



UNIVERSIDADE ESTADUAL VALE DO ACARAÚ
PROGRAMA DE MESTRADO EM ZOOTECNIA

**PERFIL PROTEICO-IMUNOGÊNICO DE PROTEÍNAS DETENTORAS DE
ALTO VALOR DIAGNÓSTICO DE LENTIVÍRUS DE PEQUENOS
RUMINANTES**

DALVA ALANA ARAGÃO DE AZEVEDO

SOBRAL – CE
FEVEREIRO – 2015

**UNIVERSIDADE ESTADUAL VALE DO ACARAÚ
PROGRAMA DE MESTRADO EM ZOOTECNIA**

**PERFIL PROTEICO-IMUNOGÊNICO DE PROTEÍNAS DETENTORAS DE
ALTO VALOR DIAGNÓSTICO DE LENTIVÍRUS DE PEQUENOS
RUMINANTES**

DALVA ALANA ARAGÃO DE AZEVEDO

**SOBRAL – CE
FEVEREIRO – 2015**

DALVA ALANA ARAGÃO DE AZEVEDO

PERFIL PROTEICO-IMUNOGÊNICO DE PROTEÍNAS DETENTORAS DE ALTO
VALOR DIAGNÓSTICO DE LENTIVÍRUS DE PEQUENOS RUMINANTES

**Dissertação apresentada ao Programa
de Mestrado em Zootecnia, da
Universidade Estadual Vale do
Acará, como requisito parcial para
obtenção do Título de Mestre em
Zootecnia.**

Área de concentração: Produção Animal

ORIENTADOR:
PROF. DR. RAYMUNDO RIZALDO PINHEIRO

CO-ORIENTADORA:
PROF(A). DRA. ALICE ANDRIOLI PINHEIRO

**SOBRAL – CE
FEVEREIRO – 2015**

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação

Universidade Estadual Vale do Acaraú

Sistema de Bibliotecas

Azevedo, Dalva Alana Aragão de
PERFIL PROTEICO-IMUNOGÊNICO DE PROTEÍNAS DETENTORAS
DE ALTO VALOR DIAGNÓSTICO DE LENTIVÍRUS DE PEQUENOS
RUMINANTES [recurso eletrônico] / Dalva Alana Aragão de Azevedo.
-- Sobral, 2015.

1 CD-ROM: il. ; 4 ³/₄ pol.

CD-ROM contendo o arquivo no formato pdf do trabalho acadêmico com 68 folhas.

Orientação: Prof. Dr. Raymundo Rizaldo Pinheiro.

Co-Orientação: Prof.^a Dra. Alice Andrioli.

Dissertação (Pos-graduação em Zootecnia) - Universidade Estadual Vale do Acaraú / Centro de Ciências Agrárias e Biológicas

1. LVPR. 2. SERPA. 3. espectrometria de massas. I. Título.

DALVA ALANA ARAGÃO DE AZEVEDO

**PERFIL PROTEICO-IMUNOGÊNICO DE PROTEÍNAS DETENTORAS DE
ALTO VALOR DIAGNÓSTICO DE LENTIVÍRUS DE PEQUENOS
RUMINANTES**

Dissertação defendida e aprovada em 09 / 02 / 2015 pela Comissão

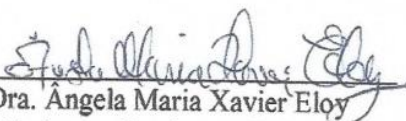
Examinadora constituída por:



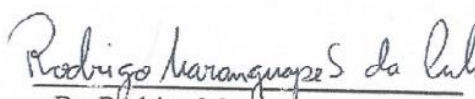
Dra. Alice Andrioli Pinheiro
Embrapa Caprinos e Ovinos
(Co-orientador/Examinador)



Dra. Lucia Helena Sider
Embrapa Caprinos e Ovinos
(Examinador)



Dra. Angela Maria Xavier Eloy
Embrapa Caprinos e Ovinos
(Examinador)



Dr. Rodrigo Maranguape da Silva
Cunha
Univ. Estadual Vale do Acaraú
(Examinador)



Dr. Raymundo Rivaldo Pinheiro
Universidade Estadual Vale do Acaraú - UVA
Embrapa Caprinos e Ovinos
Presidente

SOBRAL - CE
FEVEREIRO - 2015

Aos meus pais, Rita Vânia Aragão de Azevedo e Francisco Antônio de Azevedo Neto,

Dedico

AGRADECIMENTOS

A Deus, que sempre está comigo, segurando minha mão, iluminando meus pensamentos, me guiando nessa estrada da vida.

A minha família. Meus pais Rita Vânia e Azevedo Neto pelo imenso amor e suporte. Aos meus irmãos Alysson Francisco e Maria Alyne que para mim são como segundos pais, sempre cuidando da irmã mais nova. A minha cunhada Erbenia do Nascimento pelo carinho e por ter possibilitado a vinda de duas joias raras em nossa família, meus sobrinhos Adsson Azevedo e Talysson Azevedo.

Ao meu querido orientador e pai científico, Dr. Rizaldo Pinheiro, pela confiança, por ter possibilitado a minha iniciação e continuidade da vida científica, pela disposição, pelas risadas das histórias contadas, por todo o seu exemplo de vida.

A minha co-orientadora, Dra. Alice Andrioli, por todo carinho e ajuda, exemplo de pesquisadora e mãe.

Aos meus amigos Roberta Lomonte, Apoliana Rodrigues e Ronaldo Dias pelos primeiros ensinamentos no laboratório e por todo carinho.

Aos baianos queridos, Carla Valença e Thiago Souza, por todo apoio, ensinamentos repassados, carinho, amizade e confiança.

As minhas pupilas Ana Lídia Madeira e Juscilânia Furtado, “viruletes” do meu coração. Aos amigos mais antigos Vanderlan Warlington, Samilly Alves, Ana Milena Lima, Kelma Costa, Maximiana Mesquita, Alzira do Carmo, Aryana Lushese. Aos amigos mais novos, Renato Peixoto, Edgar Marques, Ana Carolina por todo companheirismo científico, amizade, horas de conversas, conselhos, alívio de dias estressantes.

Aos Laboratoristas da Embrapa João Ricardo, Osmarilda, Jamile, Nóbrega por toda presteza e apoio técnico.

A Joyce Sampaio da secretária da coordenação do Programa de Pós-Graduação do Mestrado Acadêmico em Zootecnia, sempre disposta a ajudar todos os alunos.

A Universidade Estadual Vale do Acaraú (UVA) pela oportunidade de realização do Mestrado Acadêmico em Zootecnia.

A Embrapa Caprinos e Ovinos, pelo apoio financeiro do projeto e pelas instalações para realização deste estudo.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pelo apoio financeiro do projeto.

A Coordenação de aperfeiçoamento de Pessoal de Ensino Superior (CAPES) pela concessão da bolsa de mestrado.

A equipe do Núcleo de Biotecnologia de Sobral, NUBIS-UVA pela ajuda, onde eu pude aprender os primeiros passos na realização da eletroforese bidimensional.

Meus sinceros agradecimentos!

*“Ontem passado. Amanhã futuro. Hoje agora. Ontem foi.
Amanhã será. Hoje é. Ontem experiência adquirida.
Amanhã lutas novas. Hoje, porém, é a nossa hora de fazer e de construir”.*

Chico Xavier

SUMÁRIO

	PÁGINA
LISTA DE TABELAS.....	IX
LISTA DE FIGURAS	X
LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS.....	XII
RESUMO GERAL.....	XV
GENERAL ABSTRACT	XVI
CONSIDERAÇÕES INICIAIS	17
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	19
CAPÍTULO 1 – REFERENCIAL TEÓRICO	20
1. LENTIVÍRUS DE PEQUENOS RUMINANTES	21
1.1 Classificação dos LVPR	21
1.2 Estrutura e genoma dos lentivírus.....	23
1.3 Proteínas dos LVPR.....	25
1.4 Tropismo e infectividade viral.....	26
1.5 Transmissão	27
1.6 Controle e Diagnóstico	27
2. PROTEÔMICA	28
2.1 Eletroforese Bidimensional (2D)	29
2.2 Espectrometria de massas (EM)	30
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	32
CAPÍTULO 2 – PERFIL PROTEICO-IMUNOGÊNICO DE PROTEÍNAS DE LENTIVIRUS DE PEQUENOS RUMINANTES DETENTORAS DE ALTO VALOR DIAGNÓSTICO.....	39
RESUMO	40
ABSTRACT	41
INTRODUÇÃO.....	42
MATERIAL E METODOS	43
Cultura de células.....	43
Multiplicação e purificação viral	43
Eletroforese bidimensional.....	44
Coloração das proteínas	46
Análise de géis	47
Transferência passiva.....	47
Western Blot.....	47
Espectrometria de Massas	48
Análise bioinformática	48
RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	50
CONCLUSÕES	63
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	64
CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	68

LISTA DE TABELAS

PÁGINA

CAPÍTULO 1

1. Vírus da família <i>Retroviridae</i> de importância em Medicina Veterinária.....	22
2. Classificação taxonômica dos lentivírus de pequenos ruminantes.....	23

CAPÍTULO 2

1. Condições de análise para realização da espectrometria de massas (ESI-Q-TOF)	48
2. Amostras utilizadas para o alinhamento de sequências.....	49
3. Proteínas imunogênicas do vírus da artrite encefalite caprina amostra padrão Cork identificados por ESI-Q-TOF MS/MS.....	55
4. Proteínas imunogênicas do vírus da artrite encefalite caprina amostra nacional do Ceará (LVC-CE) identificados por ESI-Q-TOF MS/MS.....	56
5. Proteínas imunogênicas do vírus maedi visna amostra padrão K1514 identificados por ESI-Q-TOF MS/MS.....	56
6. Valores observados de ponto isoelétrico e massa molecular dos <i>spots</i> escolhidos para espectrometria de massas.....	57
7. Proteínas imunogênicas do vírus da artrite encefalite caprina amostra padrão Cork identificados por ESI-Q-TOF MS/MS. Sequências similares a mostras de Maedi-Visna amostra padrão K1514 e isolado do Sul da África.....	58
8. Epítomos referentes as proteínas produzidas pelo gene <i>gag</i>	62

LISTA DE FIGURAS

	PÁGINA
CAPÍTULO 1	
1. Representação esquemática da estrutura dos Lentivírus. A esquerda representação do vírion imaturo, estrutura pleomórfica e a direita o vírion maturado.....	24
2. Estrutura genômica dos lentivírus de pequenos ruminantes.....	25
3. Representação gráfica de um analisador de massas Q-TOF.....	31
CAPÍTULO 2	
1. Reidratação das <i>strips</i> no IPGbox.....	45
2. <i>Strips</i> posicionadas para a focalização isoeétrica.....	45
3. Demonstração do equilíbrio das <i>strips</i>	46
4. [A] Gel da eletroforese bidimensional de CAEV Cork. Círculos em vermelho demonstram os <i>spots</i> escolhidos para a espectrometria de massas. [B] Resultado do western blot, para amostra CAEV Cork. Círculos em preto, delimitam as marcações referentes a p28 e p15.....	53
5. [A] Gel da eletroforese bidimensional de CAEV CE. Círculos em vermelho demonstram os <i>spots</i> escolhidos para a espectrometria de massas. [B] Resultado do western blot, para amostra CAEV CE. Círculos em preto, delimitam as marcações referentes a p28 e p15.....	53
6. [A] Gel da eletroforese bidimensional de MVV, círculos em vermelho demonstram os <i>spots</i> escolhidos para a espectrometria de massas. [B] Resultado do western blot, para amostra MVV, círculos, em preto, delimitam as marcações referentes a p28.....	54
7. Alinhamento de Alinhamento de sequencias de LVC-CE com amostra padrão CAEV Cork e amostra isolada do Ceará por Feitosa (2011). Foram escolhidas as sequencias de maior score entre as duplicatas. Letras em vermelho indicam as sequencias similares para as diferentes amostras.....	59

8. **Alinhamento de sequencias para proteina p28. Aminoácidos em vermelho representam regiões homologas a todas as sequencias, ou seja, regiões conservadas.....** 60
- Letras (aminoácidos) em vermelho representam as sequencias homologas da amostra de CAEV Cork do presente estudo. [A] Disposição das sequencias provenientes do *spot* 3, aminoácidos compreendidos na região de 1 a 146, região da proteina de matriz p16.
9. **[B] Disposição da sequência provenientes do *spot* 1, aminoácidos compreendidos entre 147 e 358, região que dá origem a p28. Quadrado azul indica sequência dos epítomos 21506 e 33018 respectivamente. Quadro verde indica os epítomos 20295 e 32388.....** 61
- Resultado da análise de conservação de epítomos com IEDB. Letras em azul indicam os aminoácidos homólogos das sequencias do presente
10. **estudo com o epítopo 21506 62**
(GNRAQKELIQGKLNEEAERWRRNNPPPPA).....
- Resultado da análise de conservação de epítomos com IEDB. Letras em azul indicam os aminoácidos homólogos das sequencias do presente
11. **estudo com o epítopo 33018 62**
(KQKTNEPYEDFAARLLEAIDAE).....

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

%	Porcentagem
1D	Eletroforese unidimensional
2D	Eletroforese bidimensional
A	Ampéres
A25	Garrafa de cultivo de 25cm ²
A150	Garrafa de cultivo de 150cm ²
Ac	Anticorpos
Ag	Antígeno
Anti-CAEV	Anticorpo Anti-Vírus da Artrite-Encefalite Caprina
CA	Capsídeo
CAE	Artrite Encefalite Caprina
CAEV	Vírus da Artrite-Encefalite Caprina
CAEV CE	Vírus da Artrite Encefalite Caprina isolado do Estado do Ceará
CAEV Cork	Vírus da Artrite Encefalite Caprina cepa padrão
DAB	Diaminobenzidine
DIC	Collision-induced dissociation
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DTT	Ditiotreitol
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético
ELISA	Enzyme Linked Immunosorbent Assay
EM	Espectrometria de massas
EMBRAPA	Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária
ESI	<i>Electrospray Ionization</i>
env	Gene que codifica as proteínas do envelope viral
g	Força centrífuga
g/dL	Gramas por decilitro
gag	Gene viral que codifica as proteínas internas dos vírus
gp	Glicoproteína
HIV	Vírus da Imunodeficiência Adquirida
IAA	Iodoacetamida
ICTV	Comitê Internacional de taxonomia Viral
IDGA	Imunodifusão em Gel de Agar
IN	Integrase
LTRs	Regiões terminais não-codificantes
LVPR	Lentivírus de Pequenos Ruminantes
M	Molar
mA	MiliAmper
MA	Proteína da Matriz
MALDI	Matriz assistida por laser de dessorção/ionização
MASCOT	Matriz Science
MEM	Meio Essencial Mínimo

mg	Miligrama
.mgf	Extensão de arquivo para análise bioinformática
MIP	Motilidade Individual Progressiva
mM	Milimolar
m/z	massa/carga
MS/MS	Espectrômetros que acoplam dois analisadores de massa
MSC	Membrana Sinovial Caprina
MVV K1514	Vírus Maedi Visna cepa padrão
NC	Núcleo proteína
Nm	Nanômetro
°C	Graus Celsius
OIE	Organização Mundial de Saúde Animal
P1	Programa um
P2	Programa dois
pb	Pares de bases
PBS	Tampão fosfato de sódio
PCR	Reação em Cadeia da Polimerase
PCRn	Nested –PCR
pI	Ponto isoelétrico
pH	Potencial hidrogeniônico
PM	Peso Molecular
pol	Gene que codifica as enzimas virais
Ppm	Partes por milhão
PR	Protease
QQQ	Triquadropolo
qsp	Quantidade suficiente para
rev	Gene de regulação viral
RIFI	Reação de imunofluorescência indireta
RNA	Ácido ribonucleico
RT	Transcriptase reversa
SDS	Dodeciol Sulfato de Sódio
SFB	Soro Fetal Bovino
SERPA	Análise Proteômica Sorológica
SU	Proteína de Superfície
tat	Gene de regulação viral
TCID₅₀	Dose infectante de 50% da cultura de células
TM	Proteína Transmembrana
TOF	Time-of-Flight
V	Volts
v/v	Volume/volume
vif	Gene de regulação viral
W	Watts
WB	<i>western blot</i>
WB-1D	<i>western blot</i> unidimensional

μL	Microlitros
$\mu\text{g}/\mu\text{L}$	Microgramas/microlitro
UPLC	Cromatógrafo líquido de ultraeficiência

RESUMO GERAL

Os lentivírus de pequenos ruminantes, vírus da artrite encefalite caprina e vírus *maedi visna*, pertencem a família *Retroviridae*. São relacionados genética e antigenicamente, causam doenças crônicas e progressivas, levando a perdas produtivas e econômicas. A transmissão interespecie desses vírus pode ser preocupante devido a recombinação genética desses lentivírus. O estudo da proteômica desses vírus torna-se necessário para o conhecimento da função dos genes. A análise proteômica sorológica (SERPA) associada a espectrometria de massas (EM), dentre muitas possibilidades, permite o conhecimento de proteínas de valor diagnóstico. Com isso objetivou-se delinear o perfil proteico-imunogênico bidimensional de lentivírus de pequenos ruminantes caracterizando proteínas detentoras de alto valor diagnóstico do antígeno dos lentivírus de pequenos ruminantes. Primeiramente realizou-se *explant* de células de membrana sinovial caprina e posteriormente, com o subcultivo das células, a produção do antígeno de três cepas virais MVV K1514, CAEV Cork e LVC-CE. Essas amostras foram submetidas à eletroforese bidimensional e western blot. Proteínas imunorreativas foram escolhidas para o sequenciamento através de espectrometria de massas. Como o resultado elaborou-se o perfil proteico-imunogênico bidimensional das cepas de LVPR, inclusive da cepa viral do estado do Ceará (LVC-CE), dados inéditos para o país. Seis proteínas tiveram sequências homologas compatíveis com proteínas de CAEV e MVV, referentes às proteínas p28, p19 e p15. Demonstrou-se a similaridade da resposta imune entre as cepas estudadas. A técnica SERPA associada à EM permitiu a identificação e caracterização peptídica das proteínas imunogênicas das cepas padrão CAEV Cork e MVV K1514, e da amostra de LVPR nativa do estado do Ceará.

Palavras – chave: LVPR, SERPA, espectrometria de massas.

GENERAL ABSTRACT

The small ruminant lentiviruses (SRLV), the caprine arthritis encephalitis virus and maedi visna virus belong to *Retroviridae* family. They are related genetically and antigenically, and induce chronic and progressive disease which leads to productive and economic losses. The interspecific transmission is worrying due to the genetic recombination of these viruses. The proteomic study is necessary in order to know the genes function. Serological proteome analysis (SERPA) in association with mass spectrometry, besides others possibilities, allow knowing high-value proteins for diagnosis. The aim of this study was to determine the two-dimensional protein-immunogenic profile and characterize the high-value proteins for diagnostic of different strains of SRLV. Initially, goat synovial membrane cells were explanted and subculture for antigen production of three viral strains CAEV Cork, MVV K1514 and LVC-CE. These samples were submitted to two-dimensional electrophoresis and western blot. Immunoreactive proteins were chosen in order to be sequenced by mass spectrometry. The results showed two-dimensional protein-immunogenic profile of the SRLV strains. Six proteins had homologous sequences compatible to protein CAEV and MVV, related to protein p28 and p15. The SERPA in association with mass spectrometry allowed the immunogenic protein identification and peptide characterization of the two standard strains, CAEV Cork and MVV K1514, and also the national one isolated in Ceará state.

Keywords: SRLV, SERPA, mass spectrometry.

CONSIDERAÇÕES INICIAIS

As lentivirose de pequenos ruminantes, Artrite Encefalite Caprina e Maedi-Visna, apresentam quatro formas clínicas principais: articular, respiratória, mamária e neurológica, além de causar emagrecimento progressivo que determinam perdas econômicas significativas (PINHEIRO et al., 2012).

Os prejuízos diretos causados por estas enfermidades são: diminuição da vida produtiva e da produção leiteira dos animais; redução na duração do período de lactação; predisposição para a ocorrência de infecções bacterianas, especialmente na glândula mamária; crescimento deficiente ou aumento da mortalidade das crias e diminuição da eficiência reprodutiva. A CAE pode promover, também, a redução dos níveis de gordura e de proteína do leite de cabras infectadas (CARNEIRO, 2011; MARTINEZ-NAVALON et al., 2013). Carneiro (2011) constatou, ainda, que esta enfermidade predispõe os animais à verminose gastrointestinal por *Haemonchus spp.* As perdas indiretas referem-se à desvalorização dos rebanhos, reposição precoce dos animais que desenvolvem sintomas, despesas com o controle e pelas barreiras sanitárias para matrizes, reprodutores, sêmen e embriões (ANDRIOLI et al., 2006).

Para a identificação dos animais infectados, os testes sorológicos são os mais utilizados. A prova de IDGA é um dos testes recomendados pela Organização Mundial de Saúde Animal (OIE), pois apresenta resultados rápidos e um menor custo para execução. Porém, é um exame pouco sensível, já que não detecta baixo título de anticorpos no soro, facilitando a permanência de animais falso-negativos no rebanho (PINHEIRO et al., 2006; PINHEIRO et al., 2009). Dentre os outros testes sorológicos, o *western blot* demonstrou ser sensível, pois pode detectar anticorpos numa diluição de até 128 vezes maior que o IDGA e 16 vezes maior que o ELISA indireto (PINHEIRO et al., 2012). Sendo assim, trata-se de um teste de eleição para detectar níveis baixos de anticorpos.

O estudo da proteômica é necessário para conhecer o funcionamento dos genes por meio da sua expressão proteica (PANDEY e MANN, 2000). As técnicas proteômicas muitas vezes estão aliadas às técnicas imunológicas a fim de se obter uma acurácia maior no estabelecimento de perfis proteico-imunogênicos. Dentre as metodologias disponíveis, evidencia-se a análise proteômica sorológica (serological proteome analysis – SERPA) associada à espectrometria de massas. Esta ferramenta é

eficaz para identificar proteínas de alto valor diagnóstico ou que conferem imunidade protetora (SEYFFERT et al., 2011).

Portanto, a detecção precoce de animais infectados, visando retirar ou isolar do rebanho animais portadores da doença, requer melhoria da sensibilidade dos testes de imunodiagnóstico. Com isto, torna-se cada vez mais necessário, conhecer a biologia molecular desses vírus tendo em vista a caracterização das regiões imunogênicas das proteínas envolvidas.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ANDRIOLI, A.; GOUVEIA, A. M. G.; MARTINS, A. S. et al. Fatores de risco na transmissão do lentivirus caprino pelo sêmen. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v.41, p. 1313-1319, 2006.
- CARNEIRO, F.F.D. **Perdas econômicas decorrentes da Artrite-Encefalite Caprina**. 2011. 97f. Dissertação (Mestrado em Zootecnia) - Universidade Estadual Vale do Acaraú, Sobral.
- MARTINEZ-NAVALON, B.; PERIS, C.; GOMEZ, E. A. et al. Quantitative estimation of the impact of caprine arthritis encephalitis virus infection on milk production by dairy goats. **The Veterinary Journal**, v. 197, n. 2, p. 311-317, 2013.
- PANDEY, A.; MANN, M. Proteomics to study genes and genomes. **Nature**, v. 405, p. 837-846, 2000.
- PINHEIRO, R. R.; OLORTEGUI, C. D. C.; GOUVEIA, A. M. G.; et al. Desenvolvimento de dot-blot para detecção de anticorpos para o vírus da Artrite Encefalite Caprina em caprinos. **Revista Portuguesa de Ciências Veterinárias**, Lisboa, v. 101, p. 51-56, 2006.
- PINHEIRO, R. R.; XIMENDES, L. J. F.; ANDRIOLI, A.; TEIXEIRA, M. F. S. **Lentivírus de Pequenos Ruminantes: diagnóstico, prevenção e vacinas**. In: Ximendes, L.J.F.; Martins, G.A.; Carvalho, J.M.M.; Sobrinho, J.N. (Org.). Série BNB Ciência e Tecnologia - As ações do Banco do Nordeste do Brasil em P&D na arte da pecuária de caprinos e ovinos no Nordeste brasileiro. 1ªed. Fortaleza: Banco do Nordeste, 2009, v. 1, p. 305-328.
- PINHEIRO, R. R.; ANDRIOLI, A.; SIDER, L. H.; et al. Lentiviroses em pequenos ruminantes: principais métodos de diagnóstico. **Documentos online** 107, 42p., 2012.
- SEYFFERT, N.; PACHECO, L. G. C.; SILVA, W. M. et al. Preliminary serological secretome analysis of *Corynebacterium pseudotuberculosis*. **Journal of Integrated Omics**, v.1, n.2, p.193-197, 2011.

CAPÍTULO 1

REFERENCIAL TEÓRICO

1. LENTIVÍRUS DE PEQUENOS RUMINANTES

O vírus da artrite encefalite caprina (CAEV) e o vírus Maedi Visna (MVV) são comumente chamados de lentivírus de pequenos ruminantes (LVPR). Antes eram considerados espécie-específicos, com CAEV infectando caprinos e MVV, ovinos. Porém já demonstrou-se quebra da barreira interespecie desses vírus (SOUZA et al., 2012).

A infecção pelos LVPR tem caráter crônico e multissistêmico levando a debilidade e até a morte do animal. Essas doenças geram perdas produtivas e econômicas, desde a queda da produção leiteira a barreiras sanitárias (CALLADO et al., 2001; PINHEIRO et al., 2004; BRITO, 2009) e não há terapêutica eficaz ou vacina que inativem o vírus. Portanto, a medida mais eficaz de combater estes agentes é identificar os animais infectados rapidamente e adotar medidas profiláticas (STACCHISSINI et al., 2007).

1.1 Classificação dos LVPR

De acordo com o comitê Internacional de Taxonomia Viral (International Committee of Viral Taxonomy – ICTV), os lentivírus de pequenos ruminantes estão inseridos na família *Retroviridae*, sub-família *Orthoretrovirinae*, gênero Lentivírus. Nesta mesma família estão listados outros vírus de importância na medicina humana, como o vírus da Imunodeficiência humana (HIV), e de importância veterinária como os listados na tabela 1.

Tabela 1 – Vírus da família *Retroviridae* de importância em medicina veterinária.

Subfamília	Gênero	Espécie viral
	<i>Alpharetrovirus</i>	Vírus da leucose aviária (ALV)
	<i>Betaretrovirus</i>	Jaagsiekte (JSRV; adenocarcinoma ovino)
	<i>Gamaretrovirus</i>	Vírus da leucemia felina (FeLV)
	<i>Deltaretrovirus</i>	Vírus da leucose bovina (BLV)
<i>Orthoretrovirinae</i>	<i>Epsilonretrovirus</i>	Nenhum associado à doença animal
		Vírus da imunodeficiência bovina (BIV)
		Vírus da anemia infecciosa equina (EIAV)
	<i>Lentivirus</i>	Vírus da imunodeficiência felina (FIV)
		Vírus da artrite encefalite caprina (CAEV)
	Vírus Maedi Visna dos avinos (MVV)	
<i>Spumaretrovirinae</i>	<i>Spumavirus</i>	Nenhum associado a doença animal

Fonte: FLORES, 2007.

Os LVPR são classificados em cinco grupos A-E (Tabela 2). Sendo o grupo A dividido ainda em 15 subtipos A1-A15 e o grupo B, com três subtipos sendo eles o B1, B2 e B3. Os grupos C e D são representados por poucos isolados e o genótipo E, o qual, inclui os subtipos E1 e E2 (SHAH et al., 2004; GREGO et al., 2007; GJERSET et al., 2007; PISONI et al., 2010; REINA et al., 2010; BERTOLOTTI et al., 2011; GIAMMARIOLI et al., 2011; FRAS et al., 2013; KUHAR et al., 2013).

Tabela 2 – Classificação taxonômica dos lentivírus de pequenos ruminantes.

Grupos	Subtipos	Espécies	Referências
A	A1	Caprinos e ovinos	Shah et al. (2004) e Grego et al. (2007)
	A2	Caprinos e ovinos	Shah et al. (2004) e Fras et al. (2013)
	A3	Caprinos e ovinos	Shah et al. (2004)
	A4	Caprinos e ovinos	Shah et al. (2004)
	A5	Caprinos	Shah et al. (2004)
	A6	Caprinos e ovinos	Shah et al. (2004)
	A7	Caprinos	Shah et al. (2004)
	A8	Caprinos	Grego et al. (2007)
	A9	Caprinos e ovinos	Grego et al. (2007)
	A10	Caprinos e ovinos	Pisoni et al. (2010)
	A11	Caprinos e ovinos	Giammarioli et al. (2011)
	A12	Caprinos e ovinos	Olech et al. (2012)
	A13	Caprinos e ovinos	Olech et al. (2012)
	A14	Caprinos	Kuhar et al. (2013)
	A15	Ovinos	Kuhar et al. (2013)
B	B1	Caprinos e ovinos	Shah et al. (2004) e Pisoni et al. (2005)
	B2	Caprinos e ovinos	Shah et al. (2004)
	B3	Caprinos e ovinos	Bertolotti et al. (2011) e Giammarioli et al. (2011)
C	-	Caprinos e ovinos	Shah et al. (2004) e Gjerset et al. (2007)
D	-	Caprinos	Shah et al. (2004)
E	E1	Caprinos	Grego et al. (2007) e Reina et al. (2010)
	E2	Caprinos	Grego et al. (2007) e Reina et al. (2010)

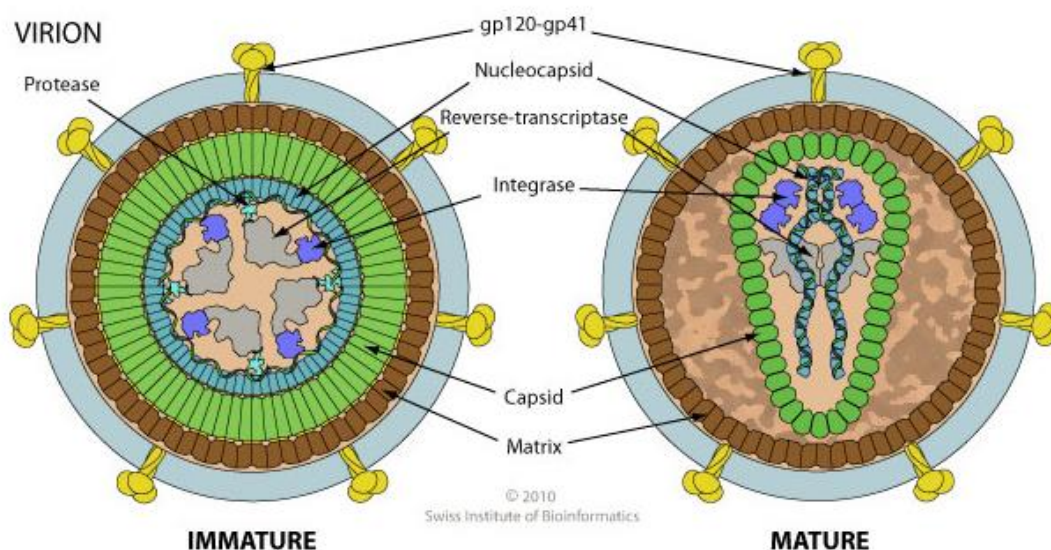
Fonte: SOUZA, 2014.

1.2 Estrutura e genoma dos lentivírus

Os lentivírus de pequenos ruminantes são *vírions* envelopados que medem de 80 a 100nm. Apresentam núcleo cônico e denso formado pela junção de cópias múltiplas de proteína do capsídeo (CA). Possuem duas moléculas idênticas de RNA de fita simples, não complementares. Os *vírions* dos retrovírus são liberados pelas células infectadas ainda imaturos. A maturação ocorre apenas no meio extracelular através da clivagem

dos precursores proteicos. Essa alteração e o rearranjo estrutural decorrente pode resultar na mudança da aparência dos *vírions*, observada sob microscopia eletrônica (Figura 1) (GONDA et al., 1986; GONDA, 1994; FLORES, 2007).

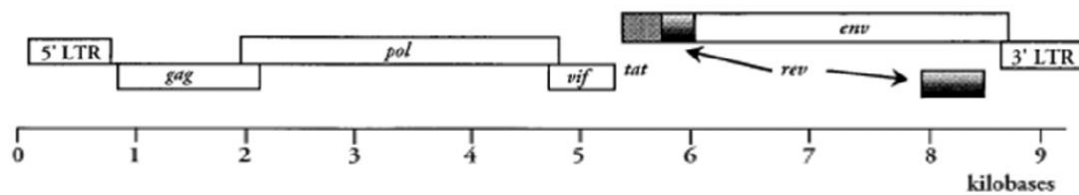
Figura 1 – Representação esquemática da estrutura dos Lentivírus - A esquerda representação do *vírion* imaturo, estrutura pleomórfica e a direita o *vírion* maturado.



Fonte: viralzone.expasy.org/all_by_species/264.html (2014).

Em geral o genoma dos vírus que compõem a família *Retroviridae* contém três genes principais: *gag*, *pol* e *env*. As proteínas geradas por esses genes são precursoras que posteriormente são clivadas em proteínas individuais. O gene *gag* codifica as proteínas da matriz (MA): a núcleo proteína (NC) e o CA. O gene *pol* codifica enzimas que desempenham funções catalíticas durante a replicação: a protease (PR), a transcriptase reversa (RT) e a integrase (IN). O gene *env* codifica proteínas do envelope viral: transmembrana (TM) e de superfície (SU). Além de genes estruturais há também genes acessórios ou auxiliares que os tornam retrovírus complexos, tais como os genes *tat*, *rev* e *vif* (CLEMENTS e PAYNE, 1994; FLORES, 2007; PEPIN et al., 1998). Observa-se, ainda, duas regiões terminais não-codificantes (Figura 2), altamente conservadas (“*long terminal repeats*” ou “LTRs”) (ZANONI et al., 1992).

Figura 2 – Estrutura genômica dos lentivírus de pequenos ruminantes (CLEMMENTS & ZINK, 1996).



1.3 Proteínas dos LVPR

As proteínas do gene *gag* são originadas pelo precursor pr55KDa, o qual origina o precursor de curta duração pr47KDa, que gera, por sua vez as proteínas do capsídeo (p28), da matrix (p19) e do nucleocapsídeo (p16). As proteínas do gene *env* são originadas de uma glicosilação traducional do precursor pr90KDa, o qual da origem ao precursor pr150KDa, que através de um processo de clivagem gera às glicoproteínas de superfície gp135 e a transmembrânica (gp45) (CHEEVERS et al., 1988).

As enzimas utilizadas na replicação viral são codificadas pelo gene *pol* sendo que a protease é responsável pela clivagem dos produtos dos genes *gag* e *pol*. A transcriptase reversa é responsável pela transcrição do RNA genômico em DNA fita dupla e a integrase coordena a integração do DNA viral ao genoma da célula hospedeira (TAVARES & PEREIRA, 1999).

Os principais determinantes antigênicos dos lentivírus são as proteínas gp 135, gp45 e p28. Entretanto, as proteínas p16 e p19, geradas pelo gene *gag*, também foram reportadas como antigênicas. Alguns estudos sugerem a semelhança antigênica dos lentivírus, enfatizando a similaridade entre CAEV e MVV e sua capacidade de infectar interespecie caprinos e ovinos (KWANG e CUTLIP, 1992; TORFASON et al., 1992; ARAGÃO et al., 2008; AZEVEDO et al., 2012; SOUZA, 2014).

Desde 1985, Ruby e seus colaboradores realizaram estudos afirmando a correlação de resposta imune cruzada entre o vírus MVV e CAEV, envolvendo todas as principais proteínas e glicoproteínas associadas aos *virions*. Nesse estudo eles demonstraram que cepas de lentivírus possuem em sua composição principal oito proteínas estruturais relativas aos pesos moleculares de 135KDa, 92KDa, 70KDa, 45KDa, 28KDa, 19KDa, 16KDa e 14KDa. Rosati et al, (1995) reportaram que a

proteína transmembrana (gp45) melhora a validade do diagnóstico, pois trata-se de um importante marcador imunológico de infecção por CAEV.

Em estudo com anticorpos monoclonais Brandão et al., (2013) demonstraram a marcação em WB para as proteínas, p55 (precursor), p44, p36, p28 e p22. A marcação para tais proteínas variou de acordo com o tratamento realizado sob o antígeno. Todos os anticorpos monoclonais foram reativos a p28 em todos os tratamentos, demonstrando a predileção da resposta imune contra proteína p28. Estes autores também verificaram um epítipo linear para p28, pois a proteína manteve sua atividade após o tratamento com SDS, o qual age na separação das cadeias polipeptídicas, enquanto que as resposta aos precursores p55 e p44 foi alterada, ou seja, a desnaturação modificou a estrutura do epítipo.

1.4 Tropismo e infectividade viral

Os monócitos/macrófagos são as células alvo da infecção pelo lentivírus de pequenos ruminantes (NARAYAN et al., 1982). Segundo Gendelman et al., (1986), a infecção nas células depende da presença de receptores para o vírus. Verificaram, também, que poucos monócitos têm estes receptores, entretanto estes aumentam após sua maturação. Isto explica a influencia na replicação dos vírus, pois a expressão de vírus infeccioso ocorre apenas nos macrófagos (NARAYAN et al., 1983; GENDELMAN et al., 1986).

Os LVPR podem estar presentes em uma grande quantidade de tecidos e fluidos infectados, mesmo que não seja o tecido de preferência para a replicação viral. Esses vírus foram identificados direta ou indiretamente em tecido de terceira pálpebra (CAPPUCHIO et al., 2003), células epiteliais do oviduto de cabras (LAMARA et al., 2002), tecido uterino (FIENI et al., 2003), glândula mamária (LERONDELLE et al., 1999) e pulmão (ARAÚJO, 2004). Foi identificado também na região cerebral em macrófagos, células microgliais, astrócitos e oligodentrócitos, plexo coroide, neurônios (SANNA et al., 1999), em células estromais de medula óssea (fibrócitos, células endoteliais e adipócitos) (GROSSI et al., 2005). Também houve identificação em fluidos corporais como sangue, colostro e leite (LARA et al., 2003), no líquido cefalorraquidiano (SIDER et al., 2010), no fluido uterino e no sêmen (ANDRIOLI, 2001; ANDRIOLI et al., 2006).

Observou-se replicação produtiva dos LVPR *in vitro*, em fibroblastos de membrana sinovial, membrana nictitante e plexo coroide caprino (ABREU et al., 1998; PINHEIRO et al., 2005; PINHEIRO et al., 2012a; ARAÚJO, 2014). Como também em células epiteliais de córnea caprina (OLIVEIRA et al., 2008) e células endoteliais vasculares (JAN et al., 2000).

1.5 Transmissão

A transmissão viral ocorre por meio de secreções ou excreções ricas em células do sistema monocítico-fagocitário, em especial macrófagos. Para o MVV a transmissão via aerossóis é muito importante, pois a principal forma clínica da doença é a pulmonar (DAWSON, 1987; MOOJEN, 2001). Quanto ao CAEV a principal via de transmissão é a digestiva, através da ingestão do leite e/ou colostro infectados. Além das vias de transmissão citadas, pode ocorrer ainda para ambos, por contato direto; pelo refluxo de leite contaminado em máquinas de ordenha desreguladas; por mãos, toalhas, agulhas, tatuadores, equipamento de descorna contaminados (ROWE & EAST, 1997) e pela inseminação artificial (SOUZA et al., 2013). A transmissão intrauterina também é uma possibilidade (RODRIGUES, 2012).

A transmissão interespecie dos LVPR ocorre, principalmente, através do contato de ovinos e caprinos infectados e também pela ingestão de colostro e leite de cabras infectadas (SOUZA, 2014).

1.6 Controle e diagnóstico

Tendo em vista a dificuldade da erradicação da doença, bem como a produção de uma vacina, algumas medidas de controle para as lentivirose são adotadas, tais como: separação imediata das crias após o nascimento impedindo o contato com as mães; administração de colostro termizado ou de bovino; realização de testes de diagnóstico em intervalos regulares e separação ou sacrifício dos animais positivos; realização de quarentena dos animais introduzidos no rebanho; adoção de linha de ordenha; controle da monta dos reprodutores positivos; utilização de materiais cirúrgicos, seringas, agulhas e tatuadores estéreis (PINHEIRO et al., 1989; CALLADO et al., 2001; SOUZA et al., 2012).

Para diagnosticar a presença dos LVPR em rebanhos, pode-se executar métodos de detecção direta como: o isolamento viral em cultivo celular, microscopia

eletrônica, hibridização *in situ* e testes com reação em cadeia de polimerase (PCR); e métodos indiretos por meio de testes sorológicos. Dentre as técnicas indiretas, as principais para o diagnóstico das LVPR são a imunodifusão em gel de agar (IDGA), a reação de imunofluorescência indireta (RIFI), a imunohistoquímica, e os ensaios imunoenzimáticos: ELISA, dot-blot e western blot (WB).

Um estudo realizado por Pinheiro et al., (2012b) classificou o nível de sensibilidade dos testes de IDGA, ELISA e WB, através da diluição seriada de soro positivo para LVPR. O IDGA apresentou linha de precipitação somente até a diluição 1/8. No ELISA, resultados positivos foram alcançados até a diluição 1/64, enquanto no WB, verificou-se que até a diluição 1/1024 apresentou positividade. Esses dados demonstram que o WB possui a capacidade de detectar anticorpos numa diluição de até 128 vezes maior que o IDGA e 16 vezes maior que o ELISA.

Muitas das técnicas indiretas, principalmente os ensaios imunoenzimáticos e o IDGA dependem diretamente da qualidade do antígeno. Segundo Knowles (1997), diversos testes de ELISA foram desenvolvidos para a detecção de anticorpos para LVPR, nos quais foram estudados tanto antígenos nativos como recombinantes. Adams e Gorham (1986) avaliando dois antígenos de CAEV, gp135 e p28, para detecção de anticorpos para este agente através de um teste de IDGA, concluíram que o antígeno gp 135 detecta maior número de caprinos infectados do que o antígeno p28, ainda que alguns animais desenvolvam resposta anti-p28 na ausência de resposta anti-gp 135.

2 PROTEÔMICA

Entende-se por proteômica o estudo em larga escala de proteínas usadas para compreender a função dos genes. A existência de sequências completas de genomas não é suficiente para entender a função biológica, sendo assim a proteômica é complementar à genômica. A regulação de proteínas por proteólise, em nível de compartimentos celulares, afeta o produto dos genes. As modificações pós-traducionais, as interações proteína-proteína e a composição de organelas celulares, por exemplo, só podem ser identificadas por métodos proteômicos. Apesar de qualquer dificuldade, a proteômica é uma ferramenta para conhecer o funcionamento dos genes analisando o produto final do genoma (PANDEY & MANN, 2000).

A proteômica na ciência animal pode ser usada para examinar as interações entre patógenos - hospedeiro, identificar as principais proteínas bacterianas, progressão de doenças, recuperação de enfermidades e elucidar a resposta do animal ao estresse. Além disto, pode comparar proteínas de animais doentes com as de indivíduos saudáveis, onde estas, por conseguinte, apresentam-se como alvo para testes de diagnóstico, novos tratamentos e descoberta de biomarcadores (LIPPOLIS & REINHARDT, 2008).

A imunoproteômica pode ser definida como a combinação de metodologias proteômicas associadas a técnicas imunológicas. Seu desenvolvimento é vital em uma época em que torna-se cada vez mais urgente identificar, com precisão e rapidez, doenças ou antígenos alvos de patógenos, para o desenvolvimento de novos medicamentos e/ou vacinas (STEEL et al., 2005). Entre as atuais técnicas proteômicas disponíveis, a eletroforese bidimensional (2-D) tem sido muitas vezes escolhida, combinada com o *western blot*, em aplicações de imunoproteômica (KLADE, 2002). Segundo FALISSE-POIRRIER et al., (2006), esta combinação multidimensional com imuno-dectecção foi chamada análise proteômica sorológica (*serological proteome analysis* - SERPA).

A técnica SERPA associada ao sequenciamento das proteínas por espectrometria de massas é uma estratégia importante, pois possibilita identificar proteínas que induzem imunidade protetora ou que desencadeiam respostas imunológicas com valor diagnóstico (SEYFFERT et al., 2011). Como exemplo da robustez da técnica, cita-se a identificação de novos candidatos de autoantígenos/autoanticorpos na diabetes tipo 1 (MASSA et al., 2013).

1.1 Eletroforese Bidimensional (2D)

A eletroforese bidimensional permite a determinação simultânea de dois parâmetros proteicos: a massa molecular e o ponto isoelétrico (pI). Na primeira dimensão as proteínas são divididas pelo seu pI com a focalização isoelétrica. Posteriormente (segunda dimensão), as proteínas são divididas pela massa molecular, sob a ação de corrente elétrica (O'FARREL, 1975). A Eletroforese 2D permite a separação de um grande número de proteínas, de amostras complexas, em alta resolução, além de comportar o estudo de produtos gênicos através da comparação de perfis proteicos (ROCHA et al., 2005).

A eletroforese 2D possui algumas limitações, pois nota-se a ausência da detecção de algumas proteínas, como as hidrofóbicas e/ou alcalinas, proteínas de pesos moleculares muito baixo ou muito alto, além de proteínas expressas em baixas quantidades, que não são detectadas pelos métodos convencionais de coloração como o Azul de *Coomassie* (ROCHA et al., 2005; RABILLOUD et al., 2010).

Para a análise dos géis nos softwares, estes são submetidos à coloração. Dois métodos são comumente utilizados, a coloração com azul de *Coomassie* e nitrato de prata. A coloração com azul de *Coomassie* tornou-se um padrão de referência, pois apesar de moderada sensibilidade, essa coloração possui uma excelente compatibilidade com a espectrometria de massas (EM). Já a coloração de prata por mais que seja sensível sua compatibilidade com a EM é problemática. Esse fator ocorre devido ao uso de formaldeído (RABILLOUD & LELONG, 2011).

2.2 Espectrometria de massas (EM)

A espectrometria de massas é uma técnica microanalítica a qual é utilizada para obter informações sobre estrutura de uma amostra, como também do peso molecular. Permite ainda conhecer, a composição elementar de amostras; a estrutura molecular; a composição qualitativa e quantitativa de misturas complexas. Toda a informação obtida a partir de um espectrometro de massa decorre através da análise de íons livres em fase gasosa (GLISH & VACHET, 2003).

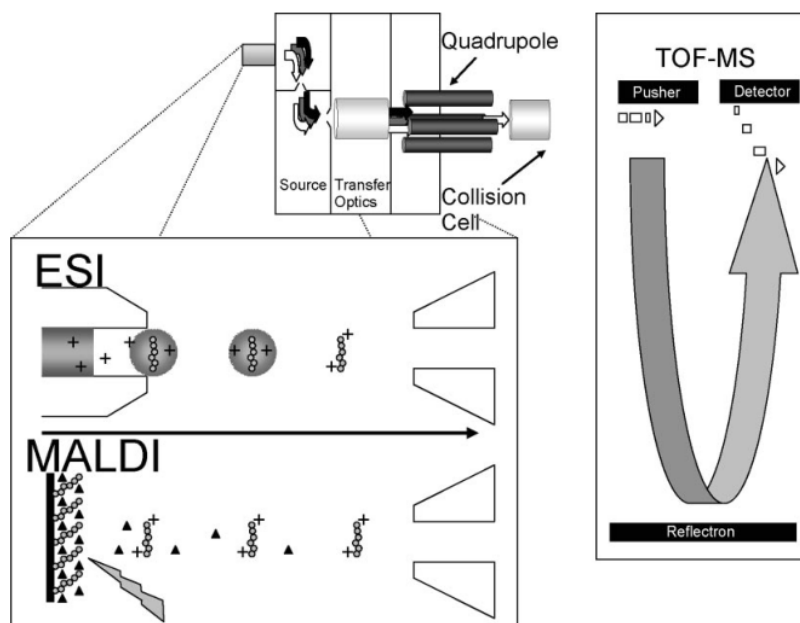
Existem diversos tipos de espectrômetros de massas que podem ser utilizados nos estudos com proteômica, cada um apresentando uma ligeira diferença na forma de identificação. Mesmo com diferentes formas, o processo básico para identificar proteínas usando um espectrômetro de massas é coerente entre vários tipos (LIPPOLIS & REINHARDT, 2008). Basicamente, existem três componentes principais de um espectrômetro de massa: uma fonte de ionização, um analisador de massas e um detector.

Dos métodos de ionização tem-se dois principais a: ionização por *electrospray* (ESI) e de ionização e dessorção a laser assistida por matriz (MALDI). A técnica *Electrospray* baseia-se na formação de um aerossol eletrostático gerando gotículas carregadas das quais são liberados íons (MORAES & LAGO, 2003). A ESI possui atributos que permite a aplicação em diversos estudos, como por exemplo, a ionização de complexos multimoleculares. Diferentemente da ESI onde os íons são produzidos de

forma contínua, os íons na MALDI são produzidos por pulsos de irradiação a laser. A amostra é co-cristalizada com uma matriz sólida que pode absorver o comprimento de onda da luz emitida pelo laser. (GLISH & VACHET, 2003).

Após a ionização da amostra os íons seguem para o analisador os quais geralmente levam em consideração a aceleração dos íons e com isso a separação ocorre de acordo com a relação massa-carga. Algumas técnicas de espectrometria ao invés de utilizar apenas um analisador de massas utilizam dois estágios, ou seja, acopla dois tipos de analisadores (EM-EM), (Figura 3). Esta técnica vem sendo bastante utilizada na detecção de compostos em baixas concentrações em matrizes complexas, pois possibilita um aumento na detectabilidade, diminui a interferência de composto da matriz no espectro e aumenta as informações estruturais que podem ser obtidas (CHIARADIA et al., 2008).

Figura 3 – Representação gráfica de um analisador de massas Q-TOF (LIPPOLIS & REINHARDT, 2008).



Após serem separados pelo analisador os íons são recebidos pelo detector, o qual amplifica e detecta a corrente de íons transformando em corrente elétrica. Essa corrente é processada e armazenada em um computador gerando os espectros de massa (AZEVEDO, 2004).

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABREU, S. R. O.; CASTRO, R. S.; NASCIMENTO, S. A.; et al. Produção de antígeno nucleoprotéico do vírus da artrite-encefalite caprina e comparação com o do vírus Maedi-Visna para utilização em teste de imunodifusão em ágar gel. **Pesq. Vet. Bras.** v. 18, n.2, p. 57-60, 1998.
- ADAMS, D. S.; GORHAM, J. R. The gp135 of caprine arthritis encephalitis virus affords greater sensitivity than the p28 in immunodiffusion serology. **Res. Vet. Sci.**, v. 40, n. 2, p. 157-160, 1986.
- ANDRIOLI, A. **Vírus da Artrite Encefalite Caprina: PCR e isolamento viral em amostras de sêmen, fluido uterino e embriões.** 2001, 68f. Tese (Doutorado em Ciências Veterinárias) - Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte.
- ANDRIOLI, A.; GOUVEIA, A.M.G.; MARTINS, A.S.; et al. Fatores de risco na transmissão do lentivírus caprino pelo sêmen. **Pesq. agropec. bras.**, v.41, n.8, p.1313-1319, 2006.
- ARAGÃO, M. A. C.; PINHEIRO, R. R.; ANDRIOLI, A.; et al. Maedi-Visna Vírus: Produção de antígeno, análise proteica e antigênica. **Arq. Inst. Biol.**, São Paulo, v.75, n.4, p.423-429, 2008.
- ARAÚJO, J. F. **Uso da cultura de células do plexo coroide caprino na produção de antígeno de lentivírus de pequenos ruminantes.** 2014. 14f. Trabalho de conclusão de curso (Bacharelado em Biologia) - Universidade Estadual Vale do Acaraú, Sobral.
- ARAÚJO, S. A. C. **Estudo histológico de pulmões de ovinos sorologicamente positivos para Maedi-Visna.** 2004, 78f. Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias) - Universidade Estadual do Ceará, Fortaleza.
- AZEVEDO, D. A. **Espectrometria de massas.** Apostila. Instituto de Química, Universidade Federal do Rio de Janeiro, 105p., 2004.
- AZEVEDO, D. A. A.; ARAÚJO, J. F.; LIMA, C. C. V.; et al. Análise protéica e imunogênica de antígenos de Lentivírus de Pequenos Ruminantes. In: Congresso Nordeste de Produção Animal, João Pessoa. **Anais...** (CD), 2012.
- BERTOLOTI, L.; MAZZEI, M.; PUGGIONI, G.; et al. Characterization of new small ruminant lentivirus subtype B3 suggests animal trade within the Mediterranean Basin. **Journal of General Virology**, v.92, n.8, p.1923-1929, 2011.
- BRANDÃO, C. F. L.; CAMPOS, G. S.; SILVA, A. C. R.; et al. Monoclonal antibodies against Caprine arthritis-encephalitis virus epitopes in the p28 and p55 gag viral proteins. **Journal of Virological Methods**, v.187, p.352– 356, 2013.

- BRITO, R. L. L. **Implicações da Artrite-Encefalite Caprina na reprodução, produção e na qualidade de leite de cabras.** 2009. 109 f. Dissertação (Mestrado em Zootecnia) - Universidade Estadual Vale do Acaraú, Sobral.
- CALLADO, A.K.C.; CASTRO, R.S.; TEIXEIRA, M.F.S. Lentivírus de pequenos ruminantes (CAEV e Maedi-Visna): Revisão e perspectivas. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v.21, n.3, p.87-97, 2001.
- CAPPUCHIO, M. T.; SANNA, E.; SANNA, M. P.; et al. Maedi-Visna Virus Detection in Ovine Third Eyelids. **J. Comp. Path.**, v.129, p. 37–43, 2003.
- CHEEVERS, W. P.; MCGUIRE, T. C. The lentiviruses: Maedi/Visna, Caprine Arthritis-encephalitis and Equine Infectious Anemia. **Adv. Virus Res.**, v. 34, p. 189-215, 1988.
- CHIARADIA, M. C.; COLLINS, C. H.; JARDIM, I. C. S. F. O estado da arte da cromatografia associada à espectrometria de massas acoplada à espectrometria de massas na análise de compostos tóxicos em alimentos. **Quim. Nova**, v. 31, n. 3, p.623-636, 2008.
- CLEMENTS, J. E.; PAYNE, S. L. Molecular basis of the pathobiology of lentiviruses. **Virus Research**, v.32, p.97-109, 1994.
- CLEMENTS, J.E.; ZINK, M.C. Molecular biology and pathogenesis of animal lentivirus infections. **Clinical Microbiology Reviews**, v.9, n.1, p.100-117, 1996.
- DAWSON, M. Pathogenesis of maedi-visna. **The Veterinary Record**. v. 120, p. 451-454, 1987.
- FALISSE-PORRIER, N.; RUELLE, V.; ELMOUALIJ, B. et al. Advances in immunoproteomics for serological characterization of microbial antigens. **Journal of Microbiological Methods**. v.67, p.593-596, 2006.
- FIENI, F.; ROWE, J.; VAN HOOSEAR, K.; BURUCOA, C.; et al. Presence of caprine arthritis-encephalitis virus (CAEV) proviral DNA in genital tracts tissues of superovulated dairy goat does. **Theriogenology**, v.59, p.1515-1523, 2003.
- FLORES, E. **Virologia veterinária**. Santa Maria:Ed. da UFSM, 888p. 2007.
- FRAS, M.; LEBOEUF, A.; LABRIE, F.M.; et al. Phylogenetic analysis of small ruminant lentiviruses in mixed flocks: Multiple evidence of dual infection and natural transmission of types A2 and B1 between sheep and goats. **Infection, Genetics and Evolution**, v.19, p.97-104, 2013.
- GENDELMAN, H. E.; NARAYAN, O.; KENNEDY-STOSKOPF, S.; et al. Tropism of Sheep Lentiviruses for Monocytes: Susceptibility to Infection and Virus Gene Expression Increase during Maturation of Monocytes to Macrophages. **Journal of Virology**, v.58, nº 1, p. 67-74, 1986.

- GIAMMARIOLI, M.; BAZZUCCHI, M.; PUGGIONI, G. Phylogenetic analysis of small ruminant lentivirus (SRLV) in Italian flocks reveals the existence of novel genetic subtypes. **Virus Genes**, v.43, n.3, p.380-384, 2011.
- GONDA, M. A.; BRAUM, M. J.; CLEMENTS, J. E., et al. Human T-cell lymphotropic virus type III shares sequence homology with a family of pathogenic lentiviruses. **Proceedings National Academy Science**, v. 83, p. 4007-4011, 1986.
- GONDA, M. A. Molecular biology and virus-host interactions of lentiviruses. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, v. 724, p.22-42, 1994.
- GLISH, G. L.; VACHET, R. W. The basics of mass spectrometry in the twenty-first century. **Nature Reviews**, v.2, p.140-150, 2003.
- GREGO, E.; BERTOLOTTI, L.; QUASSO, A.; et al. Genetic characterization of small ruminant lentivirus in Italian mixed flocks: evidence for a novel genotype circulating in a local goat population. **The Journal of general virology**, v.88 (Pt 12), p.3423-7, 2007.
- GROSSI, P.; GIUDICE, C.; BERTOLETTI, I.; et al. Immunohistochemical Detection of the p27 Capsid Protein of Caprine Arthritis–Encephalitis Virus (CAEV) in Bone-marrow Cells of Seropositive Goats. **J. Comp. Path.**, v.133, p.197–200, 2005.
- GJERSET, B.; JONASSEN, C.M.; RIMSTAD, E. Natural transmission and comparative analysis of small ruminant lentiviruses in the Norwegian sheep and goat populations. **Virus Research**, v.125, n.2, p.153-161, 2007.
- JAN, C. L.; GREENLAND, T.; GOUNEL, F.; et al. Activation of small ruminant aortic endothelial cells after *in vitro* infection by caprine arthritis encephalitis virus. **Res. Vet. Sci.**, v. 69, n.3, p.225-231, 2000.
- KLADE, C.S. Proteomics approaches towards antigen discovery and vaccine development. **Curr. Opin. Mol. Ther.**, v.4, p.216–223, 2002.
- KNOWLES, D.P. Laboratory diagnostic tests for Retrovirus infections of small ruminants. *Vet. Clin. North Am.: Food Anim. Pract.*, v. 13, p.1-11, 1997.
- KUHAR, U.; BARLIC-MAGANJA, D.; GROM, J. Phylogenetic analysis of small ruminant lentiviruses detected in Slovenia. **Veterinary Microbiology**, v.162, n.1, p.201- 206, 2013.
- KWANG, J.; CUTLIP, R. C. Analysis of antibody response to ovine lentivirus by using viral gene products expressed in a prokaryotic system. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, v. 188, p. 20-27, 1992.

- LAMARA, A.; FIENI, F.; MSELLI-LAKHAL, L.; et al. Epithelial cells from goat oviduct are highly permissive for productive infection with caprine arthritis–encephalitis virus. **Virus Research**, v.87, p.69–77, 2002.
- LARA, M.C.C.S.H.; BIRGEL JUNIOR, E. H.; FERNANDES, M. A. et al. Infecção experimental do vírus da artrite-encefalite dos caprinos em cabritos. **Arquivos do Instituto Biológico**, v.70, n.1, p.51-54, 2003.
- LERONDELLE, C.; GODET, M.; MORNEX, J. F. Infection of primary cultures of mammary epithelial cells by small ruminant lentiviruses. **Vet. Res.**, n.30, v.5, p.467-474, 1999.
- LIPPOLIS, J. D.; REINHARDT, T. A. Proteomics in animal science. **Journal of Animal Science**, v.86, p.2430-2441, 2008.
- MASSA, O.; ALESSIO, M; RUSSO, L.; et al. Serological Proteome Analysis (SERPA) as a tool for the identification of new candidate autoantigens in type 1 diabetes. **Journal of proteomics**, v.82, p.263-273, 2013.
- MOOJEN, V. Maedi-visna dos ovinos, In: Riet-Correa F., Schild A.L., Mendez M.D.C. & Lemos R.A.A. Doenças de Ruminantes e Equinos. 2 th ed. Varela, São Paulo. p.138-144, 2001.
- MORAES, M. C. B.; LAGO, C. L. do. Espectrometria de massas com ionização por “electrospray” aplicada ao estudo de espécies inorgânicas e organometálicas. **Quim. Nova**, v.26, n.4, p.556-563, 2003.
- NARAYAN, O.; WOLINSKY, J. S.; CLEMENTS, J. E.; et al. Slow virus replication: the role of macrophages in the persistence and expression of visna viruses of sheep and goats. **J. Gen. Virol.** v.59, p.345-356, 1982.
- NARAYAN, O.; KENNEDY-STOSKOPF, S., SHEFFER, D.; et al. Activation of caprine-arthritis-encephalitis virus expression during maturation of monocytes to macrophage. **Infect. Immun.** v.41, p.67-73, 1983.
- O’FARREL, P. H. High Resolution Two-Dimensional Electrophoresis of Proteins. **Journal of Biological Chemistry.** v.250, n.10, p.4007–4021, 1975.
- OLIVEIRA, M. M. M.; MELO, M. A. de; ANDRADE, P. P. de; et al. Western Blot para o diagnóstico das infecções pelos lentivírus de pequenos ruminantes em caprinos: um método simples para produção de antígeno. **Arq. Inst. Biol.**, São Paulo, v.75, n.3, p.263-270, 2008.
- PANDEY, A.; MANN, M. Proteomics to study genes and genomes. **Nature**, v.405, p.837-846, 2000.
- PÉPIN, M.; VITU, C.; RUSSO, P.; et al. Maedi-visna virus infection in sheep: a review. **Vet. Res.** v.29, p.341–367, 1998.

- PINHEIRO, R. R.; EGITO, A. S.; ROSA, J. S.; et al. **Artrite Encefalite Caprina Viral**. Sobral, CE: Embrapa caprinos e ovinos, 1989, 5p. (Comunicado Técnico, 19).
- PINHEIRO, R. R.; GOUVEIA, A. M. G.; ALVES, F. S. F. et al. Perfil de propriedades no estado do Ceará relacionado à presença do lentivírus caprino. **Ciência Animal**, v.14, n.1, p.29-37, 2004.
- PINHEIRO R. R.; GOUVEIA A. M. G.; YORINORI E. H.; et al. Comparação de três técnicas de produção do antígeno do lentivírus caprino utilizado no teste de imunodifusão em gel de Agar. **Braz J vet. Res. anim. Sci**, v. 42, n.6, p.453-458, 2005.
- PINHEIRO, R. R.; AZEVEDO, D. A. A.; SOUZA, A. L. M.; et al. **Uso de Cultura Celular de Membrana Nictitante Caprina para Produção de Antígeno de Lentivírus de Pequenos Ruminantes**. Sobral, CE: Embrapa caprinos e ovinos. 2012a, 4p. (Metodologia científica, 132).
- PINHEIRO, R.R.; ANDRIOLI, A.; SIDER, L.H.; et al. **Lentiviroses em Pequenos Ruminantes: Principais Métodos de Diagnóstico**. Sobral, CE: Embrapa Caprinos e Ovinos. 2012b, 42p. (Documentos, 107).
- PISONI, G.; BERTONI, G.; MANAROLLA G.; et al. Genetic analysis of small ruminant lentiviruses following lactogenic transmission. **Virology**, v.407, n.1, p.91-99, 2010.
- RABILLOUD, T.; CHEVALLET, M.; LUCHE, S.; et al. Two-dimensional gel electrophoresis in proteomics: Past, present and future. **Journal of proteomics**, v.73, p.2064-2077, 2010.
- RABILLOUD, T.; LELONG, C. Two-dimensional gel electrophoresis in proteomics: A tutorial. **Journal of proteomics**, v.7 4, p.1829 – 1841, 2011.
- REINA, R.; BERTOLOTTI, L.; GIUDICI, S.D.; et al. S. Small ruminant lentivirus genotype E is widespread in Sarda goat. **Veterinary Microbiology**, v.144, p.24-31, 2010.
- ROCHA, T. L.; COSTA, P. H. A.; MAGALHÃES, J. C. C.; et al. Eletroforese bidimensional e análise de proteomas. Brasília, DF: Embrapa, 2005, 12p. (Comunicado técnico, 136).
- RODRIGUES, A.S. **Padronização e utilização de testes sorológicos como ferramentas para controle da Artrite Encefalite Caprina em rebanho leiteiro semi-intensivo**. 2012. 88p. Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias) - Universidade Estadual do Ceará, Fortaleza.
- ROWE, J.D., EAST, N.E. Risk factors for transmission and methods for control of caprine arthritis-encephalitis virus infection. **Vet. Clin. North Am.: Food Anim. Pract.**, v.13, n.1, p.35-53, 1997.

- ROSATI, S.; PITTAU, M.; TOLARI, F.; et al. Genetic and antigenic characterization of CAEV (caprine arthritis-encephalitis virus) recombinant transmembrane protein. **Vet. Microbiol.**, v. 45, n.4, p. 363-370, 1995.
- RUBY P.; GOGOLEWSKI, D.; SCOTT ADAMS; et al. Antigenic Cross-reactivity between Caprine Arthritis-Encephalitis, Visna and Progressive Pneumonia Viruses Involves All Virion-associated Proteins and Glycoproteins. **J. gen. Virol.**, v. 66, p. 1233-1240, 1985.
- SANNA, E.; SANNA, M. P.; VITALI, C. G.; et al. Proviral DNA in the Brains of Goats Infected with Caprine Arthritis-encephalitis. **Virus. J. Comp. Path.** v.121, p.271-276, 1999.
- SEYFFERT, N.; PACHECO, L. G. C.; SILVA, W. M. et al. Preliminary serological secretome analysis of *Corynebacterium pseudotuberculosis*. **Journal of Integrated Omics**. v.1, n.2, p.193-197, 2011.
- SHAH, C.; BONI, J.; HUDER, J.B.; et al. Phylogenetic analysis and reclassification of caprine and ovine lentiviruses based on 104 new isolates: evidence for regular sheep-to-goat transmission and worldwide propagation through livestock trade. **Virology**, v.319, n. 1, p.12-26, 2004.
- SIDER, L. H.; BRITO, R. L. L.; VERAS, A. K. A.; et al. Processamento de líquido céfalo-raquidiano para extração de RNA genômico do vírus da artrite-encefalite caprina e diagnóstico molecular por RT-nested PCR. Sobral, CE: Embrapa caprinos e ovinos, 2010, 4p. (Comunicado técnico 114).
- SOUZA, T. S.; PINHEIRO, R. R.; LIMA, C. C. V.; et al. Transmissão interespecie dos lentivírus de pequenos ruminantes: revisão e desafios. **Acta Veterinaria Brasílica**, v.6, n.1, p.23-34, 2012.
- SOUZA, K.C.; PINHEIRO, R.R.; SANTOS, D.O.; et al. Transmission of the caprine arthritis-encephalitis virus through artificial insemination. **Small Ruminant Research**, v.109, n.2-3, p.193-198, 2013.
- SOUZA, T. S. **Transmissão interespecie de lentivírus de caprinos para ovinos: aspectos clínicos e epidemiológicos, monitoramento sorológico e análise molecular**. 2014. 126p. Tese (Doutorado em Ciência Animal nos trópicos), Universidade Federal da Bahia, Salvador.
- STACHISSINI, A.V.M.; MODOLO, J.R.; CASTRO, R.S.; et al. Controle da Artrite-Encefalite Caprina, em um capril comercial endemicamente contaminado. **Braz. J. Vet. Res. anim. Sci.**, v. 44, n. 1, p. 40-43, 2007.
- STEEL, L.F.; HAAB, B.B.; HANASH, S. M.; Methods of comparative proteomic profiling for disease diagnostics. **J. Chromatogr., B, Anal. Technol. Biomed. Life Sci.** v.815, p.275-284, 2005.

- TAVARES, L., PEREIRA, J.M. Importância das infecções por retrovírus da sub-família lentivirinae no homem e nos animais. **Rev. Port. Cien. Vet.**, v. XCIV n.529, p.9-27, 1999.
- TORFASON, E.G., GUDNADÓTTOR, M., LOVE, A. Comparison of immunoblots with neutralizing and complement fixing antibodies in experimental and natural cases of Visna-Maedi. **Arch. Virol.**, v. 123, p. 47-58, 1992.
- ZANONI, R.G., NAUTA, I.M., KUHNERT, P., PAULI, U., POHL, B., PETERHANS, E. Genomic heterogeneity of small ruminant lentiviruses detected by PCR. **Vet. Microbiol.** v.33, p.341-351, 1992.

CAPÍTULO 2

**PERFIL PROTEICO-IMUNOGÊNICO DE PROTEÍNAS DETENTORAS DE
ALTO VALOR DIAGNÓSTICO DE LENTIVÍRUS DE PEQUENOS
RUMINANTES**

**PROTEIN-IMMUNOGENIC PROFILE OF HIGH VALUE DIAGNOSTIC
PROTEINS OF SMALL RUMINANTS LENTIVIRUS**

RESUMO

O objetivo deste estudo foi delinear o perfil proteico-imunogênico bidimensional, bem como caracterizar proteínas detentoras de alto valor diagnóstico de diferentes cepas dos lentívirus de pequenos ruminantes (LVPR). Para tanto, foram cultivadas células de membrana sinovial caprina e posterior produção de antígeno com três cepas virais de LVPR, duas padrões, CAEV Cork e MVV K1514, e uma cepa nacional, isolada do estado do Ceará, LVC-CE. As cepas virais purificadas foram submetidas a eletroforese bidimensional, em duplicata. Posteriormente foram reidratadas 12 *strips* de 13cm cada, calibradas com pH de três a dez. As amostras virais foram colocadas em *strips* e então submetidas a focalização isoeétrica durante cerca de seis horas. Após, foi realizada eletroforese em gel de poliacrilamida a 12,5% (SDS-PAGE) para a separação por peso molecular das proteínas inicialmente divididas por ponto isoeétrico. Finalmente, os géis foram corados com azul de *Coomassie* e transferidos passivamente para uma membrana de nitrocelulose a fim de realizar o western blot (WB). O WB foi realizado com diluição do soro padrão positivo de 1:50. De acordo com o resultado do WB, foram selecionados *spots* nos géis corados para o sequenciamento por espectrometria de massas. Os géis foram analisados no software *ImageMaster*TM 2D *Platinum* 7.0. Em seguida, foi realizada uma análise de bioinformática com os dados gerados pelo espectrômetro para poder identificar as proteínas compatíveis com proteínas virais e elucidar sobre tais resultados. Os géis apresentaram-se reprodutíveis, demonstrando *spots* com pesos moleculares referentes as proteínas imunogênicas dos vírus, possivelmente p28, p19 e p15. Foram imunorreativos vários *spots* para as três amostras virais. Identificou-se no total seis proteínas por espectrometria compatíveis com os LVPR, três para CAEV Cork, duas para LVC-CE e uma para MVV K1514. As principais regiões sequenciadas foram comprovadamente relacionadas a p28 e uma proteína relacionada a p15 da amostra CAEV Cork. Essas regiões demonstraram semelhança para as três amostras, evidenciando similaridade da resposta imune das diferentes cepas. A proteína p28 foi a detentora de maior valor para o diagnóstico de LVPR. As sequências provenientes da cepa viral nacional LVC-CE foi bastante similar as cepas padrão e também foi compatível com a sequência do gene *gag* já publicada para isolados do estado do Ceará. Pode-se identificar regiões compatíveis com epítomos das proteínas p28 e p15. Através da técnica de análise proteômica sorológica associada à espectrometria de massas foi possível a caracterização de proteínas imunogênicas do gene *gag* dos LVPR.

Palavras – chave: LVPR, SERPA, espectrometria de massas, proteínas, diagnóstico.

ABSTRACT

The aim of this study was to determine the two-dimensional protein-immunogenic profile and characterize the high-value diagnostic epitopes from different strains of Small ruminant lentiviruses (LVPR). For this, goat synovial membrane cells were grown and inoculated with three viral strains, two standard strains, CAEV Cork and MVV K1514, and the one national strain, isolated in Ceará state, for antigen production. The purified viral strain was resolved by two-dimensional electrophoresis, in duplicate. The viral samples were rehydrated in 12 strips, 13cm each, pH 3 – 10 and then the strips were submitted to isoelectric focusing for six hours. The electrophoresis was performed in 12.5% polyacrylamide gel (SDS-PAGE) for molecular weight separation. Gels were stained with Coomassie blue and passively transferred to nitrocellulose membrane. The Western blot was carried out with positive standard serum dilution of 1:50. Immunoreactive protein spots were assayed by mass spectrometry. Gels were analyzed by software *ImageMaster™ 2D Platinum 7.0*. Bioinformatics analyses were performed with the data generated by the spectrometer in order to identify viral proteins and elucidate these results. The gels in duplicate were reproducible, showing spots with molecular weight of the viral immunogenic protein probably around p28, p19 e p15. Several spots were immunoreactive to three viral samples. Six proteins were identified by mass spectrometry, compatibles with LVPR, three for CAEV Cork, two for LVC-CE and one for MVV K1514. The main sequenced regions were related to p28 and one protein related to p15 of the CAEV Cork sample. These regions showed similarity between the different strains. Using the proteomic analysis associated to spectrometry it was possible to characterize the epitopes of proteins p28 and p15, and in consequence the main immunogenic peptides. The protein p28 has high-value for SRLV diagnosis.

Keywords: SRLV, SERPA, mass spectrometry, protein, diagnosis.

INTRODUÇÃO

O vírus da Artrite Encefalite Caprina (CAEV) e o vírus Maedi Visna (MVV) são comumente chamados de lentivirus de pequenos ruminantes (LVPR). Esses vírus pertencentes à família *Retroviridae*, estão relacionados genética e antigenicamente, e causam doenças crônicas e progressivas em caprinos e ovinos, levando a perdas produtivas e econômicas (CALLADO et al., 2001; CARNEIRO et al., 2013).

A transmissão interespecie dos vírus pode ser preocupante devido à possibilidade de recombinação entre amostras ovinas e caprinas, cujas consequências são desconhecidas (SOUZA et al., 2012), tornando-se necessário cada vez mais o estudo molecular desses vírus a fim de entender como eles se comportam, para buscar medidas efetivas de controle das doenças.

A proteômica tem papel fundamental neste cenário, visto que através dela estuda-se a dinâmica da expressão gênica. Estudar o produto final dos genes torna-se necessário, pois após a tradução, as proteínas podem sofrer diversas alterações em suas estruturas. Dentro desse universo, a imunoproteômica vem acrescentar conhecimento, agregando técnicas de proteômica à imunologia, identificando, por exemplo, antígenos alvos ou biomarcadores de doenças (STEEL et al., 2005; LIPPOLIS & REINHARDT, 2008).

A análise proteômica sorológica (serological proteome analysis - SERPA) é um método que une a eletroforese bidimensional (2D) com uma análise por *western blot* (WB) a fim de diferenciar proteínas imunorreativas, ou seja, buscar uma efetiva caracterização de antígenos, determinando um perfil imunoproteico (FALISSE-POIRRIER et al., 2006). A SERPA associada ao sequenciamento das proteínas por espectrometria de massas é uma estratégia útil que possibilita identificar proteínas que induzem imunidade protetora ou que desencadeiam respostas imunológicas com alto valor diagnóstico (SEYFFERT et al., 2011). Com isso, objetivou-se delinear o perfil proteico-imunogênico caracterizando proteínas de antígenos de lentivírus de pequenos ruminantes detentoras de alto valor diagnóstico.

MATERIAL E MÉTODOS

Cultura de células

Foram cultivadas células de membrana sinovial caprina (MSC), obtidas de caprino negativo para LVPR testados por *western blot* (WB) e pela reação em cadeia de polimerase (PCR). Os *explants* foram embebidos em Meio Essencial Mínimo (MEM) e transferidos para garrafas de 25 cm² (A25), as quais foram incubadas em estufa a 37 °C com atmosfera de 5% de CO₂, por até 30 minutos para adesão dos *explants* na garrafa. Depois foi acrescido 5 mL de MEM suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB), 2% de penicilina e estreptomicina e 1% de anfotericina B em cada A25 e recolocadas na estufa nas mesmas condições anteriormente citadas. As culturas de *explants* foram cultivadas até a obtenção de 100% de confluência da monocamada celular. Por conseguinte, as células foram subcultivadas por tripsinização (PINHEIRO et al., 2010).

A condução do estudo estava de acordo com os princípios éticos adotados pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal – CONCEA (Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008). Este estudo recebeu a aprovação da Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Estadual Vale do Acaraú (CEUA/UVA), sob o número 008/12.

Multiplicação e purificação viral

A multiplicação viral foi realizada segundo a metodologia descrita por Pinheiro et al., (2006). As amostras virais padrões CAEV Cork¹ (com título inicial de 10^{5,0} TCID₅₀/mL) e MVV K1514² (com título inicial de 10^{4,3} TCID₅₀/mL) e a amostra LVC-CE³ (com título inicial de 10^{4,8} TCID₅₀/mL) foram inoculadas em monocamadas semiconfluentes (80 a 90% de confluência) de membrana sinovial caprina (15^a passagem), em garrafas plásticas A 150, com suspensão viral com 200 doses formadoras de sincícios/mL. Realizaram-se três coletas de sobrenadante a cada sete dias. E então, foi clarificado por centrifugação a 3.300 g a 4 °C e tratado através de precipitação de proteínas com PEG-8000 a 40%, por 18h a 4 °C, até a concentração

¹ Amostra viral padrão gentilmente cedida pela Universidade Federal Rural de Pernambuco, oriunda do Laboratoire Associé de Recherches sur les Petits Ruminants – INRA – ENVL - France.

² Amostra viral padrão gentilmente cedida pela Universidade Estadual do Ceará, oriunda do Laboratoire Associé de Recherches sur les Petits Ruminants – INRA – ENVL - France.

³ Amostra de LVPR isolada de caprino oriundo do rebanho da Embrapa Caprinos e Ovinos, no Estado do Ceará – Brasil, pertencente ao grupo B1 dos LVPR, depositada no GenBank nº EU300976.

final de 8%. Posteriormente, a suspensão foi centrifugada a 4 °C a 12000g por 60 minutos e o *pellet* foi então ressuspendido em TNE (10,0 mM Tris-HCl, pH 7,4; 10,0 mM NaCl; 1,0mM EDTA, 1/10 do volume original de suspensão viral). O precipitado foi ultracentrifugado em colchão de sacarose (25%) a 42000 g por 120 minutos a 4 °C. O sedimento foi suspenso em PBS (0,05M; 0,15M NaCl; pH 7,4) e armazenou-se a -80 °C até a realização. A concentração de proteína total foi determinada (BRADFORD, 1976) e o vírus purificado mantido a -80 °C até a realização da eletroforese 2D.

Para confirmação da amostra de LVPR do estado do Ceará (LVC-CE) foi realizada a reação em cadeia de polimerase – PCR (PCR *Nested*) do sobrenadante do cultivo. Inicialmente realizou-se a extração de DNA de acordo com a metodologia descrita por Castro (1998). Subsequentemente a amostra foi submetida à amplificação por PCR nested, segundo a técnica descrita por Barlough (1994), modificado por Andrioli (2001). Os iniciadores foram desenhados baseando-se na sequência publicada de CAEV-Co (Saltarelli et al., 1990), com auxílio dos programas Blastn (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast>), Oligo® e Oligo Tech (Versão 1.0) (<http://www.oligoetc.com/OLIGOTech.HTM>), e tem como objetivo amplificar um fragmento de 630pb da região gag do genoma pró-viral, correspondente ao capsídeo viral. Os iniciadores escolhidos para o primeiro round foram: CAEV1 (sense) GGAGGGAGAAGGTGGAA; CAEV2 (antisense) CACATCTCTACATGCTTGCA; para o segundo round foram: CAEV3 (sense) GTTCCAGCAACTGCAAACAGTAGCAATG e CAEV4 (antisense) ACCTTTCTGCTTCTTCATTTAATTTCCC. Para leitura dos resultados foi realizada eletroforese em gel de agarose 1% corado com brometo de etídio. Em todas as reações utilizou-se controle positivo (células de MSC infectadas) e controle de reagentes (H₂O bidestilada, autoclavada, livre de DNase).

Eletroforese bidimensional

Primeira dimensão

Strips (ImmobilineTM DryStrip GE Healthacare GE-176001-14) com 13 cm, pH de 3 a 10 foram reidratadas com 250 µg de proteínas das cepas virais (CAEV Cork, LVC-CE e MVV K1514), em solução de reidratação (7M urea; 2M thiourea; 2%

CHAPS; 0,5/2% *Pharmalyte* ou *IPG buffer*; 0,002% de azul de bromofenol, qsp 25 mL). Este procedimento foi realizado em duplicatas durante 16 horas (Figura 1).

Figura 1 – Reidratação das *strips* no IPGbox.



Fonte: Dalva Azevedo

Posteriormente, foram submetidas à focalização isoelétrica na qual as proteínas migram até atingir o pH que coincide com o seu pI, ou seja, elas migram de acordo com sua carga até atingir um ponto de carga neutra que é particular de cada proteína (O'FARREL, 1975). A focalização foi realizada no *Ettan IPGphor 3 Isoelectric Focusing System®- GE* durante cerca de seis horas, na seguinte programação: 1 – STEP: 500 V por 120 minutos; 2 – GRAD: 4000V durante 150 minutos; 3 – STEP: 10000 V até atingir 18000 VH; 4 – STEP: 50 V por 240 minutos (Figura 2). Após a focalização as *strips* foram armazenadas em freezer a -80 °C, até a realização da eletroforese.

Figura 2 – *Strips* posicionadas para a focalização isoelétrica.

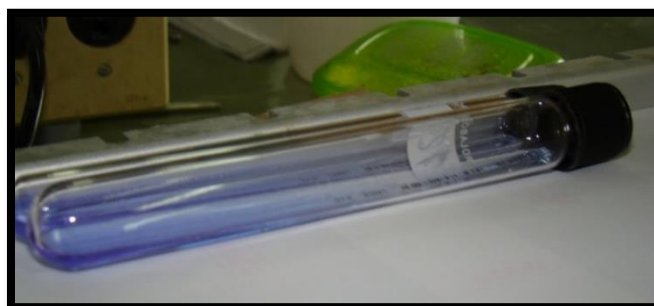


Fonte: Dalva Azevedo

Segunda dimensão

Cada *strip* recebeu 3mL de solução de equilíbrio (Tris-HCl 75 mM, pH – 8,8; Urea 6 M; Glycerol 29,3%; SDS 2%; azul de bromofenol 0,002%). Primeiro foi adicionado à solução de equilíbrio 57,8 mg de Ditioneitol (DTT) e, posteriormente, 69,3 mg de Iodoacetamida (IAA), sendo cada etapa realizada sob agitação leve durante 15 minutos (Figura 3).

Figura 3 – Demonstração do equilíbrio das *strips*.



Fonte: Dalva Azevedo

Após o equilíbrio das *strips*, elas foram incorporadas ao gel de poliacrilamida através de gel de agarose (0,5%). A eletroforese em gel de poliacrilamida (12,5%) contendo SDS, foi realizada de acordo com as orientações recomendadas pelo fabricante (GE Healthcare). Procedeu-se, então, a corrida nas seguintes condições: Programa (P1), 100 V; 30 mA, 100 W durante 15 minutos; Programa (P2): 230 V, 50 mA, 100 W durante 360 minutos. Essas condições foram mantidas para corrida de dois géis. O sistema foi sempre mantido sob refrigeração.

Foram realizadas quatro eletroforeses 2D de cada uma das três amostras virais. Duas repetições foram utilizadas na coloração e duas para o western blot.

Coloração das proteínas

Os géis foram submetidos à coloração de proteínas com azul de *Coomassie* (0,1% de azul de *Coomassie*, 50% de etanol e qsp 500 mL de água ultrapura) *over night* sob agitação leve. Foram descorados com solução descorante (30% etanol, 7,5% ácido acético, qsp 1000 mL de água ultrapura), até a visualização dos *spots*, e em seguida escaneados com o *ImageScanner*®. Eles foram guardados em solução de armazenamento (10% de etanol, 5% de glicerol, 5% de ácido acético, qsp 100 mL de água ultrapura), para isolamento dos *spots* a serem submetidos a EM.

Análise dos géis

A análise foi realizada com o software *ImageMaster*TM 2D *Platinum* 7.0. Foi feita a detecção dos *spots* proteicos, nas duplicatas, e em seguida realizado o *match* para identificar a consonância de *spots*, bem como a reprodutibilidade dos géis.

Transferência passiva

Após a corrida, os géis foram submetidos à transferência passiva das proteínas, onde este é colocado entre duas folhas de nitrocelulose (Whatman® 0,45 µm – GE Z613630) e três folhas de papel de filtro, montadas como sanduíche entre duas lâminas de vidro empacotadas com filme plástico e papel alumínio, em tampão de transferência, sob pressão de 12 kg, por três dias, em temperatura ambiente. Decorrido esse tempo, todo o aparato foi desmontado e as membranas foram coradas com *Ponceau's*, para verificar a transferência das proteínas (TESORO-CRUZ et al., 2009). Depois as membranas foram armazenadas a -20 °C até a realização do WB.

Western blot

O teste de WB realizou-se de acordo com a metodologia de Aragão et al., (2008). As membranas de nitrocelulose foram bloqueadas com PBS-Tween (0,3%) durante 60 minutos. Após o bloqueio, foram lavadas três vezes com PBS-Tween (0,05%) por cinco minutos cada lavagem, então foram submetidas a soro positivo⁴ para a verificação das proteínas imunogênicas, por 30 minutos na diluição de 1:50. Novamente as membranas foram lavadas nas mesmas condições anteriores e em seguida adicionado o conjugado anti-IgG marcado na diluição de 1:12.000 (SIGMA® - A 5420). As membranas foram reveladas com solução de DAB/4-Cloronapthtol e peróxido de hidrogênio (solução A- 12 mg de 3,3'-Diaminobenzidine (DAB - SIGMA®- D 5637) em 12 mL de PBS, solução B – 5 mg de 4-cloro-1-naftol (SIGMA® - C 8890) adicionado a 2 mL de metanol mais 10 mL de PBS. Misturou-se as duas soluções e acrescentou-se 10 uL de H₂O₂ a 30%), por 5 minutos ao abrigo da luz.

⁴ Soro positivo (rico em anticorpos contra as proteínas p28 e gp135) do kit *Caprine Arthritis-Encephalitis/Ovine Progressive Pneumonia Antibody Test Kit*. *Veterinary Diagnostic Technology*, Inc®, USA.

Espectrometria de massas

Para a espectrometria de massas foram selecionados 22 *spots* (oito de CAEV Cork; nove de CAEV CE; cinco de MVV), em duplicata, baseando-se no resultado do WB. Os fragmentos dos géis foram tratados de acordo com a metodologia descrita por Shevchenko et al., (2006). Os peptídeos eluídos de gel após tripsinização foram secos e suspensos em 10 µL de ácido fórmico 0,1% (v/v) em água. Após a eluição as amostras foram analisadas com o equipamento MicroMass Q-ToF Micro acoplado a cromatógrafo líquido de ultraeficiência nanoAcquity (UPLC). Utilizou-se analisador Q-TOF, Quadrupolo e Tempo de Vôo (*Time Of Flight* – TOF) e ionização por eletronebulização (*Electrospray Ionization*-ESI), nas condições de análise apresentadas pela tabela 1. Os dados brutos gerados pelo software MASSLYNX foram analisados junto ao software MASCOT *Distiller*, utilizando como referência o íon de m/z 784,823 presentes na solução calibrante.

Tabela 1 – Condições de análise para realização da espectrometria de massas (ESI-Q-TOF).

Condições de análise	
Polaridade	Positiva
Faixa de análise MS	200 – 2000 m/z
Faixa de análise MS/MS	50 – 2000 m/z
Modo de aquisição	DDA
Voltagem	3300 V
Calibrante	Solução de ácido fosfórico 0,1% (v/v) em solução de acetonitrila 50% (v/v)
Erro	0,6 ppm
Padrão utilizado	1 ng de peptídeos trípticos de HSP70 humana
Quantidade de amostra analisada	1 µL

Análise Bioinformática

A análise bioinformática foi realizada inicialmente com o software MASCOT a fim de conhecer as proteínas sequenciadas. Após, os peptídeos encontrados para CAEV e MVV foram alinhados com sequências padrão e nacionais para LVPR, com a ferramenta de alinhamento múltiplo de sequências (*Constraint-based Multiple Alignment Tool* – COBALT) disponível no Centro Nacional de Informação de Biotecnologia (*National Center for Biotechnology Information* - NCBI). Foram

escolhidos para o alinhamento as proteínas identificadas pelo MASCOT com maior score e sequencias proteicas das amostras padrão e amostras isoladas no Brasil (Tabela 2). Além do alinhamento também foram analisados a conservação de epítomos com IEDB (*Immune Epitope Database and Analysis Resource*).

Tabela 2. Amostras utilizadas para o alinhamento de sequências.

Amostra	ID/NCBI	Referência
CAEV Cork	gi 462152	Saltarelli et al., (1990)
MVV K1514	gi 120894	Sonigo et al., (1985)
CAEV 01	gi 409093654	Feitosa (2011)
BR/UFRGS	gi 14970849	Ravazzolo et al., (2001)
BR/MG	gi 27733407	Drumond e Resende (2001)
CAEV Cork spot1	-	Estudo
CAEV Cork spot2	-	Estudo
LVC-CE spot1	-	Estudo
LVC-CE spot2	-	Estudo
MVV K1514 spot3	-	Estudo

Software MASCOT

Os dados processados foram computados num arquivo (.mgf) e analisados em uma cópia local do servidor MASCOT, utilizando como banco de dados as entradas presentes no *Swissprot* (versão 2014-03) total ou referentes a vírus. Foram utilizadas como parâmetros para procura: (I) carboamidometilação de cisteína como modificação fixa; (II) oxidação de metionina e propionamidação de cisteína como modificações variáveis; (III) erro máximo para procura em modo MS de 1,0 Da; (IV) erro máximo para procura em modo MS/MS de 0,5 Da; (V) carga de peptídeos de 2⁺ ou 3⁺.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

As amostras dos vírus purificados exibiram as seguintes dosagens proteicas 18,50 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$, 17 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ e 6,73 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ para, CAEV Cork, LVC-CE e MVV K1514, respectivamente. Os perfis proteicos apresentaram-se diferenciados, certamente devido aos diferentes valores da quantidade e do pI de cada proteína. Buscou-se identificar *spots* com massas moleculares compatíveis com as proteínas imunogênicas, visto que atualmente os dados de perfis proteicos de LVPR, em sua maioria são de eletroforese unidimensional (TORFASON et al., 1992; ARAGÃO et al., 2008).

Os géis (duplicata) foram estatisticamente reprodutíveis (CAEV Cork – 80,1%, LVC-CE – 96,41% e MVV K1514 – 99,77% de correlação) e foi escolhido um gel de referência. Dos dois géis da 2D, de cada amostra viral, foi escolhido um de referência.

Para CAEV Cork o valor de pH para o ponto isoelétrico variou de 3,21 a 7,89 sendo que, apenas um *spot* apresentou pI no valor de 9,4-9,7. Analisando a massa molecular (PM) verificou-se que variou de 15.188Da a 81.137Da. Foram contabilizados 12 *spots* em consonância para os dois géis. No gel de referência foi determinado cinco *spots* com peso molecular em torno de 24.785Da a 29.060Da, destes, três *spots* foram comuns a duplicata. Tais *spots* muito possivelmente são referentes à proteína imunogênica p28, a qual também pode ser reportada como p25, p26, p27 ou p30 (ARAGÃO et al., 2008). Além desta proteína, ambos os géis apresentaram concomitantemente *spots* referentes às proteínas p19 e p15.

Para a amostra LVC-CE, o valor de pH para o pI oscilou de 3,09 a 9,05, enquanto o PM variou de 13.864Da a 110.129Da. Contabilizou-se 30 *spots* comuns às duplicatas. Para o gel de referência, foram identificados oito *spots* com PM entre os valores 26.143Da e 30.406Da possivelmente referente à proteína p28. Destes, sete foram comuns às duplicatas. Diferentemente da amostra de CAEV Cork que apresentou apenas um *spot*, os géis de LVC-CE exibiram dois *spots* com PM próximos ao das proteínas imunogênicas p19 e p15.

Para o MVV os valores de pH para o pI variou de 3,18 a 8,19, enquanto o PM oscilou de 18.433Da a 96.263Da. Os géis obtiverem a concordância de 24 *spots*. No gel de referência foram identificadas cinco proteínas com PM entre 24.310Da e 29.933Da muito provavelmente compatíveis com a proteína p28. Desses, apenas dois foram

comuns às duplicatas. Apenas um spot foi detectado com PM referente à proteína imunogênica p19 e não foi detectável *spot* referente à p15.

As três amostras de antígeno apresentaram *spots* com PM próximos a outras proteínas virais reportadas na literatura (ARAGÃO et al., 2008; BRANDÃO et al., 2013) tais como, a proteína gp45 e alguns precursores como pr90kDa (que origina as proteínas de superfície gp135 e/ou gp90 e gp45), pr55kDa (que origina as proteínas provenientes do gene gag, p16, p19 e p28). Embora haja a ocorrência desses *spots* nos géis analisados, os mesmos não foram identificados com precisão na marcação do WB.

Com relação ao resultado do WB, o antígeno de CAEV Cork demonstrou notavelmente quatro marcações referentes à p28 e duas para p15 (Figura 4-B). O resultado de LVC-CE apresentou cinco marcações indicativas da p28 e uma da p15 (Figura 5-B). O WB para MVV demonstrou três marcações para a proteína p28 e não foi identificado reação para proteína p15 ou p19 (Figura 6-B).

Apesar de a purificação ter sido realizada com o vírus total, as amostras obtidas não possuem provavelmente concentração de glicoproteínas suficiente para a sua detecção pelo soro positivo referência⁵. Corroborando com este achado, Celer Jr. et al., (1998) verificaram, por *western blot* unidimensional (1D) que a gp135 só foi evidente em soros fortemente positivos e, portanto, não a utilizaram para confirmação de diagnóstico. Ramirez et al., (1992), trabalhando com HIV verificaram que as nucleoproteínas (p24) são mais estáveis no WB-1D que as glicoproteínas de superfície (gp120) e transmembrânica (gp41). As glicoproteínas são relativamente instáveis e passíveis de serem perdidas durante o processo de obtenção de antígeno (RIMSTAD et al., 1994), principalmente na passagem pelo colchão de sacarose, onde podem ocorrer perdas de até 50% destas proteínas virais (McGRATH, et al., 1978), ou até mesmo perdas espontâneas das partículas virais liberadas depois de vários dias de cultivo (CASTRO, 1998).

O soro padrão do kit comercial foi preparado para detectar anticorpos contra a gp135 do MVV, e apesar de existir uma boa relação antigênica entre proteínas (GOGOLEWSKI et al., 1985), deve-se levar em conta que as amostras de soros foram coletadas em diferentes fases de infecção, além da existência de diferenças genéticas e

⁵ Soro positivo referência (rico em anticorpos contra as proteínas p28 e gp135) do kit *Caprine Arthritis-Encephalitis/Ovine Progressive Pneumonia Antibody Test Kit*. *Veterinary Diagnostic Technology*, Inc®, USA.

antigênicas entre os LVPR (LEROUX et al., 1996; SOUZA et al., 2012), aliado ao fato que o soro do Kit era heterólogo, o que reduziu a sensibilidade (KNOWES et al., 1994).

O gene *gag* codifica três proteínas, sendo uma maior do capsídeo (p28) e duas menores da matriz (p19) e do nucleocapsídeo (p16), resultado semelhante observado neste estudo. Segundo Rosati et al., (1995), a proteína maior induz a uma forte resposta de anticorpos no animal infectado, sendo desta forma, utilizada nos testes de diagnóstico. As proteínas menores são menos imunogênicas. Os genes *gag* e *pol* são os mais conservados, enquanto que o gene *env* é mais heterogêneo, devido a mutações pontuais, em uma base de nucleotídeo, que ocorrem durante a replicação dos ácidos nucleicos dos retrovírus, por “erros” cometidos pela transcriptase reversa (NARAYAN & CLEMENTS, 1989).

Segundo Zanoni (1998), constatou-se a existência de ao menos seis grupos, sem clara distinção entre as cepas de caprinos e ovinos. Em seguida, Shah et al., (2004), sugeriram uma reclassificação, baseada em sequências dos genes *gag* e *pol*, propondo-se quatro grupos ou genótipos virais (A, B, C e D), alguns contendo subtipos. Nesta categorização, sequências genômicas de um mesmo grupo não divergem em mais de 25% e sequências classificadas dentro de um subtipo divergem em até 15%. O grupo A reúne isolados arrolados ao protótipo MVV e o grupo B, isolados catalogados ao CAEV. Cepas que apresentaram grande divergência com os grupos A e B foram classificadas como C e D. Com os avanços nas pesquisas em filogenia, novos grupos e subtipos virais têm sido sugeridos (Tabela 2).

Com relação a estudos proteicos não existe comparações na literatura entre as cepas virais. Importante salientar que mesmo que as sequências de nucleotídeos apresentem uma pequena diferença, por vezes isto não reflete na tradução de aminoácidos. Portanto, possivelmente, as várias proteínas p28 verificadas neste trabalho não estejam relacionadas com a heterogenicidade genética e sim com fases da maturação da proteína p28.

De acordo com a linearidade da disposição dos *spots* comparando os géis com o resultado de WB foram selecionados oito *spots* de CAEV Cork (Figura 4-A), nove *spots* de LVC-CE (Figura 5-A) e cinco *spots* de MVV (Figura 6-A), para a espectrometria de massas. Alguns *spots* revelados pelo WB não puderam ser localizados com precisão no gel corado com o azul de *Coomassie* e, portanto, não foram enviados para a análise de espectrometria de massas

Figura 4 – [A] Gel da eletroforese bidimensional de CAEV Cork, onde círculos em vermelho demonstram os *spots* escolhidos para a espectrometria de massas. [B] Resultado do western blot, para amostra CAEV Cork, onde os círculos em preto delimitam as marcações referentes a p28 e p15.

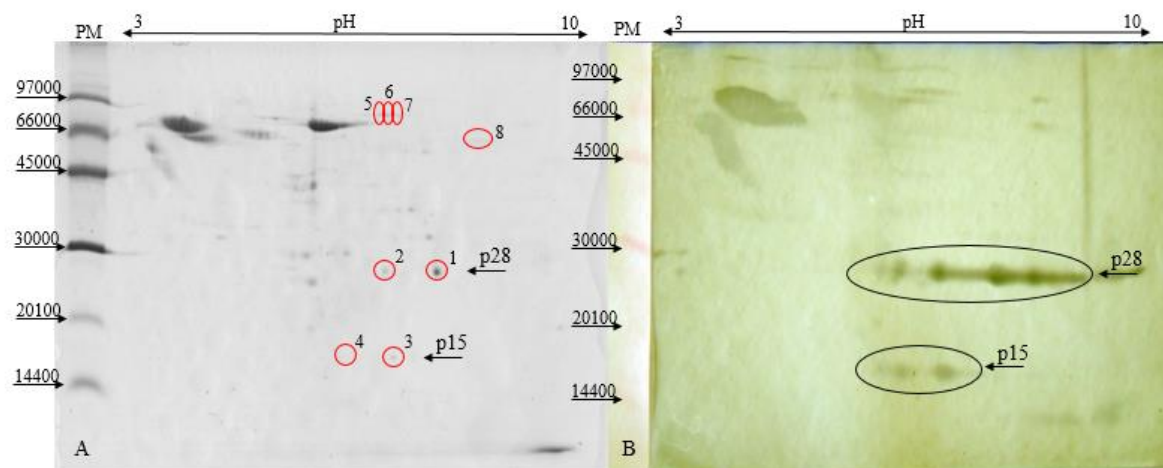


Figura 5 – [A] Gel da eletroforese bidimensional de LVC-CE, onde círculos em vermelho demonstram os *spots* escolhidos para a espectrometria de massas. [B] Resultado do western blot, para amostra LVC-CE, onde os círculos em preto delimitam as marcações referentes a p28 e p15.

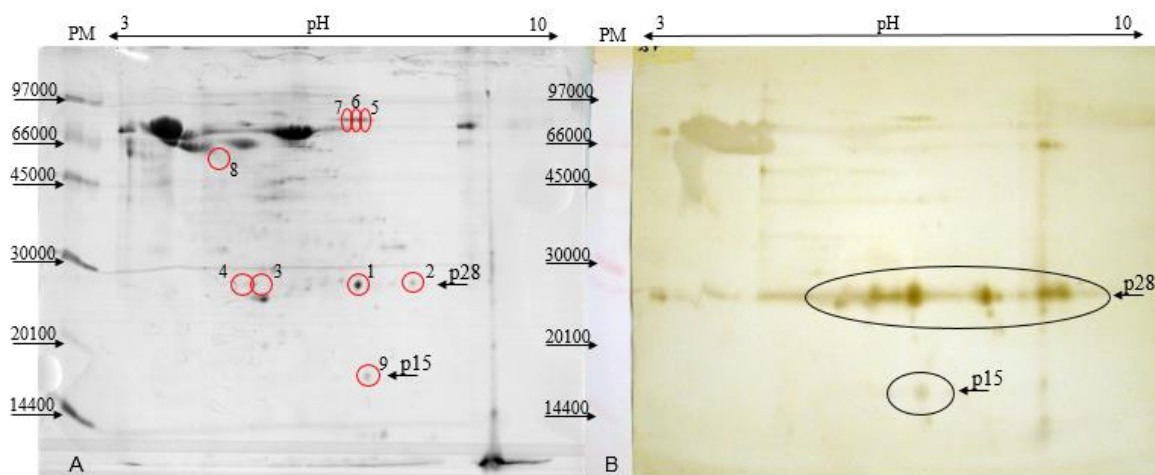
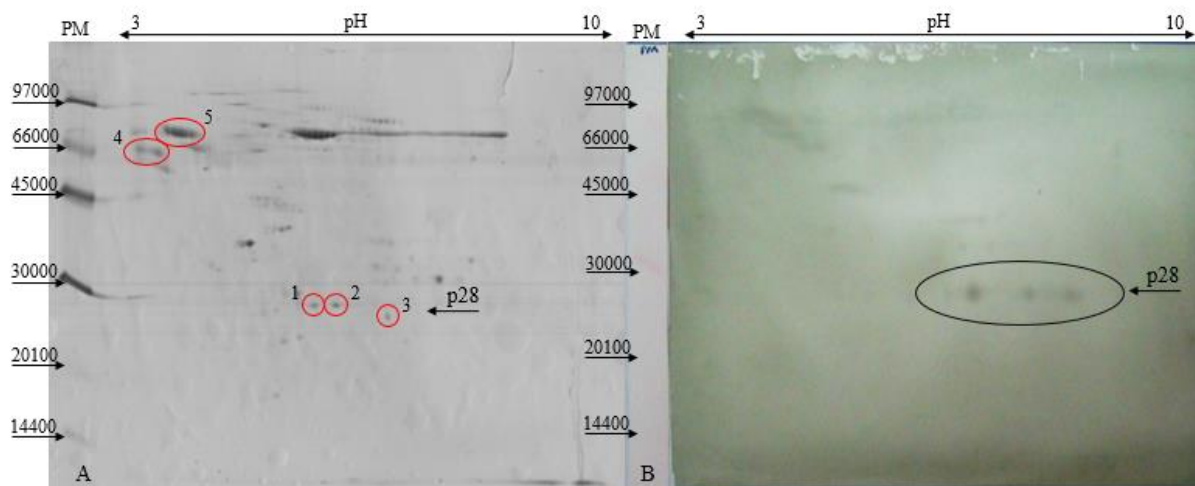


Figura 6 – [A] Gel da eletroforese bidimensional de MVV, cujos círculos em vermelho demonstram os *spots* escolhidos para a espectrometria de massas. [B] Resultado do western blot, para amostra MVV, onde os círculos em preto delimitam as marcações referentes a p28.



Dos oito *spots* selecionados de CAEV Cork, três apresentaram sequências compatíveis com proteínas do CAEV, duas para proteína p28 e uma para p15 (Tabela 3). Quanto a LVC-CE, apenas dois foram compatíveis com a sequência da proteína do capsídeo p28 (Tabela 4). Dos cinco *spots* de MVV, apenas uma foi identificada para a proteína p28 (Tabela 5). Os *spots* foram identificados com banco de dados total de organismos. Apenas o *spot* 3 de CAEV Cork foi identificado no banco de dados de vírus. As proteínas sequenciadas possuem perfis semelhantes para as três amostras (Tabela 6). Os outros *spots* apresentaram sequências de proteínas de SFB derivado do meio utilizado para cultura de células. Essas reações no WB com proteínas do SFB muito provavelmente ocorrem devido a reações inespecíficas.

Tabela 3 – Proteínas imunogênicas do vírus da artrite encefalite caprina amostra padrão
Cork identificados por ESI-Q-TOF MS/MS.

Spot/ Descrição da proteína	^a ID/ NCBI	^b Ms(Da) / ^c pI	MASCOT /Score (%)	Convergência (%)	Sequência peptídica	Ion Score					
Spot 1/Gag polyprotein OS=Caprine arthritis encephalitis virus (strain Cork) GN=gag	gi 462152	50732/ 9.19	935	31	K.AVDSVMFQQLQTVA MQHGLVSEDFER.Q + 2 Oxidation (M)	116					
					R.QLAYYATTWTSK.D	86					
					K.DILEVLAMMPGNR.A + 2 Oxidation (M)	61					
					R.RNNPPPPAGGGLTVD QIMGVGQTNQAAAQAN MDQAR.Q + 2 Oxidation (M)	183					
					R.LLEAIDAEPVTQPIKD YLK.L	96					
					K.LTLSYTNASADCQK.Q	107					
					R.VQQASVEEK.M	24					
					R.DVGSEGFK.M	37					
					Spot 2/Gag polyprotein OS=Caprine arthritis encephalitis virus (strain Cork) GN=gag	gi 462152	50732/ 9.19	401	30	K.AVDSVMFQQLQTVA MQHGLVSEDFER.Q + 2 Oxidation (M)	18
										R.QLAYYATTWTSK.D	52
K.DILEVLAMMPGNR.A + 2 Oxidation (M)	52										
R.NNPPPPAGGGLTVDQI MGVGVGQTNQAAAQANM DQAR.Q + 2 Oxidation (M)	98										
R.LLEAIDAEPVTQPIKD YLK.L	75										
K.LTLSYTNASADCQK.Q	64										
R.VQQASVEEKMQACR. D + Oxidation (M)	16										
K.RDYPELEK.C	25										
Spot 3/ Gag polyprotein - Caprine arthritis encephalitis virus (strain Cork) GN=gag	gi 462152	50732/9.19	19	7						K.TLDYMFEDHKEEPWT K.V + Oxidation (M)	4
										K.DGLLEQEEKK.E	19

a Número de acesso da proteína (NCBI). b Valor teórico de massa molecular (Ms). c Valor teórico de ponto isoelétrico (pI).

Tabela 4 – Proteínas imunogênicas do vírus da artrite encefalite caprina amostra nacional do Ceará (LVC-CE) identificados por ESI-Q-TOF MS/MS.

Spot/ Descrição da proteína	^a ID/ NCBI	^b Ms(Da) / ^c pI	MASCOT /Score (%)	Convergência (%)	Sequência peptídica	Ion Score
Spot 1/Gag polyprotein OS=Caprine arthritis encephalitis virus (strain Cork) GN=gag	gi 462152	50732/ 9.19	297	15	K.AVDSVMFQQLQTVA MQHGLVSEDFER.Q + 2 Oxidation (M)	43
					R.QLAYYATTWTSK.D	41
					K.DILEVLAMMPGNR.A + 2 Oxidation (M)	60
					R.LLEAIDAEPVTQPIKD YLK.L	68
Spot 2/ Gag polyprotein - Caprine arthritis encephalitis virus (strain Cork) GN=gag	gi 462152	50732/ 9.19	408	28	K.AVDSVMFQQLQTVA MQHGLVSEDFER.Q + 2 Oxidation (M)	79
					R.QLAYYATTWTSK.D	40
					K.DILEVLAMMPGNR.A + 2 Oxidation (M)	72
					R.NNPPPPAGGGLTVDQI MGVGGQTNQAAAQANM DQAR.Q + 2 Oxidation (M)	67
					R.LLEAIDAEPVTQPIKD YLK.L	64
					K.LTLSYTNASADCQK.Q R.DVGSEGFK.M	60 12

a Número de acesso da proteína (ID/NCBI). b Valor teórico de massa molecular (Ms-Da). c Valor teórico de ponto isoeletrico (pI).

Tabela 5 – Proteínas imunogênicas do vírus maedi visna amostra padrão K1514 identificados por ESI-Q-TOF MS/MS.

Spot/ Descrição da proteína	^a ID/ NCBI	^b Ms(Da) / ^c pI	MASCOT /Score (%)	Convergência (%)	Sequência peptídica	Ion Score
Spot 3/Gag polyprotein OS=Caprine arthritis encephalitis virus (strain Cork) GN=gag	gi 462152	50732/ 9.19	280	21	K.AVDSVMFQQLQTVA MQHGLVSEDFER.Q + 2 Oxidation (M)	51
					R.QLAYYATTWTSK.D	39
					K.DILEVLAMMPGNR.A + 2 Oxidation (M)	54
					R.LLEAIDAEPVTQPIKD YLK.L	59
					K.LTLSYTNASADCQK.Q R.VQASVEEK.M	22 32

a Número de acesso da proteína (NCBI). b Valor teórico de massa molecular (Ms). c Valor teórico de ponto isoeletrico (pI).

Tabela 6 – Valores observados de ponto isoelétrico e massa molecular dos *spots* escolhidos para espectrometria de massas.

Amostra	Spot	Ponto isoelétrico (pI)	Massa molecular (Da)
CAEV Cork	1	7,77	26.205
CAEV Cork	2	6,96	26.344
CAEV Cork	3	7,09	16.612
MVV	3	6,93	26.765
LVC-CE	1	6,95	28.207
LVC-CE	2	7,73	28.793

Observou-se que as sequências contidas no *SwissProt* são provenientes do sequenciamento do genoma de amostra CAEV Cork por Saltarelli et al., (1990), visto que todas as sequências homólogas foram correspondentes com a do estudo citado, até mesmo a amostra de MVV obteve compatibilidade com sequências de CAEV Cork. Ressalta-se que as sequências dos *spots* 1 e 2 da amostra padrão Cork, também foram compatíveis com sequências de MVV de amostra sequenciada do Sul da África (QUERAT et al., 1990). O *spot* 1 relacionou-se com outras amostras de MVV K1514 (SONIGO et al., 1985; BRAUN et al., 1987) e KV1772 (ANDRESSON et al., 1993), com score de 156 (Tabela7). Esses dados demonstram a similaridade da resposta imunológica gerada pelos vírus CAEV e MVV, apresentando a proteína p28 como a que é responsável pela principal resposta imune no animal.

Tabela 7 – Proteínas imunogênicas do vírus da artrite encefalite caprina amostra padrão Cork identificados por ESI-Q-TOF MS/MS. Sequências similares a mostras de Maedi-Visna amostra padrão K1514 e isolado do Sul da África.

Spot/ Descrição da proteína	^a ID/ NCBI	^b Ms(Da) / ^c pI	MASCOT /Score (%)	Convergência (%)	Sequência peptídica	Ion Score
Spot 1/ Gag polyprotein - Ovine maedi visna related virus (strain South Africa) GN=gag	gi 120879	51259 /9.21	158	14	R.QLAYYATTWTSK.D	75
					K.DILEVLAMMPGNR.A + 2 Oxidation (M)	55
					R.QNPPGPNVLTVDQIM GVGQTNQQASQANMD QAR.Q + Oxidation (M)	4
					R.DVGSEGFK.M	24
Spot 1/Gag polyprotein OS=Maedi visna virus (strain 1514) GN=gag	gi 120894	50575/ 9.26	156	14	R.QLAYYATTWTSK.D	75
					K.DILEVLAMMPGNR.A + 2 Oxidation (M)	55
					R.QNPPGPNVLTVDQIM GVGQTNQQASQANMD QAR.Q + Oxidation (M)	4
					R.DVGSEGFK.M	24
Spot 2/ Gag polyprotein - Ovine maedi visna related virus (strain South Africa) GN=gag	gi 120879	51259/9.21	170	16	R.QLAYYATTWTSK.D	78
					K.DILEVLAMMPGNR.A + 2 Oxidation (M)	67
					R.QNPPGPNVLTVDQIM GVGQTNQQASQANMD QAR.Q + Oxidation (M)	21
					R.VQQASVEEKMQACR. D + Oxidation (M)	4

a Número de acesso da proteína (NCBI). b Valor teórico de massa molecular (Ms). c Valor teórico de ponto isoelétrico (pI).

Neste estudo a amostra de LVC-CE demonstrou homologia com a amostra CAEV Cork, corroborando com os estudos genéticos realizados por Feitosa et al., (2010) com amostras isoladas do Ceará, que apresentaram uma similaridade genética da cepa viral nativa com amostra padrão relatada, sendo a amostra nativa classificada no grupo B1 dos LVPR. Como é demonstrado pela figura 7 às sequências de peptídeos obtidas no presente estudo para LVC-CE alinharam com a sequência de um isolado do estado do Ceará (Feitosa, 2011).

Figura 7. Alinhamento de sequencias de LVC-CE com amostra padrão CAEV Cork e amostra isolada do Ceará por Feitosa (2011). Foram escolhidas as sequencias de maior score entre as duplicatas. Letras em vermelho indicam as sequencias similares para as diferentes amostras.

CAEV Cork	swKAVDSVMFQQQLQTVAMQHGLVSEDFERQLAYYATTWTSKDILEVLAMMPGNRAQKELIQGKLNEEAERWRRNNPPPPA	80
CAEV 01	--DSVMFQQQLQTVAMQHGLVSEDFERQLAYYATTWTSKDILEVLAMMPGNRAQKELIQGKLNEEAERWRRNNPPPPA	75
LVC-CE spot1	--KAVDSVMFQQQLQTVAMQHGLVSEDFERQLAYYATTWTSKDILEVLAMMPGNRA-----	53
LVC-CE spot2	--KAVDSVMFQQQLQTVAMQHGLVSEDFERQLAYYATTWTSKDILEVLAMMPGNRA-----RNNPPPPA	61
CAEV Cork	GGGLTVDQIMGVGQTNQAAAQANMDQARQICLQWVINALRAVRHMAHRPGNPMMLVKQKTNEFYEDFAARLLEAIDAEPVT	160
CAEV 01	GGGLTVDQIMGVGQTNQAAAQANMDQARQICLQWIINALRAVRHMAHRPGNPMMLVKQKMNESYEEFAARLLEAIDAEPVT	155
LVC-CE spot1	-----RLLLEAIDAEPVT	65
LVC-CE spot2	GGGLTVDQIMGVGQTNQAAAQANMDQARQ-----RLLLEAIDAEPVT	102
CAEV Cork	QPIKDYLKLTLSYTNASADCQKQMDRTLQQRVQQASVEEKMQACRDVGSEGF--	212
CAEV 01	QPIKDYLKLTLSYTNASADCQKQMDRTLQQRVQQASVEEKMQACRDVGSEGF---	206
LVC-CE spot1	QPIKDYLKL-----	74
LVC-CE spot2	QPIKDYLKLTLSYTNASADCQKQ-----RDVGSEGFkm	135

Os peptídeos encontrados nesse estudo foram confrontados com sequencias das amostras padrão CAEV Cork e MVVK1514 e amostras de diferentes estados do Brasil (RS, MG e Ce). Mediante os resultados de alinhamento das sequencias pode-se demonstrar regiões conservadas da proteína p28 (Figura 8). Este resultado ressalta a similaridade proteica entre os LVPR em estudo, inclusive com sequencias a partir de cepas isoladas no Brasil.

Figura 8 - Alinhamento de sequencias para proteina p28. Aminoácidos em vermelho representam regiões homologas a todas as sequencias ou seja regiões conservadas.

CAEV Cork	[2]KAVDSVMFQQLQTVAMQHGLVSEDFERQLAYYATTWTSKDIILEVLAMMPGNRAQKELIQGKLNEEAERWRRNNPPF	78
MVV K1514	[12]KAVESVVFQQLQTVAMQHGLVSEDFERQLAYYATTWTSKDIILEVLAMMPGNRAQKELIQGKLNEEAERWVRQNPPG	88
CAEV 01	---DSVMFQQLQTVAMQHGLVSEDFERQLAYYATTWTSKDIILEVLAMMPGNRAQKELIQGKLNEEAERWRRNNPPF	73
BR/UFRGS	-AVDAVMFQQMQLTVAMQHGLVSEDFERQLAYCATTWTSKDIILEVLAMMPGNRAQKELIQGKLNEEAERWRRNNPPF	75
BR/MG	[8]KAVDSVMFQQLQTVAMQHGLVSEDFERQLAYYATTWTSKDIILEVLAMMPGNRAQKELIQGKLNEEAERWRRNNPPF	84
CAEV Cork spot1	KAVDSVMFQQLQTVAMQHGLVSEDFERQLAYYATTWTSKDIILEVLAMMPGNRA-----RRNNPPF	60
CAEV Cork spot2	KAVDSVMFQQLQTVAMQHGLVSEDFERQLAYYATTWTSKDIILEVLAMMPGNRA-----R-NNPPF	59
LVC-CE spot1	KAVDSVMFQQLQTVAMQHGLVSEDFERQLAYYATTWTSKDIILEVLAMMPGNRA-----	53
LVC-CE spot2	KAVDSVMFQQLQTVAMQHGLVSEDFERQLAYYATTWTSKDIILEVLAMMPGNRA-----R-NNPPF	59
MVVK1514 spot3	KAVDSVMFQQLQTVAMQHGLVSEDFERQLAYYATTWTSKDIILEVLAMMPGNRA-----	53
CAEV Cork	PAGGGLTVDQIMSGVQTINQAAAQANMDQARQICLQWVINALRAVRHMAHRPGNPMLVKQKINEPYEDFAARLLEAIDAEF	158
MVV K1514	P--NVLTVDQIMSGVQTINQAAQANMDQARQICLQWVITALRSVRHMSHRPGNPMLVKQKNTESYEDFIARLLEAIDAEF	166
CAEV 01	PAGGGLTVDQIMSGVQTINQAAAQANMDQARQICLQWIIINALRAVRHMAHRPGNPMLVKQKMNESYEEFAARLLEAIDAEF	153
BR/UFRGS	PQGGGLTVDQIMSGVQTINQAAAQANMDQARHICLQWVITALRAVRHMAHRPGNPMLVKQKINEPYEEFAAKLLEAIDAEF	155
BR/MG	QAGGGLTVDQIMSGVQTINQAAAQANMDQARQICLQWVITALRAVRHMAHKPGNPMLVKQKINESYEKFSARLLEAIDAEF	164
CAEV Cork spot1	PAGGGLTVDQIMSGVQTINQAAAQANMDQARQ-----RLEAIDAEF	101
CAEV Cork spot2	PAGGGLTVDQIMSGVQTINQAAAQANMDQARQ-----RLEAIDAEF	100
LVC-CE spot1	-----RLEAIDAEF	63
LVC-CE spot2	PAGGGLTVDQIMSGVQTINQAAAQANMDQARQ-----RLEAIDAEF	100
MVVK1514 spot3	-----RLEAIDAEF	63
CAEV Cork	VTQPIKDYLLKILSYTNASADCQKQMDRTLGRVQQASVEEKMQacrDVGSEGF--	212
MVV K1514	VTDPKITYLKVILSYTNASTDCQKQMDRTLGRVQQATVEEKMQacrDVGSEGF--	220
CAEV 01	VTQPIKDYLLKILSYTNASADCQKQMDRTLGRVQQASVEEKMQacrDVGSEGF--	206
BR/UFRGS	VTQPIKDYLLKILSYTNASSDCQKQMDRVLGRVQQASVDEKMQ-----	199
BR/MG	VTQPIKEYLLKILSYTNASSDCQKQMDRVLGRVQQASVEEKMQacrDVGSEGFrm	220
CAEV Cork spot1	VTQPIKDYLLKILSYTNASADCQKQ-----RVQQASVEEKM-----DVGSEGFkm	147
CAEV Cork spot2	VTQPIKDYLLKILSYTNASADCQKQ-----RVQQASVEEKM-----QACrd	141
LVC-CE spot1	VTQPIKDYLLK-----	74
LVC-CE spot2	VTQPIKDYLLKILSYTNASADCQKQ-----R-----DVGSEGFkm	135
MVVK1514 spot3	VTQPIKDYLLKILSYTNASADCQKQ-----RVQQASVEEKM-----	99

Observa-se que as sequencias obtidas neste estudo, compatíveis com amostra a CAEV Cork apresentada por Saltarelli et al., (1990), estão inseridas na sequência total da proteína traduzida pelo gene *gag* e correspondem as regiões específicas de cada proteína. O *spot 3* refere-se a proteína da matrix p16 compreendido na região de 1 a 146 aminoácidos, enquanto os *spots 1* e *2* referem-se a proteína do capsídeo p28 com os aminoácidos compreendidos entre 147 e 358, tratando-se de regiões que possuem maior afinidade ao anticorpo (Figura 9). Essas regiões podem ser alvo de futuros estudos desses potenciais imunoproteicos.

Figura 9 – Letras (aminoácidos) em vermelho representam as sequencias homologas da amostra de CAEV Cork do presente estudo. [A] Disposição das sequencias provenientes do *spot* 3, aminoácidos compreendidos na região de 1 a 146, região da proteína de matriz p16. [B] Disposição da sequencia provenientes do *spot* 1, aminoácidos compreendidos entre 147 e 358, região que dá origem a p28. Quadrado azul indica sequencia dos epítomos 21506 e 33018 respectivamente. Quadro verde indica epítomos 20295 e 32388.

1	MARQVSGGKR	DYPELEKCIK	HACKIKVRLR	GEHLTEGNCL	WCLKTLDYMF
51	EDHKEEPWTK	VKFRTIWQKV	KNLTPEESNK	KDFMSLQATL	AGLMCCQMGM
101	RPETLQDAMA	TVIMKDGLLE	QEEKKEDKRE	KEESVFPIVV	QAAGGRSWKA
151	VDSVMFQQLQ	TVAMQHGLVS	EDFERQLAYY	ATTWTSKDIL	EVLAMMPGNR
201	AQKELIQGKL	NEEAERWRRN	NPPPPAGGGL	TVDQIMGVGQ	TNQAAAQANM
251	DQARQICLQW	VINALRAVRH	MAHRPGNPML	VKQKTNEPYE	DFAARLLEAI
301	DAEPVTQPIK	DYLKLTLSYT	NASADCQKQM	DRTLQQRVQQ	ASVEEKMQAC
351	RDVGSEGFKM	QLLAQALRPG	KGKGNQPPQR	CYNCGKPGHQ	ARQCRQGIIC
401	HNCGKRGHMQ	KECRGKRDIR	GKQQGNRRG	IRVVPSAPPME	A
1	MARQVSGGKR	DYPELEKCIK	HACKIKVRLR	GEHLTEGNCL	WCLKTLDYMF
51	EDHKEEPWTK	VKFRTIWQKV	KNLTPEESNK	KDFMSLQATL	AGLMCCQMGM
101	RPETLQDAMA	TVIMKDGLLE	QEEKKEDKRE	KEESVFPIVV	QAAGGRSWKA
151	VDSVMFQQLQ	TVAMQHGLVS	EDFERQLAYY	ATTWTSKDIL	EVLAMMPGNR
201	AQKELIQGKL	NEEAERWRRN	NPPPPAGGGL	TVDQIMGVGQ	TNQAAAQANM
251	DQARQICLQW	VINALRAVRH	MAHRPGNPML	VKQKTNEPYE	DFAARLLEAI
301	DAEPVTQPIK	DYLKLTLSYT	NASADCQKQM	DRTLQQRVQQ	ASVEEKMQAC
351	RDVGSEGFKM	QLLAQALRPG	KGKGNQPPQR	CYNCGKPGHQ	ARQCRQGIIC
401	HNCGKRGHMQ	KECRGKRDIR	GKQQGNRRG	IRVVPSAPPME	B

Encontra-se disponível na literatura (Tabela 8) uma lista de epítomos para as proteínas codificadas para o gene *gag* dos LVPR. Nesta estão apresentados os epítomos 21506 e 33018 que ficam localizados na região que codifica a proteína p28. Enquanto os outros epítomos encontram-se no final da sequência do gene *gag*, os quais codificam a proteína p14. Os epítomos referentes à região da proteína p28, de acordo com os resultados da análise de conservação de epítomos pelo programa IEDB, foram localizados nas sequencias dos peptídeos do presente estudo (Figura 10 e 11), especificamente as regiões RNNPPPPA (GREGO et al., 2002) e LLEAIDAE (FLURI et al., 2005; NENCI et al., 2007).

Tabela 8 – Epítomos referentes as proteínas produzidas pelo gene *gag*.

Epítopo ID	Estrutura	Referência
20295	GIICHNCGKRGHMKKDCRGKK	Lacerenza et al., 2008
21506	GNRAQKELIQGKLNEEAERWRRNNPPPPA	Grego et al., 2002
32388	KMQQGNRRGIRVVPSAPPME	Lacerenza, et al., 2008
33018	KQKTNEPYEDFAARLLEAIDAE	Fluri et al., 2005 Nenci et al., 2007

Figura 10 – Resultado da análise de conservação de epítomos com IEDB. Letras em azul indicam os aminoácidos homólogos das sequencias do presente estudo com o epítopo 21506 (GNRAQKELIQGKLNEEAERWRRNNPPPPA).

Protein No. ▲ ▼	Protein name	Positions	Protein sub-sequence(s)	Identity ▲ ▼
2	Spot 2 LVC-CE	33-61	ATTWTSKDILEVLAMMPGNRA RRNNPPPPA	34.48%
3	Spot 1 caev cork	34-62	TTWTSKDILEVLAMMPGNRA RRNNPPPPA	37.93%
4	Spot 2 caev cork	33-61	ATTWTSKDILEVLAMMPGNRA RRNNPPPPA	34.48%

Figura 11 - Resultado da análise de conservação de epítomos com IEDB. Letras em azul indicam os aminoácidos homólogos das sequencias do presente estudo com o epítopo 33018 (KQKTNEPYEDFAARLLEAIDAE).

Protein No. ▲ ▼	Protein name	Positions	Protein sub-sequence(s)	Identity ▲ ▼
1	Spot 1.1 LVC-CE	41-62	I LEVLAMMPGNRA RLLEAIDAE	45.45%
2	Spot 2 LVC-CE	78-99	QAAAQANMDQAR RLLEAIDAE	40.91%
3	Spot 1 caev cork	79-100	QAAAQANMDQAR RLLEAIDAE	40.91%
4	Spot 2 caev cork	78-99	QAAAQANMDQAR RLLEAIDAE	40.91%
5	Spot 3 mvv k1514	41-62	I LEVLAMMPGNRA RLLEAIDAE	45.45%

CONCLUSÕES

SERPA associada a EM é um método eficaz para a caracterização de proteínas imunogênicas de antígenos de LVPR.

Constatou-se a similaridade proteica entre as cepas padrão CAEV Cork e MVVK1514.

Caracterizou-se a cepa nacional, LVC-CE, isolada do estado do Ceará, a qual apresentou regiões conservadas e compatíveis com as amostras padrão de LVPR (Cork e K1514) e também com outras amostras isoladas do Brasil.

Foram identificados e caracterizados vários peptídeos imunoreagentes do capsídeo com ponto isoelétrico distintos.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ANDRESSON, O. S.; ELSER, J. E.; TOBIN, G. J.; et al. Nucleotide sequence and biological properties of a pathogenic proviral molecular clone of neurovirulent visna virus. **Virology**, v.193, n.1, p.89-105, 1993.
- ANDRIOLI, A. **Vírus da artrite encefalite caprina: PCR e isolamento em amostras de sêmen, fluido uterino e embriões**. Belo Horizonte, MG: UFMG – Escola de Veterinária, 68p., Tese (Doutorado), 2001.
- ARAGÃO, M. A. C.; PINHEIRO, R. R.; ANDRIOLI, A.; et al. Maedi-Visna Vírus: Produção de antígeno, análise proteica e antigênica. **Arq. Inst. Biol.**, São Paulo, v.75, n.4, p.423-429, 2008.
- BARLOUGH, J.; EAST, N.; ROWE, J. D.; et al. Double-nested polymerase chain reaction for detection of caprine arthritis-encephalitis virus proviral DNA in blood, milk, and tissues of infected goats. **Journal of virology methods**, v.50, p.101-114, 1994.
- BERKELMAN, T.; STENSTEDT, T. **2-D Electrophoresis using Immobilized pH Gradients: Principles & Methods**. 2^o edition. Uppsala, Sweden, Amersham Biosciences. 220p. 2002.
- BRADFORD, M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Anal. Biochem.**, v.72, p.248-254, 1976.
- BRANDÃO, C. F. L.; CAMPOS, G. S.; SILVA, A. C. R.; TORRES, J. A.; TIGRE, D. M.; SARDI, S. I. Monoclonal antibodies against Caprine arthritis-encephalitis virus epitopes in the p28 and p55 gag viral proteins. **Journal of Virological Methods**, v.187, p.352– 356, 2013.
- BRAUN, M. J.; CLEMENTS, J. E.; GONDA, M. A. The visna virus genome: evidence for a hypervariable site in the env gene and sequence homology among lentivirus envelope proteins. **J. Virology**, v.61, n.12, p.4046-4054, 1987.
- CALLADO, A.K.C.; CASTRO, R.S.; TEIXEIRA, M.F.S. Lentivírus de pequenos ruminantes (CAEV e Maedi-Visna): Revisão e perspectivas. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v.21, n.3, p.87-97, 2001.
- CARNEIRO, F. F. D.; BRITO, R. L. L.; GOMES, T. C. L.; et al. Efeito da Artrite-Encefalite Caprina na receita bruta da produção de cabritos mestiços. **Anais...**, 3p, 2013 (Resumo).
- CASTRO, R.S. **Lentivírus de pequenos ruminantes: ensaios imunoenzimáticos, perfil sorológico e inferências filogenéticas**. Belo Horizonte, MG: UFMG - Escola de Veterinária, 1998. 132p. Tese (Doutorado).

- CELER Jr, V.; CELER, V.; NÉMCOVÁ, H.; et al. Serologic diagnosis of ovine lentiviruses by whole virus ELISA and AGID test. **J. Vet. Med. B.**, v. 45, p. 183-188, 1998.
- DRUMOND, B. P.; RESENDE, M. Phylogenetic analysis of small ruminant lentiviruses in naturally infected goats, based on sequence of capsid protein gene. In: 4o Encontro de Virologia do Mercosul e 12º Encontro Nacional de Virologia, 2001, Caldas Novas - GO. **Virus reviews and Research**, v. 06, p. 172-172, 2001.
- FALISSE-PORRIER, N.; RUELLE, V.; ELMOUALIJ, B. et al. Advances in immunoproteomics for serological characterization of microbial antigens. **Journal of Microbiological Methods**. v.67, pag.593-596, 2006.
- FEITOSA, A. L. V. L.; TEIXEIRA, M. F. S.; PINHEIRO, R. R. et al. Phylogenetic analysis of small ruminant lentiviruses from Northern Brazil. **Small Ruminant Research**. 5p. 2010.
- FEITOSA, A. L. V. L. **Caracterização molecular de lentivírus de pequenos ruminantes isolados no Brasil**. 2011. 182f. Tese (Doutorado em Ciências Veterinárias) - Universidade Estadual do Ceará, Fortaleza.
- FLURI, A.; NENCI, C.; ZAHNO, M. L. et al. The MHC-haplotype influences primary, but not memory, immune responses to an immunodominant peptide containing T- and B-cell epitopes of the caprine arthritis encephalitis virus Gag protein. **Vaccine**. v.24, p.597-606, 2006.
- GOGOLEWSKI, R.P.; ADAMS, D.S.; McGUIRE, T.C.; et al. Antigenic cross-reactivity between caprine arthritis-encephalitis, visna and progressive pneumonia viruses involves all virion-associated proteins and glycoproteins. **J. Gen. Virol.**, v. 66, p. 1233-1240, 1985.
- GREGO, E.; PROFITI, M.; GIAMMARIOLI, M., et al. Genetic Heterogeneity of Small Ruminant Lentiviruses Involves Immunodominant Epitope of Capsid Antigen and effects Sensitivity of Single-Strain-Based Immunoassay. **Clinical and diagnostic laboratory immunology**. v.9, n.4, p.828-832, 2002.
- KNOWLES, D.P., EVERMANN, J.F., SHROPSHIRE, C., VANDERSCHALIE, J., BRADWAY, D., GEZON, H.M., CHEEVERS, W. P. Evaluation of agar gel immunodiffusion serology using caprine and ovine lentiviral antigens for detection of antibody to caprine arthritis-encephalitis virus. **J. Clin. Microb.** v. 32, n. 1, p. 243-245, 1994.
- LACERENZA, D.; GENOVESE, F.; PROFITI, M. et al. Characterization of an immunodominant epitope of small ruminant lentivirus (SRLV) nucleoprotein. **Veterinary Immunology and Immunopathology**. v.125 (3-4), p.361-367, 2008.
- LEROUX, C.; GREENLAND, T.; MORNEX, J.F. Molecular characterization of field isolates of lentiviruses of small ruminants. *AIDS Res.* **Human Retrovir.**, v. 12, n. 5, p. 427-429, 1996.

- LIPPOLIS, J. D.; REINHARDT, T. A. Proteomics in animal science. **Journal of Animal Science**, 2008. v.86, p.2430–2441, 2008.
- McGRATH M.; WITTE, O.; PINCUS, T. et al. Retrovirus purification: Method that conserves envelop glycoprotein and maximizes infectivity. **J. Virol.**, v. 25, n.3, p.923-927, 1978.
- NARAYAN, O.; CLEMENTS, J.E. Biology and pathogenesis of lentiviruses. **J. Gen. Virol.**, v.70, p.1617-1639, 1989.
- NENCI, C.; ZAHMO, M. L.; VOGT, H. R. et al. Vaccination with a T-cell-priming Gag peptide of caprine arthritis encephalitis virus enhances virus replication transiently in vivo. **Journal of General Virology**, v.88, p.1589–1593, 2007.
- O'FARREL, P. H. High Resolution Two-Dimensional Electrophoresis of Proteins. **Journal of Biological Chemistry**. v.250, n.10, p.4007–4021, 1975.
- PINHEIRO, R.R.; OLORTEGUI, C.D.C.; GOUVEIA, A.M.G. et al. Desenvolvimento de dot-blot para detecção de anticorpos para o vírus da Artrite Encefalite Carina em Caprinos. **Revista Portuguesa de Ciências Veterinárias**, v.101, p.557-58, 2006.
- PINHEIRO, R. R.; ANDRIOLI, A.; GOUVEIA, A. M. G.; et al. Avaliação de antígenos para diagnóstico de lentivírus em rebanho caprino sob programa de controle. **Arq. Inst. Biol.**, v.77, n.1, p.133-137, 2010.
- QUERAT, G.; AUDOLY, G.; SONIGO, P.; VIGNE, R. Nucleotide sequence analysis of SA-OMVV, a visna-related ovine lentivirus: phylogenetic history of lentiviruses. **Virology**, v.175, n.2, p.434-447, 1990.
- RAMIREZ, E.; URIBE P.; ESCANILLA, D. et al. Reactivity patterns and infection status of serum samples with indeterminate Western Immunoblot test for antibody to Human Immunodeficiency virus type 1. **J. Clin. Microbiol.**, v. 30, n.4, p.801-805, 1992.
- RAVAZZOLO, A.P.; REISCHAK, D.; PETERHANS, E. et al. Phylogenetic analysis of small ruminant lentiviruses from Southern Brazil. **Vírus Res.** v.79, p.117– 123, 2001.
- RIMSTAD, E., EAST, N., DeROCK, E., HIGGINS, J., PEDERSEN, N. Detection of antibodies to caprine arthritis-encephalitis virus using recombinant gag proteins. **Arch. Virol.**, v.134, p.345-356, 1994.
- ROSATI, S., PITTAU, M., TOLARI, F., ERRE, G., KWANG, J. Genetic and antigenic characterization of CAEV (caprine arthritis-encephalitis virus) recombinant transmembrane protein. **Vet. Microbiol.**, v. 45, v. 4, p. 363-370, 1995.
- SALTARELLI, M.; QUERAT, G.; KONINGS, D. A.; et al. Nucleotide sequence and transcriptional analysis of molecular clones of CAEV which generate infectious virus. **Journal Virology**, v.179, n.1, p.347-364, 1990.

- SEYFFERT, N.; PACHECO, L. G. C.; SILVA, W. M. et al. Preliminary serological secretome analysis of *Corynebacterium pseudotuberculosis*. **Journal of Integrated Omics**. v.1, n.2, p.193-197, 2011.
- SHAH, C.; BONI, J.; HUDER, J.B.; et al. Phylogenetic analysis and reclassification of caprine and ovine lentiviruses based on 104 new isolates: evidence for regular sheep-to-goat transmission and worldwide propagation through livestock trade. **Virology**, v.319, n. 1, p.12-26, 2004.
- SHEVCHENKO, A.; TOMAS, H.; HAVLIS, J. et al. In-gel digestion for mass spectrometric characterization of proteins and proteomes. **Nat. Protoc.** v.1, p.2856-2860, 2006.
- SONIGO, P.; ALIZON, M.; STASKUS, K.; et al. Nucleotide sequence of the visna lentivirus: relationship to the AIDS virus. **Cell**, v.42, n.1, p.369-382, 1985.
- SOUZA, T. S.; PINHEIRO, R. R.; LIMA, C. C. V.; COSTA, J. N. Transmissão interespecie dos lentivírus de pequenos ruminantes: revisão e desafios. **Acta Veterinaria Brasilica**, v.6, n.1, p.23-34, 2012.
- STEEL, L.F.; HAAB, B.B.; HANASH, S. M.; Methods of comparative proteomic profiling for disease diagnostics. **Journal of Chromatography B**, v.815, p.275-284, 2005.
- TESORO-CRUZ, E. et al. Frequency of the serological reactivity against the caprine arthritis encephalitis lentivirus gp135 in children who consume goat milk. In: (Ed.). **Arch Med Res**. v.40, p.204-7, 2009.
- TORFASON, E.G., GUDNADÓTTOR, M., LOVE, A. Comparison of immunoblots with neutralizing and complement fixing antibodies in experimental and natural cases of Visna-Maedi. **Arch. Virol.**, v. 123, p. 47-58, 1992.
- ZANONI, R.G. Phylogenetic analysis of small ruminant lentiviruses. **J. Gen. Virol.**, v. 79, p. 1951-1961, 1998.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

As lentivirose de pequenos ruminantes constituem-se um problema mundial sendo necessário, cada vez mais, estudos detalhados e minuciosos para melhorar o controle destas enfermidades.

Fatores limitantes para a detecção precoce de animais infectados pelos lentivirus de pequenos ruminantes e, conseqüentemente, para os programas de controle, são a sensibilidade e especificidades de testes de imunodiagnóstico. Portanto, é de suma importância estudos que visem à melhoria destas provas. Nesta pesquisa, procurou-se, com o auxílio de refinadas técnicas, como a eletroforese bidimensional, o western blot e a espectrometria de massas, melhorar o entendimento sobre a proteômica dos LVPR, principalmente com relação às proteínas de alto valor para o diagnóstico. Isto ocorreu através da caracterização de proteínas virais, sobretudo daquelas codificadas pelo gene *gag* e em especial à proteína do capsídeo (p28).

Esses resultados podem servir de base em futuros estudos para o desenvolvimento de vacinas.