificity of MAbs is essential for antigen-specific reactions, especially when different proteins are capable of acting as cellular substrates. This property was assessed through the detection of viral antigens in infected GSM cells, which showed positive detection of all the MAbs (F12, A9, C7, G7, H9, and B9) (Figure 1). When exposed to uninfected GSM cells, the MAbs did not react with cellular proteins, which highlights their specificity. Figure 1 shows that MAbs detected viral proteins that are mainly found in the cytoplasm. The image also shows the presence of multinucleated cells that result from cell fusion during viral replication. In these cells, the cytoplasmic fluorescence was weaker, which may be associated with the onset of the final phase of viral replication, when the production of viral proteins decreases right before the release of virions (2).

The indirect ELISA assay showed low MAb titers in ascitic fluid, of up to 1:160 (Figure 2); lower values were detected for B9, which titers only doubled the value of the signal obtained with the cell antigen. These data were in contrast to the findings generated by the dot-blot assay, which showed that A9, H9, G7, C7, and B9 MAbs detected CAEV at a concentration up to 2.675 μg , whereas F12 MAb presented a lower sensitivity, using concentrations of up to 5.35 μg proteins (Figure 3). These results suggest that by adopting a secondary and/or tertiary conformation, antigenic determinants are internalized in protein, thus minimizing its exposure and consequent access to its epitope (3, 12). Moreover, several proteins can undergo conformational changes that are induced by the adsorption to a solid polystyrene surface, and these modifications could alter the reactivity of the epitope with MAbs (7)

Improving the exposure of protein epitopes or of multiple epitopes could favor antigenic recognition (Brandao et al., 2013). This finding suggests that combining MAbs will improve the detection of a specific viral antigen. The results showed that the

combination of MAbs led to an improvement in CAEV detection (Figure 4). The A9 MAb played a major role in the detection, especially when combined with G7, F12, or C7. Moreover, a higher sensitivity of detecting CAEV was observed when the G7 MAb was combined with the C7 MAb. The use of the G7 MAb combined with the H9 MAb resulted in a reduction in the sensitivity for the detection of CAEV, which may suggest that these MAbs recognize the same epitope, and therefore, are competing for the same binding site.

In conclusion, the antigenic specificity of F12, C7, B9, H9, G7, and A9 Mabs were examined using various immunoenzymatic assays; however, the combined use of different MAbs such as A9 MAb with G7, C7, and F12 MAbs is recommended to increase their efficiency. The higher specificity using MAbs that were exposed to viral proteins and proteins of cellular origin suggests their potential use in CAEV detection in viral isolates and secretions that are rich with infected cell material such as milk.

ACKNOWLEDGMENTS

The authors would like to thank FAPESB (Bahia-Brazil) and the Bank of Northeastern-FUNDECI (Ceará-Brazil) for financial support.

REFERENCES

Adams, D.S., Gogolewski, R.P., Barbet, A.F., Cheevers, W.P., 1985. Identification of caprine arthritis-encephalitis retrovirus proteins in immunodiffusion precipitin lines. *J. Gen. Vir.* 66,1139–1143.

Belov, L., Whalley, J.M., 1988. Virus-specific polypeptides of caprine arthritis-encephalitis virus recognized by monoclonal antibodies to virion proteins p24 and p14. *J. Gen. Virol.* 69,1097–1103.

Brandao, C.F.L., Campos, G.S., Silva, A.C.R., Torres, J.A., Tigre, D.M.T., Sardi, S.I., 2013. Monoclonal antibodies against caprine arthritis-encephalitis virus epitopes in the p28 and p55 gag viral proteins. *J. Virol. Meth.* 187, 352–356.

Callado, A.K.C., Castro, R.S., Teixeira, M.F. da S., 2001. Lentivírus de pequenos ruminantes (CAEV e Maedi-Visna): Revisão e perspectivas. *Pesq. Vet. Brás.* 21,87–97.

Cheevers, W.P., Roberson, S., Klevjer-Anderson, P., Crawford, T.B., 1981. Characterization of caprine arthritis-encephalitis virus: a retrovirus of goats. *Arch. Virol.* 67:111–117.

Cheevers, W., McGuire, T., Norton, L.K., Cordery-Cotter, R., Knowles, D., 1993. Failure of neutralizing to regulate CAE lentivirus expression in vivo. *Virology.* 196, 835–839.

Chen, W.L., Huang, H.C., Liu, H.C., Li, W., Mao, S.J.T., 2004, Distinction between dry and raw milk using monoclonal antibodies prepared against dry milk proteins. *J. Dairy Sci.* 87, 2720–2729.

De la Concha-Bermejillo, A., Brodie, S.J., Magnus-Corral, S., Bowen, R.A., Dematini, J.C., 1995. Pathologic and serologic responses of isogeneic twin lambs to phenotypically distinct lentiviruses. *J. Acquir. Immune Defic. Synd.* 8,116–123.

Goff, S.P., 2006. *Retroviridae: The retroviruses and their replication*. 2nd ed, pp. 1999-2069. *In*: B. N., Knipe, D.M., Howley, P.N., *Fields Virology*, 5th ed.

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.* 66,1233–1240.

Husso, L.D., Narayan, O., Hart, W.G., 1988. Sialic acid on the surface of caprine arthritis-encephalitis virus define the biological properties of the virus. *J. Virol.* 72,1974–1980.

Karush, F., 1978. The affinity of antibody: range, variability and the role of multivalence. *In*: Litman, G.W., Good, R.A., eds. *Comprehensive Immunology. Immunoglobulins*, New York, Plenum Medical Book. Vol. 5, pp. 85–116.

Ladyman, H.M., Ritter, M.A., 1995. *Monoclonal antibodies: Production engineering and clinical application*. Cambridge University Press. pp. 480.

Margni, R.A., 1996. *Inmunología e Inmunoquímica: Fundamentos*. 5^o Ed. Editora Médica Panamericana. Buenos Aires. pp. 176–200.

Murphy, F.A., Gibbs, E.P.J., Horzinek, M.C., Studdert, M.J., 1999. Retroviridae. In: *Veterinary Virology*, 3rd ed. USA: Academic Press, pp. 363–389.

Narayan, O., Joag, S.V., Chebloune, Y., Zink, M. C., Clements, J. E., 1997. Visna-Medi: The prototype lentiviral disease. In: Nathanson, N (coord.), *Viral Pathogenesis*. Philadelphia: Lippincott-Raven Publishers. pp. 657–668.

Nelson, P.N., Reynolds, G.M., Waldron, E.E., Ward, E., Giannopoulos, K., Murray, P.G., 2000. Monoclonal antibodies. *J. Clin. Pathol.* 53,111–117.

Parker, C.W., 1976. *Radioimmunoassay of Biologically Active Compounds*. Prentice-Hall, Englewood Cliffs, New Jersey. pp. 239.

Parker, C.W., 1990. Immunoassays. In: Deutscher, M.P. (ed.), *Guide to Protein Purification. Methods in Enzymology*. Vol. 182. pp. 700-718.

Reed, L.J., Muench, H., 1938. A simple method of estimating 50 per cent and point. *Am. J. Hyg.*, 27,493–497.

Schoborg, R.V., 2002. Analysis of caprine arthritis encephalitis virus (CAEV) temporal gene expression in infected cells. *Virus Res.* 90,37–46.

Tigre, D.M., Campos, G.S., Sardi, S.I., 2006. Isolamento do vírus da Artrite-encefalite caprina a partir do co-cultivo de células mononucleares do sangue com células de membrana sinovial de cabras. R. Ci. Med. Biol. 5, 100–108.

Table 1. Immunochemical profile and reactivity of MAbs against Caprine arthritis-encephalitis virus (CAEV)

AcM	Isotipificação	IDGA	IFI	Dot-blot
F12	IgG1, k	-	+	+
C7	IgG1, k	-	+	+
B9	IgG1, k	-	+	+
H9	IgG1, k	-	+	+
G7	IgG1, k	-	+	+
A9	IgG1, k	-	+	+

(+) Positive result

(-) Negative result

AGID: Agarose Gel Immunodiffusion test; IIF: Indirect Immunofluorescence

Figure captions

Figure 1. Indirect immunofluorescence. GSM cells infected with CAEV, incubated with MAbs (H9, F12, B9, G7, C7, and A9), followed by incubation with a polyclonal

antibody (PAb). Arrows indicate the presence of virus-induced multinucleated cells (cell fusion) after replication. *Cell antigen [negative control of goat synovial membrane (GSM) cells] incubated with PAb and F12 MAb.

Figure 2. Titration curve of MAbs against CAEV AgV. The assay was carried out by indirect ELISA. AgV (3 µg /well) was used as capture agent, exposed to increasing dilutions of MAb (1:10, 1:40, 1:80, 1: 160, 1:800, 1:1,600, and 1:3200), and subsequently incubated with peroxidase-conjugated mouse anti-IgG antibody (1:5,000). Optical densities higher than those found when MAbs were exposed to the cell antigen [negative control of goat synovial membrane (GSM) cells] were considered positive.

Figure 3: Characterization of MAbs by dot-blot analysis. (1) Viral antigen (AgV) and (2) Cell antigen [Negative control of goat synovial membrane (GSM) cells]. MAb (1/5) was used as primary antibody, and peroxidase-conjugated mouse anti-immunoglobulins as secondary antibody. The protein concentrations used for the assay are shown on the left side.

Figure 4. Combined ELISA. The assay was performed using the indirect ELISA. AgV (3 µg/well) was used as capture agent and exposed to 50 µL of the testing MAb (1/20), to which were added 50 µL of the combined MAb (1/20). The controls were prepared by using 50 µL of the testing MAb, to which were added 50 µL of 0.5% milk-PBS. All the wells had a final volume of 100 µL and were subsequently incubated with a peroxidase-conjugated mouse anti-IgG antibody (1:5,000). Spectrophotometric reading was performed at a wavelength of 490 nm.

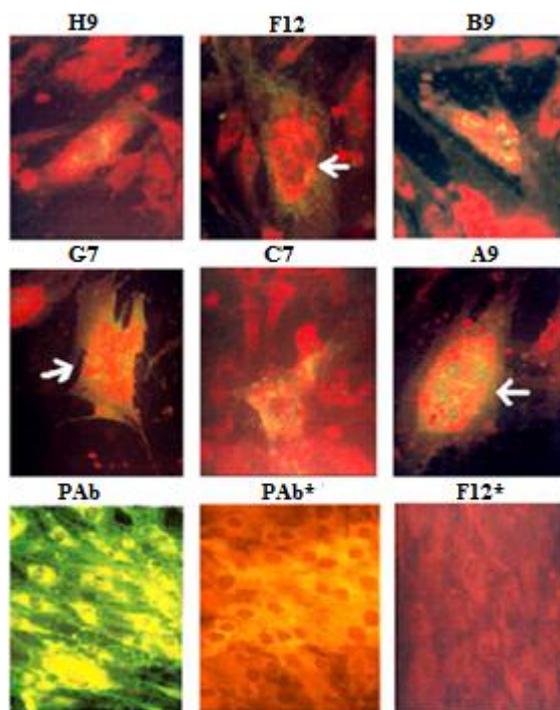


Figure 1

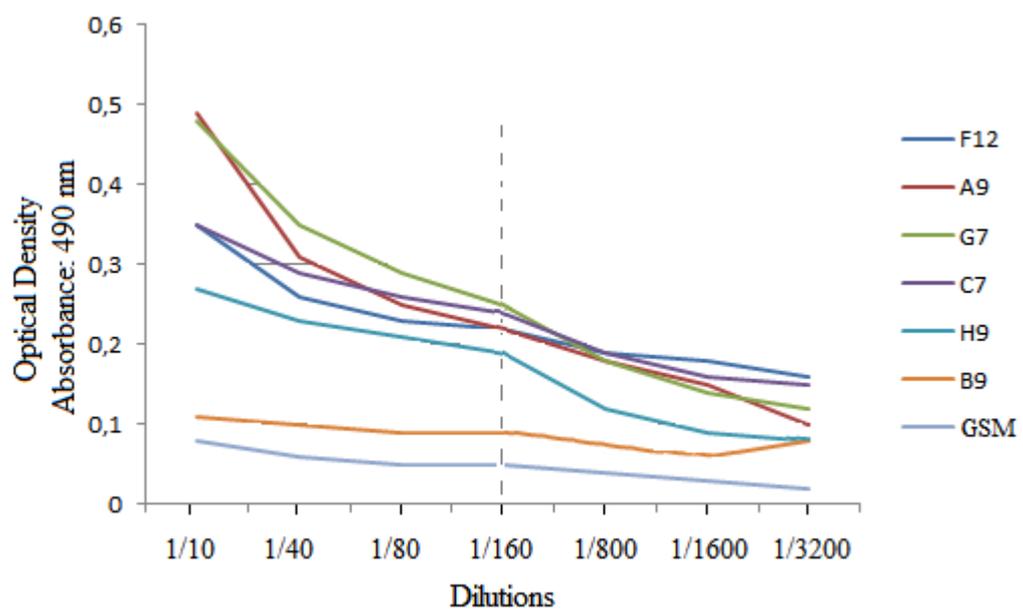


Figure 2

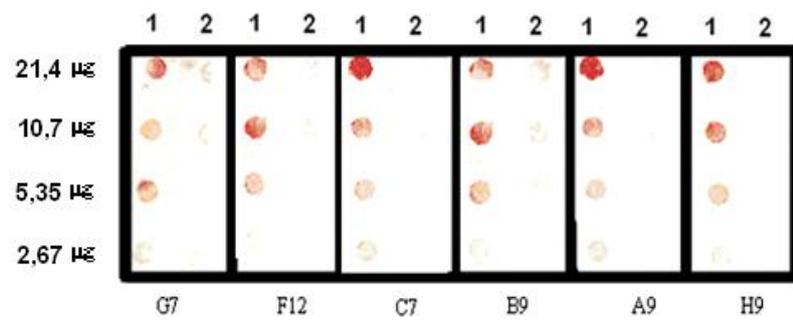


Figure 3

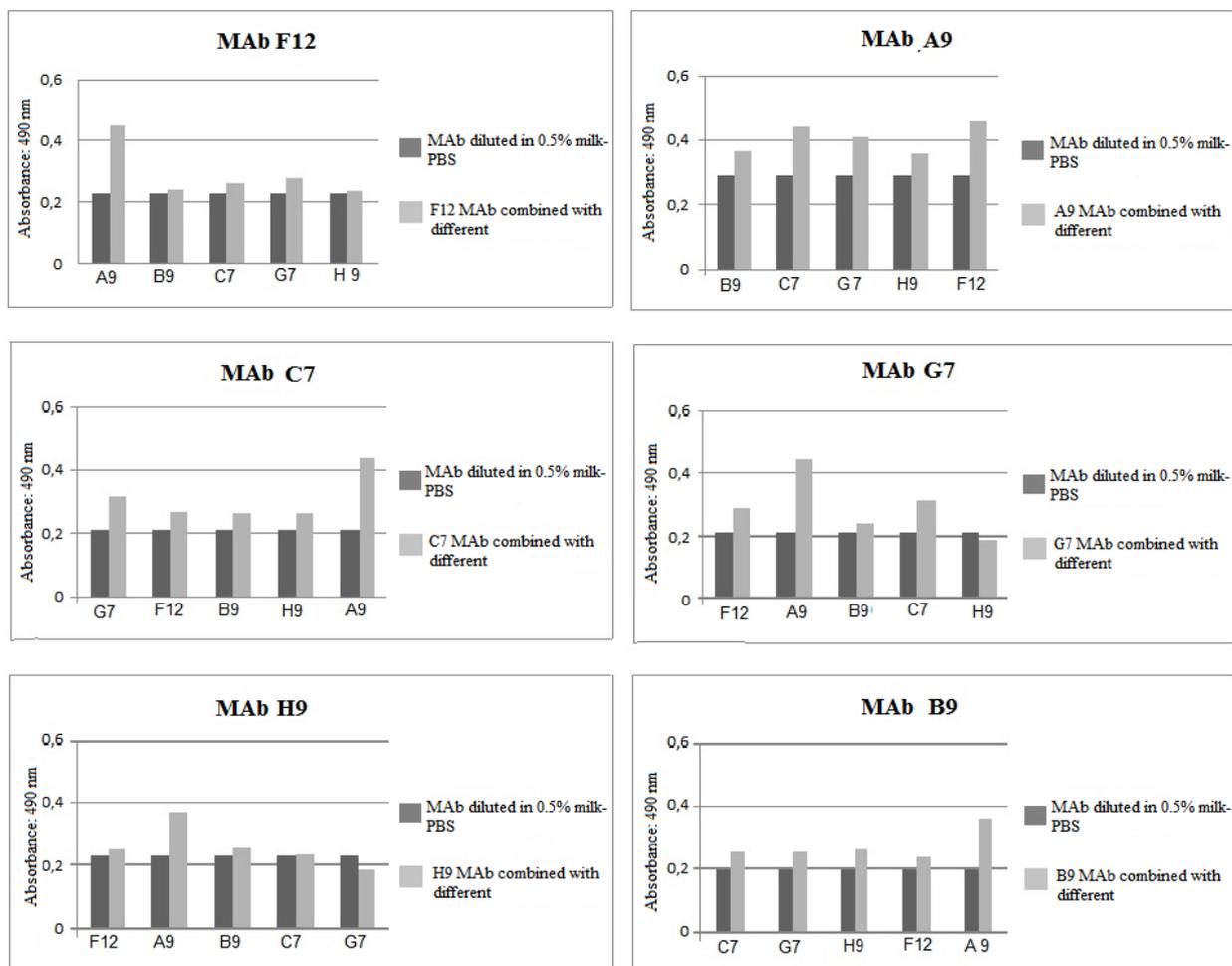


Figure 4.

CAPÍTULO 6

DEPÓSITO DE PATENTE

**PROCESSO DE DETECÇÃO DE ANTÍGENO DO VÍRUS
DA ARTRITE-ENCEFALITE CAPRINA (CAEV) EM CÉLULAS
DO LEITE DE CABRAS INFECTADAS**

Depósito de Patente

PROCESSO DE DETECÇÃO DE ANTÍGENO DO VÍRUS DA ARTRITE-ENCEFALITE CAPRINA (CAEV) EM CÉLULAS DO LEITE DE CABRAS INFECTADAS

Brandão, C. F. L.^{1,2}; Campos, G. S.¹; Torres, J. A.^{1,3}; Sardi, S.I.¹

¹ Laboratory of Virology, Department of Bio-interaction, Institute of Health Science, Universidade Federal da Bahia, Salvador, Bahia.

² Baiano Federal Institute of Education, Science and Technology Ciência e Tecnologia IFBaiano, Santa Inês, Bahia.

³ Sergipe Federal Institute of Education, Science and Technology Ciência e Tecnologia IFSE, Glória, Sergipe.

E-mail: camila.brandao@si.ifbaiano.edu.br

“PROCESSO DE DETECÇÃO DE ANTÍGENOS DO VÍRUS DA ARTRITE-ENCEFALITE CAPRINA (CAEV) EM CÉLULAS DO LEITE DE CABRAS INFECTADAS”.

RESUMO

A seguinte invenção consiste na apresentação de um processo de detecção precoce de antígeno do CAEV em células de leite de cabras infectadas, por meio da utilização de Anticorpos Monoclonais na técnica de Imunofluorescência Indireta. A invenção permitirá, ainda, a formulação de kits para diagnóstico precoce do vírus em rebanhos.

7. Declaração na forma do item 3.2 do Ato Normativo nº 127/97:

7.1 Declaro que os dados fornecidos no presente formulário são idênticos ao da certidão de depósito ou documento equivalente do pedido cuja prioridade está sendo reivindicada.

em anexo

8. Declaração de divulgação anterior não prejudicial: (Período de Graça):
(art. 12 da LPI e item 2 do AN nº 127/97)

em anexo

9. Procurador (74)

9.1 Nome:

9.2 CNPJ/CPF:

9.3 API/OAB:

9.4 Endereço completo:

9.5 CEP:

9.6 Telefone:

9.7 Fax:

9.8 E-Mail:

10. Listagem de sequências Biológicas (documentos anexados) (se houver):

Listagem de sequências em arquivo eletrônico: n° de CDs ou DVDs (original e cópia).

Código de controle alfanumérico no formato de código de barras: fl.

Listagem de sequências em formato impresso: fls.

Declaração de acordo com o artigo da Resolução INPI nº 228/09: fls.

11. Documentos anexados (assinale e indique também o número de folhas):
(Deverá ser indicado o nº total de somente uma das vias de cada documento)

<input checked="" type="checkbox"/>	11.1 Guia de Recolhimento	fls.	<input checked="" type="checkbox"/>	11.5 Relatório descritivo	9	fls.
<input type="checkbox"/>	11.2 Procuração	fls.	<input checked="" type="checkbox"/>	11.6 Reivindicações	1	fls.
<input type="checkbox"/>	11.3 Documentos de Prioridade	fls.	<input checked="" type="checkbox"/>	11.7 Desenhos	1	fls.
<input type="checkbox"/>	11.4 Doc. de contrato de trabalho	fls.	<input checked="" type="checkbox"/>	11.8 Resumo	1	fls.
<input checked="" type="checkbox"/>	11.9 Outros que não aqueles definidos no campo 11 (especificar) REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS				3	fls.

12. Total de folhas anexadas (referentes aos campos 10 e 11): 16 fls.

13. Declaro, sob penas da Lei, que todas as informações acima prestadas são completas e verdadeiras.

SALVADOR-BA, 14/06/2012

Local e Data


Prof. Marcelo Embiruçu
Pró-Reitor de Pesquisa, Criação e Inovação

Assinatura e Carimbo

6. INVENTORES (72):

- 6.1 Nome: SILVIA INES SARDI
6.2 Qualificação: DOUTORADO 6.3 CPF: 779.710.275-91
6.4 Endereço: AV REITOR MIGUEL CALMON, S/N, INSTITUTO DE
CIÊNCIAS DA SAÚDE, VALE DO CANELA, SALVADOR, BA,
BRASIL.
6.5 CEP: 40110-100 6.6 Telefone: 71-99878907
6.8 E-Mail: sissardi@yahoo.com.br

6. INVENTORES (72):

- 6.1 Nome: GUBIO SOARES SANTOS
6.2 Qualificação: DOUTORADO 6.3 CPF: 090.842.665-87
6.4 Endereço: AV REITOR MIGUEL CALMON, S/N, INSTITUTO DE
CIÊNCIAS DA SAÚDE, VALE DO CANELA, SALVADOR, BA,
BRASIL.
6.5 CEP: 40110-100 6.6 Telefone: 71-96259092
6.8 E-Mail: gubio@ufba.br

6. INVENTORES (72):

- 6.1 Nome: JULIANA ALVES TORRES
6.2 Qualificação: MESTRE 6.3 CPF: 825.882.795-20
6.4 Endereço: AV REITOR MIGUEL CALMON, S/N, INSTITUTO DE
CIÊNCIAS DA SAÚDE, VALE DO CANELA, SALVADOR, BA,
BRASIL.
6.5 CEP: 40110-100 6.6 Telefone: 71-99785527
6.8 E-Mail: jalvestorres@globo.com.br

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. ABREU, S.R.O.; CASTRO, R.S.; NASCIMENTO, S.A.; SOUZA, M.G. Produção de antígeno nucleoproteico do vírus da artrite-encefalite caprina e comparação com o do vírus Maedi-Visna para utilização em teste de imunodifusão em Agar gel. **Pesq. Vet. Brás.** v.18, n.2,p.57-60, 1998.
2. CALLADO, A.K.C.; CASTRO, R.S.; TEIXEIRA, M.F. da S. Lentivírus de pequenos ruminantes (CAEV e Maedi-Visna): revisão e perspectivas. **Pesq. Vet. Brás.** 21 : 87-97, 2001.
3. CAMPOS, G S ; Freitas,M.M. ; SILVA, A.C.R. ; TORRES, J A ; BRANDAO, C. F. L.; SARDI, S I . Production and characterization of monoclonal antibodies against the Caprine Arthritis-Encephalitis virus and their use for diagnosis. In: **XI congresso Argentino de Microbiologia.** v. 39. p. 141-141. , 2007.
4. COLFOR, A.;HALL, P.A. Monoclonal antibodies in oncology: diagnostic pathology In LADYMAN &RITTER (Eds.). **Monoclonal Antibodies-** Production, Engineering and Clinical application.. Cambridge: University Press, p. 209-246. 1997
5. COOFIN, J.M. Retroviridae : the viruses and their replication. In: FIELDS, B. Et al., **Virology.** 4th. ed. Philadelphia: Lippincott-Raven Publishers, v.2, p. 1767-1830. 2001.
6. COOK, D. B.; SELF, C.H. Monoclonal Antibodies in diagnostic immunoassays. In LADYMAN & RITTER (Eds.). **Monoclonal Antibodies** – Production, Engineering and Clinical Application. Cambridge: University Press, p.180-208.1995.
7. EAST, N.E.; ROWE, J.D.; DAHLBERG, J.E.; THEILEN, G.H.; PEDERSEN, N.C. Modes of trasmission of caprine arthritis-encephalitis virus infection. *Small Ruminant Research*, 10: 251-262, 1993.

8. GARCIA, M. Artrite-encefalite caprina: uma nova doença no Brasil. **A Hora Veterinária**, 76: 57-59, 1993.
9. GOFF, S. P. Retroviridae: the retroviruses and their replication. 2 ed, p. 1999-2069. In: **Fields Virology**, B. N., KNIPE, D. M., HOWLEY, P. N., 5 ed, 2006.
10. HARKISS, G.D.; WATT, N.J. Lentivirus infections and their detection. **Goat Vet. Soc. J.**,11 (1): 19-25,1990.
11. KNOWLES, D. P.; CHEEVERS W. P.; McGUIRE, T. C; STEM, T. A. and GORHAM J. R.. Severity of arthritis is predicted by antibody response to gp135 in chronic infection with caprine arthritis-encephalitis virus. **J. Virol.** 64:2396–2398. 1990.
12. KÖHLER G, MILSTEIN C. Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity. **Nature**, v. 256, p.495-497, 1975.
13. MSELLI-LAKHAL, L.; GUIGUEN, F.; FORNAZERO, C. DU J.; FAVIER, C.; DURAND, J.; GREZEL, D.; BALLEYDIER, S.; MORNEX, J. F.; CHEBLOUNE, Y.. Goat Milk epithelial cells are highly permissive to CAEV infection *in vitro*. **Virology**, v. 259, p.67-73, 1999.
14. MURPHY, F.A.; GIBBS, E.P.J.; HORZINEK, M.C.; STUDDERT, M.J. Retroviridae. In: **Veterinary Virology**, 3ed. USA: Academic Press, p.363-389. 1999.
15. NARAYAN, O.; CLEMENTS, J.E.; STRANDBERG, J.D.; CORK, L.C.; GRIFFIN, D.E. Biological characterization of the virus causing leukoencephalitis and arthritis in goats. **J. Gen. Virol.**, v.50, p. 69-79. 1980.

16. NELSON, P. N.; REYNOLDS, G. M.; WALDRON, E. E.; WARD, E.; GIANNOPOULOS, K.; MURRAY, P. G. Monoclonal antibodies. **Journal Clinical of Pathology**, v. 53, p. 111-117, 2000.

17. PINHEIRO, R.R.; GOUVEIA, A.M.G.; ALVES, F.S.F. Prevalência da infecção pelo vírus da artrite encefalite caprina no estado do Ceará, Brasil. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 31, n. 3, p. 449-454, 2001.

18. REILLY, L.K.; BAIRD, A.N.; PUGH, D.G. Enfermidades do Sistema Musculoesquelético. In: **Clínica de ovinos e caprinos**. São Paulo: Roca, p.251-286. 2004.

19. REISCHAK, D.; RAVAZZOLO, A.P.; MOOJEN, V. Imunofluorescência utilizando isolados brasileiros no diagnóstico sorológico de infecção por lentivírus em caprinos. *Pesq. Vet. Brás.* (22): 7-12, 2002.

20. SARDI, S I ; SILVA, A.C.R. ; TORRES, J A ; TIGRE, D M. ; BRANDAO, C. F. L. ; CAMPOS, G S . Produção e caracterização de anticorpos monoclonais e policlonais contra o vírus da Artrite Encefalite Caprina.. In: **XXXIII Conbravet - Congresso Brasileiro de Medicina Veterinária**, Cuabá, 2006.

21. SMITH, M. C., CUTLIP, R. Effects of infection with caprine arthritis-encephalitis virus on milk production in goats. **J. Am. Vet. Med. Assoc.**, v. 193, p. 63-7, 1988. B. P. Tratado de medicina veterinária interna de grandes animais. São Paulo: Manole,. P.1138-1139.1993.

22. TIGRE,D.M. Detecção do vírus da artrite-encefalite caprina através da técnica de Duple Nested PCR em amostras de sangue e leite. **Dissertação de Mestrado**. Dezembro 2003.

CAPÍTULO 7

7.1 CONCLUSÕES

- A obtenção de antígeno a partir da utilização de cultivos primários de MSC apresentou uma massa antigênica satisfatória para a hiperimunização dos camundongos usados na produção dos AcM, além de ser um método simples e de baixo custo;
- Foi aplicada com êxito a tecnologia para o desenvolvimento de AcM para o Vírus da Artrite-Encefalite Caprina, cepa viral Decente, com produção e seleção de 6 hibridomas.
- A eficácia da metodologia aplicada a produção do soro hiperimune foi comprovada pela reatividade apresentada nos ensaios de caracterização;
- O uso combinado de AcM pode melhorar a detecção do CAEV e proporcionar uma melhoria na sensibilidade do reconhecimento antigênico;
- A especificidade dos AcM na detecção da proteína viral foi observada quando estes foram enfrentados com uma diversidade proteica, comum em substratos celulares, o que sugeriria seu possível uso na detecção do CAEV em isolamentos virais e em secreções ricas em material celular, tal como o leite;
- A ausência de multivalência observada nos AcM dificultou a formação de imunocomplexos precipitantes, fundamento de certas técnicas sorológicas como a IDGA;

- A partir do estudo do perfil proteico do CAEV, foi demonstrado que todos os AcM reagem fortemente com a proteína da cápside (p28), e com poliproteínas precursoras (p55^{gag}, p44, p36 e p22);
- A conformação molecular reconhecida pelo sítio de ligação dos AcM na p28 é um epítipo linear ou contínuo e sem pontes dissulfeto intramoleculares;
- Nas proteínas precursoras da cápside (p55^{gag}, p36 e p22), o epítipo está associado em proteínas diméricas ou que apresentam regiões com pontes dissulfeto, provavelmente ricas em resíduos Cys;
- De forma pioneira, os epítipos das proteínas da cápside do CAEV e de seus precursores foram caracterizados bioquimicamente utilizando tratamentos desnaturantes, comprovando que estes podem ser importantes ferramentas para o estudo das características das proteínas virais;
- Potencial uso dos AcM em diagnóstico: “PROCESSO DE DETECÇÃO DE ANTÍGENO DO VÍRUS DA ARTRITE-ENCEFALITE CAPRINA (CAEV) EM CÉLULAS DO LEITE DE CABRAS INFECTADAS.” Pedido de processo de patente. 09/07/2012.

CAPÍTULO 8

APÊNDICES

APÊNDICE 1- COLHEITA DA ARTICULAÇÃO INTERCARPIAL DOS MEMBROS ANTERIORES DE CABRITOS PARA A PRODUÇÃO DE CULTIVOS CELULARES DE MSC.



APÊNDICE 2- OBTENÇÃO DE CULTIVOS CELULARES DE MSC

