

Caracterização molecular parcial do gene *gag* de amostras do vírus da artrite-encefalite caprina (CAEV) isoladas de animais naturalmente infectados no Rio Grande do Sul, Brasil¹

Denise M. Marchesin², Valéria Moojen² e Ana Paula Ravazzolo³

ABSTRACT. Marchesin D.M., Moojen V. & Ravazzolo A.P. 1998. [Molecular characterization of part of the *gag* gene of caprine arthritis-encephalitis virus isolated from naturally infected goats from Rio Grande do Sul, Brazil.] Caracterização molecular parcial do gene *gag* de amostras do vírus da artrite-encefalite caprina (CAEV) isoladas de animais naturalmente infectados no Rio Grande do Sul, Brasil. *Pesquisa Veterinária Brasileira* 18(3/4):119-126. Centro de Biotecnologia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Av. Bento Gonçalves 9500, Cx. Postal 15005, Porto Alegre, RS 91501-970, Brazil.

The *gag* gene of 5 CAEV samples, isolated from naturally infected goats from Rio Grande do Sul, Brazil, were analysed by PCR and restriction endonuclease (*DdeI*, *HaeIII* e *NdeI*) digestion. Fragments of about 600 bp were amplified by PCR and submitted to enzymatic digestion. The patterns observed were compared with the corresponding *gag* sequences from 6 small ruminant lentiviruses. The results obtained allowed the separation of 3 distinct groups. The restriction fragment profiles observed were different from those previously described.

INDEX TERMS: Caprine arthritis-encephalitis virus, lentivirus, PCR, RFLP.

RESUMO. Realizou-se a análise de parte do gene *gag*, que codifica para as proteínas do capsídeo viral, de 5 amostras de CAEV isolados de animais naturalmente infectados do Rio Grande do Sul, Brasil. As amostras foram analisadas por PCR e clivagem com enzimas de restrição (*DdeI*, *HaeIII* e *NdeI*). Fragmentos de aproximadamente 600 pb foram amplificados na PCR e submetidos à digestão enzimática. Os perfis obtidos foram comparados com as seqüências *gag* de 6 lentivírus de pequenos ruminantes. Os resultados obtidos permitiram separar as amostras em 3 grupos distintos. Os fragmentos observados foram diferentes dos descritos previamente.

TERMOS DE INDEXAÇÃO: Virus da artrite-encefalite caprina, lentivírus, PCR, RFLP.

INTRODUÇÃO

O vírus da Artrite-Encefalite Caprina (CAEV) e o vírus Maedi-Visna (MVV) dos ovinos são lentivírus pertencentes à família *Retroviridae*, caracterizados por produzir doença degenerativa de evolução lenta e progressiva, que se manifesta após longo período de incubação (Sigurdsson 1954). A artrite-encefalite caprina (CAE) é caracterizada principalmente por uma artrite em animais adultos e leucoencefalite em animais jovens (Cork et al. 1974, Crawford et al. 1980). Mamite e pneumonia intersticial também podem ocorrer em caprinos infectados pelo CAEV (Kennedy-Stoskopf et al. 1985, Zink et al. 1987). Em ovinos, a principal forma de apresentação da doença é a pneumonia intersticial, embora mamite e artrite sejam observadas com certa frequência (Lerondelle & Ouzrout 1990).

Os lentivírus MVV e CAEV são vírus envelopados. A partícula viral é composta pelos produtos dos genes *gag* ("Group Antigen"), *pol* (polimerase) e *env* (envelope) e pelo RNA genômico. Os genes *gag* e *pol* são os mais conservados, enquanto que o gene *env* é altamente heterogêneo. A partir da transcrição reversa, o RNA genômico dá origem ao DNA proviral, o qual se integra ao genoma das células-alvo, os monócitos e macrófagos. A infecção produtiva ocorre nas células diferenciadas, os macrófagos (Narayan & Clements 1989), sendo que a replicação ocorre preferencialmente em algumas populações de macrófagos teciduais (Gendelman et

¹Aceito para publicação em 22 de abril de 1998.

Parte da tese de mestrado do primeiro autor. Defendida no Curso de Pós-graduação (CPG) em Ciências Veterinárias, área de concentração em virologia veterinária, Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), em 27 de agosto de 1997.

²CPG em Ciências Veterinárias, área de concentração em virologia veterinária, Faculdade de Veterinária, UFRGS, Av. Bento Gonçalves 9090, Cx. Postal 15094, Porto Alegre, Rio Grande do Sul, 91540-000.

³Centro de Biotecnologia, UFRGS, Av. Bento Gonçalves 9500, Cx. Postal 15005, Porto Alegre, Rio Grande do Sul, 91501-970. Autor para correspondência.

al. 1986), resultando na produção e excreção do vírus infeccioso no leite e provavelmente secreções respiratórias.

O CAEV está amplamente difundido pelo mundo, tendo sido detectado em diversos países (Narayan & Clements 1989), como: Austrália, Brasil, Canadá, Espanha, Estados Unidos, Fiji, França, México, Noruega, Nova Zelândia, Peru, Quênia, Reino Unido, Suíça e Taiwan. No Brasil, Moojen et al. (1986), relataram pela primeira vez a ocorrência de lentivírus em caprinos através da presença de anticorpos (Ac), utilizando a técnica de agar gel-imunodifusão (AGID) com antígeno (Ag) preparado a partir de MVV. Hötzel et al. (1993) registraram pela primeira vez o isolamento do CAEV no Brasil, no Rio Grande do Sul (RS). Cunha & Nascimento (1995) testaram soros do Rio de Janeiro (RJ); Dezan (1996) analisou soros de caprinos do Triângulo Mineiro e Alto Paranaíba, com animais reagentes em todos os capris.

Diversos lentivírus de pequenos ruminantes já foram descritos em diferentes países, como por exemplo: MVV K1514 (isolado na Islândia em 1957), ZZV 1050 (isolado na Holanda, 1970), CAEV Cork, CAEV 63 e CAEV 75-G63 (isolados nos EUA em 1980), CAEV G122C, MVV G3081, CAEV WB887 e MVV OLV (isolados na Suíça em 1981, 1983, 1987 e 1987, respectivamente), SA-OMVV (isolado na África do Sul em 1987). O CAEV Cork (CAEV-Co) é considerado a cepa protótipo do CAEV. As sequências nucleotídicas completas ou parciais desses lentivírus encontram-se registradas em banco de dados (Genbank).

O diagnóstico das lentivirose baseia-se nos sinais clínicos (artrite, mamite, pneumonia, encefalite) complementados pelo diagnóstico laboratorial. Os métodos mais utilizados para o diagnóstico laboratorial das infecções por MVV e CAEV são o teste de AGID (Crawford & Adams 1981, Knowles et al. 1994), e o teste de ELISA (Zanoni et al. 1991, Rimstad et al. 1994, Rosati et al. 1995). A detecção de DNA proviral pode ser feita através de técnicas como a reação em cadeia da polimerase (PCR) e/ou a hibridização *in situ* (Brahic et al. 1981, Zanoni et al. 1990a, Zanoni et al. 1990b, Xu & Larzul 1991, Zanoni et al. 1992, Rimstad et al. 1994, Ravazzolo et al., manuscrito em preparação). A PCR é uma técnica sensível para detectar pequenas quantidades de ácidos nucleicos virais e é utilizada para demonstrar a presença de DNA proviral *in vivo* e *in vitro* (Robinson & Ellis 1986).

O seqüenciamento de DNA, a hibridização e a digestão enzimática (Zanoni et al. 1990b; Rosati et al. 1995) são técnicas que podem ser utilizadas para analisar a variabilidade viral. A alteração do padrão de clivagem obtido a partir de uma determinada região do DNA ("restriction fragment length polymorphism"- RFLP) (Zaha 1996) permite a caracterização molecular de amostras virais, entre outros.

Este trabalho teve como objetivo a caracterização molecular parcial do gene *gag* de CAEV de caprinos naturalmente infectados e isolados no RS-Brasil, utilizando técnicas de biologia molecular: PCR e caracterização molecular com enzimas de restrição - RFLP.

MATERIAL E MÉTODOS

Isolados de lentivírus

As diferentes amostras virais foram isoladas no Laboratório de

Virologia Clínica da Faculdade de Veterinária da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS) de caprinos com artrite crônica, no período de 1989 a 1996 e foram denominadas CAEVs: 767, 018, 047, 25 e C5. Os soros dos animais dos quais foram isoladas as amostras foram submetidos ao teste de AGID, utilizando-se como Ag o MVV amostra WLC-1, produzido no "Veterinary Laboratories Agency", Weybridge, Reino Unido (Dawson et al. 1982). Todos os animais possuíam anticorpos para a glicoproteína do envelope, a gp135, e os animais que originaram as amostras 018 e 25 apresentaram Ac também para a proteína do capsídeo, a p28.

Cultivo celular

As células utilizadas para o cultivo celular controle e para inoculação dos diferentes isolados virais foram obtidas a partir de explante de membrana sinovial caprina (MSC) (Hötzel et al. 1993). As mesmas foram mantidas em meio mínimo essencial (MEM) de Eagle com sais de Earle, enriquecido com soro fetal bovino (SFB⁴) em concentrações de 2% e 10-20%, para manutenção e crescimento das células, respectivamente.

Inoculação dos isolados de lentivírus

O isolado CAEV 767 foi mantido em células MSC infectadas conservadas em MEM com 50% de SFB e 10% de dimetil sulfoxido (DMSO) em nitrogênio líquido; os demais isolados foram obtidos de sobrenadantes (SN) de células infectadas mantidos a -20°C para a inoculação nas células susceptíveis. O isolado CAEV 767 sofreu descongelamento rápido a 37°C e foi inoculado por adsorção em células MSC com 24-48 horas de cultivo. Antes da inoculação o MEM foi desprezado, permanecendo o inóculo durante uma hora no processo de adsorção, a 37°C. Em seguida, colocou-se MEM com 20% de SFB, sem retirar o inóculo. Nos demais isolados seus SN foram inoculados diretamente sobre os cultivos celulares, com 24-48 horas de cultivo.

Os cultivos celulares foram observados diariamente para a identificação de efeito citopático (CPE), ou seja, a presença de sincícios ou células gigantes multinucleadas. Nos cultivos celulares em que as amostras eram mais destrutivas e líticas, houve a necessidade da reposição de células MSC controle. Acrescentou-se células tripsinizadas diretamente sobre o cultivo pré-existente, inoculado com as amostras virais.

Reação em Cadeia da Polimerase (PCR)

Extração de DNA das células. A extração do DNA foi realizada quando aproximadamente 50% do tapete celular apresentava CPE. As células foram tripsinizadas e lavadas com salina tamponada com fosfato (PBS - "phosphate buffered saline") por centrifugação à 1200g em temperatura ambiente. Após a centrifugação, as células foram extraídas com "DNAzol"⁵, seguindo o protocolo recomendado pelo fabricante. Brevemente, para uma quantidade aproximada de 1-3x10⁷ células, acrescentou-se 1ml de "DNAzol" em um tubo de microcentrifuga. As células foram lisadas suavemente com o auxílio de uma pipeta. O homogeneizado foi centrifugado por 10 min a 10.000g em temperatura ambiente e após esta centrifugação o SN, de consistência viscosa, foi transferido para outro tubo. O DNA foi precipitado adicionando-se ao SN 0,5ml de etanol absoluto. O sedimento de DNA foi lavado com 1ml de etanol 95% por duas vezes, sendo centrifugado a cada lavagem e ressuspensionado em 8mM NaOH,

⁴Fazenda Pigue/EMBRARIO-Rio de Janeiro, RJ.

⁵DNAzolTM Reagent, GIBCO-BRL.

assegurando-se uma completa solubilização do DNA precipitado, em um volume aproximando-se à concentração em 0,2-0,3mg/ml de DNA. Após a solubilização, o DNA foi estocado por 1-3 dias a 4°C e determinou-se sua concentração através da densidade ótica. Utilizou-se de 200 a 500ng de DNA dissolvidos em 10mM Tris-HCl pH 8 na reação de PCR para um volume final de 50ml.

O DNA das células MSC não inoculadas, extraído como acima, foi utilizado como controle negativo.

"Primers". Os "primers" utilizados foram desenhados baseando-se no alinhamento de cinco seqüências de amostras de lentivírus MVV e CAEV (Visna K1514, EV1, "South Africa", Cork e Dalbergh), com o objetivo de se detectar os dois lentivírus. Os "primers" são degenerados e específicos para um fragmento conservado do gene gag, situado entre as posições 962 e 1582 do clone CAEV-Co (Saltarelli et al. 1990), que codifica parte da p27 do capsídeo. Os "primers" utilizados foram: L3 (962 a 978) "primer sense" e LRT3 "primer antisense" (1566 a 1582) (Ravazzolo et al., manuscrito em preparação).

PCR. A técnica foi realizada de acordo com protocolos descritos por Innis et al. (1990). O DNA obtido do cultivo celular extraído com "DNAzol" foi amplificado por PCR em um volume final de 50ml da reação contendo 200 a 500ng do DNA, 10mM de Tris-HCl pH 8, 50mM de KCl, 2mM de MgCl₂, 0,2mM de cada dNTP, 200ng de cada "primer" (L3 e LRT3) e 2,5 U de Taq DNA polimerase (CENBIOT- Enzimas, Centro de Biotecnologia, UFRGS).

As condições de temperatura utilizadas para as reações foram: 5min a 94°C, 30 ciclos de desnaturação de 1min a 94°C, anelamento de 1min a 57°C e polimerização de 90seg a 72°C. Após os 30 ciclos, seguiram-se 8min a 72°C.

Os produtos da PCR foram analisados por eletroforese horizontal em gel de agarose 2% com tampão TAE 1X, corados com brometo de etídio e visualizados em luz UV (Sambrook et al. 1989).

Caracterização dos fragmentos amplificados por PCR - Clivagem com enzimas de restrição

A análise dos fragmentos amplificados por PCR foi feita através da clivagem do DNA com enzimas de restrição que digerissem o fragmento do gene gag na região amplificada entre o par de primers L3 (962) e LRT3 (1582) em mais de um sítio, baseando-se na carta de restrição do clone CAEV-Co (Saltarelli et al. 1990), utilizado como padrão. As enzimas utilizadas foram: *Ddel*, *HaeIII* e *NdeI*. Todos os isolados foram submetidos à clivagem pelas três enzimas. Os locais de clivagem das enzimas no clone CAEV-Co são: *Ddel* - 1041, gerando fragmentos de 79 e 541 pb; *HaeIII* - 1032, 1112, 1354, com fragmentos de 70, 80, 242 e 228 pb; *NdeI* - 1341, 1396 e fragmentos de 55, 186 e 379 pb.

As seqüências de nucleotídeos do gene gag de lentivírus de pequenos ruminantes publicadas foram obtidas a partir do Genbank e alinhadas com o auxílio do programa "Pileup" (GCG), para posterior comparação com os isolados obtidos neste trabalho. Foram elas: CAEV-Co (Saltarelli et al. 1990), KV1772 (Braun et al. 1987), VLVC (Sonigo et al. 1985), ZZV (não publicado, nº de acesso X54379), Afri (Quérat et al. 1990), Briti (Sargan et al. 1991). O número de acesso no Genbank das seqüências são: M33677, L06906, M10608, X54379, M31646, S51392, respectivamente (Quadro 1). A partir do alinhamento das seqüências, a região correspondente ao fragmento amplificado pelos "primers" L3/LRT3 (aproximadamente 600 pb), foi identificada manualmente, e logo após, com o auxílio do programa MAPLOT (GCG), obteve-se o mapa de restrição de cada seqüência de lentivírus de pequenos ruminantes com as 3 enzimas utilizadas (*Ddel*, *HaeIII*, *NdeI*), determinando o tamanho dos fragmentos esperados.

Quadro 1. Denominação, número de acesso, origem e espécie das seqüências utilizadas para a comparação com as amostras virais de CAEV na região compreendida entre os nucleotídeos 962 e 1582 (gene gag) da seqüência CAEV Cork

Denominação da seqüência	Número de acesso Genbank	Origem	Espécie
CAEV-Co ^a	M33677	EUA	caprina
KV 1772	L06906	Islândia	ovina
VLVC	M10608	Islândia	ovina
ZZV	X54379	Holanda	ovina
Afri	M31646	África do Sul	ovina
Briti	S51392	Grã-Bretanha	ovina

^a Saltarelli et al. 1990.

Quadro 2. Caracterização das amostras virais quanto à presença de anticorpos no soro, sinais clínicos dos animais infectados e efeito citopático em cultivo celular

Espécie	Isolados	AGID ^a gp135	Sinais clínicos de artrite	CPE ^b
caprina	767	+ ^c	+ ^d	++
caprina	018	+	+	+
caprina	047	+	+	++
caprina	25	+	++	+++
caprina	C5	+	+	++

^a AGID: teste de ágar gel imunodifusão com soros de referência para anticorpos contra a glicoproteína do envelope (gp 135) do Maedi-Visna (Moojen, 1996);

^b CPE: Efeito citopático: de (+) discreto a (+++) severo;

^c +: presença de anticorpos contra a gp135;

^d intensidade dos sinais clínicos nos animais dos quais se isolaram as amostras (Moojen, 1996).

Análise dos produtos de clivagem

Após a clivagem dos DNAs obtidos, seus fragmentos foram analisados por eletroforese horizontal em gel de agarose 2,5% com tampão TAE 1X, corado com brometo de etídio e visualizados em luz UV (Sambrook et al. 1989). O marcador de peso molecular utilizado (600ng) para a estimativa dos fragmentos gerados foi o 100 bp "ladder" (Pharmacia).

RESULTADOS

Isolados de lentivírus

O CPE nos cultivos celulares inoculados com os isolados CAEV 767, 047, 018, 25 e C5 foi compatível com lentivírus, variando o intervalo de tempo para o aparecimento do mesmo. O CPE caracterizou-se pelo aparecimento de células em forma de neurônios ou do tipo "spider" seguindo-se do aparecimento de sincícios (células gigantes multinucleadas). No momento em que havia grande quantidade de sincícios e antes do desprendimento dos mesmos, estimado em 50% de CPE, as células foram tripsinizadas para a extração de DNA.

O CPE desenvolvido pelo isolado 25 foi mais intenso, com um maior número de sincícios observados em menor intervalo de tempo e uma alta destruição e lise do tapete celular, diferente do CPE induzido pelos outros isolados (Quadro 2). O isolado 018 diferenciou-se dos demais por desenvolver um CPE mais discreto, com menor número de sincícios e não tão

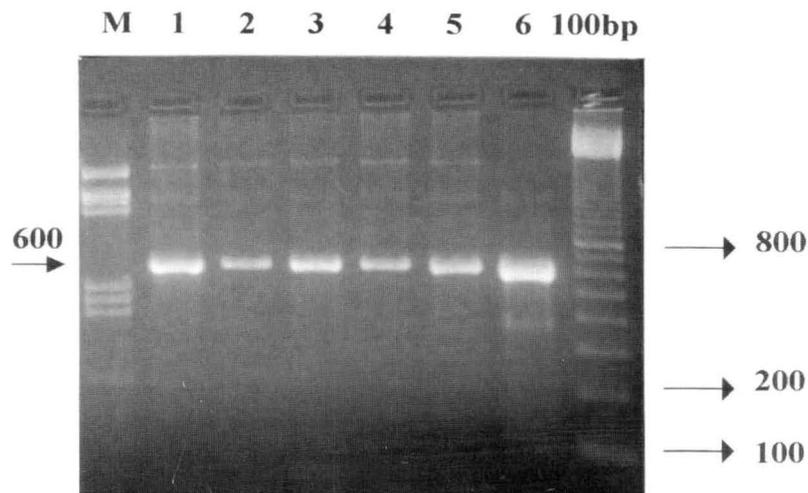


Fig. 1. Análise dos produtos amplificados por PCR em gel de agarose 2,5% corado com brometo de etídio e visualizado em UV. Os "primers" L3LRT3 amplificaram um fragmento de aproximadamente 600pb. O método de extração de DNA foi o "DNAzol". Os números correspondem aos diferentes isolados de CAEV: 1-CAEV 25; 2-CAEV C5; 3-CAEV 047; 4-CAEV 018; 5-CAEV 767; 6-clone íntegro (CAEV-Co utilizado como padrão); M-Marcador BS.C12; 100bp – "ladder"(Pharmacia).

destrutivo e lítico como os outros isolados. Os demais isolados (767, 047, C5) desenvolveram CPE mais discretos que o do isolado 25, porém mais intensos que o isolado 018. (Quadro 2)

Os soros dos animais dos quais se isolaram as amostras foram submetidos ao teste de AGID (ver Material e Métodos) e todos apresentaram anticorpos contra a proteína do envelope viral, a gp135.

PCR

A PCR feita a partir do DNA extraído dos cultivos celulares infectados com as amostras de lentivírus caprinos (767, 018, 047 e 25), permitiu a amplificação de um fragmento com o tamanho de aproximadamente 600 pb - 639 pb para o clone CAEV-Co (Saltarelli et al. 1990) (Fig. 1) .

Análise dos produtos de clivagem

De acordo com o perfil da digestão enzimática obtido com as 3 enzimas de restrição utilizadas, as amostras foram separadas em 3 grupos conforme o tamanho dos fragmentos gerados, para melhor compreensão dos resultados. Esses perfis foram comparados com o obtido na digestão do clone CAEV-Co (Saltarelli et al. 1990), utilizado como padrão.

As amostras foram classificadas em grupos I, II e III, conforme o perfil enzimático apresentado e comparadas com os perfis de digestão analisados para as outras sequências já publicadas (Material e Métodos, Caracterização dos fragmentos amplificados por PCR).

Enzima DdeI. Na digestão com a enzima com a enzima *DdeI* das 5 amostras, observou-se três perfis de restrição diferentes, separados em três grupos. No grupo I, os CAEVs C5, 25 e 767 apresentaram perfis semelhantes entre si e fragmentos maiores que o CAEV-Co digerido. O CAEV-Co apre-

sentou um fragmento de 541 pb e os isolados apresentaram um fragmento de aproximadamente 600 pb, ou seja, de tamanho similar ao CAEV-Co íntegro (Fig. 2a). O CAEV 018 (grupo II) apresentou um fragmento de aproximadamente 500 pb, menor que o CAEV-Co digerido (541 pb) e um outro fragmento em torno de 100 pb, tornando-se aparentemente semelhante às sequências Briti, KV1772 e VLVCG. (Quadro3) E no grupo III, o CAEV 047 apresentou um fragmento semelhante ao clone CAEV-Co (541 pb) e outro de aproximadamente 80 pb (Fig. 2a).

Nos resultados das digestões com a enzima *DdeI*, o fragmento de aproximadamente 600pb visualizado na digestão dos CAEVs C5, 25 e 767, de tamanho semelhante ao clone CAEV-Co íntegro, indica a ausência do sítio *DdeI* nestes isolados. Na sequência Afri, o sítio para esta enzima também não está presente.

Enzima HaeIII. Da mesma forma que para a enzima *DdeI*, foi possível observar 3 padrões distintos para os fragmentos das cinco amostras digeridas com *HaeIII*. Os CAEVs C5, 25, 047 e 767 apresentaram perfis semelhantes entre si, com um fragmento de aproximadamente 500 pb, maior que o CAE-Co digerido (242 e 228 pb) e também um fragmento menor que 100 pb (Fig. 2b), formando o grupo I. O grupo II foi representado pelo CAEV 018, que apresentou um fragmento de aproximadamente 500 pb e outro fragmento de aproximadamente 180 pb. Somente o CAEV-Co formou o grupo III, com os fragmentos de 242 e 228 pb (visualizados como se fossem um único fragmento) e os de 70 e 80 pb (também visualizados como se fossem um só) (Fig. 2b).

Na digestão dos CAEVs com a enzima *HaeIII*, todos apresentaram um fragmento de aproximadamente 500pb, e com exceção do 018, também apresentaram um fragmento menor que 100pb. Estes resultados sugerem que os CAEVs isola-

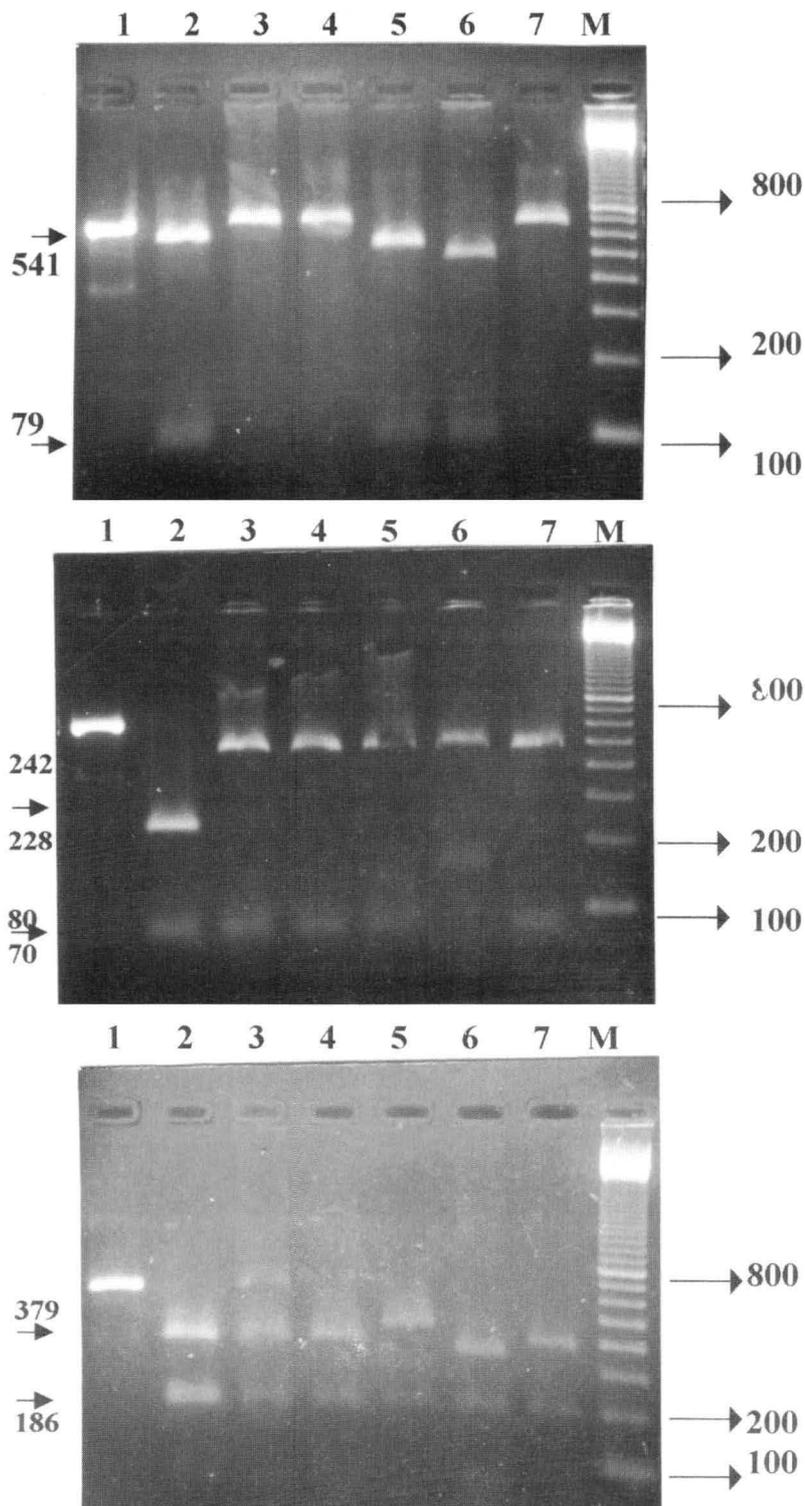


Fig. 2. Análise dos produtos da clivagem dos fragmentos amplificados por PCR com os "primers" L3LRT3, dos diferentes isolados de CAEV, com as enzimas *DdeI* (2a), *HaeIII* (2b) e *NdeI* (2c) em gel de agarose 2,5% corados com brometo de etídio e visualizados em UV. Os números correspondem aos diferentes CAEVs isolados: 1-clone íntegro (CAEV-Co utilizado como padrão), 2-clone digerido, 3-CAEV 25, 4-CAEV C5, 5-CAEV 047, 6-CAEV 018, 7-CAEV 767, M-Marcador 100 bp. As flechas à esquerda correspondem ao tamanho dos fragmentos esperados na clivagem do clone CAEV-Co com as enzimas *DdeI*, *HaeIII* e *NdeI*.

Quadro 3. Classificação das amostras de CAEV de acordo com a similaridade dos perfis de restrição para cada enzima

Grupos ^a	Enzimas		
	<i>Ddel</i>	<i>HaeIII</i>	<i>Ndel</i>
Grupo I	C5, 25, 767, Afri ^b	C5, 25, 047, 767	047
Grupo II	018, Briti ^b , KV1772 ^b , VLVCg ^b	018	018
Grupo III	047, CAEV-Co ^c	CAEV-Co	C5, 25, 767, CAEV-Co

^a Os grupos foram denominados I, II e III para cada perfil enzimático conforme a similaridade dos fragmentos gerados pelas clivagens;

^b ver Quadro 1;

^c clone CAEV-Co (Saltarelli et al. 1990).

dos não possuem o sítio que forma os fragmentos de 242pb e 228pb como ocorre para o CAEV-Co. Os fragmentos inferiores a 100pb poderiam corresponder aos fragmentos de 70 e 80pb visualizados juntos. Portanto, os CAEVs C5, 25, 767 e 047 só teriam dois sítios para a enzima *HaeIII* (o primeiro e o segundo da região 5' do fragmento amplificado). O CAEV 018, além do fragmento de 500pb apresentou também um de aproximadamente 180pb, diferente de todos os outros CAEVs, sugerindo que ele tenha somente um sítio para a enzima *HaeIII* (o primeiro sítio da região 5' do fragmento amplificado).

Enzima *Ndel*. A digestão das amostras com a enzima *Ndel* também permitiu observar perfis distintos entre as amostras e as sequências analisadas. Todos os isolados apresentaram um fragmento de aproximadamente 200 pb. Quando comparado ao CAEV-Co, o CAEV 047 apresentou um fragmento maior (aproximadamente 450 pb) que o do clone digerido (379 pb) e um de aproximadamente 200 pb (grupo I), sugerindo assim que o isolado não forma o fragmento de 55 pb. O perfil do CAEV 047 não foi semelhante a nenhum dos isolados publicados analisados. (Quadro 3, Fig. 2c). Novamente, o CAEV 018 constituiu um grupo a parte (grupo II), com um fragmento menor (menor que 400 pb) que o do CAEV-Co digerido (379 pb) e um fragmento de aproximadamente 200 pb, sugerindo que há a formação de um fragmento inferior a 100pb que não foi visualizado, e para isto, haveria um sítio a mais da enzima *Ndel* neste isolado, anterior aos sítios que formam os fragmentos de 55 e de 186pb no clone CAEV-Co. No grupo III, os CAEVs C5, 25 e 767 apresentaram um perfil semelhante ao clone CAEV-Co, com um fragmento de aproximadamente 400 pb, um de 200 pb e outro de 50 pb que não pôde ser visualizado (Fig. 2c).

O CAEV 047 não manteve um mesmo padrão na classificação dos grupos. Para cada enzima utilizada, pertenceu a um grupo distinto. Com a enzima *Ddel* mostrou-se semelhante ao clone CAEV-Co, com a enzima *HaeIII* aos CAEVs C5, 25 e 767 e com nenhuma das sequências publicadas. Com a enzima *Ndel* formou um grupo isolado sem homologia com outros isolados. (Quadro 3)

O CAEV 767 manteve um perfil muito semelhante aos CAEVs C5 e 25, sendo similar ao clone CAEV-Co somente na digestão com a enzima *Ndel* e similar à sequência Afri na digestão com a enzima *Ddel*. (Quadro 3)

DISCUSSÃO

O CPE observado nos cultivos celulares foi compatível com lentivírus em todas as amostras isoladas, caracterizando-se pelo aparecimento de sincícios ou células gigantes multinucleadas, como descrito por Moojen (1996).

Os resultados obtidos na análise dos produtos da PCR demonstraram um fragmento com o tamanho esperado (aproximadamente 600pb) a partir do DNA extraído dos cultivos celulares infectados. Dos cultivos celulares não infectados não houve a amplificação de semelhante fragmento.

A análise da digestão com enzimas de restrição dos fragmentos de DNA dos isolados demonstrou diferenças entre os isolados e o CAEV-Co. Os CAEVs mostraram perfis distintos do CAEV-Co, o que comprova também que as amostras não foram contaminadas com o clone utilizado como padrão.

Podemos considerar que: o CAEV 018 apresentou um perfil próprio, heterogêneo de todos os outros CAEVs com as 3 enzimas utilizadas, formando um grupo à parte. Este perfil sugere que a região 5' do fragmento amplificado por PCR do isolado 018 seja diferente, pois não apresentou o sítio para a enzima *Ddel* e só um sítio para a enzima *HaeIII*, ambas na mesma região 5' do fragmento amplificado. Portanto, ele demonstrou ser mais semelhante às sequências publicadas analisadas (de MVV) do que os outros CAEVs, quando comparado com as sequências Briti, KV1772 e VLVCg na digestão com a enzima *Ddel*. Pode-se sugerir que o animal do qual foi isolado o CAEV 018 possa ter sido naturalmente infectado com um vírus mais relacionado com MVV do que com CAEV-Co. A possível infecção de pequenos ruminantes com lentivírus (infecção "cruzada entre espécies"), no caso MVV e CAEV, foi sugerida por vários autores (Chebloune et al. 1996, Karr et al. 1996), e experimentalmente realizada por Oliver et al. (1985), assim como foi determinada a existência de quasiespécies virais (Leroux et al. 1996).

Embora as amostras de CAEVs 018 e 047 fossem provenientes da mesma propriedade, os dois apresentaram perfis de restrição enzimática completamente diferentes. Entretanto, não se sabe a origem dos animais dos quais se isolou as amostras 018 e 047, antes de pertencerem à mesma propriedade. Por outro lado, o CAEV 018 apresentou um perfil diferente dos outros CAEVs no cultivo celular, com o desenvolvimento de um CPE mais discreto, como foi relatado por Moojen (1996).

Ao contrário do que foi observado para o CAEV 018, o CAEV 25 sempre causou um intenso CPE mostrando-se altamente lítico e destrutivo para o cultivo celular, sendo necessário várias vezes a reposição de células na garrafa de cultivo devido à destruição causada nas células. Moojen et al. (1996b) relataram também que o animal do qual foi isolado o lentivírus apresentou as lesões mais severas de artrite quando comparado com os outros animais naturalmente infectados. Poderia-se sugerir uma relação direta entre a intensidade de efeito citopático e das lesões observadas nos animais infectados, como observado para o lentivírus humano (vírus da imunodeficiência em humanos - HIV). Alguns isolados de HIV de pacientes com sinais leves de infecção resultam em baixa

produção de partículas virais após um período prolongado em cultura (Fenjo et al. 1989). Por outro lado, Tersmette et al. (1989) concluíram que a capacidade de induzir a formação de sincícios em cultivo é uma propriedade estável observada em determinadas amostras de HIV, frequentemente encontradas em pacientes que desenvolvem a AIDS (síndrome da imunodeficiência adquirida).

Os CAEV C5 e 25, que igualmente pertenciam à mesma propriedade, apresentaram um perfil enzimático muito semelhante entre si com as 3 enzimas utilizadas. Por isso enquadrados sempre no mesmo grupo, juntamente com o isolado 767, sugerindo que os animais possam ter sido infectados com a mesma cepa viral. Estes mesmos isolados apresentaram similaridade com o CAEV-Co somente na digestão com a enzima *Ndel* e com a seqüência *Afri* na digestão com a enzima *Ddel*.

Houve diferenças entre os isolados de CAEV estudados, tanto por suas características em cultivo celulares como nos perfis obtidos na análise por enzimas de restrição. Em parte, a explicação para tais resultados poderia residir no fato de que os isolados de lentivírus de pequenos ruminantes brasileiros são de caprinos, enquanto que a maioria (5/6) dos publicados e analisados no programa MAPLOT (GCG) são de ovinos. Portanto, não foi possível encontrar uma homologia significativa entre as análises realizadas com os programas MAPLOT (GCG) e com a digestão enzimática aqui realizada, já que os autores citados anteriormente analisaram amostras ovinas e compararam-nas com seqüências de CAEV, diferindo do que foi realizado neste trabalho. A medida que um maior número de seqüências de lentivírus caprino forem incorporadas ao banco de dados (Genbank), poderemos avaliar se os perfis observados estão mais relacionados com CAEV do que com MVV.

Alguns autores demonstraram que a sensibilidade do teste de ágar gel imunodifusão (AGID) é dependente do antígeno (Ag) utilizado. Os Ags de origem ovina, utilizados no diagnóstico de lentivírus de pequenos ruminantes, detectam um menor número de caprinos infectados do que quando utilizado Ag de origem caprina, indicando provavelmente uma menor especificidade, reforçando diferenças antigênicas entre os produtos dos genes *gag* e *env* do CAEV e do MVV (Knowles et al. 1994). Vários autores já relataram a maior semelhança dos isolados de lentivírus ovinos com a cepa protótipo CAEV Cork (CAEV-Co) (Saltarelli et al. 1990) do que com a cepa protótipo do lentivírus ovino, a cepa K1514 (Sonigo et al. 1985) da Islândia, (Zanoni et al. 1992, Rosati et al. 1995, Leroux et al. 1995, Chebloune et al. 1996, Karr et al., 1996). Em função disto, para um programa de erradicação e controle das doenças, faz-se necessária a produção de reagentes mais específicos para realizar o diagnóstico do CAEV e MVV, evitando-se ocasionalmente resultados falso-negativos (Knowles, 1997).

Como os CAEVs isolados neste trabalho não foram sequenciados, o tamanho dos fragmentos gerados com a digestão enzimática e analisados em gel de agarose 2,5% são aproximados. Os valores reais dos mesmos poderão ser obtidos com o seu sequenciamento. O sequenciamento dos CAEVs

C5, 25, 018, 047 e 767 poderá fundamentar o desenvolvimento de reagentes para diagnóstico de maior especificidade e sensibilidade do que os atualmente disponíveis no mercado internacional.

Agradecimentos.- Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio Grande do Sul (FAPERGS), que financiaram este trabalho; ao Prof. Hélio Maia e sua equipe, da CENBIOT-enzimas, Centro de Biotecnologia, UFRGS, pela doação da enzima *Taq* DNA polimerase e por permitir o uso de equipamentos no seu laboratório; à acadêmica Andrea Von Groll, da Faculdade de Veterinária da UFRGS, pelo fornecimento das células para o cultivo celular.

REFERÊNCIAS

- Brahic M., Stowring L., Ventura P. & Haase A. 1981. Gene expression in visna virus infection in sheep. *Nature*. 292(5820):240-242.
- Braun M.J., Clements J.E. & Gonda M.A. 1987. The visna virus genome: evidence for a hypervariable site in the *env* gene and sequence homology among lentivirus envelope proteins. *J. Virol.* 61(12):4046-4054.
- Chebloune Y., Karr B., Sheffer D., Leung K. & Narayan O. 1996. Variations in lentiviral gene expression in monocyte-derived macrophages from naturally infected sheep. *J. Gen. Virol.* 77:2037-2051.
- Cork L.C., Hadlow W.J., Crawford T.B., Graham J.R. & Piper R.C. 1974. Infectious leukoencephalomyelitis of young goats. *J. Infect. Dis.* 129(2):134-141.
- Crawford T.B., Adams D.S. & Cheevers W.P. 1980. Chronic arthritis in goats caused by a retrovirus. *Science* 207:997-999.
- Crawford T.B. & Adams D.S. 1981. Caprine arthritis-encephalitis: clinical features and presence of antibody in selected goats populations. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 178(7):713-719.
- Cunha R.G. & Nascimento M.D. 1995. Ocorrência de anticorpos para o vírus da Artrite-encefalite caprina em soros de caprinos do estado do Rio de Janeiro. *Revta Bras. Med. Vet.* 17(2): 72-75.
- Dawson M., Biront P. & Houwers D.J. 1982. Comparison of serological tests used in three state veterinary laboratories to identify maedi-visna virus infection. *Vet. Rec.* 6:432-434.
- Dezan C.P. 1996. Levantamento epidemiológico da Artrite Encefalite Caprina em Municípios do Triângulo Mineiro e Alto Paranaíba. Monografia de Estágio Curricular, Faculdade de Veterinária da Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, MG. 67p.
- Fenyö E.M., Albert J. & Åsjö B. 1989. Replicative capacity, cytopathic effect and cell tropism of HIV. *AIDS* 3(1):5-12.
- Gendelman H.E., Narayan O., Kennedy-Stoskopf S., Kennedy P.G.E., Ghotbi Z., Clements J.E., Stanley J. & Pezeshkpour G. 1986. Tropism of sheep lentiviruses for monocytes: susceptibility to infection and virus gene expression increase during maturation of monocytes to macrophages. *J. Virol.* 58(1):67-74.
- Hötzel I., Bastos E.S., Ravazzolo A.P. & Moojen V. 1993. Caprine arthritis-encephalitis virus: isolation and identification in Rio Grande do Sul, Brazil. *Braz. J. Med. Biol. Res.* 26:1175-1179.
- Innis M.A., Gelfand D.H., Sninsky J.J. & White T.J. 1990. PCR Protocols. A Guide to Methods and Applications. Academic Press, San Diego.
- Karr B.M., Chebloune Y., Leung K. & Narayan O. 1996. Genetic characterization of two phenotypically distinct north american ovine lentiviruses and their possible origin from Caprine Arthritis-Encephalitis Virus. *Virology*. 225:1-10.
- Kennedy-Stoskopf S., Narayan O. & Strandberg J.D. 1985. The mammary gland as a target organ for infection with caprine arthritis-encephalitis virus. *J. Comp. Pathol.* 95:609-617.
- Knowles D.P.Jr., Evermann J.F., Shropshire C., Vanderschalie J., Bradway D., Gezon H.M. & Cheevers W.P. 1994. Evaluation of agar gel immunodiffusion serology using caprine and ovine lentiviral antigens for detection of antibody to caprine arthritis-encephalitis virus. *J. Clin. Microbiol.* 32(1):243-245.

- Knowles D.P.J.R. 1997. Laboratory diagnostic tests for retrovirus infections of small ruminants. *Vet. Clinics North America: Food Animal Practice* 13(1):1-11.
- Lerondelle C. & Ouzrout R. 1990. Expression of Maedi-Visna virus in mammary secretions of a seropositive ewe. *Developmental Biological Standard* 72:223-227.
- Leroux C., Cordier G., Mercier I., Chastang J., Lyon M., Quérat G., Greenland T., Vigne R. & Mornex J.F. 1995. Ovine aortic smooth muscle cells allow the replication of visna-maedi virus *in vitro*. *Arch. Virol.* 140:1-11.
- Leroux C., Greenland T. & Mornex J.F. 1996. Molecular characterization of field isolates of lentiviruses of small ruminants. *AIDS Res. Human Retroviruses* 12(5):427-429.
- Moojen V., Soares H.C., Ravazzolo A.P., Dal Pizzol M. & Gomes M. 1986. Evidência de infecção pelo Lentivírus (Maedi-Visna/Artrite-Encefalite Caprina) em caprinos no Rio Grande do Sul, Brasil. *Arq. Fac. Vet. UFRGS* 14:77-78.
- Moojen V. 1996. Caracterização de isolados de lentivírus de pequenos ruminantes naturalmente infectados, do Rio Grande do Sul, Brasil. Tese de doutorado em Biologia Celular e Molecular, Instituto Oswaldo Cruz, Fundação Oswaldo Cruz - FIOCRUZ, Rio de Janeiro
- Narayan O. & Clements J.E. 1989. Review Article. Biology and pathogenesis of lentiviruses. *J. Gen. Virol.* 70:1617-1639.
- Oliver R., Cathcart A., Mcniven R., Poole W. & Robati G. 1985. Infection of lambs with caprine arthritis-encephalitis virus by feeding milk from infected goats. *Vet. Rec.* 19:83.
- Quérat G., Audoly G., Sonigo P. & Vigne R. 1990. Nucleotide sequence analysis of SA-OMVV, a Visna-related ovine lentivirus: phylogenetic history of lentiviruses. *Virology.* 175:434-447.
- Rimstad E., East N., Derock E., Higgins J. & Pedersen N.C. 1994. Detection of antibodies to caprine arthritis-encephalitis virus using recombinant gag proteins. *Arch. Virol.* 134:345-356.
- Robinson W.F. & Ellis T.M. 1986. Caprine arthritis-encephalitis virus infection: from recognition to eradication. *Aust. Vet. J.* 63(8):237-241.
- Rosati S., Kwang J. & Keen J.E. 1995. Genome analysis of North American small ruminant lentiviruses by polymerase chain reaction and restriction enzyme analysis. *J. Vet. Diagn. Invest.* 7:437-443.
- Saltarelli M., Querat G., Konings D.A.M., Vigne R. & Clements J. 1990. Nucleotide sequence and transcriptional analysis of molecular clones of CAEV which generate infectious virus. *Virology* 179:347-364.
- Sambrook J., Fritsch E.F. & Maniatis T. 1989. *Molecular Cloning. A Laboratory Manual.* 2nd ed. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York.
- Sargan D.R., Bennet I.D., Cousens C., Roy D.J., Blacklaws B.A., Dalziel R.G., Watt N.J. & McConnell I. 1991. Nucleotide Sequence of EV1, a British isolate of Maedi-Visna Virus. *J. Gen. Virol.* 72:1893-1903.
- Sigurdsson B. 1954. Maedi, a slow Progressive Pneumonia of Sheep: an epizootological and pathological study. *Brit. Vet. J.* 110:255-270.
- Sonigo P., Alizon M., Staskus K., Klatzmann D., Cole S., Danos O., Retzel E., Tiollais P., Haase A. & Wain-Hobson S. 1985. Nucleotide sequence of the Visna lentivirus: relationship to the AIDS virus. *Cell* 42:369-382.
- Tersmette M., Goede R.E.Y., Al B.J.M., Winkel I.N., Gruters R.A., Cuypers, H.T., Huisman H.G. & Miedema F. 1988. Differential syncytium-inducing capacity of human immunodeficiency virus isolates: frequent detection of syncytium-inducing isolates in patients with acquired immunodeficiency syndrome (AIDS) and AIDS-related complex. *J. Virol.* 62(6):2026-2032.
- Xu L.Z. & Larzul D. 1991. The polymerase chain reaction: basic methodology and applications. *Comp. Immun. Microbiol. Infect. Dis.* 14(3):209-221.
- Zaha A. 1996. *Biologia Molecular Básica.* Arnaldo Zaha (Coord.). Ed. Mercado Aberto, Porto Alegre.
- Zanoni R., Pauli U. & Peterhans E. 1990a. Caprine arthritis-encephalitis (CAE) and Maedi-Visna viruses detected by polymerase chain reaction (PCR). *Vet. Microbiol.* 23:329.
- Zanoni R., Pauli U. & Peterhans E. 1990b. Detection of caprine-arthritis-encephalitis and maedi-visna viruses using the polymerase chain reaction. *Experientia* 46:316-319.
- Zanoni R.G., Nauta I.M., Pauli U. & Peterhans E. 1991. Expression in *Escherichia coli* and sequencing of the coding region for the capsid protein of Dutch Maedi-Visna virus strain ZZV 1050: application of recombinant protein in enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of caprine and ovine lentiviruses. *J. Clin. Microbiol.* 29(7):1290-1294.
- Zanoni R.G., Nauta I.M., Kuhnert P., Pauli U., Pohl B. & Peterhans E. 1992. Genomic heterogeneity of small ruminant lentiviruses detected by PCR. *Vet. Microbiol.* 33:341-351.
- Zink M.C., Narayan O., Kennedy P.G.E. & Clements J.E. 1987. Pathogenesis of Visna-Maedi and Caprine Arthritis-Encephalitis: new leads on the mechanism of restricted virus replication and persistent inflammation. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 15:167-180.