

## Vírus da artrite encefalite caprina: isolamento e caracterização de parte do gene *gag*

[*Caprine arthritis-encephalitis virus: isolation and molecular characterization of part of the gag gene*]

P.P. Lima, M.A. Rocha\*, D. Stancek, A.M.G. Gouveia, G.D.R. Oliveira

Escola de Veterinária da UFMG  
Caixa Postal 567  
30123-970 – Belo Horizonte, MG

### RESUMO

Amostras de sangue de 12 animais soropositivos pelo teste de imunodifusão em gel de agarose e que não apresentavam sinais clínicos sugestivos de infecção pelo vírus da artrite-encefalite caprina (CAEV) foram coletadas para isolamento viral. Macrófagos derivados de monócitos foram co-cultivados com células de membrana sinovial caprina (MSC), resultando em cinco amostras que apresentaram efeito citopático característico do tipo persistente, semelhante ao observado para o CAEV. Uma técnica de reação em cadeia de polimerase (PCR) foi padronizada para amplificar parte do gene *gag* do genoma pró-viral, codificante para a proteína do capsídeo viral (p25). As cinco amostras foram amplificadas pela PCR e três delas, BR-UFMG/PL1, BR-UFMG/PL2 e BR-UFMG/PL3, foram seqüenciadas diretamente dos seus produtos de PCR. O alinhamento múltiplo das seqüências obtidas com outras de lentivírus de pequenos ruminantes (LVPR), obtidas no GenBank, e o dendrograma revelaram que as novas amostras de CAEV são únicas e distintas das demais amostras de LVPR, possuindo maior identidade de nucleotídeos e aminoácidos entre si e com as amostras de CAEV do que com a do vírus maedi-visna.

Palavras-chave: vírus da artrite-encefalite caprina, isolamento, PCR, análise filogenética

### ABSTRACT

*Blood samples from 12 seropositive animals by agar gel immunodiffusion test (AGID) showing no evident clinical signs of disease were taken to attempt caprine arthritis-encephalitis virus (CAEV) isolation. Monocyte-derived macrophages were co-cultured with goat synovial membrane cells (GSM) resulting in five virus isolations, which presented cytopathic effects of the persistent type, resembling those observed for CAEV. A polymerase chain reaction (PCR) assay was designed to amplify a portion of the gag proviral gene coding for the major core protein (p25). All of the five isolates were amplified by this PCR and three of them named BR-UFMG/PL1, BR-UFMG/PL2 and BR-UFMG/PL3, were sequenced directly from their PCR products. Multiple sequence analysis and a dendrogram including other sequences from the GenBank database showed that these Brazilian isolates are unique and distinct from those of known caprine and ovine lentiviruses, with a higher identity of nucleotide and deduced aminoacids to each other and to CAEV than to maedi-visna virus.*

*Keywords: caprine arthritis-encephalitis virus, virus isolation, PCR, phylogenetic analysis*

---

Recebido para publicação em 20 de novembro de 2002

Recebido para publicação, após modificações, em 14 de julho de 2003

\*Autor para correspondência:

E-mail: rochama@ufmg.br

## INTRODUÇÃO

O vírus da artrite-encefalite caprina (CAEV) é um vírus protótipo do gênero Lentivirus da família Retroviridae. Ele causa artrite progressiva crônica, pneumonia e mastite em animais adultos e, mais raramente, leucoencefalomielite em animais de dois a quatro meses de idade (Crawford, Adams, 1981). O CAEV provoca infecção persistente por se integrar ao genoma celular, possuindo tropismo por células do sistema imune da linhagem dos monócitos/macrófagos (Gorrel et al., 1992).

O CAEV compartilha características genéticas, morfológicas e patológicas com outros lentivírus, incluindo o vírus maedi-visna (MVV). Frequentemente CAEV e MVV são denominados de lentivírus de pequenos ruminantes (LVPR), por possuírem características patogênicas, epidemiológicas e organização genômica semelhantes (Banks et al., 1983).

No início da década de 80, importações de caprinos de raças leiteiras exóticas, procedentes de distintos países da Europa (França, Suíça, Alemanha, Holanda, Inglaterra) e da América do Norte (Estados Unidos e Canadá) foram feitas com o objetivo de introduzir material genético para melhorar a produção de leite das raças nativas brasileiras. Nessas importações, realizadas sem a adequada supervisão, foi também introduzido o CAEV (Assis, Gouveia, 1994).

Diferentes amostras de LVPR têm sido isoladas e caracterizadas em diversos estados brasileiros (Marchesin et al., 1998; Castro et al., 1999; Ravazzolo et al., 2001). A caracterização molecular dessas amostras é importante para evidenciar a diversidade de propriedades biológicas dos vírus que podem redundar em diferenças de citopatogenicidade tanto *in vivo* quanto *in vitro*, e de manifestação clínica da doença, além de auxiliar o desenvolvimento de métodos de diagnóstico mais sensíveis.

Esse trabalho objetivou a caracterização molecular de parte do gene *gag* de amostras brasileiras de lentivírus caprino isoladas de animais naturalmente infectados do Estado de Minas Gerais

## MATERIAL E MÉTODOS

De um rebanho caprino do Estado de Minas Gerais, foram obtidas 12 amostras de sangue total de animais soropositivos a anticorpos anti-CAEV pela microtécnica de imunodifusão em gel de agarose (IDGA; Gouveia, 1994). O sangue foi centrifugado a 1500g por 20min em centrífuga clínica para a retirada dos leucócitos, segundo Castro (1998). Os leucócitos foram ressuspensos em meio RPMI (com L-glutamina, 2g/l de bicarbonato de sódio e 25mM de Hepes), adicionado de 2% de solução de penicilina e estreptomicina (P/S) e 10% de soro fetal bovino (SFB), e colocados em garrafas A25 e em placas de seis poços. Após 24 horas de cultivo à 37°C e em 5% de CO<sub>2</sub>, o meio foi completamente trocado e os leucócitos foram mantidos, por uma semana, em estufa à 37°C para a maturação dos monócitos em macrófagos (Chebloune et al., 1996). Após essa semana de incubação foram acrescentadas células de membrana sinovial de caprino (MSC) na concentração de 30.000 células/cm<sup>2</sup> em meio de manutenção celular (MEM) com 2% de P/S, 1% de fungison (F) e 5% de SFB. As garrafas e placas foram observadas periodicamente ao microscópio óptico para verificar a presença de efeito citopático (ECP), característico da infecção por lentivírus caprino (formação de sincícios). A cada 15 dias as monocamadas de células eram tripsinizadas, sendo as garrafas e placas acrescidas de células de MSC e de meio de manutenção celular (Castro, 1998). Ao final de 45 dias, as placas de seis poços contendo as amostras e os controles positivo e negativo foram coradas com solução de cristal violeta a 0,1%, para melhor visualização do ECP. As monocamadas das garrafas A25 foram tripsinizadas e o DNA foi extraído por *kit* de extração *GFX<sup>TM</sup> Genomic Blood DNA Purification Kit* (Pharmacia), segundo instruções do fabricante.

Para as reações de PCR, os iniciadores foram desenhados baseando-se na seqüência publicada de CAEV-Co (Saltarelli et al., 1990), com auxílio dos programas Blastn (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast>), Oligo<sup>®</sup> e OligoTech (Versão 1.0) (<http://www.oligoset.com/OLIGOTech.HTM>), e o objetivo de se amplificar um fragmento de 630pb da região *gag* do genoma pró-viral,

### Vírus da artrite encefalite caprina...

correspondente à proteína do capsídeo viral (CA). Os iniciadores escolhidos, CAEV1 e CAEV2, foram: CAEV1 (*sense*) GGA GGG AGA AGC TGG AA; CAEV2 (*antisense*) CAC ATC TCT ACA TGC TTG CA.

As reações de PCR foram realizadas em volume total de 30µl, contendo 10mM de Tris-HCl (pH 8,0), 50mM de KCl, 2,0mM de MgCl<sub>2</sub>, 200µM de cada dNTP (dATP, dGTP, dCTP, dTTP), 20pmoles de cada iniciador, 1,0 U Taq DNA polimerase e 1µg de DNA. Uma gota de óleo mineral foi colocada em cada tubo. Os ciclos consistiram de um passo inicial à 94°C por 5min e 35 passos de desnaturação à 94°C por 1min, hibridização à 60°C por 1min e extensão à 72°C por 1min. Após os ciclos, as amostras foram submetidas à 72°C por 8min. Para leitura dos resultados foi realizada eletroforese em gel de agarose 1% corado com brometo de etídio. Em todas as reações foram utilizados controles negativos (células de MSC não infectadas) e controle de reagentes (H<sub>2</sub>O bidestilada, autoclavada, livre de DNase).

As amostras amplificadas por PCR foram purificadas após eletroforese em gel de agarose de baixo ponto de fusão (“low melting point”) a 1%, por meio do *kit* de extração<sup>1</sup>, conforme instruções do fabricante. As amostras purificadas foram enviadas ao laboratório de pesquisa e análise de fragmentos de DNA<sup>2</sup>, para seqüenciamento.

As seqüências obtidas foram editadas com auxílio do programa Chromas (versão gratuita 1.45) (Technelysium Pty, Ltd) (<http://www.technelysium.com.au/chromas.html>) e alinhadas com auxílio do programa Clustal W, versão 1.8 DOS (Thompson et al., 1994) (<http://www.csc.fi/molbio/progs/clustalw>), para obtenção de uma seqüência com senso. As seqüências editadas foram analisadas para a determinação de similaridades em relação a nucleotídeos e aminoácidos de amostras de LVPR, utilizando os programas Blastn e Blastx e frente aos bancos de dados *nr* (GenBank + EMBL + DDBJ + PDB *sequences*) (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast>).

<sup>1</sup>WIZARD® PCR Preps – Promega

<sup>2</sup>Bioagro - Campus Universidade Federal de Viçosa 36570-000, Viçosa – MG

As seqüências com senso de nucleotídeos e as seqüências deduzidas de aminoácidos foram alinhadas, usando os programas Multalin (Corpet, 1998) (<http://prodes.toulouse.inra.fr/multalin>) e Clustal W versão 1.8 DOS (Thompson et al., 1994), com os padrões de CAEV (CAEV-Co) e MVV (K1514, ZZV1050, SA-OMVV e EV1) e os graus de homologia/divergência entre as amostras foram calculados e expressos em porcentagem.

O dendrograma foi construído com o auxílio do programa Multalin (Corpet, 1998). As amostras utilizadas para comparação e seus respectivos números de acesso ao GenBank estão descritos na Tab. 1.

Tabela 1. Seqüência de lentivírus de pequenos ruminantes (LVPR) e seu respectivo número de acesso ao GenBank

LVPR	Amostra e origem	Número de acesso
CAEV	CAEV-Co <sup>a</sup> (Estados Unidos)	M33677
	CA680 (França)	AF015181
	1GA (Noruega)	AF322109
	C18 (Brasil)	AJ305040
	C767 (Brasil)	AJ305041
	C47 (Brasil)	AJ305042
MVV	K1514 (Islândia)	M10608
	SA-OMVV (África do Sul)	M34193
	ZZV1050 (Holanda)	X54379
	EV1 (Escócia)	S51392
	V27 (Brasil)	AJ305039

<sup>a</sup> A seqüência de nucleotídeos corresponde à região do gene *gag* codificante para a proteína do capsídeo (CA) viral, posições entre 979 e 1572.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

Das 12 amostras colhidas para tentativa de isolamento, cinco apresentaram ECP característico da infecção por LVPR e foram nomeadas de BR-UFGM/PL1, BR-UFGM/PL2, BR-UFGM/PL3, BR-UFGM/PL4, BR-UFGM/PL5. A ocorrência de muitos sincícios entre três e cinco dias após inoculação das amostras em MSC com 24 horas de cultivo foi considerada como ECP característico.

Todas as amostras positivas ao isolamento e que foram amplificadas pela PCR resultaram em um fragmento de aproximadamente 600pb (Fig. 1). As sete amostras negativas para o isolamento também o foram para a PCR.

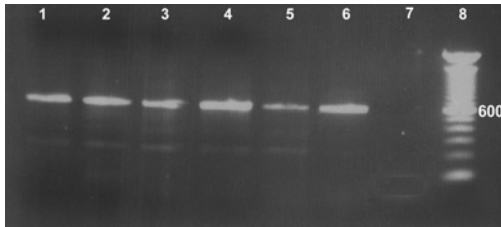


Figura 1. Gel de agarose 1% (p/v) corado com brometo de etídio e visualizado sob luz ultravioleta. Canaleta 1 (BR-UFGM/PL1), canaleta 2 (BR-UFGM/PL2), canaleta 3 (BR-UFGM/PL3), canaleta 4 (BR-UFGM/PL4), canaleta 5 (BR-UFGM/PL5), canaleta 6 (controle positivo), canaleta 7 (controle negativo) e canaleta 8 (marcador molecular 100 bp DNA ladder – Gibco-BRL).

Das cinco amostras, três foram seqüenciadas a partir do produto obtido por PCR purificado (BR-UFGM/PL1, BR-UFGM/PL2 e BR-UFGM/PL3). Foram obtidas pelo menos duas seqüências para cada amplificado. As seqüências editadas foram depositadas no GenBank ([www.ncbi.nlm.nih.gov/Genbank](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Genbank)) e receberam os seguintes números de acesso: AY081139 (BR-UFGM/PL1), AY101347 (BR-UFGM/PL2) e AY101348 (BR-UFGM/PL3).

As seqüências com senso das amostras BR-UFGM/PL1, BR-UFGM/PL2 e BR-UFGM/PL3 foram alinhadas separadamente com o padrão CAEV-Co (Saltarelli et al., 1990), para a retirada das regiões correspondentes aos iniciadores. Verificou-se que cada amostra resultou em uma seqüência de 593 nucleotídeos, correspondente à porção codificante para a proteína do capsídeo viral (CA ou p25), entre os aminoácidos 150 e 347 do padrão CAEV-Co, obtido no banco de dados Swissprot (número de acesso P33458). As seqüências apresentavam em média 91% de homologia com a seqüência CAEV-Co.

As seqüências obtidas mantiveram a mesma proporção de bases observadas para os lentivírus, com maior predominância de bases A e menor de T. A maioria das substituições observadas na seqüência de nucleotídeos eram silenciosas, com predominância de transições A↔G. O mesmo tipo de predominância de transições A↔G tem sido descrito para o HIV-1 (Fitzgibbon et al.,

1993). Com relação aos aminoácidos, a maioria das mutações foi conservativa e observada na porção C-terminal da proteína (aminoácido 106 a aminoácido 197) (Fig. 2).

A porção C-terminal da proteína *gag* dos diversos gêneros de retrovírus tem sido descrita como mais bem conservada que a porção N-terminal e contém uma região denominada de região de homologia principal (MHR), com grande homologia entre os diferentes retrovírus (Wills, Craven, 1991). A região MHR das amostras isoladas nesse estudo mostrou-se menos conservada, porém as mutações observadas foram conservativas e os aminoácidos Q<sup>134</sup>, E<sup>138</sup>, F<sup>143</sup> e R<sup>146</sup>, considerados conservados entre os diferentes lentivírus, também se mantiveram conservados.

As divergências de nucleotídeos e aminoácidos entre as seqüências do CAEV e do MVV estão representadas na Tab. 2.

As seqüências de nucleotídeos de BR-UFGM/PL1, BR-UFGM/PL2 e BR-UFGM/PL3 apresentaram, respectivamente, 10, 8 e 9% de divergência com relação ao CAEV-Co e de 21 a 26% de divergência com relação ao padrões de MVV (K1514, SA-OMVV, ZZV1050 e EV1), divergências similares às encontradas entre o CAEV-Co (de 21 a 23%) e as amostras de MVV. Em relação aos aminoácidos, as seqüências BR-UFGM/PL1, BR-UFGM/PL2 e BR-UFGM/PL3 apresentaram 11, 9 e 7% de divergência em relação ao CAEV-Co, respectivamente.

A Fig. 2 mostra o alinhamento das seqüências de aminoácidos com a amostra padrão CAEV-Co e com as amostras padrão de MVV (K1514, ZZV1050, SA-OMVV e EV1), feito com o auxílio do programa Multalin (Corpet, 1998).

Com relação às proteínas, foram observadas 20, 17 e 13 substituições nas amostras BR-UFGM/PL1, BR-UFGM/PL2 e BR-UFGM/PL3, respectivamente, quando cada um foi comparado com a amostra padrão CAEV-Co (Saltarelli et al., 1990). A maioria dessas substituições foram conservativas e mais freqüentes na porção C-terminal da proteína. A cisteína C<sup>177</sup>, considerada altamente conservada entre as diversas amostras de lentivírus, também se mostrou conservada nas amostras brasileiras.

Vírus da artrite encefalite caprina...

As amostras BR-UFGM/PL1 e BR-UFGM/PL2 apresentaram uma substituição (P<sup>76</sup>→Q) na região rica em prolina e glicina (aa<sup>73</sup> a aa<sup>80</sup> da Fig. 2) e uma (P<sup>139</sup>→S) na região do MHR (aa<sup>131</sup> a aa<sup>150</sup>). A amostra BR-UFGM/PL3 apresentou duas substituições (T<sup>136</sup>→A e D<sup>142</sup>→E) na região do MHR. Dentro do MHR, os aminoácidos Q<sup>134</sup>, E<sup>138</sup>, F<sup>143</sup> e R<sup>146</sup>, considerados bastante

conservados entre os diversos lentivírus, mantiveram-se conservados.

As amostras BR-UFGM/PL1, BR-UFGM/PL2 e BR-UFGM/PL3 apresentaram a mesma substituição para o aa<sup>114</sup> (N→S), para o aa<sup>125</sup> (R→K), para o aa<sup>175</sup> (A→S) e para o aa<sup>196</sup> (E→Q).

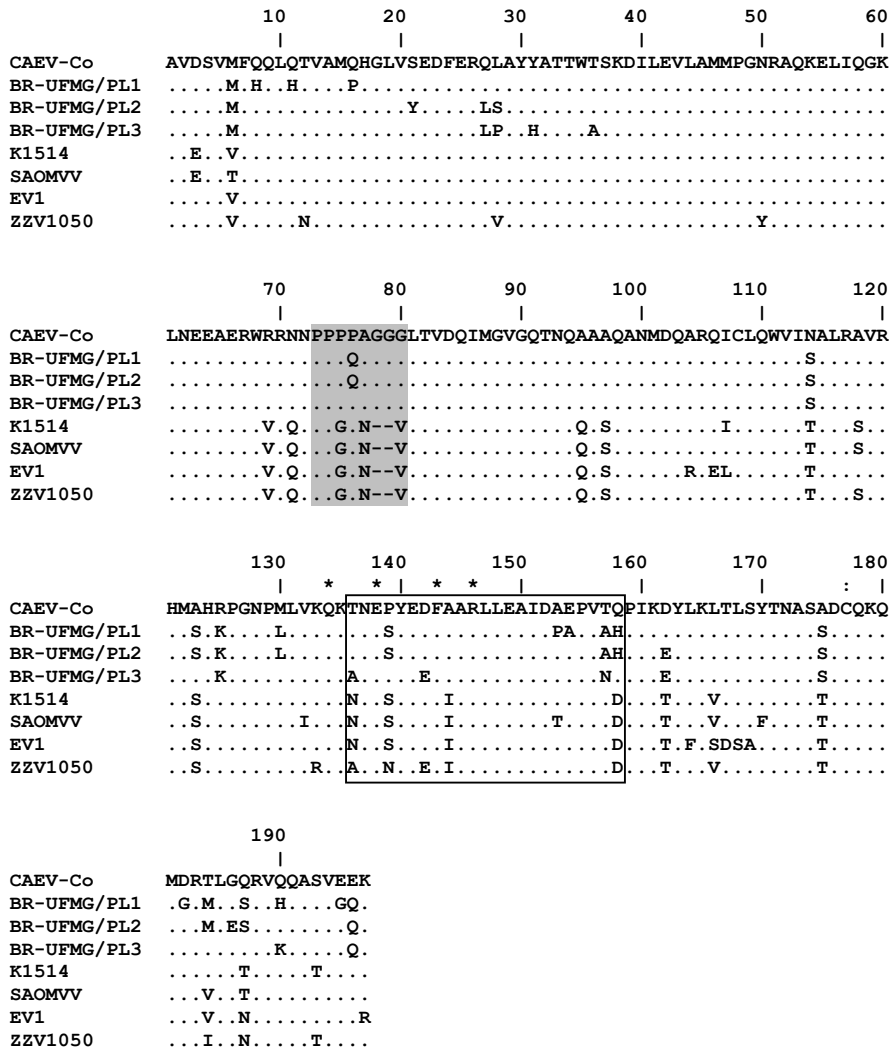


Figura 2. Alinhamento das seqüências de aminoácidos das amostras BR-UFGM/PL1, BR-UFGM/PL2 e BR-UFGM/PL3 com as amostras de CAEV (CAEV-Co) e MVV (K1514, SA-OMVV, ZZV1050 e EV1). (.) indica homologia, (-) indica deleção em relação ao CAEV-Co, em cinza (aa<sup>73</sup> a aa<sup>80</sup>) região rica em prolina e glicina, o quadrado (aa<sup>131</sup> a aa<sup>150</sup>) indica a região do MHR, \* aminoácidos mais bem conservados entre diferentes retrovírus, : cisteína, resíduo bem conservado entre as diferentes lentivírus.

Tabela 2. Porcentagem de divergência de nucleotídeos (porção inferior esquerda da matriz) e aminoácidos (porção superior direita da matriz) entre as seqüências das amostras BR-UFGM/PL1 (PL1), BR-UFGM/PL2 (PL2) e BR-UFGM/PL3 (PL3), CAEV-Co (Cork) e K1514, SA-OMVV (SAOMV), ZZV1050 (ZZV) e EV1, de MVV

LVPR	Amostra	Distâncias com:							
		Cork	PL1	PL2	PL3	K1514	SAOMV	ZZV	EV1
CAEV	Cork	-	11	9	7	12	14	14	15
	PL1	10	-	7	12	18	19	20	20
	PL2	8	5	-	9	16	17	17	18
	PL3	9	14	12	-	16	18	16	19
MVV	K1514	22	23	22	23	-	5	6	8
	SAOMV	21	23	22	23	16	-	9	9
	ZZV	21	22	21	23	16	15	-	11
	EV1	23	26	24	26	17	15	15	-

As diferenças foram calculadas por comparação duas a duas entre as amostras. As seqüências comparadas correspondem ao gene *gag* codificante para a proteína do capsídeo viral (p25) – posições entre 979 e 1572 da amostra CAEV-Co (Saltarelli et al., 1990). O alinhamento das seqüências foi obtido por meio do programa Clustal W versão 1.8. CAEV= vírus da artrite-encefalite caprina; MVV= vírus maedi-visna.

A fim de se obter informação sobre a relação filogenética entre as três novas amostras brasileiras de CAEV com as seqüências de CAEV e MVV previamente publicadas no GenBank, foi construído um dendrograma a partir da seqüência deduzida de aminoácidos da proteína *gag* CA (p25), usando o alinhamento das seqüências de aminoácidos das amostras BR-UFGM/PL1, BR-UFGM/PL2 e BR-UFGM/PL3 com as amostras padrão de CAEV (CAEV-Co) e MVV (K1514, SAOMVV, ZZV1050 e EV1), além da inclusão de outras amostras brasileiras de lentivírus caprino (C18, C47 e C767) (Ravazzolo et al., 2001), uma francesa (CA680) (Valas et al., 1997), uma norueguesa (IGA) (Gjerset et al., 2000) e uma brasileira de lentivírus ovino (V27) (Ravazzolo et al., 2001). As amostras obtidas neste trabalho formaram um subgrupo do grupo CAEV, claramente separado do grupo MVV (Fig. 3). Relação filogenética similar, com clara distinção entre as amostras de LVPR originadas de caprinos e ovinos, foi encontrada por Ravazzolo et al. (2001) ao compararem seqüências do gene *gag* de amostras brasileiras isoladas no Rio Grande do Sul com as amostras de referência de CAEV e MVV. Em contraste, Rolland et al. (2002) verificaram que uma amostra irlandesa de CAEV agrupava-se com as amostras de MVV e em um grupo claramente separado do grupo CAEV, pela análise dos genes *gag*, *pol* e *env*.

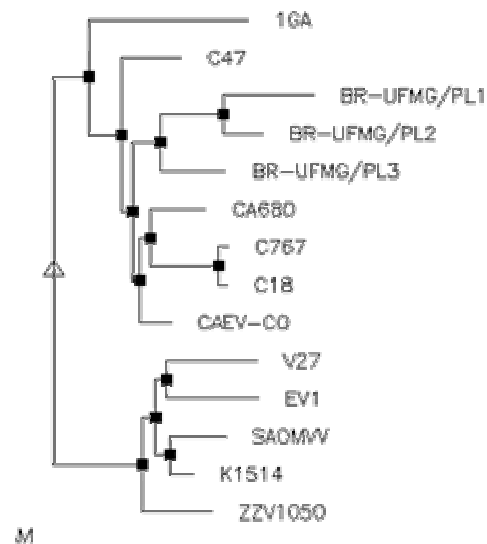


Figura 3. Dendrograma obtido com auxílio do programa Multalin (Corpet, 1998) para as seqüências de aminoácidos das amostras BR-UFGM/PL1, BR-UFGM/PL2 e BR-UFGM/PL3 com outras de CAEV e de padrões CAEV-Co e MVV.

Não houve formação de um subgrupo homogêneo das amostras brasileiras. Quérat et al. (1990) e Sargan et al. (1991) relataram que as

amostras K1514, SA-OMVV e EV1, embora tenham sido isoladas de países diferentes, possuem origem comum (possivelmente a Alemanha) e sempre se agrupam juntas nas análises filogenéticas. No Brasil foram importados caprinos de diferentes regiões da Europa e da América do Norte, o que possibilita a ocorrência de amostras virais de diferentes origens, justificando a não formação de um grupo homogêneo das amostras brasileiras.

Os LVPR, CAEV e MVV, embora sejam genética e antigenicamente relacionados, são classificados como quasispécies virais distintas. Entretanto vários autores têm demonstrado que algumas amostras de lentivírus ovino isoladas de animais naturalmente infectados e provenientes de diversas regiões geográficas são mais semelhantes ao CAEV (Zanoni et al., 1992; Chebloune et al., 1996) e que algumas amostras de lentivírus caprino assemelham-se mais ao MVV (Castro et al., 1999; Rolland et al., 2002), sugerindo a possível ocorrência de infecção cruzada entre espécies, nas duas direções. Assim, os estudos filogenéticos realizados com amostras de LVPR têm indicado que esses vírus devem ser considerados como quasispécies virais únicas que têm a capacidade de infectar tanto ovinos quanto caprinos.

Existem apenas duas seqüências completas de CAEV publicadas no GenBank, a da amostra considerada padrão CAEV-Co (Saltarelli et al., 1990) e de uma amostra norueguesa 1GA (Gjerset et al., 2000), além de poucas seqüências parciais do gene *gag*. Para o MVV existem apenas três seqüências completas, os padrões K1514, SA-OMVV e EV1 e algumas seqüências parciais do gene *gag*. Dessa forma, o isolamento e a caracterização de novas amostras virais provenientes de regiões geográficas distintas possibilita uma melhor verificação da heterogeneidade genética entre os LVPR, importante tanto para os estudos epidemiológicos relacionados à transmissão intra e interespecíficas dos vírus, quanto para esclarecer a origem e a evolução desse grupo viral. A maioria dos estudos filogenéticos dos LVPR foram baseados nos genes *pol*, *env* e *gag*, com poucos estudos comparando os genes regulatórios (Castro et al., 1999) e a região LTR (Zanoni et al., 1998).

O alinhamento das seqüências obtidas neste estudo com as outras amostras de CAEV e MVV depositadas no GenBank, assim como as árvores filogenéticas construídas demonstraram que as amostras isoladas são únicas, distintas e mais relacionadas entre si e com as amostras de CAEV do que com as amostras de MVV.

#### AGRADECIMENTOS

À Pró-Reitoria de Pesquisa da UFMG, pelo financiamento do trabalho.

#### REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ASSIS, A.P.M.; GOUVEIA, A.M. Evidência sorológica de lentivírus (Maedi Visna/Artrite Encefalite Caprina) em rebanhos nos estados de Minas Gerais, Rio de Janeiro, Bahia, Ceará. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE MEDICINA VETERINÁRIA, 23., Recife. *Anais...* Recife, Sociedade Brasileira de Medicina Veterinária, 1994. p.104
- BANKS, K.L.; ADAMS, D.S.; MCGUIRE, T.C. et al. Experimental infection of sheep by caprine arthritis-encephalitis virus and goats by progressive pneumonia virus. *Am. J. Vet. Res.*, v.44, p.2037-2311, 1983.
- CASTRO, R. S. Lentivírus de pequenos ruminantes: ensaios imunoenzimáticos, perfil sorológico e inferências filogenéticas. 1998. 132f. Tese (Doutorado) - Escola de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte.
- CASTRO, R.S.; GREENLAND, T.; LEITE, R.C. et al. Conserved sequence motifs involving the *tat* reading frame of Brazilian caprine lentiviruses indicate affiliations to both caprine arthritis-encephalitis virus and visna-maedi virus. *J. General Virol.*, v.80, p.1583-1589, 1999.
- CHEBLOUNE, Y.; KARR, B.; SHEFFER, D. et al. Variations in lentiviral gene expression in monocyte-derived macrophages from naturally infected sheep. *J. General Virol.*, v.77, p.2037-2051, 1996.
- CORPET, F. Multiple sequence alignment with hierarchical clustering. *Nucleic Acids Res.*, v.16, p.10881-10890, 1998.

- CRAWFORD, T. B.; ADAMS, D. S. Caprine arthritis-encephalitis: clinical features and presence of antibody in selected populations. *J. Am. Vet. Med. Assoc.*, v.178, p.713-719, 1981.
- FITZGIBBON, J.E.; MAZAR, S.; DUBIN, D. A new type of GA hypermutation affecting human immunodeficiency virus. *AIDS Res. Humam Retrov.*, v.9, p.833-938, 1993.
- GJERSET, B.J.; STORSET, A.K.; RIMSTAD, E. *Direct submission to GenBank*, nov., n. AF32109, 2000. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>. Acesso em: 20/03/2001.
- GORREL, M.D.; BRANDON, M.R.; SHEFFER, D. et al. Ovine lentivirus is macrophagetropic and does not replicate productively in T lymphocytes. *J. Virol.*, v.66, p.2679-2688, 1992.
- GOUVEIA, A.M. Padronização de microtécnica de imunodifusão em gel de agarose para diagnóstico de lentivírus da pneumonia progressiva ovina (OPP), maedi-visna (MVV) e artrite encefalite caprina (CAEV). Sobral, 1994. 4p. (*Mimeografado*).
- MARCHESIN, D.M.; MOOJEN, V.; RAVAZZOLO, A.P. Caracterização molecular parcial do gene *gag* de amostras do vírus da artrite-encefalite caprina (CAEV) isoladas de animais naturalmente infectados no Rio Grande do Sul, Brasil. *Pes. Vet. Bras.*, v.18, p.119-126, 1998.
- QUÉRAT, G.; AUDOLY, G.; SONIGO, P. et al. Nucleotide sequence analysis of SA-OMVV, a Visna-Related Ovine Lentivirus: philogenetic history of lentiviruses. *Virology*, v.175, p.434-447, 1990.
- RAVAZOLLO, A.P.; REISCHAK, D.; PETERHANS, E. et al. Phylogenetic analysis of small ruminant lentiviruses from southern Brazil. *Virus Res.*, v.79, p.117-123, 2001.
- ROLLAND, M.; MOONEY, J.; VALAS, S. et al. Characterization of an Irish caprine lentivirus strain – SRLV phylogeny revisited. *Virus Res.*, v.85, p.29-39, 2002.
- SALTARELLI, M.; QUERAT, G.; KONINGS, D.A.M. et al. Nucleotide sequence and transcriptional analysis of molecular clones of CAEV which generate infectious virus. *Virology*, v.179, p.347-364, 1990.
- SARGAN, D.R.; BENNET, J.D.; COUSENS, C. et al. Nucleotide sequence of EV1, a British isolate of maedi-visna virus. *J. Gen. Virol.*, v.72, p.1893-1903, 1991.
- THOMPSON, J.D.; HIGGINS, D.G.; GIBSON, T.J. Clustal W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, positions-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Res.*, v.22, p.4673-4680, 1994.
- VALAS, S.; BENOIT, C.; GUIONAUD, C. et al. North American and French caprine arthritis-encephalitis viruses emerge from ovine maedi-visna viruses. *Virology*, v.237, p.307-318, 1997.
- WILLS, J.W.; CRAVEN, R.C. Form, function and use of retroviral Gag proteins. *J. Acq. Immunodef. Syndr.*, v.5, p.639-654, 1991.
- ZANONI, R.G. Phylogenetic analysis of small ruminant lentiviruses. *J. Gen. Virol.*, v.79, p.1951-1961, 1998.
- ZANONI, R.G.; NAUTA, I.M.; KUHNERT, P. et al. Genomic heterogeneity of small ruminant lentiviruses detected by PCR. *Vet. Microbiol.*, v.33, p.341-351, 1992.