

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL  
FACULDADE DE VETERINÁRIA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS

OBTENÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE CÉLULAS DE MEMBRANA SINOVIAL  
OVINA TRANSFORMADAS PELO ANTÍGENO T DO VÍRUS SÍMIO 40:  
INFLUÊNCIA NA VARIABILIDADE DOS GENES *gag* e *env* E DO LTR DOS  
VÍRUS DA ARTRITE-ENCEFALITE CAPRINA (CAEV) E MAEDI-VISNA (MVV)  
DOS OVINOS

AUTOR: UBIRAJARA MACIEL DA COSTA  
ORIENTADORA: Profa. Dra. ANA PAULA RAVAZZOLO

PORTO ALEGRE  
2004

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL  
FACULDADE DE VETERINÁRIA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS

OBTENÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE CÉLULAS DE MEMBRANA SINOVIAL  
OVINA TRANSFORMADAS PELO ANTÍGENO T DO VÍRUS SÍMIO 40:  
INFLUÊNCIA NA VARIABILIDADE DOS GENES *gag* e *env* E DO LTR DOS  
VÍRUS DA ARTRITE-ENCEFALITE CAPRINA (CAEV) E MAEDI-VISNA (MVV)  
DOS OVINOS

Autor: UBIRAJARA MACIEL DA COSTA

Tese apresentada como requisito para obtenção do  
grau de Doutor em Ciências Veterinárias na área de  
Medicina Veterinária Preventiva, especialidade  
Virologia.

Orientadora: Profa. Dra. Ana Paula Ravazzolo

PORTO ALEGRE

2004

Ubirajara Maciel da Costa

Obtenção e caracterização de células de membrana sinovial ovina transformadas pelo antígeno t do vírus símio 40: influência na variabilidade dos genes *gag* e *env* e do LTR dos vírus da artrite-encefalite caprina (CAEV) e maedi-visna (MVV) dos ovinos

Aprovada em 27 de FEV 2004

APROVADO POR:

Este trabalho foi realizado no:

- Laboratório de Virologia Clínica Veterinária do Departamento de Patologia Clínica Veterinária da Faculdade de Veterinária, UFRGS.
- Laboratório de Virologia Molecular do Centro de Biotecnologia do Rio Grande do Sul, UFRGS.

Com apoio financeiro de:

- PRONEX em Virologia Veterinária.
- CAPES – Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior.
- CNPq – Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico.

Aos meus pais

Leonil (*in memoriam*) e Nadir

## AGRADECIMENTOS

À Profa. Dra. Ana Paula Ravazzolo, pela orientação, amizade, apoio e confiança durante a realização deste trabalho.

À Profa. Dra. Valéria Moojen, exemplo de profissionalismo e responsável pelo início de minhas atividades na área de virologia.

Ao Prof. Dr. Laerte Ferreiro, que durante toda a execução do trabalho foi fonte de incentivo e amizade.

Aos sempre amigos do Laboratório de Virologia da FAVET/UFRGS, por todos momentos passados juntos. Em especial às amigas Dilmara, Aline, Andréa e Orema.

Aos amigos da Micologia Karine, Izamara, Sandra, Vanessa e em especial a doutoranda Edna Maria pela amizade incondicional.

Ao Prof. Dr. José Luiz Rigo Rodrigues e todos os amigos do Laboratório de Embriologia, pelo fornecimento constante da tão valiosa água ultrapura.

Àos amigos do Centro de Biotecnologia: Alessandra, Alexandre, Daniela, Fernanda, Felipe, Gabriel, Grasiela, Homero Dewes, Jaqueline, Luciano, Márcia, Melissa e Silvia Centeno.

Ao Prof. Dr. Arnaldo Zaha e a MSc. Deise pelo seqüenciamento das amostras.

Ao CBiot<sub>enzimas</sub> do Centro de Biotecnologia-UFRGS, pelo fornecimento das enzimas utilizadas no trabalho.

À Dra. Juliana da Silva pelo apoio técnico e amizade.

Ao Dr. Giuseppe Bertoni pela seqüência dos primers do gene *env* e ao Dr. Ernst Peterhans pelo seqüenciamento das amostras do LTR viral, ambos do Instituto de Virologia Veterinária, Suíça.

Ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias pela possibilidade de realização desta Tese, bem como as secretárias Andréa, Maria, Simone, Vera e, em especial, à Carminha.

Àos amigos Lurdinha, Fernando, Camila, Fernanda e Bárbara pela amizade e auxílio com a Júlia sempre que necessitei ficar mais tempo no Laboratório.

À minha mãe de coração Maribel e minha irmã de coração Nadir.

Em especial aos meus grandes amigos Rui Fernando Félix Lopes e Alexandre Tavares Duarte de Oliveira, por todo o apoio e pelas horas de descontração durante os dias turbulentos.

Um agradecimento especial faz-se necessário a duas pessoas que fizeram parte ativa e importante neste trabalho. À minha esposa Fabiana Forell, pelo carinho, paciência (sempre que possível), opiniões e discussões a respeito do trabalho. E a minha filha Júlia Forell da Costa, por ter esperado intranqüilamente a finalização desta jornada e que, finalmente, voltará a ter um pai para brincar.

## RESUMO

Cultivos celulares podem ser utilizados para isolamento viral, caracterização de novas amostras virais e produção de imunobiológicos. Podem ser empregados cultivos celulares primários, secundários ou de linha. Estes últimos podem ser obtidos pela transformação física, química ou biológica de cultivos primários ou secundários. Para verificar a interação entre células transformadas com o Ag T do vírus símio 40 (SV40) e os Lentivírus de Pequenos Ruminantes (SRLV), amostras brasileiras de SRLV foram utilizadas para inoculação em cultivos celulares de membrana sinovial ovina transformados pelo Ag T e comparadas à amostras inoculadas em cultivos não transformados. Inicialmente, as células transformadas pelo Ag T foram caracterizadas e observou-se um aumento na cinética de crescimento e alterações no cariótipo, provavelmente induzidas pela presença do Ag T. Este foi detectado por PCR no núcleo e no citoplasma das células transformadas e sua expressão, confirmada através de RT-PCR. A fim de avaliar a permissividade e a possível seleção de populações virais em células transformadas, dois isolados, um de maedi-visna dos ovinos e um de artrite-encefalite caprina, foram inoculados em células MSO e TMSOpSV1. Através da análise de sequências dos genes *gag* e *env* e LTR obtidos por PCR, procurou-se avaliar a variabilidade viral em função do tipo de célula utilizada. Analisando-se as sequências obtidas pelo método de *Maximum Likelihood*, embora tenha sido observada variabilidade viral, esta não estava associada ao tipo celular utilizado para inoculação viral.

Palavras-chave: CAEV/MVV, cultivo celular, células de linhagem, SV40.

## ABSTRACT

Transformed cells obtained by the use of tumor genes may induce the selection of virus populations during the isolation and characterization process. In order to evaluate the interaction of small ruminant lentivirus (SRLV) and simian virus 40 (SV40) T Ag transformed cells, two Brazilian isolates were used to inoculate the transformed ovine synovial membrane cell (TOSM) and compared to the non transformed counterpart (OSM). Firstly, the transformed cells were characterized and an increase in growth kinetic and cariotype alterations were observed, probably due to SV40 T Ag. The detection of the T Ag DNA in the nucleus and the cytoplasm of TOSM cells was done by PCR, as well as its expression by RT-PCR. In order to evaluate the permissibility and the hypothesis of virus population selection in the transformed cells, two isolates, one of CAEV and one of MVV, were inoculated in the secondary cultures and in the TOSM cells. Sequence analysis of *gag* and *env* genes and LTR by Maximum Likelihood has demonstrated virus variability, although it was not associated to the cell type used to propagate SRLV.

Keywords: MVV/CAEV, cell culture, cell line, SV40.

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

Ag T	antígeno T maior
Ag t	antígeno t menor
AGID	ágar-gel imunodifusão
AP	proteína ativadora
ATCC	<i>American Tissue Culture Collection</i>
BIV	vírus da imunodeficiência bovina
BLAST	Basic Local Alignment Search Tool
CAEV	vírus da artrite encefalite caprina
CDK	quinase ciclina dependente
CPE	efeito citopático
D-MEM	meio de Eagle modificado por Dulbecco
DMSO	dimetil sulfóxido
DNA	ácido desoxirribonucléico
dNTP	desoxirribonucleotídeo-5' trifosfatado
DTT	ditiotreitól
EBV	vírus Epstein-Bar
EDTA	ácido etilenodiaminotetracético
ELISA	<i>enzyme-linked immunosorbent assay</i>
<i>env</i>	gene codificante das proteínas do envelope viral
Env	proteína precursora das proteínas do envelope
FAVET	Faculdade de Veterinária
FIV	vírus da imunodeficiência felina
<i>g</i>	unidade de força centrífuga relativa
<i>gag</i>	gene codificante das proteínas do antígeno grupo específico
Gag	proteína precursora das proteínas do capsídeo
GAPDH	gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase
HIV	vírus da imunodeficiência humana
HTLV-1	vírus da leucemia T humana tipo 1
IFA	imunofluorescência indireta
IN	integrase
LMP	baixo ponto de fusão
LTR	seqüências longas repetidas ( <i>long terminal repeat</i> )
M	molar

MA	proteína da matriz
mA	miliampéres
MEM	meio mínimo essencial
MHC	complexo maior de histocompatibilidade
min	minutos
ML	máxima probabilidade
mL	mililitros
mM	milimolar
mRNA	RNA mensageiro
MSC	membrana sinovial caprina
MSO	membrana sinovial ovina
MVV	vírus Maedi-Visna
N	normal
NC	proteína do nucleocapsídeo
ng	nanogramas
°C	graus Celsius
ORI	origem de replicação
pb	pares de base
PBS	solução salina tamponada com fosfatos
PCR	reação em cadeia da polimerase
pH	potencial de hidrogênio
<i>pol</i>	gene codificante das enzimas virais
PR	protease
RFLP	<i>restriction fragment lenght polymorphism</i>
RNA	ácido ribonucléico
RT	transcriptase reversa
SDS	dodecil sulfato de sódio
seg	segundos
SFB	soro fetal bovino
SIV	vírus da imunodeficiência símia
SRLV	lentivírus de pequenos ruminantes
SU	proteína da superfície
SV40	vírus símio 40
TBP	proteína ligadora ao TATA <i>box</i>
TCID <sub>50</sub>	dose infectante para 50% do cultivo celular

TE	Tris-EDTA
TM	proteína transmembrana
TMSO	membrana sinovial ovina transformada
TNF	fator de necrose tumoral
UFRGS	Universidade Federal do Rio Grande do Sul
UI	unidades internacionais
V	Volts
WHO	World Health Organization
µg	microgramas
µL	microlitros

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Representação esquemática da região funcional do Ag T.....	28
<b>Figura 2.</b> Representação esquemática da estrutura de um retrovírus.....	33
<b>Figura 3.</b> Representação esquemática do genoma dos SRLV.....	36
<b>Figura 4.</b> Representação das etapas utilizadas na obtenção dos clones seqüenciados.....	59
<b>Figura 5.</b> Morfologia, ao microscópio óptico, das células MSO <sub>50</sub> e TMSOpSV1.....	64
<b>Figura 6.</b> Curva de crescimento das células MSO <sub>50</sub> e TMSOpSV1.....	66
<b>Figura 7.</b> Análise dos produtos da RT-PCR para presença do Ag T do SV40 em células COS-1 e TMSOpSV1 <i>versus</i> MSO <sub>50</sub> .....	67
<b>Figura 8.</b> Análise dos produtos de PCR obtidos a partir do DNA nuclear e citoplasmático das células TMSOpSV1.....	68
<b>Figura 9.</b> Cromossomos metafásicos das células MSO e TMSOpSV1.....	69
<b>Figura 10.</b> Contagem do número de cromossomos das células TMSOpSV1.....	70
<b>Figura 11.</b> Análise dos produtos de PCR para os genes <i>gag</i> e <i>env</i> em células TMSOpSV1 e MSO.....	71
<b>Figura 12.</b> Análise do produto de PCR do LTR.....	71
<b>Figura 13.</b> Alinhamento das seqüências de aminoácidos do fragmento correspondente a região Env do CAEV.....	73
<b>Figura 14.</b> Alinhamento das seqüências de aminoácidos de Env do MVV.....	75
<b>Figura 15.</b> Alinhamento das seqüências de aminoácidos, após a tradução das seqüências de nucleotídeos do gene <i>gag</i> do CAEV.....	77
<b>Figura 16.</b> Alinhamento das seqüências de aminoácidos do fragmento de Gag do MVV.....	79
<b>Figura 17.</b> Árvore filogenética construída pelo método <i>Maximum Likelihood</i> a partir de seqüências do gene <i>env</i> do CAEV.....	82
<b>Figura 18.</b> Árvore filogenética construída pelo método <i>Maximum Likelihood</i> a partir das seqüências de aminoácidos de Env do CAEV.....	83
<b>Figura 19.</b> Árvore filogenética construída pelo método <i>Maximum Likelihood</i> a partir das seqüências de nucleotídeos do gene <i>env</i> do MVV.....	84

<b>Figura 20.</b> Árvore filogenética construída pelo método <i>Maximum Likelihood</i> a partir das seqüências de aminoácidos de Env do MVV.....	85
<b>Figura 21.</b> Árvore filogenética construída pelo método <i>Maximum Likelihood</i> a partir das seqüências de nucleotídeos do gene <i>gag</i> do CAEV.....	86
<b>Figura 22.</b> Árvore filogenética construída pelo método <i>Maximum Likelihood</i> a partir das seqüências de aminoácidos de Gag do CAEV.....	87
<b>Figura 23.</b> Árvore filogenética construída pelo método <i>Maximum Likelihood</i> a partir das seqüências de nucleotídeos do <i>gag</i> do MVV.....	88
<b>Figura 24.</b> Árvore filogenética construída pelo método <i>Maximum Likelihood</i> a partir das seqüências de aminoácidos da seqüência de Gag do MVV..	89
<b>Figura 25.</b> Árvore filogenética construída pelo método <i>Maximum Likelihood</i> a partir de seqüências do LTR, do MVV.....	90
<b>Figura 26.</b> Árvore filogenética construída pelo método <i>Maximum Likelihood</i> a partir de seqüências do LTR, do CAEV.....	91
<b>Figura 27.</b> Alinhamento da seqüência de nucleotídeos do fragmento de LTR das seqüências do Maedi-Visna.....	93
<b>Figura 28.</b> Alinhamento da seqüência de nucleotídeos do fragmento de LTR da amostra de CAEV.....	97

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1</b>	Denominação dos diferentes isolados inoculados nos diferentes cultivos celulares.....	56
<b>Tabela 2.</b>	Seqüência de nucleotídeos dos <i>primers</i> utilizados na reação de PCR para amplificação dos fragmentos de LTR, <i>gag</i> e <i>env</i> .....	56
<b>Tabela 3.</b>	Condições de temperatura e tempo usados nas reações de PCR para as diferentes seqüências amplificadas.....	57

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO .....</b>	<b>18</b>
<b>2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....</b>	<b>20</b>
<b>2.1 Cultivos Celulares .....</b>	<b>20</b>
2.1.1 Cultivos Primários e Secundários .....	21
2.1.2 Cultivos de Linha .....	23
2.1.3 Transformação celular pelo Vírus Símio 40 (SV40) .....	25
<b>2.2 Lentivírus de Pequenos Ruminantes .....</b>	<b>32</b>
2.2.1 Classificação e Estrutura .....	33
2.2.2 Genoma e Replicação.....	34
2.2.3 Infecção e Patogenia .....	38
2.2.4 Diagnóstico e Controle.....	41
2.2.5 Diversidade Genômica .....	43
<b>3 MATERIAL E MÉTODOS.....</b>	<b>46</b>
<b>3.1 Cultivos Celulares .....</b>	<b>46</b>
3.1.1 Cultivos Primários e Secundários .....	46
3.1.2 Cultivos Transformados .....	47
3.1.2.1 Dinâmica de crescimento .....	47
3.1.2.2 Extração do mRNA .....	48
3.1.2.3 Extração de DNA nuclear e citoplasmático .....	49
3.1.2.4 RT-PCR para Ag T .....	50
3.1.2.5 Análise de cromossomos em células mitóticas .....	51
<b>3.2 Amostras Virais.....</b>	<b>53</b>
<b>3.3 Titulação dos Estoques Virais .....</b>	<b>53</b>
<b>3.4 Inoculação dos Isolados e Passagens .....</b>	<b>54</b>
<b>3.5 Extração do DNA .....</b>	<b>55</b>
<b>3.6 Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) .....</b>	<b>56</b>
<b>3.7 Clonagem .....</b>	<b>58</b>
<b>3.8 Minipreparação dos Plasmídios.....</b>	<b>60</b>
<b>3.9 Análise das Sequências .....</b>	<b>61</b>
<b>4. RESULTADOS.....</b>	<b>63</b>
<b>4.1 Cultivo Celular Secundário.....</b>	<b>63</b>
<b>4.2 Cultivo Celular Transformado .....</b>	<b>63</b>
4.2.1 Dinâmica de Crescimento .....	65
4.2.2 Presença do mRNA do Antígeno T.....	66

4.2.3	Localização do Plasmídeo pSV1 .....	67
4.2.4	Análise de Cromossomos em Células Mitóticas .....	68
4.3	<b>Reação da Polimerase em Cadeia para os Genes gag e env e LTR .....</b>	<b>70</b>
4.4	<b>Clonagem, Seqüenciamento e Alinhamento para Obtenção das Sequências</b>	
	<b>Consenso .....</b>	<b>72</b>
4.5	<b>Análise Filogenética .....</b>	<b>81</b>
4.5.1	Gene <i>env</i> .....	81
4.5.2	Gene <i>gag</i> .....	86
4.5.3	LTR (Long Terminal Repeats) .....	90
5.	<b>DISCUSSÃO .....</b>	<b>99</b>
6	<b>CONCLUSÕES .....</b>	<b>107</b>
7	<b>PERSPECTIVAS .....</b>	<b>109</b>
	<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>	<b>110</b>
	<b>ARTIGO SUBMETIDO A PUBLICAÇÃO .....</b>	<b>121</b>
	<b>ANEXO 1 .....</b>	<b>140</b>
	<b>ANEXO 2 .....</b>	<b>142</b>
	<b>ANEXO 3 .....</b>	<b>143</b>
	<b>ANEXO 4 .....</b>	<b>144</b>
	<b>ANEXO 5 .....</b>	<b>146</b>

## 1. INTRODUÇÃO

O isolamento de agentes virais em sistemas de cultivo celular é amplamente utilizado em laboratórios de pesquisa e diagnóstico. Este procedimento serve, não só para a identificação do agente, como também para produção de antígenos, utilizados em testes diagnósticos e vacinas. Os tipos de cultivo celulares mais utilizados são os cultivos primários, os secundários e os de linhagem (ou imortalizados).

Células de diferentes origens têm sido imortalizadas através da transfecção de cultivos primários ou secundários com o Ag T do vírus símio 40 (SV40) (Montano *et al.*, 1990; Teixeira *et al.*, 1997). A transformação de células *in vitro*, através de vírus indutores de tumor, pode causar uma completa alteração no fenótipo celular, observada por alterações na morfologia e capacidade de crescimento celular. A transformação pode ser parcial, isto é, utilizando-se um vetor de expressão com parte do oncogene viral.

Estas alterações poderiam levar à seleção de determinadas populações virais, a partir de isolados de campo. Assim, após inoculação em cultivos celulares transformados, estes isolados tenderiam a divergir da população original, o que dificultaria uma análise precisa das amostras originais.

Este fato adquire especial importância quando se levam em conta vírus com altas taxas de mutação, como é o caso dos lentivírus: os vírus da imunodeficiência humana

(HIV), felina (FIV), bovina (BIV) e símia (SIV), da artrite-encefalite caprina (CAEV), da anemia infecciosa eqüina (EIAV) e Maedi-Visna dos ovinos (MVV).

O objetivo deste trabalho foi verificar a permissividade de células de membrana sinovial ovina transformadas pelo Ag T do SV40, ao CAEV e MVV; avaliar o uso das células transformadas através do Ag T como método para isolamento e seqüenciamento de amostras do CAEV e MVV; e contribuir no estudo da variabilidade de agentes virais de importância econômica na área animal, também indicados como modelos na área humana.

## **2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA**

### **2.1 Cultivos Celulares**

A cultura de tecidos foi criada no início do século passado como um método para estudar o comportamento das células animais, livres de variações do organismo. Nestes sistemas, eram usados fragmentos de tecido sem a individualização das células. Somente após 40 anos, iniciou-se a utilização de cultivos celulares com células dispersas (Freshney, 1994).

O sistema de cultivo de células tem sido utilizado no diagnóstico de agentes virais, na produção de reagentes para diagnóstico, na avaliação da atividade de substâncias antivirais e na produção de vacinas, entre outros (WHO, 1998; Storch, 2000; Korke *et al.*, 2002). Embora muitos métodos imunológicos e moleculares para uma rápida detecção de antígenos e genomas estejam disponíveis, na investigação de novos agentes virais o isolamento viral permanecem sendo o padrão ouro, podendo ser realizado em cultivos celulares, embriões de galinha e ,menos freqüentemente, em animais vivos (Murphy *et al.* 1999; Ferrari *et al.*, 2003). Além disto, vários autores têm utilizado cultivos celulares abordando aspectos como a influência do número de passagens sobre o título viral; susceptibilidade de diferentes tipos de células ao processo de immortalização; ou mesmo o uso de cultivos celulares como método confirmatório no

diagnóstico viral (Chebloune *et al.*, 1996; Craig *et al.*, 1997; Lerondelle *et al.*, 1999; Jensen & Norrild, 2000; Mselli-Lakhal *et al.*, 2001; Ferris *et al.*, 2002; Walen, 2002; Yamada *et al.*, 2002; Zheng & Zhao, 2002; Ferrari *et al.*, 2003).

Os principais tipos de cultivos celulares utilizados são: cultivos primários, obtidos a partir de tecidos frescos de animais mortos; cultivos secundários ou diplóides, que são gerados a partir dos cultivos primários através da dispersão das células deste e redistribuição em novos cultivos; e os cultivos de células de linha ou imortalizadas obtidas a partir de tecidos oncogênicos ou transformados com vetores que causem a perda da capacidade de regulação do ciclo celular (Freshney, 1994; McIntosh, 1996).

### **2.1.1 Cultivos Primários e Secundários**

Os cultivos primários são obtidos diretamente de tecidos animais e a dispersão inicial das células pode ser realizada através de dissociação enzimática ou simplesmente por desprendimento celular do tecido para o frasco de cultivo (explantação). O termo passagem é utilizado para definir cada evento de dispersão ao qual as células são submetidas.

As células dos cultivos primários sofrem poucas divisões e tendem a manter muitas das características que possuíam no órgão de origem. Cultivos primários que ainda não tenham sofrido passagens têm uma grande susceptibilidade para isolamento viral, principalmente quando o vírus infecta a mesma espécie que deu origem ao cultivo celular. Entretanto, cultivos primários apresentam uma série de desvantagens, como: contaminação com outros vírus; alto custo para freqüente manutenção destes cultivos, uma vez que é necessária a constante obtenção de tecido animal; e a impossibilidade de padronização do cultivo, principalmente pela variação individual de cada animal que

deu origem ao mesmo (WHO, 1998; Balin *et al.*, 2002; Ferris *et al.*, 2002; Ferrari *et al.*, 2003).

Os cultivos secundários são obtidos a partir da dispersão dos cultivos primários e redistribuição das células em novos frascos de cultivo. Estes cultivos podem ser utilizados por várias passagens, mas apresentam uma capacidade limitada de divisões celulares e, após um determinado número de divisões, as células entram em um processo conhecido como senescência ou envelhecimento. Este processo, *in vitro*, é a perda da capacidade mitótica após um determinado número de passagens, e está relacionado, principalmente, à origem da célula utilizada (Hayflick e Moorehead, 1961; Hayflick, 1965; Balin *et al.*, 2002; Ferrari *et al.*, 2003).

Em uma célula normal, os processos de crescimento e divisão são controlados por uma série de eventos conhecidos como ciclo celular. Este ciclo pode ser dividido, de maneira geral, em quatro fases distintas. Fase G1 (*gap* ou intervalo 1) em que a atividade celular está praticamente em repouso aguardando sinais celulares para iniciar o processo de divisão. Fase S (síntese) que é desencadeada na fase G1 através de uma série de fatores e sinais mitogênicos. É nesta fase que ocorre o início da síntese do DNA celular. A fase G2 (*gap* ou intervalo 2) fornece um intervalo extra para que ocorra o término da síntese do DNA antes da célula entrar em mitose. E na última fase, que é a mitose ou fase M, ocorrem várias alterações no interior do núcleo até que este possa sofrer o processo de divisão nuclear, que culmina com a divisão celular propriamente dita. A fase M é subdividida em: prófase, pró-metáfase, metáfase, anáfase, telófase e citocinese. A mudança da fase G1 para fase S é a mais crítica durante o processo, sendo que existem uma série de pontos de controle e mecanismos que previnem a entrada na fase S se houver qualquer dano genético. Qualquer mudança, em alguma das fases do ciclo celular, pode levar a célula a sofrer alterações como morte celular, parada no ciclo

celular e entrada em senescência. Ou mesmo transformações, que levem a célula a multiplicar-se descontroladamente (Alberts *et al.*, 1997; Strauss & Constanzi-Straus; 1999).

### 2.1.2 Cultivos de Linha

Enquanto uma célula diplóide normal, que não sofreu processo de transformação, tem uma capacidade limitada de se dividir, tanto *in vivo* quanto *in vitro*, uma célula que tenha sido transformada espontânea, física, química ou biologicamente consegue escapar dos mecanismos regulatórios que limitam o crescimento e tem uma tendência a se dividir indefinidamente (Gonos *et al.*, 1998; Lubiniecki & Petricciani, 2001). Porém, estas células tornam-se indiferenciadas, isto é, perdem uma parte da morfologia especializada e habilidade bioquímica que possuíam *in vivo*. Morfológicamente podem ocorrer modificações no citoesqueleto, superfície celular e matriz extracelular. Estas alterações morfológicas, juntamente com alterações na capacidade de crescimento, estão relacionadas entre si. Mas nem todas são observadas ao mesmo tempo, em diferentes células transformadas (McIntosh, 1996; Freshney, 1994).

Células de linhagem podem ser usadas para isolamento viral, multiplicação viral para produção de antígenos usados em diagnóstico, além de estudos de tumores *in vitro* e produção de proteínas recombinantes. Os cultivos imortalizados apresentam vantagens, como a possibilidade de formação de um banco de células padronizado e bem caracterizado por um período de tempo infinito, menor exigência quanto a enriquecimento do meio de cultivo e concentração de soro no meio (Freshney, 1994; Lewis Jr *et al.*, 1999; Rhim, 2000; Korke *et al.*, 2002).

Cultivos celulares de linha apresentam um potencial de divisão ilimitado e podem crescer aderidos a uma superfície ou mesmo em suspensão. Os principais métodos biológicos para obtenção de cultivos de linha são: a) cultivo de células obtido a partir de um tecido tumoral, como as células HeLa (ATCC CCL-2) ; b) cultivos oriundos de células normais que sofreram várias passagens, *in vitro*, até o surgimento de uma nova população que apresente uma capacidade de divisão infinita, como as células VERO (*african green monkey kidney cells* – ATCC CCL-81), BHK21 (*baby hamster kidney cells* – ATCC CCL-10) e CHO (*chinese hamster ovary cells* – ATCC CCL-61); c) fusão entre células de mieloma e linfócitos B produtores de anticorpos; ou d) transformação de uma célula normal através de um vírus oncogênico como o SV40 como é o caso das células COS-1 (ATCC CRL-1650) (WHO, 1998).

A transformação de células normais utilizando-se vírus e/ou vetores que induzam uma alteração do ciclo celular, apresenta uma frequência de transformação baixa e pode ocorrer somente após contínuas passagens do cultivo celular (Shay *et al.* 1993; Rhim, 2000; Ferris *et al.*, 2002).

Wright *et al.* (1989) classificaram a transformação em dois estágios: estágio de mortalidade 1 (M1) em que fatores celulares levariam a célula ao estado de senescência; e o estágio de mortalidade 2 (M2) que levaria a célula à crise, que é o período em que ocorre um desequilíbrio entre crescimento celular e morte celular acompanhado por um decréscimo no número total de células sobreviventes. Uma vez ultrapassado o estágio M2, ocorreria o surgimento de células imortalizadas. Em uma classificação semelhante, Walen (2002) propôs a divisão do processo de transformação (T) em três fases distintas: a fase T1, que compreende a fase inicial do cultivo onde ocorrem as várias passagens a partir do cultivo primário e secundário; a fase T2, em que ocorre o aparecimento das primeiras células imortalizadas; e a fase T3 com o surgimento de células com

capacidade tumorigênica. O mesmo autor, utilizando células epiteliais transformadas com o vírus símio 40 (SV40) observou, durante a fase T1, a presença de células gigantes multinucleadas, com núcleo fragmentado, porém com tamanho homogêneo. Na fase T2, as alterações observadas foram semelhantes às da fase T1, porém mais exacerbadas, com núcleos maiores e fragmentados. Esta heterogeneidade entre os núcleos, durante a fase T2 é a principal característica na diferenciação das 2 fases.

Durante o processo de obtenção de células imortalizadas, seja por fatores físicos, químicos ou através de genes virais, devem ser consideradas interações com genes de regulação do crescimento e divisão celular, como as proteínas pRb e p53, além da ativação da enzima telomerase (Rhim, 2000). Em células transformadas, frequentemente são observadas alterações em genes que regulam a fase G1. O progresso da fase G1 depende, entre outros fatores, da proteína pRb. Quando pRb está defosforilada ocorre uma espécie de pausa na fase G1. Ao sofrer fosforilação, através de uma série de complexos quinase ciclina-dependentes (CDK), ocorre a passagem para a fase S. Em células transformadas pode ocorrer a perda de função da pRb e, desta forma, perda do controle na transição entre as fases G1 e S. Da mesma forma, a proteína repressora de tumor p53, promove uma pausa na fase G1 para que aumente o tempo do ciclo, caso haja necessidade de algum reparo no DNA. Assim, fatores que afetem a p53, levariam a um descontrole do ciclo celular (Alberts *et al*, 1997; Strauss & Constanzi-Straus, 1999; Ali & DeCaprio, 2001).

### **2.1.3** Transformação celular pelo Vírus Símio 40 (SV40)

O SV40 pertence à família *Papovaviridae* e subfamília *Polyomavirinae*. É um vírus DNA, não envelopado e com simetria icosaédrica que apresenta um capsídeo com

45 nanômetros. O genoma possui uma fita dupla, circular, com DNA supertorcido e com tamanho de 5 quilobases. Embora a formação de tumores não seja a ação primária dos poliomavírus, eles são classificados como pequenos vírus DNA indutores de tumor (Cole, 1996; Lednicky & Butel, 1999).

O genoma do SV40 apresenta-se funcionalmente dividido em três regiões, a região regulatória (não codificante), a região precoce e a região tardia. A região regulatória separa as regiões codificantes, e apresenta seqüências promotoras, *enhancers* e a origem de replicação (ORI). Estas seqüências são necessárias para o início da replicação viral, além de regularem o nível de transcrição das regiões precoce e tardia. Durante a replicação, a direção da transcrição das regiões precoce e tardia é divergente, e cada região usa a fita de DNA oposta (Cole, 1996; Lednicky & Butel, 1999).

A região precoce é a porção do genoma que é expressa assim que o vírus penetra na célula alvo e mantém sua expressão durante o processo de replicação. Esta região codifica as proteínas regulatórias virais, chamadas de antígenos T ou tumorais que no SV40 são o T maior (Ag T) e o t menor (Ag t). Estas proteínas são geradas a partir de um pré-mRNA comum que sofre *splicing* alternativo. A região tardia do genoma é expressa eficientemente somente após o início da replicação do DNA viral e codifica as três proteínas do capsídeo VP1, VP2 e VP3, também geradas por *splicing* alternativo (Cole, 1996).

Este vírus é originário do macaco Rhesus e foi descoberto em 1960 como um contaminante de vacinas contra poliomielite que haviam sido preparadas em cultivos celulares de rim de Rhesus. Estas vacinas foram distribuídas a milhões de pessoas entre 1955 e 1963 (Cole, 1996; Butel, 2000; Dimmock *et al.* 2001).

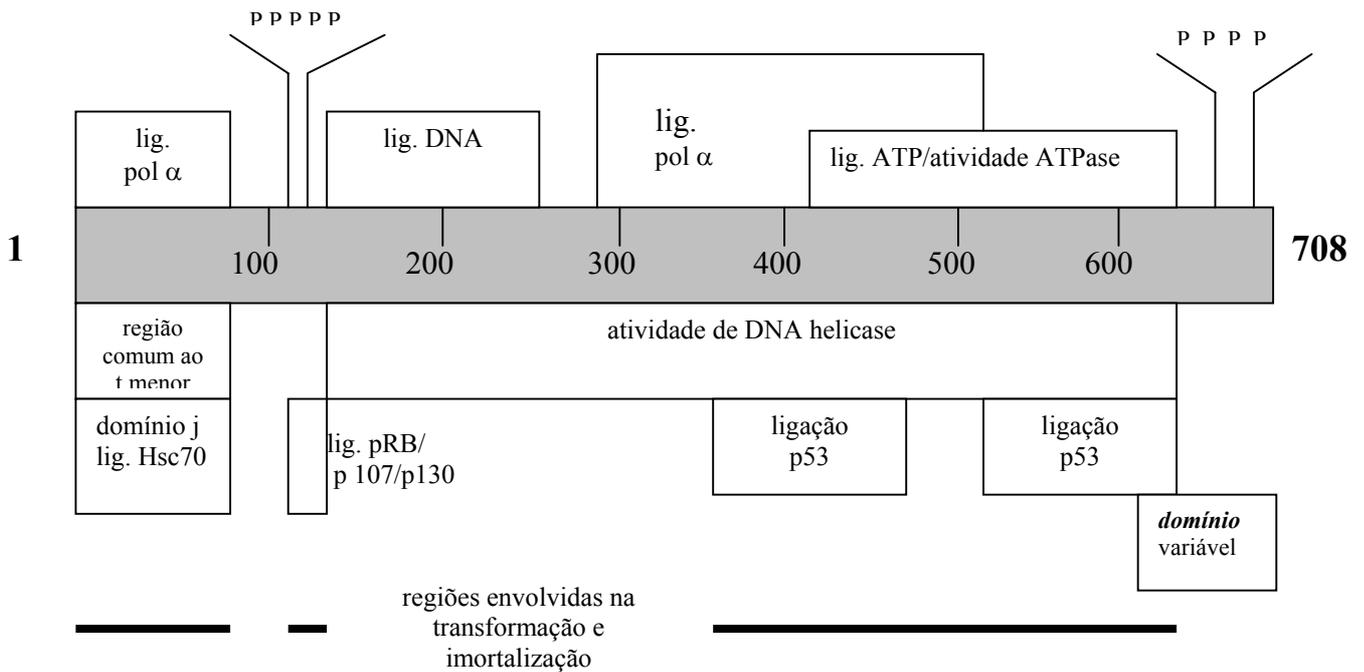
A infecção natural pelo SV40 em macacos é usualmente benigna, mas pode tornar-se patogênica em animais imunodeprimidos; podendo igualmente ocorrer

recombinação do SV40 com outros agentes virais, como o adenovírus (Kelly & Lewis, 1973; Butel & Lednicky, 1999). Além de macacos, o SV40 pode infectar outros primatas, incluindo o homem, embora pouco se saiba sobre a infecção nestes hospedeiros. É possível que ocorra o mesmo padrão observado em macacos Rhesus, ou seja, uma infecção inaparente (Newman *et al.*, 1998; Lednicky & Butel., 2001).

Durante a fase inicial da infecção, as proteínas precoces são produzidas e afetam a célula hospedeira estimulando sua entrada na fase S da divisão celular e desta forma obtendo a produção de enzimas necessárias à replicação viral. Estas proteínas também estimulam células que não estão se dividindo a entrarem novamente em divisão. Após a entrada na célula, ocorre uma contínua expressão do Ag T, com conseqüente alteração no fenótipo celular e desta forma, a célula passa a ser considerada como sendo transformada pelo vírus. Uma alteração fenotípica, característica de células transformadas, é a capacidade de proliferação em meio semi-sólido ou em baixas concentrações de soro. Para que ocorra a replicação viral, é necessário que ocorra a produção de níveis adequados do Ag T que vai interagir com fatores de transcrição celulares e também com a origem de replicação viral (Cole, 1996).

O antígeno T maior é uma potente oncoproteína com 708 aminoácidos capaz de transformar uma grande variedade de tipos celulares e induzir a formação de tumor em uma variedade de modelos animais (Ali & De Caprio, 2001) (Figura 1).

O Ag T é uma proteína multifuncional complexa que apresenta múltiplas atividades enzimáticas, interagindo com várias proteínas celulares e desempenhando diversas funções durante a infecção. Esta proteína é modificada de várias formas após a tradução, podendo sofrer acetilação, adenilação e fosforilação. Entre estas modificações, a fosforilação parece ser a mais importante no controle das atividades e funções da proteína (Cole, 1996).



**Figura 1.** Representação esquemática da região funcional do Ag T. Estão representados as regiões para ligação da polimerase  $\alpha$ , do DNA da origem de replicação, da Hsc70, das proteínas pRB/p107/p130 e da p53. Igualmente estão representadas as regiões com atividade DNA helicase e ATPase, a região comum aos Ags T e t, o domínio J e o domínio variável. As projeções com as letras P representam os sítios de fosforilação. Abaixo, as barras representam as regiões envolvidas nos processos de transformação e imortalização celular (adaptado de Butel & Lednicky, 1999).

Os principais alvos do Ag T são as proteínas da família retinoblastoma pRB (e as proteínas relacionadas p107 e p130/pRB2), a proteína supressora de tumor p53, e os co-ativadores transcricionais p300 e CBP. A proteína pRB e suas proteínas relacionadas, p107 e p130, são críticas para manutenção de um fino controle do ciclo celular, controlando os processos de proliferação, diferenciação e apoptose. As proteínas p300 e CBP interagem com vários fatores celulares como p53, mdm2 e NF- $\kappa$ B.

A região do Ag T responsável pela transformação celular apresenta-se dividida em três domínios. O primeiro domínio, que apresenta a região bi-partida carboxi terminal, está localizado entre os aminoácidos 351-450 e 533-626, e se liga a proteína

p53. Esta região parece estar relacionada também com a associação entre o Ag T e as proteínas CBP, p300 e p400. O segundo domínio compreende o motivo LxCxE, entre os aminoácidos 103 e 107 e se liga às proteínas pRB, p107 e p130. O terceiro é o domínio J, na região N-terminal entre os resíduos 1-82, o qual apresenta homologia com a família de chaperonas DnaJ e liga-se a hsc70 (uma homóloga da proteína de choque térmico hsp70). O domínio J do Ag T é idêntico ao do Ag t.

A capacidade de transformação do Ag T está relacionada à inativação funcional das proteínas supressoras de tumor pRB/p107/p130 e p53. O Ag T apresenta também atividades de ATPase e DNA helicase, bem como uma atividade de ligação a DNA. Esta ligação ao DNA parece agir como um transativador, possivelmente aumentando a transcrição de alguns genes celulares (Sladek *et al.*, 2000; Ali & De Caprio, 2001).

Em um estudo sobre a ação do Ag T na imortalização de fibroblastos de embrião de rato, Powel *et al.* (1999) observaram que várias atividades do antígeno T são necessárias para diferentes níveis de obtenção de células imortalizadas; que uma atividade dependente da região N-terminal é necessária para transformação de fibroblasto de embrião de rato, mas não é necessária para manutenção da imortalidade; que mutações pontuais dentro da região carboxi terminal perturbam as funções da região amino terminal; e que funções necessárias para manter o crescimento celular podem ser ativadas em *trans* através de moléculas de Ag T. Mostraram também que tanto a região N-terminal quanto a C-terminal do Ag T são necessárias para transformação e manutenção do crescimento celular.

O antígeno t menor (Ag t) é uma proteína com somente 174 aminoácidos e destes, 82 são semelhantes a porção N-terminal do Ag T maior. O antígeno t menor sozinho não tem capacidade de causar transformação celular, mas pode potencializar a capacidade de transformação do T maior agindo no controle do ciclo celular (Ali & De

Caprio, 2001). Em uma tentativa de imortalização de fibroblastos de embrião de rato, a capacidade de imortalização do Ag t foi similar à observada nas células do grupo controle (Powel *et al.*, 1999).

Estudos demonstram que o Ag t menor é importante na ativação do ciclo celular durante o período inicial de transformação celular, aumentando a atividade de transformação do Ag T. Montano *et al* (1990) demonstraram que o domínio N-terminal presente no Ag T maior é necessário para transformação celular e que o Ag t menor pode suprir em *trans* a ausência desta região no Ag T.

Duas atividades bioquímicas específicas têm sido descritas para o Ag t, a interação e inibição da PP2A e a transativação (ou transrepressão) de promotores virais e celulares. Com a inibição da PP2A, várias quinases celulares tornam-se mais fosforiladas e apresentam um aumento de atividade na presença do Ag t (Rundell & Parakati, 2001).

O Ag T possui atividade capaz de transativar vários promotores virais e celulares (Wildeman, 1989). Feuchter & Mager (1992) observaram a ativação da transcrição de LTRs de retrovírus endógenos humanos pelo Ag T e esta ativação pode ocorrer em *trans*.

A interação entre antígenos T e proteínas celulares, desempenham um papel importante na habilidade do T em transformar células, sendo utilizados na transformação de vários tipos de cultivos celulares, incluindo os de origem humana (Stanbridge, 1990; Butel *et al.*, 1999). Shay *et al.* (1993) transformaram células fibroblásticas e epiteliais humanas, utilizando um plasmídeo que codificava para os antígenos T e t, e analisaram a frequência de imortalização nas células transfectadas. Observaram nas células de origem fibroblástica, que a frequência de imortalização variou de  $1,5$  a  $4,5 \times 10^{-7}$ , e nas de origem epitelial de  $1,3$  a  $8,0 \times 10^{-6}$ .

Teixeira et al. (1997) imortalizaram células de fibroblasto de embrião caprino utilizando um plasmídeo que codificava para a seqüência do Ag T do SV40 e verificaram, através de imunocitoquímica, que havia expressão deste antígeno nas linhagens obtidas. Células de plexo coróide murino transfectadas com um plasmídeo que expressava os antígenos T maior e t menor do SV40, foram imortalizadas e caracterizadas por Zheng & Zhao (2002). Ferris *et al.* (2002) também imortalizaram células de tireóide e rim bovinos, e rim suíno, utilizando um plasmídeo que apresentava somente a seqüência do Ag T. Da mesma forma, Weingartl *et al.* (2002), estabeleceram uma linhagem a partir de macrófagos alveolares de suíno.

Porrás *et al.* (1999), utilizando células de fibroblasto humano, observaram que somente as células transfectadas com o Ag T maior e o Ag t menor conseguiram avançar no ciclo celular para os estágios S e G2/M, indicando que as duas proteínas (Ags T e t) agem sinergisticamente.

Devido aos primeiros estudos realizados em roedores, acreditava-se que o DNA viral, quando associado a tumores, estava integrado ao genoma do hospedeiro. Entretanto, o DNA de poliomavírus, sob forma epissomal, tem sido detectado em vários tipos de tumores e cultivos celulares transformados. Embora estudos feitos não comparem cuidadosamente a freqüência de DNA na forma epissomal *versus* integrada, muitas observações indicam que cópias na forma epissomal persistem em tumores e células transformadas pelos poliomavírus (Butel & Lednicky, 1999; Huang *et al.*, 1999; Lednicky & Butel, 1999).

Células de um glioblastoma humano, persistentemente infectadas com SV40, apresentaram um fenótipo alterado e carregavam o DNA viral, não defectivo, na forma epissomal (Norkin *et al.*, 1985). Estes vírus tem como alvo células já diferenciadas que se encontram em estado de quiescência. Como estas células não apresentam os fatores

necessários para a replicação viral, os poliomavírus induzem as células a ativarem novamente os processos de divisão celular. (Cole, 1996; Alberts *et al.*, 1997)

## 2.2 Lentivírus de Pequenos Ruminantes

Os lentivírus de pequenos ruminantes (*small ruminant lentiviruses* - SRLV), CAEV e MVV, são estreitamente relacionados biológica, fenotípica e antígenicamente.

Causam uma infecção persistente com longo período de incubação, produzindo doenças crônicas de evolução lenta nos animais infectados (Tavares & Pereira, 1999).

Os SRLVs estão amplamente distribuídos pelo mundo. Relatos de animais infectados pelo CAEV já foram feitos em vários países como: Nigéria (Belino & Ezeifeke, 1984), Austrália (Greenwood *et al.*, 1995), França (Perrin & Polak, 1987), Espanha (Gonzales *et al.*, 1987), EUA (East *et al.*, 1987) e México (Daltabuist Test *et al.*, 1999).

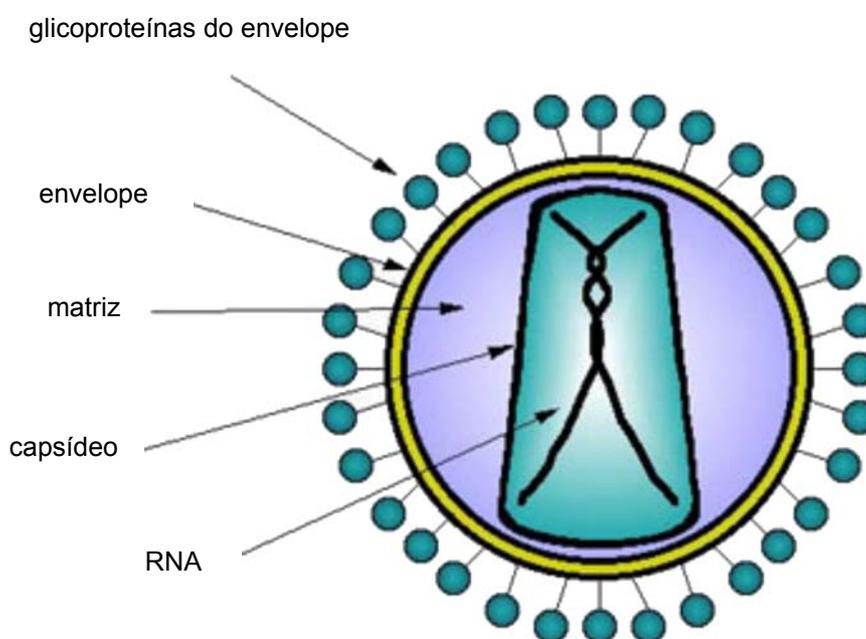
No Brasil, o primeiro relato de caprinos infectados foi feito por Moojen *et al.* (1986) através da detecção de anticorpos pela técnica de ágar-gel imunodifusão. Ravazzolo *et al.* (1988) detectaram anticorpos contra CAEV em caprinos de seis dos dez municípios do Rio Grande do Sul analisados e Hotzel *et al.* (1993) fizeram o primeiro isolamento de CAEV no Brasil, no Estado do Rio Grande do Sul, a partir de um animal naturalmente infectado. A presença de animais positivos já foi detectada igualmente em outros estados brasileiros como: Rio de Janeiro (Cunha & Nascimento, 1995), Pernambuco (Castro *et al.*, 1994; Saraiva Neto *et al.*, 1995), Minas Gerais (Dezan, 1996), Bahia (Fitterman, 1988), Ceará (Melo & Franke, 1997) e São Paulo (Garcia *et al.*, 1992).

A presença do vírus Maedi-Visna já foi descrita em diversos países como:

Islândia (Sigurdardottir & Thomar, 1964), EUA (Cutlip *et al.*, 1977), Canadá (Lamontagne *et al.*, 1983), Inglaterra (Pritchard *et al.*, 1984), França (Devillechaise, 1992) e Portugal (Fevereiro *et al.*, 1995).

No Brasil, ovinos infectados foram relatados por Dal Pizzol *et al.* (1989) e o primeiro isolamento foi realizado por Moojen *et al.* (1996) a partir de explantes de membrana sinovial e plexo coróide de um ovino sem sinais clínicos e negativo sorologicamente pelo teste de ágar gel imunodifusão para MVV.

### 2.2.1 Classificação e Estrutura



**Figura 2.** Representação esquemática da estrutura de um retrovírus.

O CAEV e MVV são lentivírus pertencentes à família *Retroviridae*. Apresentam ácido nucléico composto de duas fitas de RNA idênticas e não complementares, com

polaridade positiva, são envelopados e têm simetria icosaédrica (Coffin, 1996). O virion é esférico e tem aproximadamente 100 nm. A parte central do vírus é composta pelo complexo genoma e núcleo-proteína (NC) associados à transcriptase reversa. Esta estrutura é empacotada por uma capsídeo icosaédrico envolto pelo envelope (Figura 2) que é adquirido durante o brotamento através da membrana plasmática da célula infectada (Pépin *et al.* 1998).

Os SRLVs, assim como os vírus das imunodeficiências humana (HIV), felina (FIV), bovina (BIV) e símia (SIV) e o vírus da anemia infecciosa eqüina (EIAV), apresentam um genoma de aproximadamente 10 quilobases.

### 2.2.2 Genoma e Replicação

O genoma proviral dos lentivírus apresenta os genes *gag* (*group-specific antigen*), *pol* (*polymerase*) e *env* (*envelope*) que codificam para as proteínas estruturais e é flanqueado nas extremidades 5' e 3' pelos LTR (*Long Terminal Repeats*), que são regiões não traduzidas e possuem toda a informação necessária para transcrição, integração e poliadenilação do RNA viral (Figura 3). Além dos genes que codificam as proteínas estruturais, encontram-se presentes seqüências reguladoras - *tat* e *rev* - e seqüências acessórias como *vif*, *nef*, *vpr* e *vpu* (Tavares & Pereira, 1999). Nos SRLVs, somente as seqüências codificadoras das proteínas regulatórias Tat, Rev e Vif foram identificadas

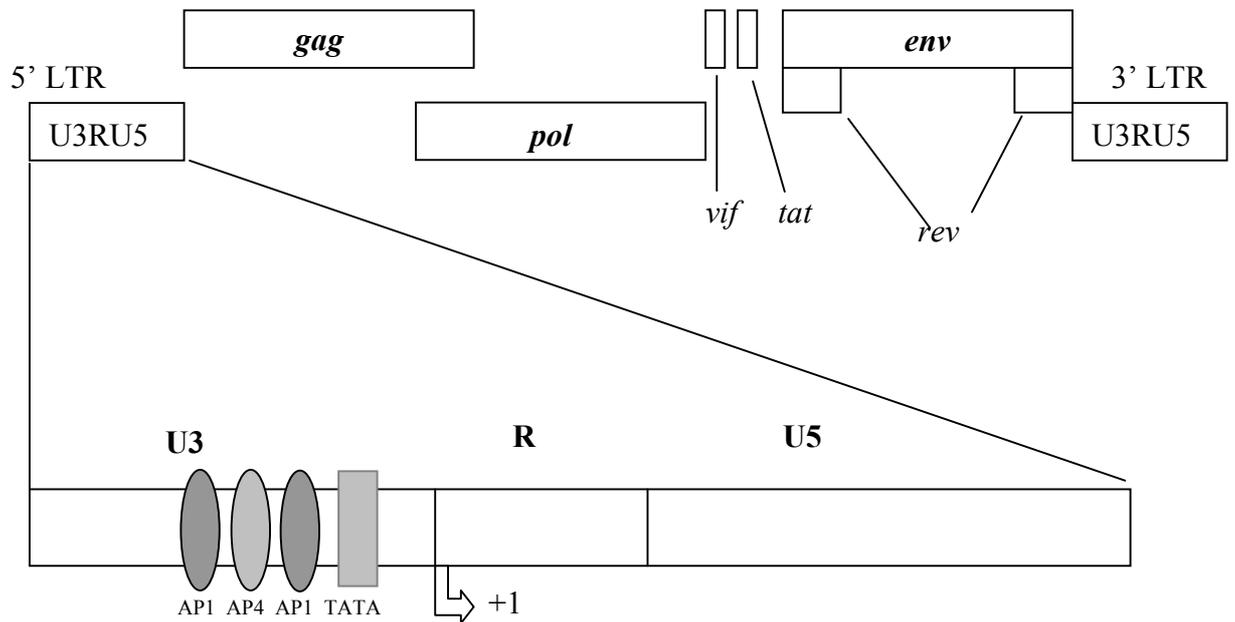
O gene *gag* é traduzido em uma poliproteína precursora Pr55<sup>gag</sup> que, após clivagem pela protease viral dá origem as proteínas do capsídeo (CA ou p28), do nucleocapsídeo (NC ou p14) e da matriz (M ou p17). A proteína do capsídeo é a mais abundante e forma o núcleo hidrofóbico no virion. Está relacionada com uma forte

resposta imune humoral durante a infecção e, desta forma, é uma proteína importante na produção de testes diagnósticos (Joag *et al*, 1996; Pépin *et al*, 1998). A proteína do NC aparece firmemente associada ao genoma viral. Dentro do vírus, a proteína da matriz está localizada entre o envelope viral e o capsídeo (Figura 2), sendo a responsável pela associação da proteína Pr55<sup>gag</sup> com a membrana celular durante a replicação.

O gene *env* codifica para a glicoproteína do envelope. Esta glicoproteína é sintetizada como uma precursora (gp160) que é clivada em duas subunidades: a glicoproteína de superfície (SU-gp135) e a glicoproteína transmembrana (TM-gp 44). A parte do envelope viral correspondente a TM fica ancorada à bicamada lipídica que compõe o envelope, e a glicoproteína de superfície fica ligada à TM de forma não covalente. As glicoproteínas do envelope dos lentivírus possuem funções biológicas importantes e apresentam epitopos responsáveis, tanto pela indução de anticorpos neutralizantes como também pela interação entre o vírus e a célula alvo (Luciw, 1996; Joag *et al*, 1996; Pépin *et al*, 1998).

O gene *pol* codifica para as enzimas transcriptase reversa (RT), protease (PR), integrase (IN) e dUTPase. A transcriptase reversa, que deu origem à denominação dos retrovírus, apresenta-se associada ao RNA viral no virion. É uma DNA polimerase dependente de RNA, responsável pela transcrição do RNA viral em DNA proviral. É um heterodímero que apresenta igualmente atividade RNaseH. A protease cliva as poliproteínas precursoras Gag e Gag-Pol. A integrase, da mesma forma que a RT, apresenta várias moléculas associadas ao genoma viral. Após a transcrição reversa o provírus migra até o núcleo da célula e a integrase promove a integração da dupla fita de DNA do provírus ao DNA da célula hospedeira. A enzima dUTPase foi identificada somente em alguns lentivírus, entre eles o CAEV e o MVV. Esta enzima parece estar relacionada com uma diminuição na frequência de mutações do tipo G para A (Joag *et*

*al.*, 1996; Pereira & Tavares, 1999).



**Figura 3.** Representação esquemática do genoma dos SRLV. Em destaque a região LTR e sítios fixadores de fatores de transcrição celulares e sítio de início da transcrição (+1).

Os genes auxiliares presentes nos SRLVs são os genes *tat* (*transcriptional transactivator*), *vif* (*viral infectivity factor*) e *rev* (*regulator of virion protein expression*). O gene *tat* codifica para a proteína Tat que está relacionada ao acúmulo de mRNA viral via sítios AP-1 e AP-4 presentes na região U3 da LTR ou via fatores celulares como c-Fos e c-Jun. Harmache *et al.* (1995), estudando um CAEV com deleção de *tat*, demonstraram que este gene não é essencial para a replicação viral. Entretanto, a proteína Tat pode contribuir para a interação entre o vírus e a célula hospedeira, seja pelo recrutamento ou pela modulação de fatores celulares envolvidos no início da transcrição. O gene *vif* codifica para uma proteína de 29 kDa e sua atividade parece estar relacionada à fase tardia da replicação viral. O produto do gene

*rev* é uma proteína de 19 kDa e sua ação está relacionada ao transporte do núcleo para o citoplasma do mRNA viral que não sofreu *splicing* (Pépin *et al.*, 1998). Estudos demonstram que a proteína Rev é essencial para uma eficiente replicação do vírus (Malim, *et al.*, 1989).

O LTR dos retrovírus é proveniente da fusão das seqüências 5' e 3' terminais do RNA viral durante a transcrição reversa. É dividido em três regiões funcionalmente distintas designadas U3, R e U5. A região promotora U3 apresenta três domínios: o promotor central; o *enhancer* e o domínio modulatório. O promotor central contém sítios de ligação para fatores celulares, incluindo a proteína que se liga ao TATAA box (TBP - TATA *binding protein*) e a proteína SP-1. O *enhancer*, no HIV-1, consiste em uma duplicação no sítio de ligação para o fator celular NFκB, este fator controla a transcrição de vários genes celulares como a cadeia leve κ de imunoglobulinas, MHC de classes I e II, interleucina 2, β-interferon e fator de necrose tumoral α (TNF-α). O domínio modulatório contém sítios de ligação para vários fatores celulares incluindo AP-1, AP-4, USF-1, Ets-1 e LEF. A região R, na extremidade 5', apresenta o nucleotídeo +1 onde ocorre o início da transcrição viral. Na extremidade 3', entre R e U5, está o limite final para todos os transcritos, definido pelo sinal de poliadenilação em R. A região U5 é a primeira a ser copiada durante a transcrição reversa e na extremidade 3' apresenta um dos sinais necessários para a integração viral no genoma do hospedeiro (Saltarelli *et al.*, 1990; Andrésson *et al.*, 1993; Sargan *et al.*, 1995; Luciw, 1996, Andrésdóttir *et al.*, 1998; Pereira *et al.*, 2000).

O ciclo de replicação dos lentivírus é dividido em duas fases: uma precoce (infecção) e outra tardia (expressão). A fase precoce abrange desde o reconhecimento da célula alvo pelo virion até a integração do provírus no genoma do hospedeiro. A fase tardia inicia com a expressão regulada do provírus integrado e finaliza com a maturação

e brotamento da partícula viral (Gonda, 1994; Luciw, 1996).

Na fase precoce ocorre o reconhecimento entre o vírus e os receptores e co-receptores celulares específicos na membrana celular. Após este reconhecimento, ocorre a fusão da membrana celular com o envelope viral e a liberação do material genético viral no citoplasma. Inicia-se então a transcrição reversa, a partir do RNA viral, que tem fim com a formação do provírus. O provírus migra para o núcleo, juntamente com uma série de proteínas que formam o complexo de integração. Uma vez no núcleo, o DNA viral é integrado covalentemente ao genoma da célula hospedeira através da atividade catalítica da integrase.

A fase tardia inicia com a síntese dos transcritos de mRNA, que são transportados, sob regulação da proteína Rev, para fora do núcleo a fim de sofrerem a tradução. Os produtos dos genes estruturais ligam-se à membrana celular e incorporam o RNA genômico na partícula viral. As partículas virais são liberadas da célula por brotamento através da membrana celular (Gonda, 1994; Turner & Summers, 1999).

### **2.2.3 Infecção e Patogenia**

Os SRLVs replicam primariamente em células da linhagem monócito/macrófago, portanto quaisquer secreções que apresentem células infectadas são consideradas importantes vias de transmissão.

A via de transmissão mais comum é através da ingestão de colostro ou leite de fêmeas infectadas. A prática de manejo de fazer um banco de colostro sem controle de fêmeas infectadas aumenta consideravelmente a possibilidade de transmissão do vírus para o rebanho (Oliver *et al.*, 1985; Concha-Bermejillo, 1997; Russo *et al.*, 1997). A transmissão por contato também tem sido demonstrada entre animais de idades variadas,

podendo ocorrer através de contato direto, fômites, saliva, urina, fezes ou secreções respiratórias (Phelps & Smith, 1993). A transmissão horizontal também está relacionada com a produção de animais em regime de confinamento (Concha-Bermejillo, 1997). A presença do vírus no sêmem de animais infectados foi demonstrada por Concha-Bermejillo *et al.* (1996), juntamente com *Brucella ovis*, relacionando a disseminação do vírus a lesões no aparelho genital.

A infecção experimental inter-espécies também foi demonstrada por Dickson & Ellis (1989) quando ovinos foram inoculados com CAEV. Embora não tenham apresentado nenhum sinal de infecção nem alterações patológicas, foi possível recuperar o vírus através de co-cultivo de leucócitos sangüíneos com células de membrana sinovial.

A patogenia dos SRLV está relacionada a longos períodos de incubação e os sintomas podem aparecer somente meses ou anos após a infecção. Uma vez infectados os animais não eliminam o vírus e passam a ser disseminadores para animais saudáveis, sendo portanto reservatórios do vírus durante toda a vida (Pépin *et al.*, 1998). Diferente do vírus da imunodeficiência humana, os lentivírus de pequenos ruminantes não causam imunodeficiência em seus hospedeiros (Pétursson *et al.*, 1991; Egberink & Horzinek, 1992).

O vírus Maedi Visna afeta principalmente os pulmões, causando uma pneumonia intersticial. Os termos maedi e visna são de origem islandesa e significam dispnéia e definhamento, respectivamente (Pétursson *et al.*, 1991). Animais com sintomatologia respiratória apresentam inicialmente uma respiração forçada, que vai tornando-se mais intensa levando o animal a respirar com a boca aberta após esforço físico. Os animais afetados podem ter tosse seca e pouca descarga nasal. Com a evolução da doença, ocorre uma gradual perda de peso; os animais vão ficando debilitados e não recuperam-

se, podendo ocorrer a morte no período de um ano. A forma nervosa (visna) da infecção é, geralmente uma complicação que se segue após a sintomatologia respiratória e está mais relacionada a animais adultos. Os sinais nervosos são: ataxia dos membros posteriores e incordenação. Estes sinais podem durar meses e levar à paralisia do trem posterior ou mesmo a quadriplegia. A artrite é uma complicação menos comum em ovinos infectados: os animais não conseguem andar e apresentam perda de peso (Narayan & Cork, 1985).

Em caprinos infectados pelo CAEV, a patologia mais freqüente é a artrite/sinovite, que pode desenvolver-se lentamente durante anos. Os locais mais afetados são as articulações, as bursas e os tendões, mas o alvo principal do vírus são as articulações do carpo (joelhos). A doença é normalmente observada em animais com mais de 2 anos. Os caprinos afetados apresentam perda de peso e alterações no pêlo. A apresentação da forma nervosa está relacionada principalmente a animais jovens, embora adultos também possam ser afetados. Normalmente a doença nervosa é observada em animais com menos de seis meses e os principais sinais são ataxia dos membros posteriores com gradual paralisia, embora alguns animais possam apresentar uma quadro agudo de quadriplegia. Outros sinais incluem tremores da cabeça, andar em círculos e dificuldade de sucção (Narayan & Cork, 1985; Zink *et al.* 1990)

Zink *et al.* (1990) confirmaram a relação entre idade e apresentação da doença, onde artrite ocorre em animais adultos e encefalomielite em jovens. Entretanto, utilizando técnicas mais sensíveis como PCR, hibridização e co-cultivo com células susceptíveis, Johnson *et al.* (1992) verificaram não existir diferença significativa quanto à presença do vírus em ovinos adultos ou jovens.

#### 2.2.4 Diagnóstico e Controle

O diagnóstico dos SRLVs é principalmente baseado em testes sorológicos. O mais utilizado é o ágar gel imunodifusão (AGID) (Cutlip *et al.*, 1977). O antígeno para diagnóstico sorológico por AGID é composto pelas proteínas estruturais p28 e gp135 (Dawson *et al.*, 1996). Devido à estreita relação existente entre o vírus da artrite encefalite caprina e o Maedi Visna, o teste de AGID utilizando estes dois antígenos tem sido utilizado rotineiramente para detecção de animais infectados com estes vírus (Pépin *et al.*, 1998).

O diagnóstico sorológico através de ensaio imunoenzimático (ELISA) também é utilizado, e vários testes tem sido desenvolvidos utilizando-se tanto antígenos nativos como recombinantes (Rosati *et al.*, 1995a; Knowles, 1997; Lara *et al.*, 2002).

O teste de imunofluorescência apresenta-se também como um método de diagnóstico bastante sensível e específico. Reischak *et al.* (2002) desenvolveram um teste de imunofluorescência indireta (IFA) que detectou um maior número de animais sorologicamente positivos quando comparado ao teste de AGID.

Johnson *et al.* (1992) utilizaram hibridização *in situ*, PCR e cocultivo com células susceptíveis, para detecção de MVV. Em 18 ovinos sorologicamente negativos pelo teste de ELISA, os autores obtiveram 12 animais positivos através dos testes utilizados.

O diagnóstico dos SRLVs através da reação em cadeia da polimerase (PCR) tem sido desenvolvido por vários autores, com diferentes genes alvo (Zanoni *et al.*, 1990; Reddy *et al.*, 1993; Rutkoski *et al.*, 2001). O uso da PCR tem apresentado resultados variados quanto a capacidade de detecção do vírus, mas pode ser utilizado com cautela, em situações específicas durante programas de erradicação. O uso de técnicas

moleculares, portanto, é influenciado diretamente por variações nas seqüências de nucleotídeos existentes entre diferentes isolados, e até entre os mesmos isolados após sofrerem diferentes tipos de tratamento como cultivo celular ou origem do tecido em que foi coletada a amostra (Olivares *et al.*, 1997; Pasick, 1998; van't Wout *et al.*, 1998; von Briesen *et al.*, 1999).

O isolamento viral em cultivo celular é utilizado principalmente na obtenção e caracterização de novas amostras e apresenta-se como um método altamente sensível para o isolamento dos SRLV. Diversos tipos de células têm se mostrado sensíveis à infecção pelos lentivírus, inclusive células imortalizadas através do Ag T do SV40 (Teixeira *et al.*, 1997; Lerondelle *et al.*, 1999; Mselli-Lakhal, *et al.*, 2001). Todavia, alguns autores demonstram que diferentes tipos de células podem influenciar não somente características de crescimento dos lentivírus, como também sua sensibilidade à neutralização (Peden *et al.*, 1991; Chebloune *et al.*, 1996; Craig *et al.*, 1997; Zhang *et al.*, 1997).

O controle da infecção pelos SRLVs baseia-se em cuidados na transmissão horizontal, principalmente evitando-se a ingestão de colostro e leite pelos animais recém nascidos de rebanhos infectados. Outras medidas de controle incluem: isolamento dos filhos de mães soropositivas após o nascimento, testes periódicos através de AGID ou ELISA; oferecimento de colostro inativado ou leite pasteurizado aos animais filhos de mães positivas; abate sistemático dos animais soropositivos; separação dos animais em rebanhos distintos para positivos e negativos; em animais de ordenha iniciar primeiramente com os soronegativos e depois os soropositivos, bem como animais jovens antes de animais velhos; evitar o uso de sêmen proveniente de machos infectados; adquirir somente animais comprovadamente livres do vírus; e evitar a transmissão iatrogênica (Adams *et al.*, 1983; Narayan & Cork, 1985; Dal Pizzol *et al.*,

1989; Phelps & Smith, 1993; Pépin *et al.*, 1998; Tavares & Pereira, 1999; Washburn *et al.*, 2001).

### 2.2.5 Diversidade Genômica

Para a descrição da complexidade genética dos vírus RNA, tem sido utilizado o conceito de quasispécies virais. De acordo com este conceito, quasispécies compreendem um grupo de mutantes dominados por uma seqüência mestre que pode representar a média das seqüências ou mesmo uma seqüência consenso da população existente (Domingo *et al.*, 1996). Estas seqüências mutantes constituem um reservatório de diferentes fenótipos com capacidade de escapar a pressões de seleção impostas durante a replicação viral.

A variabilidade genética é uma das características importantes dos lentivírus e está relacionada a sua patogênese, permitindo a persistência do vírus no hospedeiro, tanto pelo escape da resposta imune, como pela resistência a tratamentos anti-retrovirais (Pétursson *et al.*, 1991).

Vartanian *et al.* (1991), estudando uma região hipervariável do gene *env*, demonstraram que o HIV-1 pode sofrer seleção quando inoculado em células de linhagem MOLT-3 e U937-2. Embora os autores tenham observado o aparecimento de poucas variantes, os cultivos utilizados demonstraram exercer seleção sobre o HIV. O aparecimento destas variações pode ser suficiente para albergar seqüências capazes, por exemplo, de escapar ao sistema imune ou fugir ao tratamento com drogas antivirais.

Neste sentido, Zhang *et al.* (1997) observaram que a passagem de clones do HIV-1 em diferentes tipos de células, fazia com que as amostras adquirissem diferentes graus de sensibilidade à neutralização. von Briesen *et al.* (1999), utilizando amostras clínicas de HIV, demonstraram outrossim que o uso de diferentes cultivos primários

leva à seleção de diferentes variantes do vírus.

Em um experimento utilizando um isolado de HIV-1, Olivares *et al.* (1997), demonstraram que o vírus, após sofrer passagens sucessivas em células MT-4, apresentou uma alteração em seu fenótipo. A amostra, que inicialmente era incapaz de produzir sincícios nas células utilizadas, após 15 passagens, passou a produzir o CPE característico.

Os SRLV são estreitamente relacionados, sendo que, antígenicamente, reações cruzadas têm sido demonstradas quando são analisadas as proteínas codificadas pelos genes *gag* e *env* (Rosati *et al.*, 1999). Por esta razão, antígenos derivados de proteínas de lentivírus ovino têm sido utilizadas no desenvolvimento de testes diagnósticos para CAEV e MVV.

Zanoni (1998), comparando diversas amostras de CAEV e MVV, encontrou uma divergência de 35% em LTR, 22% em *env* e 16% em *pol* e *gag*, demonstrando um complexa relação entre diferentes SRLV. Neste trabalho, não foi possível separar os isolados ovinos e caprinos em grupos distintos.

Analisando isolados de MVV oriundos de pulmão e cérebro de diferentes animais, Andrésdóttir *et al.* (1998) encontraram divergências de 8% e 6% no gene *env* e LTR, respectivamente.

Através de um exame parcial do gene *gag*, utilizando análise de polimorfismo por tamanho de fragmento de restrição, em cinco isolados brasileiros de CAEV comparados com seis seqüências de SRLV, Marchesin *et al.* (1998) conseguiram separar estes isolados em 3 grupos conforme o perfil de bandas obtido.

Castro *et al.* (1999) comparando uma região do gene *pol* de diferentes isolados brasileiros de CAEV, das regiões de Minas Gerais e Pernambuco, encontraram uma diferença significativa entre os isolados, sugerindo a existência de quasispécies virais.

Vários estudos tentam agrupar diferentes isolados de SRLV, mas os resultados parecem muito divergentes. Rosati *et al.* (1995a) utilizando PCR, hibridização com sonda de DNA e RFLP (*restriction fragment length polymorphism*) estudaram 8 amostras Norte Americanas de lentivírus ovino e observaram que a amostra WLC-1 apresentava semelhança com a amostra Islandesa K1514. Por outro lado, utilizando as mesmas técnicas, as amostras restantes mostraram-se diferentes do protótipo Islandês.

Ravazzolo *et al.* (2001), utilizando isolados brasileiros de SRLV, realizaram um estudo filogenético no qual observaram a separação dos isolados de origem caprina do isolado de origem ovina. Os isolados caprinos agruparam-se ao isolado padrão de CAEV enquanto o isolado ovino agrupou-se às amostras protótipos MVV, tanto nas seqüências oriundas de *gag* como de *env*.

Pasick (1998), fazendo uma análise de diversos trabalhos que tentam caracterizar os SRLV e separá-los em grupos de origem caprina e/ou ovina, concluiu que CAEV e MVV podem ser vistos como pertencentes a um grupo heterogêneo ou mesmo como quasispécies virais.

Considerando-se a alta variabilidade existente entre os SRLV e as alterações sofridas pelos cultivos celulares

após sua transformação com agentes tumorais, torna-se necessário um estudo de como estas alteração podem influenciar o aparecimento de populações virais.

### **3 MATERIAL E MÉTODOS**

#### **3.1 Cultivos Celulares**

##### **3.1.1 Cultivos Primários e Secundários**

O cultivo secundário utilizado para inoculação viral foi gerado através da tripsinização de um cultivo primário obtido a partir de explantes de membrana sinovial ovina (MSO), de um animal negativo para MVV aos testes de ágar gel imunodifusão (AGID) e reação em cadeia da polimerase (PCR) (Rutkoski *et al.*, 2001). Este cultivo foi denominado MSO<sub>50</sub> (Reischak *et al.*, 2002) e estava estocado em tubo criogênico, a -196 °C, em uma solução com 80% de soro fetal bovino (SFB, NUTRICELL) e 20% de dimetilsulfóxido (DMSO, SIGMA), no Laboratório de Virologia da Faculdade de Veterinária UFRGS.

As células MSO<sub>50</sub> foram descongeladas na sétima passagem, depositadas em uma garrafa de cultivo de 25 cm<sup>2</sup> (NUNC™) e mantidas em estufa bacteriológica a 37°C, em Meio Mínimo Essencial de Eagle modificado por Dulbecco (D-MEM, SIGMA, D-1152), acrescido de 2 ou 10% de SFB para manutenção ou crescimento, respectivamente.

Durante o período de crescimento, os cultivos foram tripsinizados sempre que o tapete celular apresentava confluência completa.

### **3.1.2 Cultivos Transformados**

Foi utilizada uma linhagem celular obtida pela transformação de um cultivo secundário de MSO com o plasmídeo pSV1 (cedido por Gilles Quérat, U372, Pathogénie des Infections à Lentivirus, INSERM, Marseille, France), que apresenta a origem de replicação, os genes que codificam para os antígenos T maior e t menor do Vírus Símio 40 (SV40) inseridos no plasmídeo pBR322. A transfecção das células MSO foi realizada conforme Reischak *et al.* (2002). A linhagem celular obtida foi denominada TMSOpSV1 e armazenada a -196 °C em uma solução de 80% de SFB e 20% DMSO, no Laboratório de Virologia da FAVET/UFRGS.

Os cultivos de TMSOpSV1 foram descongelados na décima quarta passagem, depositados em uma garrafa de cultivo de 25 cm<sup>2</sup> e mantidos em estufa bacteriológica a 37 °C em D-MEM acrescido de 2% de SFB para manutenção ou 10% para crescimento das células.

Durante o período de crescimento, os cultivos foram tripsinizados sempre que o tapete celular apresentava confluência completa.

#### **3.1.2.1 Dinâmica de crescimento**

Foram preparadas placas de 06 poços, uma para cada tipo celular (MSO<sub>50</sub> e TMSOpSV1), com uma concentração de  $1,5 \times 10^5$  cél/poço e as células foram mantidas em MEM com 10% de SFB. A contagem das células foi feita em duplicata após 24, 48 e

72 horas de cultivo. Para cada contagem, o MEM era retirado do poço e fazia-se duas lavagens para retirada das células mortas, a primeira com um mL de MEM e a segunda com um mL de tripsina versene. A seguir era colocado um mL de tripsina para liberação das células e feita a pipetagem para individualização das mesmas. Após a individualização, foi acrescentado mais um mL de MEM com 10% de SFB para inativação da tripsina, e uma alíquota da suspensão celular foi utilizada para contagem pelo método de exclusão das células mortas com azul de tripan. Foram feitas 5 repetições para cada tipo celular e, a partir do resultado obtido na contagem, foi feita a média do número de células obtidas nos diferentes tempos.

#### **3.1.2.2 Extração do mRNA**

Células TMSOpSV1 foram tripsinizadas, transferidas para um tubo cônico de 50 mL e centrifugadas a 800 g por 5 min. Após a centrifugação, o sobrenadante foi desprezado e o tubo mantido em gelo até a adição do TRIzol (GIBCO-BRL). Foi adicionado 0,75 mL de TRIzol para  $5-10 \times 10^6$  células e feita a lise celular através de pipetagens repetidas até a homogeneização completa. O homogeneizado foi transferido para um tubo de 1,5 mL, incubado por 5 min à temperatura ambiente. A seguir foi adicionado 0,2 mL de clorofórmio e o tubo foi agitado vigorosamente durante 15 seg e incubado por 10 min a temperatura ambiente. A amostra foi centrifugada a 12000 g por 15 min e a fase aquosa (contendo RNA) foi recuperada e transferida para um novo tubo. O RNA foi então precipitado adicionando-se 0,5 mL de álcool isopropílico e a amostra incubada por 10 min à temperatura ambiente e novamente centrifugada a 12000 g por 10 min. O sobrenadante foi desprezado e o pelete de RNA lavado com um mL de etanol

a 75% e centrifugado. O sobrenadante desprezado novamente e o pelete seco ao ar por 10 min e então dissolvido em 250  $\mu$ L de água livre de RNase.

Após a extração do RNA total, foi utilizado o kit PolyAtract<sup>®</sup> mRNA Isolation Systems (Promega) para isolamento de RNA mensageiro (mRNA), e o protocolo utilizado seguiu rigorosamente as recomendações do fabricante (Anexo 1). Para a reação de transcrição reversa foram utilizados 5  $\mu$ L da solução contendo o mRNA. O material restante foi armazenado à  $-196$  °C.

Todo o material utilizado na extração de RNA era livre de RNase.

Os mesmos procedimentos de extração de RNA e isolamento de mRNA foram utilizados nas células MSO e COS-1. As células COS-1 foram escolhidas como controle positivo, pois foram transformadas com um mutante do SV40, sem a origem de replicação do vírus, e apresentam a expressão do antígeno T.

### **3.1.2.3** Extração de DNA nuclear e citoplasmático

A fim de tentar estabelecer a localização do DNA do plasmídeo pSV1, foi realizada a extração do DNA citoplasmático e nuclear da célula TMSOpSV1.

Para extração do DNA citoplasmático foi utilizada uma adaptação do protocolo descrito por Single *et al.* (1998). Para a lise, foi adicionado a um tubo cônico de 1,5 mL, contendo  $4 \times 10^6$  células, um mL do tampão composto de 75 mM de NaCl, 1 mM  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ , 8 mM  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ , 250 mM sacarose e digitonina 35  $\mu\text{g}/\text{mL}$ . As células foram submetidas ao vortex e, após 30 seg, foram centrifugadas a 10000 x g por 60 seg e depositadas em banho de gelo. O sobrenadante, contendo o DNA citoplasmático, foi recuperado, transferido para um novo tubo e uma alíquota de 5  $\mu$ L foi retirada para a PCR, o restante foi armazenado a  $-20$  °C. O tubo contendo os restos celulares e

núcleos foi utilizado para extração do DNA nuclear utilizando-se DNAzol (GIBCO-BRL). Após a extração do DNA nuclear, uma alíquota de 5 µL foi utilizada para a PCR.

#### 3.1.2.4 RT-PCR para Ag T

A confirmação da expressão do Ag T nas células transformadas, foi realizada através da técnica de transcrição reversa do RNA, seguida pela reação em cadeia da polimerase (RT-PCR). A RT-PCR foi realizada para os três tipos celulares (TMSOpSV1, MSO e COS-1).

Os *primers* utilizados para RT-PCR do Ag T haviam sido descritos por Bergsagel *et al.*, (1992), e foram: *primer* senso S<sub>for3</sub> 5' TGAGGCTACTGCTGACTC TCAACA 3' e *primer* reverso SV<sub>rev</sub> 5' GCATGACTCAAAAAA CTTAGCAAT TCTG 3'.

Como controle das extrações de DNA e mRNA foram utilizados *primers* para detecção do produto do gene constitutivo GAPDH (gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase). Neste caso, foram utilizados o *primer* senso GAPDH<sub>for</sub> 5' GGC AAGTTCCATGGCACAGT 3' e *primer* reverso GAPDH<sub>rt</sub> 5' GTCCCTCCAC GATGCCAAAG 3'.

Para a transcrição reversa, a um tubo de 0,2 mL contendo 5 µL do mRNA, foi acrescentado 130 ng do *primer* reverso e 4,7 µL de água livre de RNase, e a mistura foi incubada a 70 °C por 5 min e depois mantida a 4 °C. Aos mesmos tubos, foram adicionados 4 µL de solução tampão contendo Tris-HCl (pH 8,3) 50 mM, KCl 75 mM, MgCl<sub>2</sub> 3 mM, 2 µL de ditioneitol (DTT) 10 mM, 10 mM de dNTP e 35 UI de inibidor de ribonuclease (RNAguard – GIBCO-BRL). Aos tubos ímpares de cada amostra foram adicionados 100 UI da enzima Transcriptase Reversa M-MuLV ( GIBCO –BRL),

permanecendo os tubos pares como controle negativo para presença de DNA. A reação foi realizada a 37 °C por 60 min. Após este tempo houve a inativação da RT a 70 °C por 10 min e os tubos foram mantidos a – 20 °C até a realização da PCR.

Para a realização da PCR para Ag T foram utilizados 2 µL da reação de transcrição reversa, 100 ng de cada primer, Tris HCl pH 8 10 mM, KCl 50 mM, MgCl<sub>2</sub> 2 mM, dNTPs 200 µM e 2,5 UI de enzima *Taq* DNA Polimerase, em um volume final de reação de 50 µL. Na PCR para GAPDH foi utilizado 2,5 mM de MgCl<sub>2</sub>, para os demais reagentes foram mantidas as mesmas concentrações.

As amplificações foram feitas em um termociclador Perkin Elmer GeneAmp PCR System 2400 sob as seguintes condições: 94 °C por 5 min para desnaturação; seguida de 40 ciclos de 94 °C por 45 seg, 55 °C por 45 seg e 72 °C por 45 seg; finalizando a 72 °C por 7 min, para o gene do Ag. T.

Para o gene GAPDH as condições foram: 94 °C por 5 min para desnaturação; seguida de 40 ciclos de 94 °C por 1 min, 58 °C por 1 min e 72 °C por 1 min; finalizando a 72 °C por 7 min

Os produtos obtidos na reação de PCR foram depositados em gel de agarose 2,5%, submetidos à eletroforese (50V, 45 mA), corados com brometo de etídio (0,5 µg/mL) e visualizados sob luz ultravioleta (Sambrook et al., 1989).

### **3.1.2.5** Análise de cromossomos em células mitóticas

A fim de verificar possíveis alterações cromossômicas, cultivos celulares de MSO e TMSOpSV1 foram submetidos à análise cariotípica.

Garrafas de cultivo celular de 75 cm<sup>2</sup> com células MSO<sub>50</sub> (passagem 36) e TMSOpSV1 (passagem 40) foram tripsinizadas quando o tapete celular apresentou

confluência acima de 80%. Após tripsinização, as células foram transferidas para um tubo cônico de 50 mL e acrescentado 5 mL de MEM com 10% de SFB para inativação da tripsina. O tubo contendo as células foi centrifugado a 800 x g por 10 min e a seguir o meio retirado. Foi acrescentado às células 10 mL de MEM contendo 40 µL de colchicina (0,025%), 200 µL de brometo de etídeo (0,5 µg/ml) e então as células foram incubadas por 2 horas e meia a 37 °C, sendo o tubo agitado a cada 30 min. Após a incubação, o tubo foi centrifugado a 800 x g por 10 min, retirado o sobrenadante, acrescentado 3 mL de KCl 0,75 M aquecido, novamente incubado a 37 °C por 30 min, acrescentado 1 mL de fixador (metanol/ácido acético, 2:1, v/v) gelado e centrifugado a 800 x g por 10 min. O sobrenadante foi retirado, acrescentou-se 5 mL de fixador gelado e o tubo com as células foi mantido a 4 °C *over night*. Após este período, foram realizadas 3 lavagens com 3 mL de fixador. Depois da última lavagem, as células foram mantidas em fixador a 4 °C até o momento da montagem da lâmina.

Lâminas de microscopia eram mantidas em etanol gelado até o momento da montagem, quando então eram submetidas à secagem parcial ao ar livre, deixando-se uma fina camada de etanol. Gotas da suspensão de células e fixador foram distribuídas sobre cada lâmina. Estas foram secas a temperatura ambiente, coradas por 5 min com uma solução de Giemsa 5% em tampão fosfato pH 8,0 e observadas ao microscópio óptico.

O teste foi realizado em duplicata e foram analisadas, para cada tipo celular, 20 células, selecionadas ao acaso, para cada repetição.

### **3.2 Amostras Virais**

Foram utilizadas duas amostras brasileiras de SRLV, isoladas no Laboratório de Virologia da FAVET/UFRGS, uma de origem caprina (CAEV Br/UFRGS-2 ou C767) e uma de origem ovina (MVV Br/UFRGS-2 ou V27). Estes isolados foram obtidos de animais naturalmente infectados e com sinais clínicos de infecção por lentivírus (Hötzel et al, 1993; Milczewski et al., 1997). As amostras virais iniciais foram descongeladas em banho de gelo, filtradas em membrana com poro de 0,22 µm e inoculadas em células MSO<sub>50</sub>. Após a inoculação, as células foram mantidas em garrafas de cultivo de 150 cm<sup>2</sup> (NUNC™) suplementadas com D-MEM contendo 2% de SFB. Após 9 dias, quando o tapete celular apresentou 70 a 80% de efeito citopático (CPE), o sobrenadante foi retirado e foram feitas alíquotas de 5 mL, com o objetivo de se obter um estoque viral, sendo utilizadas posteriormente como inóculos. As alíquotas foram estocadas a -70 °C.

### **3.3 Titulação dos Estoques Virais**

O estoque de inóculos virais foi titulado em placas de 96 poços com diluições de 10<sup>-1</sup> a 10<sup>-6</sup> e foram usadas 6 repetições (poços) para cada diluição.

Em cada poço foi colocado 100 µL de uma suspensão de células MSO<sub>50</sub> contendo 1 x 10<sup>5</sup> células/mL de D-MEM com 4% de SFB. Após 24 horas, essas células foram inoculadas com 100 µL de cada diluição de vírus e incubadas a 37 °C. As placas foram observadas diariamente e a leitura final foi feita 10 dias após a inoculação.

No décimo dia, as células foram fixadas em uma solução 80% (v/v) de acetona em água e coradas com solução de Giemsa 5% para observação de sincícios, que é o CPE característico da presença do vírus.

Os títulos foram obtidos de acordo com o método descrito por Reed e Muench (1938) e determinados pelo cálculo da dose capaz de infectar 50% das células em cultivo (TCID<sub>50</sub> – *Tissue Culture Infective Dose*).

### **3.4 Inoculação dos Isolados e Passagens**

Os inóculos das amostras CAEV Br/UFRGS-2 e MVV Br/UFRGS-2 foram descongelados em banho de gelo e mantidos no mesmo até o momento da inoculação.

Garrafas de 150 cm<sup>2</sup> contendo células MSO<sub>50</sub> e TMSOpSV1 foram utilizadas para inoculação de cada uma das amostras virais, quando apresentaram 50 a 60% de confluência do tapete celular. Para inoculação, foi retirado o meio de cultivo e a cada garrafa foram adicionados 5 mL do inóculo contendo 10<sup>4</sup> TCID<sub>50</sub>/mL para CAEV e 10<sup>4,65</sup> TCID<sub>50</sub>/mL para MVV. As células e o inóculo permaneceram 2 h a 37 °C para adsorção viral. Após este período, foram acrescentados 30 mL de D-MEM suplementado com 2% de SFB.

As inoculações, as passagens e a manutenção das células inoculadas com cada uma das amostras eram feitas em dias diferentes para evitar contaminação entre as amostras.

Os cultivos inoculados foram observados diariamente para verificação da presença de sincícios. As passagens foram realizadas a cada 6 dias e, sempre que necessário, eram acrescentadas mais células aos cultivos inoculados. Após a 7<sup>a</sup> passagem, aguardou-se até que 70 a 80% do tapete celular apresentasse CPE e foi realizada a extração do DNA total das células infectadas.

### 3.5 Extração do DNA

As células foram tripsinizadas e transferidas para um tubo cônico de 50 mL, lavadas com solução salina tamponada com fosfatos (PBS - *phosphate buffered saline*) sem cálcio e magnésio, pH 7,4 e centrifugadas a 800 g por 5 min. A lavagem com PBS foi repetida mais duas vezes, o sobrenadante foi desprezado e foi iniciada a extração do DNA com DNAzol (GIBCO-BRL).

Foi adicionado 1 mL de DNAzol ao tubo contendo as células e com o auxílio de uma micropipeta (Gilson, P1000) foi realizada a homogeneização para lise celular. Após a lise, o DNA foi recuperado com o auxílio de uma ponteira de micropipeta e transferido para um tubo de 1,5 mL. A seguir, foi acrescentado 0,5 mL de etanol absoluto e lentamente feita a homogeneização por inversão. O tubo foi mantido durante 5 min à temperatura ambiente depois o DNA foi retirado com o auxílio de uma ponteira e transferido para novo tubo onde foram realizadas 3 lavagens com 1 mL de uma solução 95% (v/v) de etanol em água, sendo que a cada lavagem o DNA era ressuspenso por inversão do tubo e centrifugado a 8000 g por 5 min. Após as lavagens, o DNA foi seco à temperatura ambiente durante 30 min e depois dissolvido em 200 µL de NaOH 8 mM. Para garantir uma completa dissolução do DNA, o tubo foi armazenado durante 48 horas à 4 °C e, após este período, foi determinada a concentração de DNA das amostras. As amostras foram aliquotadas com uma concentração de 100 ng/µL.

Após a extração do DNA dos diferentes isolados, inoculados nos diferentes cultivos celulares, a denominação das amostras passou a ser a descrita conforme a Tabela 1.

**Tabela 1.** Denominação dos diferentes isolados inoculados nos diferentes cultivos celulares.

Isolados	Tipo celular	
	M50 <sub>50</sub>	TMSOpSV1
CAEV Br/UFRGS- 2	C50	CSV1
MVV Br/UFRGS – 2	M50	MSV1

### 3.6 Reação em Cadeia da Polimerase (PCR)

As reações de PCR foram realizadas para obtenção de fragmentos dos genes virais *gag* e *env* e LTR. As seqüências de nucleotídeos dos *primers* utilizados estão descritas na tabela 2.

**Tabela 2.** Seqüência de nucleotídeos dos *primers* utilizados na reação de PCR para amplificação dos fragmentos de LTR, *gag* e *env* dos SRLV analisados.

Gene	Orientação	Primer (seqüência 5'→3') <sup>a</sup>	Posição <sup>b</sup>	Fragmento (pb)
<i>gag</i> <sup>c</sup>	senso	GGRGGGAGAAGYTGGAA	961 – 978	
	reverso	ACATGCTTGCATYTTYT	1565 – 1582	622
<i>env</i> <sup>d</sup>	senso	GGIACIAAIACWAATTGGAC	7482 – 7501	
	reverso	GCYAYATGCTGIACCATGGCATA	8067 – 8089	608
LTR <sup>d</sup>	senso	AGCAAATGTAACCGCAAGT	8986 – 9005	
	reverso	CGTTGGGCGCCAGCTGCGAG	156 – 175	294

<sup>a</sup> R= G ou A; Y= T ou C; W= A ou T; I= inosina.

<sup>b</sup> Baseado na seqüência CAEV Cork (nº acesso M 33677).

<sup>c</sup> Conforme Marchesin *et al.* (1998).

<sup>d</sup> Projetados no *Institute of Veterinary Virology*, Universidade de Berna, Suíça.

Para cada gene foram feitas dez repetições da PCR, simultaneamente, cada uma em um volume de 50  $\mu$ L, o que gerou ao final da reação um volume de 500  $\mu$ L com o fragmento correspondente ao gene amplificado.

Cada reação de PCR para o gene *gag* e LTR, foi realizada em um volume final de 50  $\mu$ L contendo 10 mM de Tris-HCl, 50 mM de KCl<sub>2</sub>, 2 mM de MgCl<sub>2</sub>, 0,2 mM dNTP, 200 ng de cada primer, 2,5 UI de *Taq* DNA polimerase (CBIOTenzimas-UFRGS) e 500 ng do DNA. Para a PCR do gene *env* foram utilizados os mesmos reagentes e mesmas concentrações descritas para *gag* e LTR com exceção do MgCl<sub>2</sub>, que foi utilizado na concentração de 2,5 mM, e dos *primers*, que foram utilizados 100 ng de cada primer.

As condições de tempo e temperatura utilizados nas reações de PCR estão descritos na Tabela 3 e todas as reações foram realizadas em um termociclador Perkin-Elmer GeneAmp PCR System 2400.

**Tabela 3.** Condições de temperatura e tempo, usados nas reações de PCR, para as diferentes seqüências amplificadas.

Temperatura/Tempo	PCR 50 $\mu$ L		
	<i>gag</i>	<i>env</i>	LTR
Desnaturação inicial	94 °C/5 min	94 °C/5 min	94 °C/5 min
Desnaturação	94 °C/1 min	94 °C/45 seg	94 °C/30 seg
Anelamento	57 °C/1 min	49 °C/45 seg	59 °C/30 seg
Extensão	72 °C/1 min	72 °C/1 min	72 °C/45 seg
Extensão final	72 °C/7 min	72 °C/7 min	72 °C/7 min
Conservação	4 °C/ $\infty$	4 °C/ $\infty$	4 °C/ $\infty$

Após o término de cada uma das reações de PCR, alíquotas de 9 µL do primeiro tubo e do décimo foram depositadas em gel de agarose 1,5%, submetidas à eletroforese, coradas com brometo de etídio (0,5 µg/mL) e visualizadas sob luz ultravioleta (Sambrook et al., 1989), a fim de verificar os produtos obtidos na amplificação. Após a visualização dos produtos, o conteúdo de cada uma das 10 repetições foi transferido para um tubo de 1,5 mL. Os fragmentos obtidos foram precipitados com 2,5 volumes de etanol absoluto e 300 mM final de acetato de sódio pH 8,0, incubados durante uma hora a -20 °C e centrifugados a 10800 x g por 10 min. Os sobrenadantes foram desprezados, e os precipitados (DNA) foram lavados duas vezes com 1 mL de uma solução 70% (v/v) de etanol em água, ressuspensos em 45 µL de TE pH 8,0 (10 mM Tris Cl, pH 8; 1 mM EDTA, pH 8) e mantidos a -20 °C.

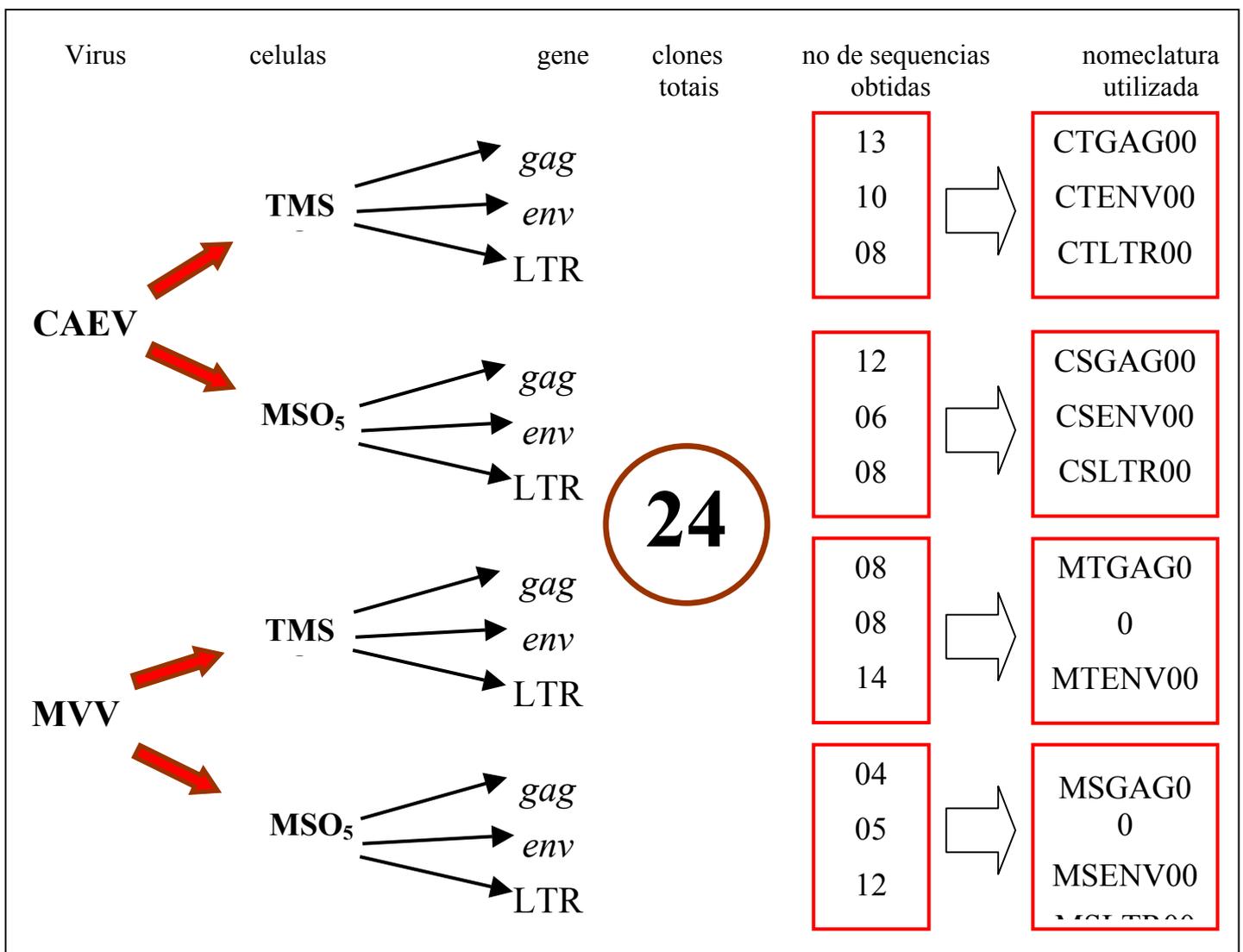
O DNA precipitado foi submetido a eletroforese em gel preparativo de baixo ponto de fusão (LMP – “low melting point”) 1,5% e a banda correspondente ao fragmento esperado foi cortada e purificada no QIAquick Gel Extraction Kit (QIAGEN) ou Wizard® PCR Preps DNA Purification System (PROMEGA), conforme recomendação do fabricante (Anexos 2 e Anexo 3, respectivamente).

Após a purificação, o DNA das diferentes amostras foi solubilizado em 30 µL de água Milli-Q® autoclavada e estocado a -20 °C até o momento da clonagem.

### **3.7 Clonagem**

Os fragmentos de LTR-M50 e MSV1, *gag*-M50 e MSV1, *env*-M50 e MSV1, LTR-C50 e CSV1, *gag*-C50 e CSV1, *env*-C50 e CSV1 foram clonados no plasmídeo pCR®2.1-TOPO® (TOPO TA Cloning Kit – Invitrogen) conforme protocolo do fabricante (Anexo 4).

Cada fragmento foi clonado em dias diferentes e foram selecionadas 24 colônias positivas (brancas) de cada gene em cada tipo de cultivo celular para cada isolado (Figura 4). O aparecimento de colônias brancas indica que houve a inserção de um fragmento de DNA no sítio de clonagem, pois este sítio interrompe a leitura do gene *LacZα*. Em plasmídeos em que não houve a inserção do DNA, o gene *LacZα* permanece ativo e expressa β-galactosidase gerando a cor azul nas células bacterianas.



**Figura 4** Representação das etapas utilizadas na obtenção dos clones seqüenciados. Os vírus CAEV e MVV foram inoculados nos diferentes tipos celulares e após a obtenção do DNA e reação da polimerase em cadeia (PCR) os fragmentos obtidos foram clonados. Vinte e quatro clones de cada amostra foram selecionados e submetidos ao seqüenciamento. As seqüências geradas foram denominadas de acordo com o tipo de células utilizado e gene analisado seguidos do número correspondente ao clone que deu origem a amostra.

Desta forma, a partir das colônias brancas selecionadas, foram feitas as minipreparações para posterior seqüenciamento.

### **3.8 Minipreparação dos Plasmídios**

Cada colônia selecionada foi colocada em crescimento em tubos contendo 2 mL de meio 2xYT (Anexo 5) e 100 µg/mL de ampicilina, e incubada *overnight* sob agitação (180 rpm/min). Após a incubação, 1,5 mL da cultura foi transferido para um tubo cônico de 1,5 mL e centrifugado a 8000 x g durante 5 min. O sobrenadante foi desprezado e o precipitado foi ressuspenso em 100 µL de uma solução composta de glicose 50 mM, TrisCl 25 mM (pH 8) e EDTA 10 mM (pH 8). Após a completa homogeneização, foram acrescentados 200 µL de uma solução composta de NaOH 0,2 N e 1% SDS. A mistura foi feita por inversão do tubo. Foram adicionados 150 µL de uma solução composta de acetato de potássio 5 M e ácido acético glacial 11,5%. A mistura foi feita por inversão e o tubo depositado no gelo por três a cinco minutos. Após este período, o tubo foi centrifugado a 8000 x g por 5 min e o sobrenadante transferido para um novo tubo. A extração do DNA foi realizada acrescentando-se 500 µL de fenol:clorofórmio (v/v), sendo a mistura agitada vigorosamente no vortex e centrifugada a 8000 g por 2 min. A fase aquosa foi transferida para novo tubo e o DNA precipitado com dois volumes de etanol absoluto a temperatura ambiente durante 2 minutos. O DNA foi centrifugado a 8000 g por 5 min e submetido a 3 lavagens com 1 mL de etanol 70% (v/v) em água. Após as lavagens o DNA foi seco durante 30 min à temperatura ambiente, dissolvido em 50 µL de TE (pH 8) e armazenado a -20 °C.

Após a extração, os plasmídeos foram submetidos à análise por digestão enzimática, com a enzima EcoRI para verificar a presença do inserto. Os positivos foram seqüenciados no Mega Bace 1000 (Molecular Dynamics & Amersham Life Science) através do método de terminação de cadeia (método enzimático de Sanger). Cada inserto, teve as duas fitas seqüenciadas e foram utilizados para o sequenciamento os primers M13 senso e reverso cujas seqüências estavam presentes no vetor.

### **3.9 Análise das Seqüências**

As seqüências obtidas foram analisadas no programa BLAST (*Basic Local Alignment Search Tool*), para verificar a identidade de cada uma. Para o trabalho foram utilizadas somente as seqüências que apresentaram similaridade com seqüências dos SRLVs. As fitas senso e reverso das seqüências utilizadas foram alinhadas no programa Bioedit versão 5.0.9 (Hall, 1999) a fim de corrigir pequenos erros gerados durante o processo de seqüenciamento. Após as correções, somente a seqüência senso foi utilizada nas demais análises.

Os alinhamento múltiplos foram realizados no programa Clustal W (Thompson *et al.*, 1994) versão 1.83, de acordo com o gene e tipo celular utilizados.

Os alinhamentos foram analisados utilizando-se o programa GeneDoc (Nicholas & Nicholas, 1997) versão 2.6.002 e possíveis erros nas seqüências foram comparados aos gráficos obtidos no seqüenciamento (eletroferogramas). Após suprimidas quaisquer dúvidas, quanto às seqüências geradas, os *primers* foram retirados e um novo alinhamento foi realizado para obtenção das seqüências consenso. Juntamente às seqüências obtidas, foram utilizadas as seguintes seqüências padrões já descritas na literatura (com seu respectivo nº de acesso junto ao GenBank): CAEV-Cork (nº acesso

M33677), MVV 1514 (nº acesso M10608), MVV SA (nº acesso M31646) e MVV EV1 (nº acesso S51392). Para os alinhamentos do gene *gag*, além das seqüências padrões já relacionadas, foram utilizadas seqüências de MVV (nº acesso AJ305039) e CAEV (nº acesso AJ305042), já descritas na literatura (Ravazzolo *et al.*, 2001) e referentes a mesma amostra e ao mesmo fragmento utilizado neste trabalho.

Para a análise filogenética foi utilizado o pacote de programas Phylip (Felsenstein, 2002 – versão 3.6). As seqüências obtidas foram analisadas pelo programa DNAML que utiliza o método da probabilidade máxima (*Maximum Likelihood* - ML). A repetibilidade da topologia das árvores foi testada através do programa SEQBOOT (*bootstrap* com 100 interações) e a árvore consenso foi obtida pelo programa CONSENSE.

A edição das árvores foi realizada utilizando-se o programa TREEVIEW versão 1.6.6 (Page, 2001).

## **4. RESULTADOS**

### **4.1 Cultivo Celular Secundário**

O cultivo secundário obtido por explantação foi proveniente das articulações de um cordeiro de abatedouro e denominado MSO<sub>50</sub>.(Figura 5a).

Após o descongelamento, as células apresentaram crescimento uniforme e inibição por contato. A dinâmica de crescimento destas células foi comparada às células TMSOpSV1 e pode ser observada na Figura 6.

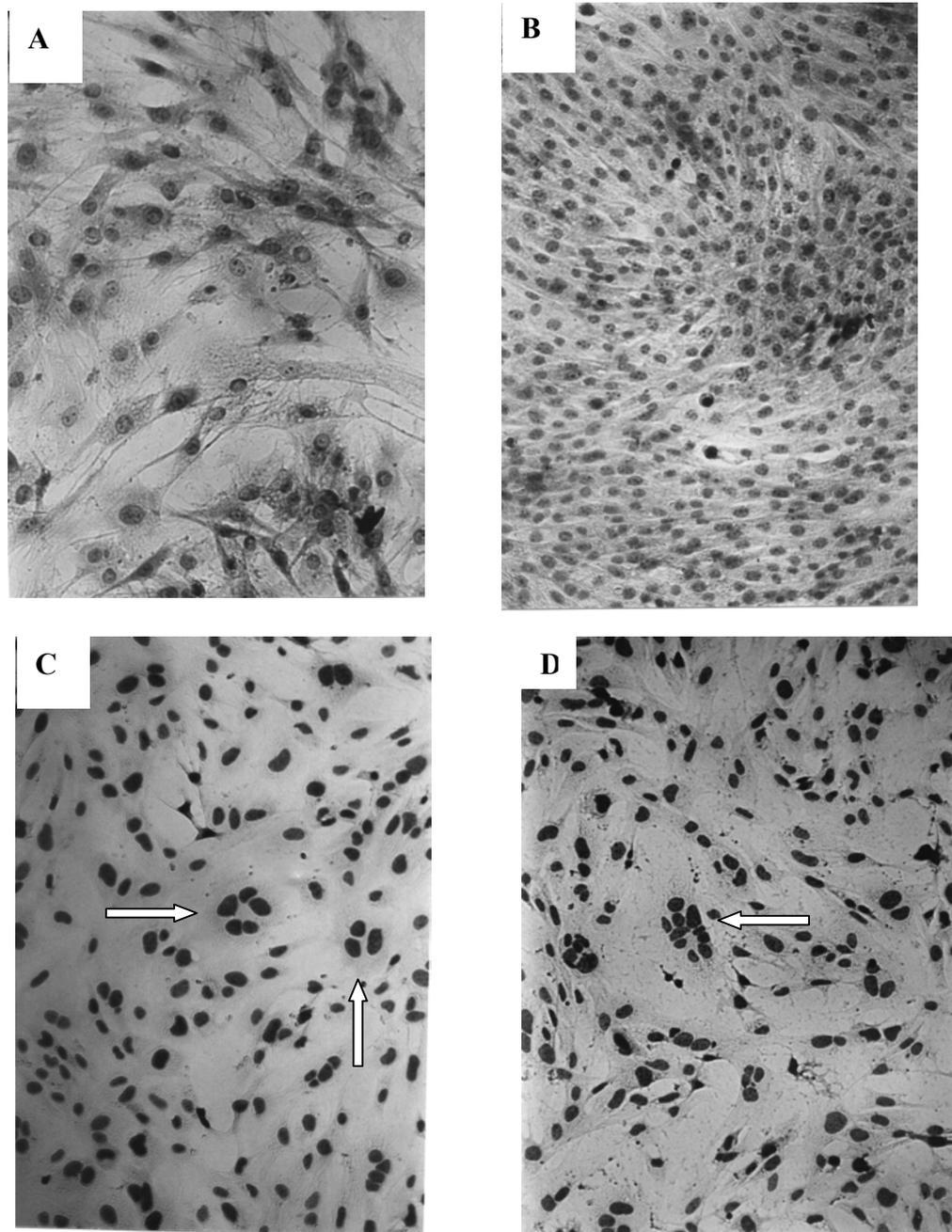
Durante o período de crescimento celular (10% SFB), era realizada uma passagem por semana e as células dispersas numa proporção de 1:2. Estes cultivos mostraram-se permissíveis às amostras virais de SRLV utilizadas, o que pode ser observado microscopicamente pela presença de sincícios com um variado número de núcleos.

### **4.2 Cultivo Celular Transformado**

O cultivo transformado foi proveniente de um cordeiro de abatedouro e após a transfecção com o plasmídeo pSV1 foi denominado TMSOpSV1 (Figura 5b).

Após sofrerem o descongelamento, as células apresentaram um crescimento uniforme e com menor inibição por contato quando comparadas às MSO<sub>50</sub>.

As células TMSOpSV1 mostraram-se permissivas à replicação pelos SRLV. Este fato foi observado na microscopia óptica pela presença de sincícios (Figura 5c e 5d). Estes sincícios apresentaram um menor número de núcleos quando comparados ao efeito produzido nas MSO<sub>50</sub>.



**Figura 5.** Morfologia, ao microscópio óptico, das células MSO<sub>50</sub> (A) e TMSOpSV1 (B). As células TMSOpSV1 mostraram-se permissivas ao MVV e ao CAEV (Figura 1C e 1D respectivamente) o que pode ser observado através da presença de CPE. Setas brancas indicam a presença de sincícios. (Coloração Giemsa, 200x)

Durante o período de crescimento celular, as células mantidas em 10% de SFB, sofriam passagens duas à três vezes por semana. A cada passagem as células eram dispersas numa proporção de 1:4.

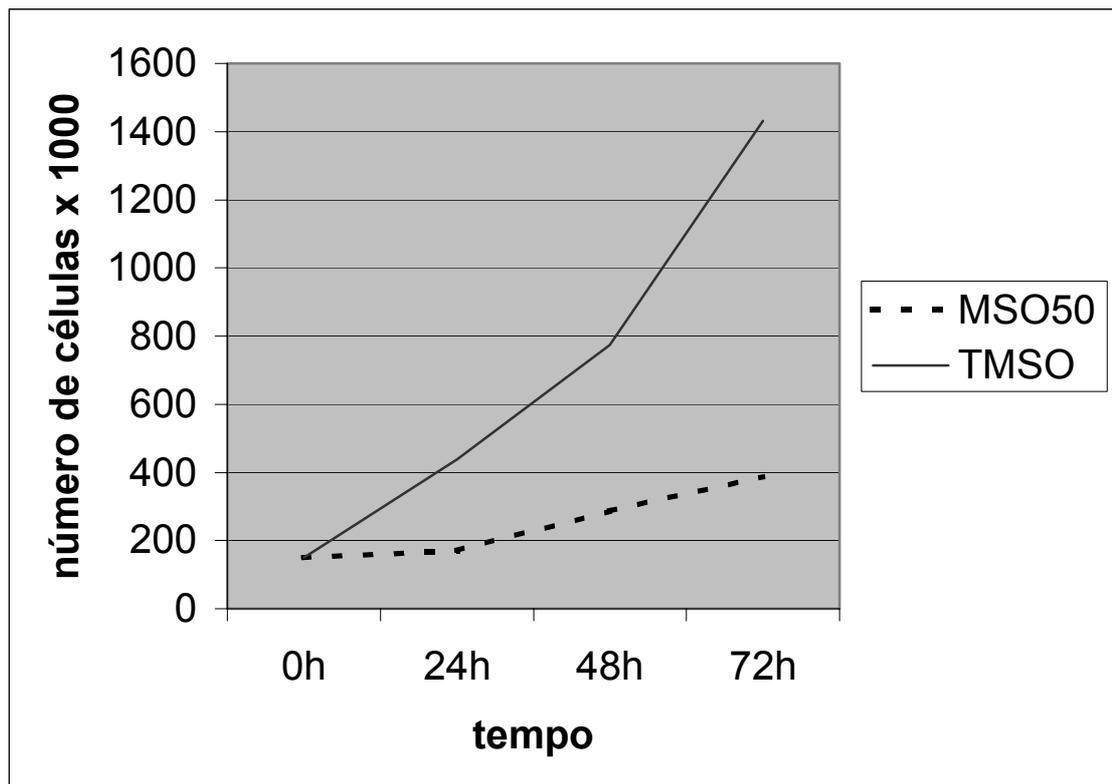
#### 4.2.1 Dinâmica de Crescimento

A fim de verificar a cinética de crescimento, as células TMSOpSV1 foram analisadas através da contagem de células após tripsinização.

A Figura 6 mostra as células transformadas com um crescimento aproximadamente 3,5 vezes maior do que as células MSO<sub>50</sub> após 72 horas de cultivo. Este comportamento já pôde ser observado logo nas 24 horas após a preparação da placa quando as células TMSOpSV1 já apresentavam um crescimento duas vezes maior comparado as MSO<sub>50</sub>.

O padrão de crescimento celular observado está compatível com o padrão apresentado durante a manipulação, quando as células TMSOpSV1 necessitavam um intervalo de tempo menor entre as passagens, bem como uma taxa de dispersão maior (1:4 das TMSOpSV1 *versus* 1:2 das MSO<sub>50</sub>).

Ao microscópio óptico, as células TMSOpSV1 apresentavam-se formando uma monocamada no frasco de cultivo, semelhante as MSO. Entretanto, com uma morfologia levemente diferenciada pois as células apresentavam um formato mais poligonal, enquanto o cultivo secundário apresentava uma forma mais elíptica (Figuras 5a e 5b).



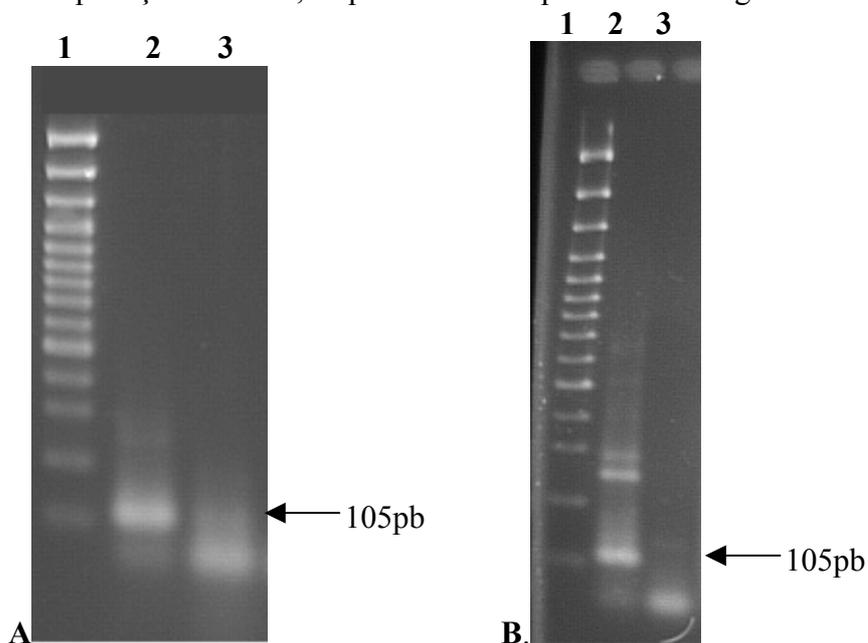
**Figura 6.** Curva de crescimento das células MSO<sub>50</sub> e TMSOpSV1. As células TMSOpSV1 mostram um crescimento aproximadamente 3,5 vezes maior do que as MSO<sub>50</sub>, após 72h.

#### 4.2.2 Presença do mRNA do Antígeno T

Considerando a dinâmica de crescimento apresentada pelas células TMSOpSV1, e sabendo-se que o antígeno T do SV40 está envolvido na perda da capacidade de regulação do ciclo celular, foi realizada a extração do mRNA total para verificar a presença do mRNA do Ag T. *Primers* específicos para uma região do antígeno T do SV40 foram utilizados na transcrição reversa e PCR, obtendo-se um fragmento de 105 pb (Figura 7).

Foi possível observar a banda esperada nas células TMSOpSV1 e nas células utilizadas como controle positivo, as células COS-1 (Figura 7). As células COS-1 foram

escolhidas como controle, pois foram transformadas com um mutante do SV40 sem a origem de replicação do vírus, e apresentam a expressão do antígeno T.



**Figura 7.** Análise dos produtos da RT-PCR para presença do Ag T do SV40 em células COS-1 e TMSOpSV1 *versus* MSO<sub>50</sub>. Em **A** células COS-1 foram testadas para presença do Ag T (linha 1 - marcador, linha 2 - COS-1, linha 3 - controle da reação). Em **B** células TMSOpSV1 e MSO<sub>50</sub> igualmente testadas (linha 1 - marcador, linha 2 - TMSOpSV1, linha 3 - MSO<sub>50</sub>). Gel de agarose 2,5% corado com brometo de etídio.

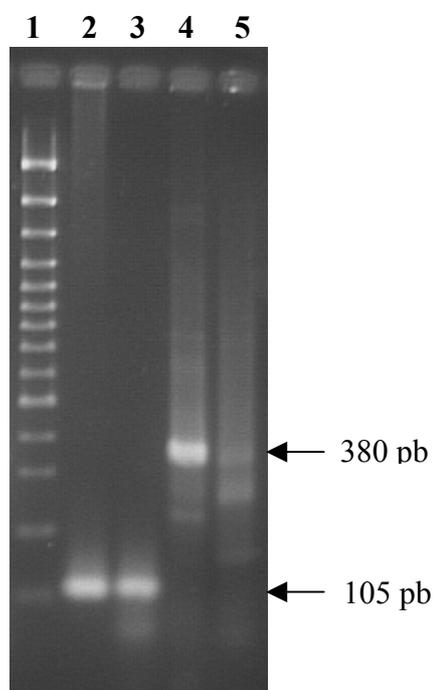
#### 4.2.3 Localização do Plasmídeo pSV1

Depois de verificada a presença do mRNA do Ag T, decidiu-se analisar a localização do plasmídeo pSV1. Para isto, foi realizada uma extração do DNA citoplasmático de acordo com Single *et al.* (1998). Conforme os autores, após a realização do protocolo descrito, o sedimentado restante apresenta debrís celulares e material nuclear. Este sedimento foi submetido à extração de DNA, conforme descrito no Material e Métodos, e utilizado como material de origem nuclear.

Na reação de PCR para o Ag T foram utilizados os mesmo *primers* descritos anteriormente e, como controle, foram utilizados *primers* específicos para a seqüência que codifica a proteína constitutiva GAPDH. Estes *primers* deram origem ao fragmento esperado de 380 pb.

Verificou-se desta forma a presença do fragmento esperado do Ag T tanto no núcleo quanto no citoplasma das células TMSOpSV1 (Figura 8). Entretanto, o fragmento originário da amplificação de material nuclear mostrou-se com uma intensidade levemente maior do que o de origem citoplasmática.

A amplificação da seqüência controle - GAPDH - apresentou-se conforme o esperado, ou seja, o fragmento obtido a partir do material nuclear apresentou uma banda de intensidade maior do que o obtido a partir do citoplasma (Figura 8).



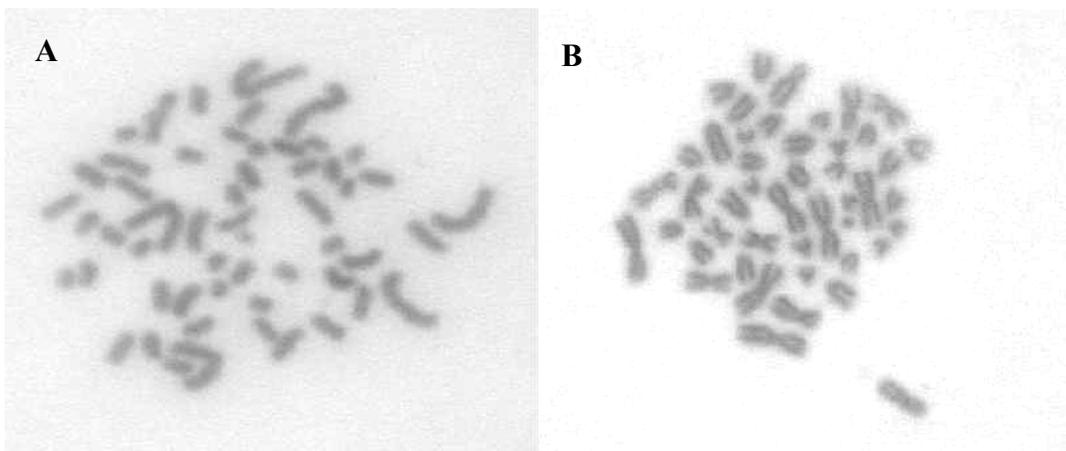
**Figura 8.** Análise dos produtos de PCR obtidos a partir do DNA nuclear e citoplasmático das células TMSOpSV1. Foram observados os fragmentos correspondentes ao Ag T (105 pb) e ao controle GAPDH (380 pb). Linha 1 - marcador, linha 2 - antígeno T de origem nuclear, linha 3 - antígeno T de origem citoplasmática, linha 4 - GAPDH de origem nuclear, e linha 5 - GAPDH de origem citoplasmática. Gel de agarose 2,5% corado com brometo de etídio.

#### 4.2.4 Análise de Cromossomos em Células Mitóticas

Com a finalidade de verificar alterações cromossômicas nas células transformadas TMSOpSV1, foi realizada a análise destas células e das células de cultivo secundário MSO<sub>50</sub>. Ambos os cultivos celulares apresentavam-se com um número de

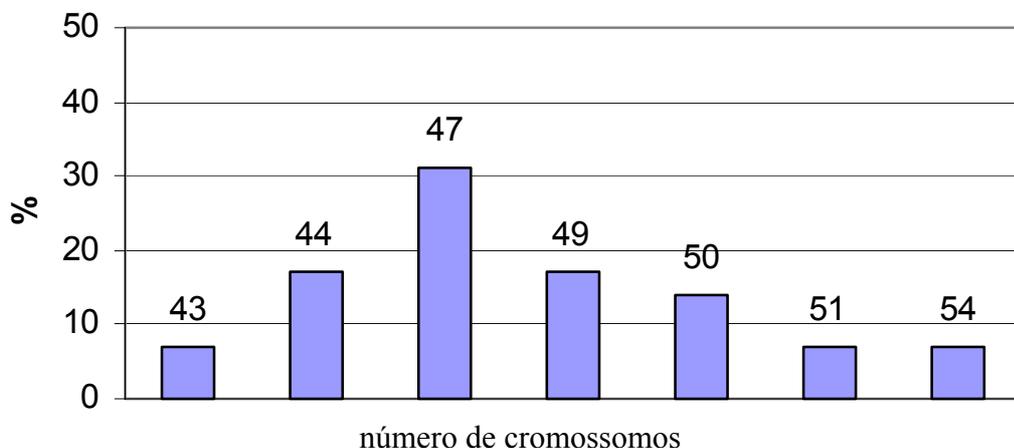
passagens elevado (TMSOpSV1 passagem 39, MSO passagem 36), no momento do teste. Entretanto, foi possível observar diferenças entre os dois tipos celulares.

As células MSO<sub>50</sub> apresentaram o número de cromossomos normal,, compatível com os da espécie ovina (2n=54) (Figura 9a). Possíveis translocações Robertsonianas foram observadas (Figura 9b). A translocação cromossômica é uma aberração estrutural em que um segmento de um cromossomo é transferido para outro local no mesmo cromossomo ou em outro não homólogo.



**Figura 9.** Cromossomos metafásicos das células MSO (A) e TMSOpSV1 (B) foram analisados. As células TMSOpSV1 apresentaram em sua maioria uma redução no número de cromossomos e pode observar-se alterações cromossômicas estruturais.

Nas células TMSOpSV1 observou-se uma variação no número de cromossomos sendo que 31 % das células visualizadas apresentaram 47 cromossomos (Figura 10).

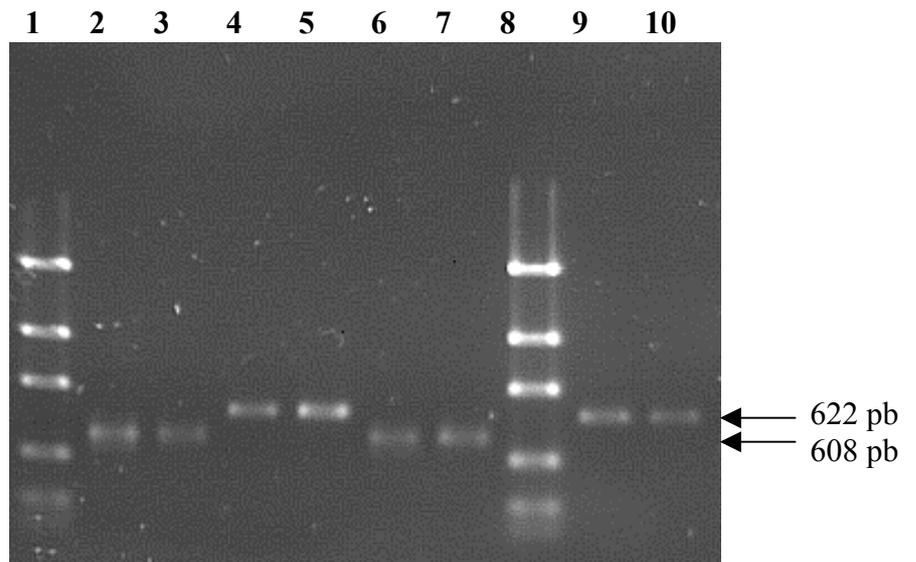


**Figura 10.** Contagem do número de cromossomos das células TMSOpSV1. Foram observados 40 campos nos quais foi realizada a contagem dos cromossomos.

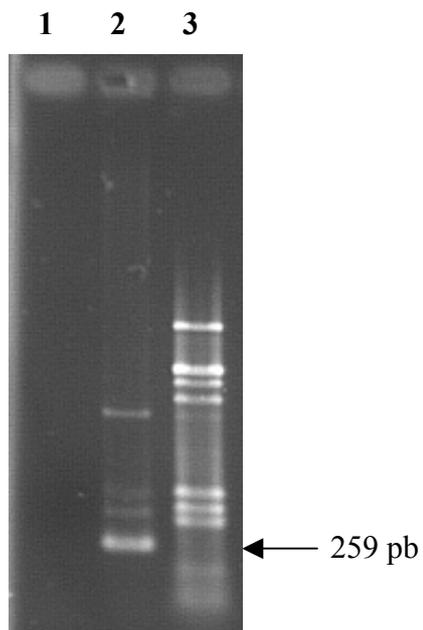
#### 4.3 Reação da Polimerase em Cadeia para os Genes *gag* e *env* e LTR

Após a extração de DNA das células TMSOpSV1, infectadas com CAEV (CSV1) e MVV (MSV1), e das células MSO<sub>50</sub> infectadas com CAEV (C50) e MVV (M50), foi realizada a reação em cadeia da polimerase buscando a amplificação de segmentos específicos dos genes *gag* e *env* e LTR.

Foi possível obter a amplificação de fragmentos com tamanhos esperados para cada um dos segmentos: 622 pb para *gag* (Figura 11), 608 pb para *env* (Figura 11), e 259 pb para LTR (Figura 12). Para o fragmento de LTR apesar das tentativas de otimização da reação, manteve-se o aparecimento de bandas espúrias.



**Figura 11.** Análise dos produtos de PCR para os genes *gag* (linhas 4, 5, 9, 10) e *env* (linhas 2, 3, 6, 7) em células TMSOpSV1 (linhas 3, 5, 7, 10) e MSO (linhas 2, 4, 6, 9). Marcador Low Mass Leader (Gibco) (linhas 1 e 8). Gel de agarose 1,5%, corado com brometo de etídio.



**Figura 12.** Análise do produto de PCR do LTR (linha 1 - controle da PCR, linha 2 - LTR C50, linha 3 - Marcador BSC12). Gel de agarose 1,5%, corado com brometo de etídio.

#### 4.4 Clonagem, Seqüenciamento e Alinhamento para Obtenção das Sequências Consenso

Após análise por restrição enzimática, os clones cujo fragmento correspondia ao tamanho esperado, foram seqüenciados. As seqüências obtidas foram analisadas no programa BLAST. As que apresentaram tamanho adequado e similaridade com os SRLVs, após as devidas correções e cortes, sofreram um alinhamento prévio de acordo com o gene analisado. Deste primeiro alinhamento foram obtidas as seqüências consenso utilizadas para as análises filogenéticas. Em todos os alinhamentos foram empregadas, comparativamente, as principais seqüências padrões para CAEV e MVV.

Todas as seqüências analisadas foram nomeadas de acordo com o isolado utilizado (MVV ou CAEV), o tipo de célula em que foi inoculado (Secundária ou Transformada), o gene a que pertence e o número do clone da qual foi derivada (Figura 4). Assim, a seqüência CTENV02 corresponde ao isolado de CAEV, inoculado em células transformadas (TMSOpSV1), pertencente ao gene *env* e correspondente ao clone 02.

Das 24 seqüências, pertencentes ao gene *env* do isolado de CAEV, obtidas após o seqüenciamento, 8 foram descartadas por não pertencerem aos SRLVs. As 16 restantes foram alinhadas e obteve-se 12 seqüências consenso. Destas, 04 são oriundas de cultivos secundários e 08 são de cultivos transformados.

Cada seqüência foi traduzida individualmente, e a partir da seqüência de aminoácidos obtida foi realizado um novo alinhamento (Figura 13). As regiões de maior homologia entre os clones e o isolado CAEV-Cork foram assinaladas de cinza.

		*	20	*	40	*	6	
CTENV11	:	.H...I.K.T..E.....	TGN....T.A..K.....	Q.....A.TNGT--.R..	:	57		
CTENV22	:	.H...I.K.T..E.....	TGN....T.A..K.....	Q.....A.TNGT--.R..	:	57		
CTENV10	:	.H...I.K.T..E.....	TGN....T.A..K.G.....	Q.....A.TNGS--.R..	:	57		
CSENV23	:	.H...I.K.T..E.....	TGN....T.A..K.....	Q.....A.TNGT--.R..	:	57		
CTENV12	:	.....	.....	.....	:	57		
CSENV05	:	.....	.....	.....	:	57		
CTENV08	:	.....	.....	.....	:	57		
CSENV06	:	.....	.....	.....	:	57		
CTENV23	:	.....	.....	.....	:	57		
CSENV20	:	.....	.....	.....	:	57		
CTENV02	:	.....	.....	.....	:	57		
CTENV06	:	.H...I.K.T.....	.....	.....	:	57		
CAEVCork	:	TMW.IYKN...E.....	NTGE.....A.K.....	N.....QRD.--.T..	:	57		
MVV-EV-1	:	TMWEIYKN..S.E.S...	IGN...TIQ.....R..	TNT...A.AASR...R..	:	59		
MVV1514en	:	TMWNIY.N..R.N.SS...	TGS...T.N.LK....R..	N...KS-----QR..	:	52		
MVV-SAenv	:	TMW.IYKN..E.K.S...	T.N...T.N.....Y..	N...A.NSKK--.R..	:	57		
		NYVGNLQECSGCQNATLDRKDTGTLGGVDNINCSLPHKNESHKWTCAPRWDNGGNKKDS						
		0	*	80	*	100	*	1
CTENV11	:	.....T.....	I.....	.....	:	116		
CTENV22	:	.....T.....	I.....	.....	:	116		
CTENV10	:	.....T.....	.....	.....	:	116		
CSENV23	:	.....	.....	.....K...	:	116		
CTENV12	:	.....	.....	.....	:	116		
CSENV05	:	.....	.....	.....K.....	:	116		
CTENV08	:	.....	.....	.....	:	116		
CSENV06	:	.....	.....	.....	:	116		
CTENV23	:	.....T.....	I.....	.....	:	116		
CSENV20	:	.....T.....	.....	.....R.....DL.K...	:	116		
CTENV02	:	.....	.....	.....R.....DL.K...	:	116		
CTENV06	:	.....	.....	.....R.....DL.K...	:	116		
CAEVCork	:	.....KK..T.I...F...	I.Q...L...I.....	.....A.....	:	116		
MVV-EV-1	:	.....-D..G...H.....	GV.....I.....I.R.....	EVD...QS.L	:	117		
MVV1514en	:	.....-D..GK...K.....	G.S.....R...R.....	V...QS.M	:	109		
MVV-SAenv	:	.....-D..G...L.....	G.....V.....	VD...KA.R	:	115		
		LYIAGGRQFWKRVKAQYSCESNLGELDGMHQMLLQKYQVIKVRAYTYGVIEMPENYE						

Figura 13. continua

	20	*	140	*	160	*	
CTENV11	:	..-.....			V.....		: 174
CTENV22	:	..-.....					: 174
CTENV10	:	..-.....					: 174
CSENV23	:	..-.....				T.....	: 174
CTENV12	:	..-.....					: 174
CSENV05	:	..-.....					: 174
CTENV08	:	..-.....					: 174
CSENV06	:	..-.....					: 174
CTENV23	:	..-.....				T.....	: 174
CSENV20	:	..-L..R..					: 174
CTENV02	:	..-L..R..					: 174
CTENV06	:	..-.....					: 174
CAEVCork	:	KTRI.....					: 175
MVV-EV-1	:	EK---..RNAFK-KE.....I...V.A...I...G...V...RTL..S... : 172					
MVV1514en	:	EERGE..RS.RN-LQ.....I...V.A...I...G...V...RT...S... : 167					
MVV-SAenv	:	EKN.R.KRST.I.RP.....I...V.A...I...G...V...RT...S... : 174					
		QISMINRKKRELSHKRKKRGVGLVIMLVIMAIVAAAGASLGVANAIQQSYTKAAVQTLA					
	180	*					
CTENV11	:	.....--	:	185			
CTENV22	:	.....--	:	185			
CTENV10	:	.....--	:	185			
CSENV23	:	.....-.....	:	184			
CTENV12	:	.P.....--	:	185			
CSENV05	:	.....--	:	185			
CTENV08	:	.....--	:	185			
CSENV06	:	.....--	:	185			
CTENV23	:	.....PGCVR--	:	185			
CSENV20	:	.....--	:	185			
CTENV02	:	.....--	:	185			
CTENV06	:	.....--	:	185			
CAEVCork	:	.....--	:	186			
MVV-EV-1	:	.....N...T	:	185			
MVV1514en	:	.....E.....	:	180			
MVV-SAenv	:	.....-----	:	180			
		NATAAQQDVLEAS					

**Figura 13.** Alinhamento das seqüências de aminoácidos do fragmento correspondente a região Env do CAEV, obtidas a partir dos clones analisados.

Nas células inoculadas com Maedi-Visna, foram obtidas 24 seqüências para o gene *env*. Destas, 11 não representavam seqüências compatíveis com SRLV e foram desconsideradas. Das 13 restantes, obteve-se 09 seqüências consensos sendo 04 oriundas de cultivo secundário e 05 de cultivo transformado.

O alinhamento da seqüência de proteínas de Env do MVV está representado na Figura 14. A região de maior homologia entre os clones e os isolados padrões de Maedi-Visna está grifada em cinza. A seqüência MTENV15 mostrou-se mais curta do que as demais, embora tenha sido gerada exatamente a partir dos *primers* utilizados para as

outras seqüências. As seqüências MTENV16 e MSEN11, apresentaram-se distintas das demais a partir da posição 121 e 137 respectivamente.

		*	20	*	40	*	6		
MVVEV1	:	..WEI...	SS.E...	D.I...T...	IQ..N.....	R..TNT.....	AASR.....	: 59	
MVVSAenv	:	..WGI...	SE.K...	D.D..T...	N..N.....	Y..N.....	NSK.--...	: 57	
MVV1514en	:	..WNI.Q..	SR...S.D...	S.T...N.L.....	R..N.....	KS-----	Q... : 52		
CAEVCork	:	..WGI...	S..E.A..	DN..E.T..	G.A.KN....	K..N.....	P.QRDG--.T..	: 57	
MTENV15	:	-----P..	--.IS.----	.....	.....	.....	.....	: 41	
MSEN11	:	.....	.....	.....	.....	R.....	EKKG--...	: 57	
MTENV12	:	.....	-----	.....	.....	.....	.....	: 53	
MTENVO1	:	.....	-----	.....	.....	.....	.....	: 53	
MSEN12	:	.....	-----	.....	.....	.....	.....	: 53	
MSEN13	:	.....	-----	.....	.....	.....	.....	: 53	
MTENV04	:	.....	-----	.....	.....	.....	.....	: 57	
MSEN11	:	.....	-----	.....	.....	.....	.....	: 53	
MTENV16	:	.....	-----	.....	.....	R.....	EKKG--...	: 57	
		TMMQYYKNCTGCNNSTLIRTGNGPLGTVGNIKCSLPHINESSKWTCAARRQPKGNKRDS							
		0	*	80	*	100	*	1	
MVVEV1	:	.....-	D.....	H.....	L..V.....	.....	A.....	E.D.....	: 117
MVVSAenv	:	.....-	D.....	L.....	L.....	MV.....	V.K..A.....	D..KA.R	: 115
MVV1514en	:	-.....-	D...K.....	L...S.....	M...R...V...	A.....	.....	M	: 109
CAEVCork	:	.....	KK..T.I..	QF.....	Q...L.....	.....	V.K..A.....	I..EN.A	: 116
MTENV15	:	.....-	.....	.....	.....	.....	.....	.....	: 99
MSEN11	:	.....-	.....	.....	.....	.....	.....	.....	: 115
MTENV12	:	.....-	.....	N.....	.....	.....	.....	.....	: 111
MTENVO1	:	.....-	.....	.....	.....	.....	.....	.....	: 111
MSEN12	:	.....-	.....	.....	.....	.....	.....	.....	: 111
MSEN13	:	.....-	.....	.....	.....	.....	.....	.....	: 111
MTENV04	:	.....-	.....	.....	.....	.....	.....	.....	: 115
MSEN11	:	.....-	.....	.....	.....	.....	.....	.....	: 111
MTENV16	:	.....-	G.....	.....	.....	.....	.....	.....	: 115
		LYIAGGRNFWGRVKAKYSCESNIGGLDGMHQILLQKYQIIRVRSYTYGVVEMPQSYL							

Figura 14. continua

	20	*	140	*	160	*	
MVVEV1	:	...RR.----	AFKKE.....				L..... : 172
MVVSAenv	:	...MR....	TEISRP.....				: 174
MVV1514en	:	.ERGE.R..-	RRNLQ.....				: 167
CAEVCork	:	KTRII.RKK.	ELSHK.....	V....	M.V....	V.....	S.....I.....KA...T.. : 175
MTENV15	:	.....-	.....				: 157
MSENV01	:	.....-	.....				: 173
MTENV12	:	.....-	.....				: 169
MTENVO1	:	.....-	.....				: 169
MSENV02	:	.....-	.....				: 169
MSENV13	:	.....-	.....				: 169
MTENV04	:	.....-	.....				: 173
MSENV11	:	.....-	.....E.H-----	R.GHSACDH.NNS.	CRSRTRCCKR.A.	ILYKD	: 163
MTENV16	:	..KH.KQKK-	PTNSDK..E.H-----	R.GHSACYH.NNS.	CRSRTRCCKR.A.	ILYKD	: 167
			EKNTKNKRSRLQTQTRKRGIGLVIVLAIMAIAAAGAGLGVANAVQQSYTRTAVQSLA				
	180	*					
MVVEV1	:	....A..N.	LE.T-----				: 185
MVVSAenv	:	....A..N.	LE.T-----				: 187
MVV1514en	:	....A..E.	LE.S-----				: 180
CAEVCork	:	....A..D.	LE.T-----				: 188
MTENV15	:	.-ALLFSR.	CKP-----				: 168
MSENV01	:	.V.V.FSR.	CKP-----				: 185
MTENV12	:	.....-..S..E..	-----				: 182
MTENVO1	:	.....-..S..E..	-----				: 182
MSENV02	:	.....-..S..E..	-----				: 182
MSENV13	:	.....-..S..E..	-----				: 182
MTENV04	:	.....F..S..E..	-----				: 187
MSENV11	:	GCPVSCRNCCS.	EC.....				: 181
MTENV16	:	GCPVSCRNCCS.	EC.....				: 185
		NATAVQQQVLAASVRSL					

**Figura 14.** Alinhamento das 13 seqüências de aminoácidos de Env do MVV, obtidas a partir dos clones analisados.

Quanto ao gene *gag*, do CAEV foram obtidas 42 seqüências e destas, 25 foram compatíveis com SRLV. A partir das 25 foram geradas 14 seqüências consenso, sendo 7 oriundas de cultivo secundário e 7 de cultivo transformado.

Após a tradução foi gerado o alinhamento das proteínas do fragmento de Gag (Figura 15). As seqüências de aminoácidos analisadas mostraram-se mais homogêneas quando comparadas a amostra CAEV-Cork. As seqüências das amostras de MVV, apresentaram uma deleção de dois resíduos na posição 77 e 78 (grifado em cinza).

	1				50
AJ305042	AVDAVMFQQM	QTVAMQHGLV	SEDFERQLAY	YATTWTSKDI	LEVLAMMPGN
CSGAG19	AVDAVMFQQM	QTVAMQHGLV	SEDFERQLAY	YATTWTSKDI	LEVLAMMPGN
CTGAG16	AVDAVMFQQM	QTVAMQHGLV	SEDFERQLAY	YATTWTSKDI	LEVLAMMPGN
CTGAG22	AVDAVMFQQM	QTVAMQHGLV	SEDFERQLAY	YATTWTSKDI	LEVLAMMPGN
CSGAG17	AVDAVMFQQM	QTVAMQHGLV	SEDFERQLAY	YATTWTSKDI	LKVLAMMPGN
CTGAG19	AVDAVMFQQM	QTVAMQHGLV	SEDFERQLAY	YATTWTSKDI	LEVLAMMPGN
CTGAG14	AVDAVMFQQM	QTVAMQHGLV	SEDFERQLAY	YATTWTSKDI	LEVLAMMPGN
CTGAG13	AVDAVMFQQM	QTVAMQHGLV	SEDFERQLAY	YATTWTSKDI	LEVLAMMPGN
CTGAG11	AVDAVMFQQM	QTVAMQHGLV	SEDFERQLAY	YATTWTSKDI	LEVLAMMPGN
CSGAG14	AVDAVMFQQM	QTVAMQHGLV	SEDFERQLAY	YATTWTSKDI	LEVLAMMPGN
CSGAG10	AVDAVMFQQM	QTVAMQHGLV	SEDFERQLAY	YATTWTSKDI	LEVLAMMPGN
CSGAG03	AVDAVMFQQM	QTVAMQHGLV	SEDFERQLAY	YATTWTSKDI	LEVLAMMPGN
CTGAG15	AVDAVRFQQM	QTVAMQHGLV	SEDFERQLAY	YATTWTSKDI	LEVLAMMPGN
CSGAG01	AVDAVMFQQM	QTVAMQHGLV	SEDFERQLAY	YATTWTSKDI	LEVLAMMPGN
CSGAG06	AVDSVMFQQM	QTVAMQHGLV	SEDFERQLAY	YATTWTSKDI	LEVLAMMPGN
CAEV-Cork	AVDSVMFQQM	QTVAMQHGLV	SEDFERQLAY	YATTWTSKDI	LEVLAMMPGN
MVV-SA	AVESVTFQQM	QTVAMQHGLV	SEDFERQLAY	YATTWTSKDI	LEVLAMMPGN
MVV1514	AVESVVFQQM	QTVAMQHGLV	SEDFERQLAY	YATTWTSKDI	LEVLAMMPGN
MVV-EV1	AVDSVVFQQM	QTVAMQHGLV	SEDFERQLAY	YATTWTSKDI	LEVLAMMPGN
	51				100
AJ305042	RAQKELIQGK	LNEEAERWRR	NNPPPPQGGG	LTVDQIMGIG	QTNQAAAQAN
CSGAG19	SAQKELIQGK	LNEEAERWRR	NNPPPPQGGG	LTVDQIMGIG	QTNQAAAQAN
CTGAG16	RAQKELIQGK	LNEEAERWRR	NNPPPPQGGG	LTVDQIMGIG	QTNQAAAQAN
CTGAG22	RAQKELIQGK	LNEEAERWRR	NNPPPPQGGG	LTVDQIMGIG	QTNQAAAQAN
CSGAG17	RAQKELIQGK	LNEEAERWRR	NNPPPPQGGG	LTVDQIMGIG	QTNQAAAQAN
CTGAG19	RAQKELIQGK	LNEEAERWRR	NNPPPPQGGG	LTVDQIMGIG	QTNQAAAQAN
CTGAG14	RAQKELIQGK	LNEEAERWRR	NNPPPPQGGG	LTVDQIMGIG	QTNQAAAQAN
CTGAG13	RAQKELIQGK	LNEEAERWRR	NNPPPPQGGG	LTVDQIMGIG	QTNQAAAQAN
CTGAG11	RAQKELIQGK	LNEEAERWRR	NNPPPPQGGG	LTVDQIMGIG	QTNQAAAQAN
CSGAG14	RAQKELIQGK	LNEEAERWRR	NNPPPPQGGG	LTVDQIMGIG	QTNQAAAQAN
CSGAG10	RAQKELIQGK	LNEEAERWRR	NNPPPPQGGG	LTVDQIMGIG	QTNQAAAQAN
CSGAG03	RAQKELIQGK	LNEEAERWRR	NNPPPPQGGG	LTVDQIMGIG	QTNQAAAQAN
CTGAG15	RAQKELIQGK	LNEEAERWRR	NNPPPPQGGG	LTVDQIMGIG	QTNQAAAQAN
CSGAG01	RAQKELIQGK	LNEEAERWRR	NNPPPPQGGG	LTVDQIMGTG	QTNQAAAQAN
CSGAG06	RAQKELIQGK	LNEEAERWRR	NNPPPPQGGG	LTVDQIMGIG	QTNQAAAQAN
CAEV-Cork	RAQKELIQGK	LNEEAERWRR	NNPPPPAGGG	LTVDQIMGVG	QTNQAAAQAN
MVV-SA	RAQKELIQGK	LNEEAERWVR	QNPPGP..NV	LTVDQIMGVG	QTNQQASQAN
MVV1514	RAQKELIQGK	LNEEAERWVR	QNPPGP..NV	LTVDQIMGVG	QTNQQASQAN
MVV-EV1	RAQKELIQGK	LNEEAERWVR	QNPPGP..NV	LTVDQIMGVG	QTNQQASQAN

Figura 15. continua

	20	*	140	*	160	*	
AJ305042	:	.....	.....	.....	.....L.....	.....	: 177
CSGAG19	:	.....S.....	.....	.....	.....	.....	: 177
CTGAG16	:	.....	.....	.....	.....I.....	.....	: 177
CTGAG22	:	.....	.....	.....	.....	.....	: 177
CSGAG17	:	.....	.....	.....	.....	.....	: 177
CTGAG19	:	.....	.....	.....	.....	.....	: 177
CTGAG14	:	.....	.....	.....	.....	.....	: 177
CTGAG13	:	.....	.....	.....	.....	.....	: 177
CTGAG11	:	.....	.....	.....	.....	.....	: 177
CSGAG14	:	.....	.....	.....	.....	.....	: 177
CSGAG10	:	.....	.....	.....	.....	.....	: 177
CSGAG03	:	.....	.....	.....	.....	.....	: 177
CTGAG15	:	.....	.....	.....	.....H.....	.....	: 177
CSGAG01	:	.....	.....	.....	.....	.....	: 177
CSGAG06	:	.....	.....	.....	.....	.....	: 177
CAEV-Cork	:	.....	.....D.....R.....	.....	.....	.....A.....	: 177
MVV-SA	:	.....S.....I.....NS.S.....D.I.R.....T.....D.....T.....V.....F.....T.....	.....	.....	.....	.....	: 175
MVV1514	:	.....S.....NT.S.....D.I.R.....D.....T.....V.....T.....	.....	.....	.....	.....	: 175
MVV-EV1	:	.....S.....NT.S.....D.I.R.....D.....T.F.SDSA.....T.....	.....	.....	.....	.....	: 175
							VRHMAHRPGNPMLVKQKTNEPYEEFAAKLLEAIDAEPVTQPIKDYLLKLTLSYTNASSDC
	180	*					
AJ305042	:	.....	.....	.....	.....	.....	: 195
CSGAG19	:	.....	.....	.....	.....	.....	: 195
CTGAG16	:	.....	.....	.....	.....	.....	: 195
CTGAG22	:	.....	.....	.....	.....	.....	: 195
CSGAG17	:	.....	.....	.....	.....	.....	: 195
CTGAG19	:	.....	.....	.....	.....	.....	: 195
CTGAG14	:	.....	.....	.....	.....	.....	: 195
CTGAG13	:	.....	.....	.....	.....	.....	: 195
CTGAG11	:	.....	.....	.....	.....	.....	: 195
CSGAG14	:	.....	.....	.....	.....	.....	: 195
CSGAG10	:	.....	.....	.....	.....	.....	: 195
CSGAG03	:	.....	.....	.....	.....	.....	: 195
CTGAG15	:	.....	.....	.....	.....	.....	: 195
CSGAG01	:	.....	.....	.....	.....	.....	: 195
CSGAG06	:	.....M.....	.....	.....	.....	.....	: 195
CAEV-Cork	:	.....T.....E.....	.....	.....	.....	.....	: 195
MVV-SA	:	.....T.....E.....	.....	.....	.....	.....	: 193
MVV1514	:	.....T..T.....T.E.....	.....	.....	.....	.....	: 193
MVV-EV1	:	.....N.....E.....	.....	.....	.....	.....	: 193
							QKQMDRVLGQRVQQASVD

**Figura 15.** Alinhamento das seqüências de aminoácidos, após a tradução das seqüências de nucleotídeos do gene *gag* do CAEV, obtidas a partir dos clones analisados. Uma deleção de dois resíduos é observada nos isolados de MVV (grifado cinza).

Para o gene *gag* de MVV, das 45 seqüências obtidas inicialmente, 12 apresentaram similaridade aos SRLVs e destas foram geradas 10 seqüências consenso, sendo 03 provenientes de cultivo primário e 07 de cultivo transformado (Figura 16).

Semelhante ao realizado anteriormente, as seqüências de nucleotídeos do fragmento analisado do gene *gag*, foram traduzidas. As seqüências de aminoácidos obtidas foram alinhadas e igualmente verificou-se a existência de uma deleção de dois resíduos, em todas as amostras de MVV.

		*	20	*	40	*	6	
MVV-SA	:	..E..T.....						L..... : 59
MVV1514	:	..E.....						L..... : 59
MTGAG07	:	.....						..... : 59
MTGAG02	:	.....						..... : 59
MTGAG10	:	.....						..... : 59
MTGAG19	:	.....						..... : 59
MSGAG09	:	.....						..... : 59
MSGAG07	:	.....						..... : 59
MTGAG01	:	.....						..... : 59
MTGAG13	:	.....						..... : 59
MSGAG19	:	.....						..... : 59
MTGAG20	:	.....G.....						V..... : 59
AJ305039	:	.....						V..... : 59
MVV-EV1	:	.....						L..... : 59
CAEV-Cork	:	.....M.....						L..... : 59
		AVDSVVFQQLQTVAMQHGLVSEDFERQMAYYATTWTSKDILEVLAMMPGNRAQKELIQG						
		0	*	80	*	100	*	1
MVV-SA	:	.....						P.....S : 116
MVV1514	:	.....						P.....I.....S : 116
MTGAG07	:	.....						..... : 116
MTGAG02	:	.....						..... : 116
MTGAG10	:	.....						..... : 116
MTGAG19	:	.....						..... : 116
MSGAG09	:	.....						..... : 116
MSGAG07	:	.....						..... : 116
MTGAG01	:	.....						..... : 116
MTGAG13	:	.....						..... : 116
MSGAG19	:	.....						..... : 116
MTGAG20	:	.....						..... : 116
AJ305039	:	.....						..... : 116
MVV-EV1	:	.....						P.....R.E..... : 116
CAEV-Cork	:	.....R.N...PPA..G.....						A.A.....I.....N..... : 118
		KLNEEAERWVRQNPPGQNGGVLTVDQIMGVGQTNQQASQANMDQARQLCLQWVITALRA						

Figura 16. continua

	20	*	140	*	160	*	
MVV-SA	:	.....I.....S..Y.....T.....F.....	:	175			
MVV1514	:	.....T..Y.....	:	175			
MTGAG07	:	.....A.....	:	175			
MTGAG02	:	.....A.....	:	175			
MTGAG10	:	.....A.....	:	175			
MTGAG19	:	.....A.....	:	175			
MSGAG09	:	.....A.....	:	175			
MSGAG07	:	.....A.....	:	175			
MTGAG01	:	.....	:	175			
MTGAG13	:	.....	:	175			
MSGAG19	:	.....	:	175			
MTGAG20	:	.....	:	175			
AJ305039	:	.....Y.....K.....	:	175			
MVV-EV1	:	.....T..Y.....F.SDSA.....	:	175			
CAEV-Cork	:	.....A.....T..PY...A.....Q...D...L.....A..	:	177			
		VRHMSHRPGNPMLVKQKNNESFEDFIARLLEAIDAEPVTDPIKTYLKVTLSTYTNASTDC					
	180	*					
MVV-SA	:	.....T.....S..	:	193			
MVV1514	:	.....T..T.....	:	193			
MTGAG07	:	.....	:	193			
MTGAG02	:	.....	:	193			
MTGAG10	:	.....	:	193			
MTGAG19	:	.....	:	193			
MSGAG09	:	.....	:	193			
MSGAG07	:	.....	:	193			
MTGAG01	:	.....	:	193			
MTGAG13	:	.....	:	193			
MSGAG19	:	.....	:	193			
MTGAG20	:	.....	:	193			
AJ305039	:	.....G.....A.....	:	193			
MVV-EV1	:	.....S..	:	193			
CAEV-Cork	:	.....T..Q.....S..	:	195			
		QKQMDRVLGNRVQQATVE					

**Figura 16.** Alinhamento das seqüências de aminoácidos do fragmento de Gag do MVV, obtidas a partir dos clones analisados. Em cinza aparece uma deleção comum a todas as amostras de maedi-visna.

Para a região LTR foram obtidas 26 seqüências para o Maedi-Visna e, de forma semelhante a anterior, 06 foram descartadas por não pertencerem aos SRLVs. Das 20 seqüências restantes, 11 originaram-se das células MSO<sub>50</sub> e 09 das TMSOpSV1.

Quanto ao LTR de CAEV, 16 seqüências, das 19 iniciais, mostraram-se relacionadas aos SRLV. Destas, foram geradas 6 seqüências consenso sendo 2 de células secundárias e 4 de células transformadas.

## 4.5 Análise Filogenética

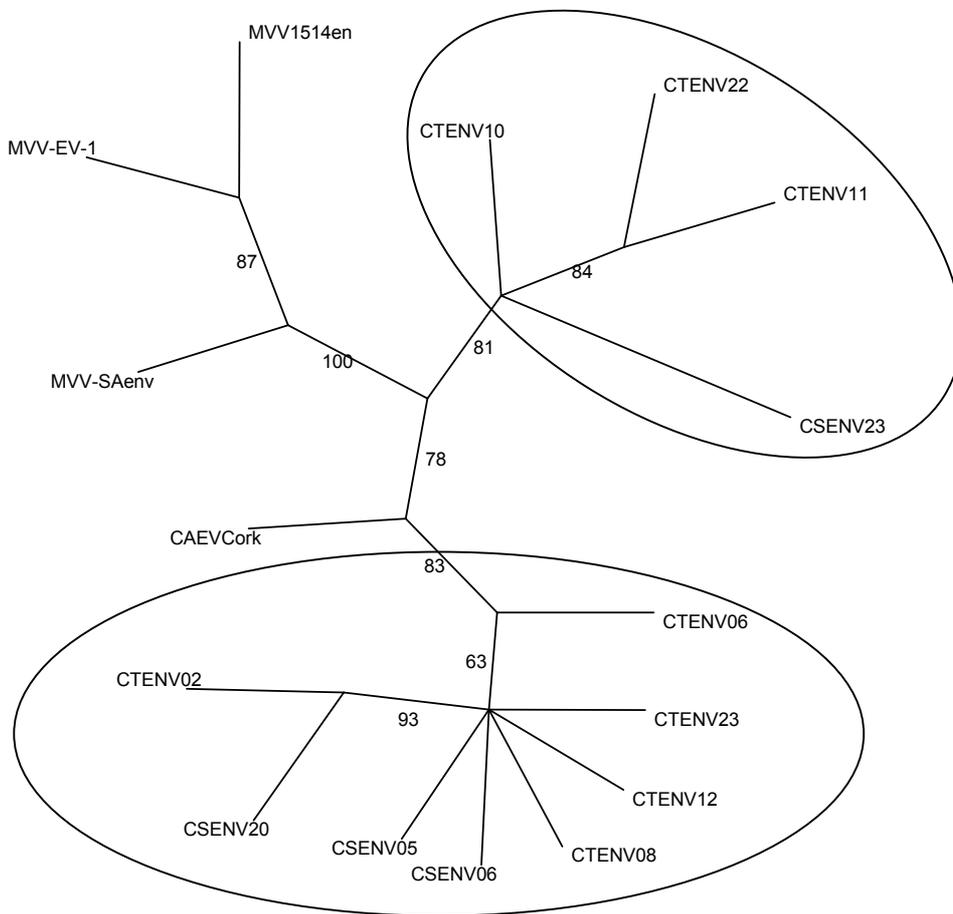
Após a obtenção das seqüências consenso foi realizado o alinhamento das mesmas buscando-se encontrar diferenças a fim de verificar a existência de seleção de amostras ou não, conforme o tipo de célula utilizado. Utilizando o programa PHYLIP, as seqüências foram analisadas pelo método da probabilidade máxima (*Maximum Likelihood* - ML), gerando-se então as árvores filogenéticas para as diferentes seqüências obtidas, os diferentes vírus e tipos de célula utilizados.

### 4.5.1 Gene *env*

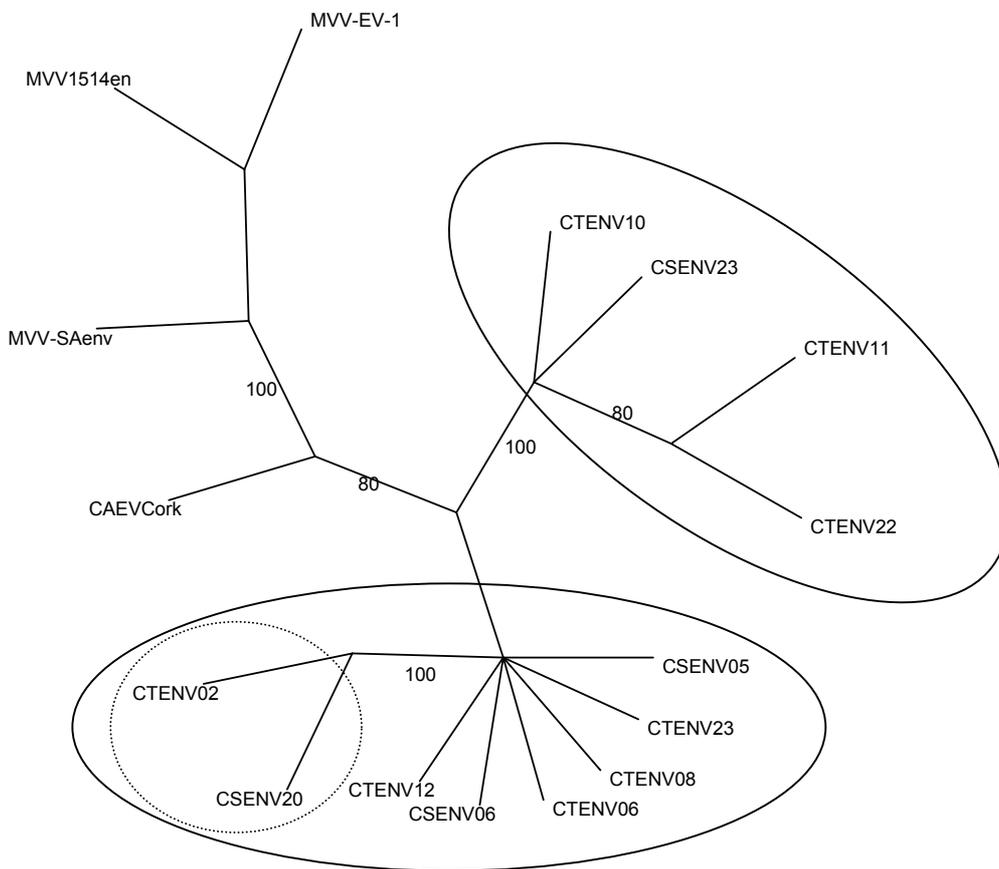
Analisando-se a seqüência de nucleotídeos, correspondente ao fragmento do gene *env*, das amostras de SRLVs utilizadas, observamos que não houve o aparecimento de populações virais distintas após a inoculação em células MSO<sub>50</sub> ou TMSOpSV1. A árvore filogenética gerada a partir dos clones de CAEV mostra que não houve uma seleção entre os clones provenientes dos diferentes tipos de células. As amostras padrões do vírus Maedi-Visna mostraram-se agrupadas enquanto a amostra padrão do CAEV (CAEV-Cork) apresentou-se mais relacionada às amostras utilizadas no presente trabalho (Figura 17).

Com o objetivo de verificar se o padrão observado na seqüência de nucleotídeos, mostrava-se semelhante as seqüência de aminoácidos, as seqüências foram traduzidas e alinhadas. Após o alinhamento foi gerada uma árvore filogenética (Figura 18) com um padrão de concordância semelhante ao observado com a seqüência de nucleotídeos.

Embora não tenha sido possível agrupar as seqüências de acordo com o tipo de célula utilizado, pode-se observar a formação de sub-grupos, tanto na seqüência de nucleotídeos quanto na de aminoácidos.



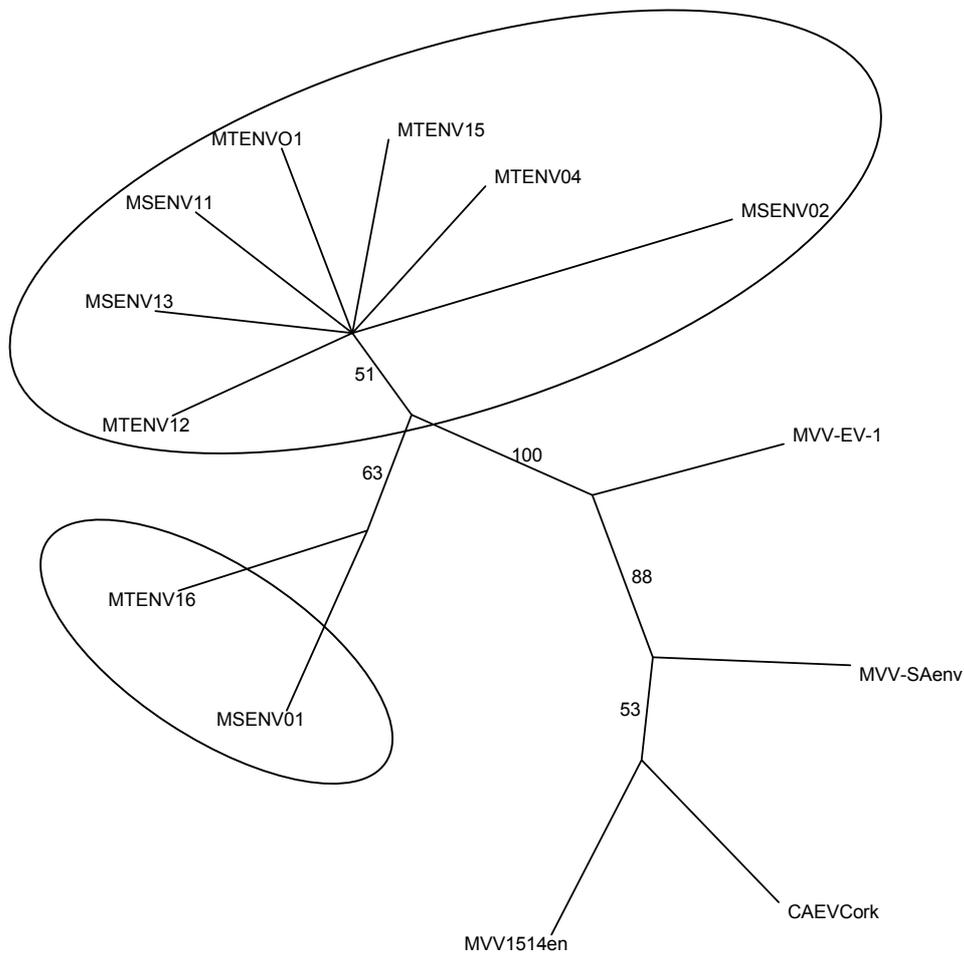
**Figura 17.** Árvore filogenética construída pelo método *Maximum Likelihood* a partir de seqüências do gene *env*, do CAEV inoculado em células MSO<sub>50</sub> e TMSOpSV1. Os valores presentes nas bifurcações representam o valor de *bootstrap* (100 interações). As linhas demarcam sub-grupos.



**Figura 18.** Árvore filogenética construída pelo método *Maximum Likelihood* a partir das seqüências de aminoácidos de Env do CAEV. Os valores presentes nas bifurcações representam o valor de *bootstrap* (100 interações). As linhas demarcam sub-grupos.

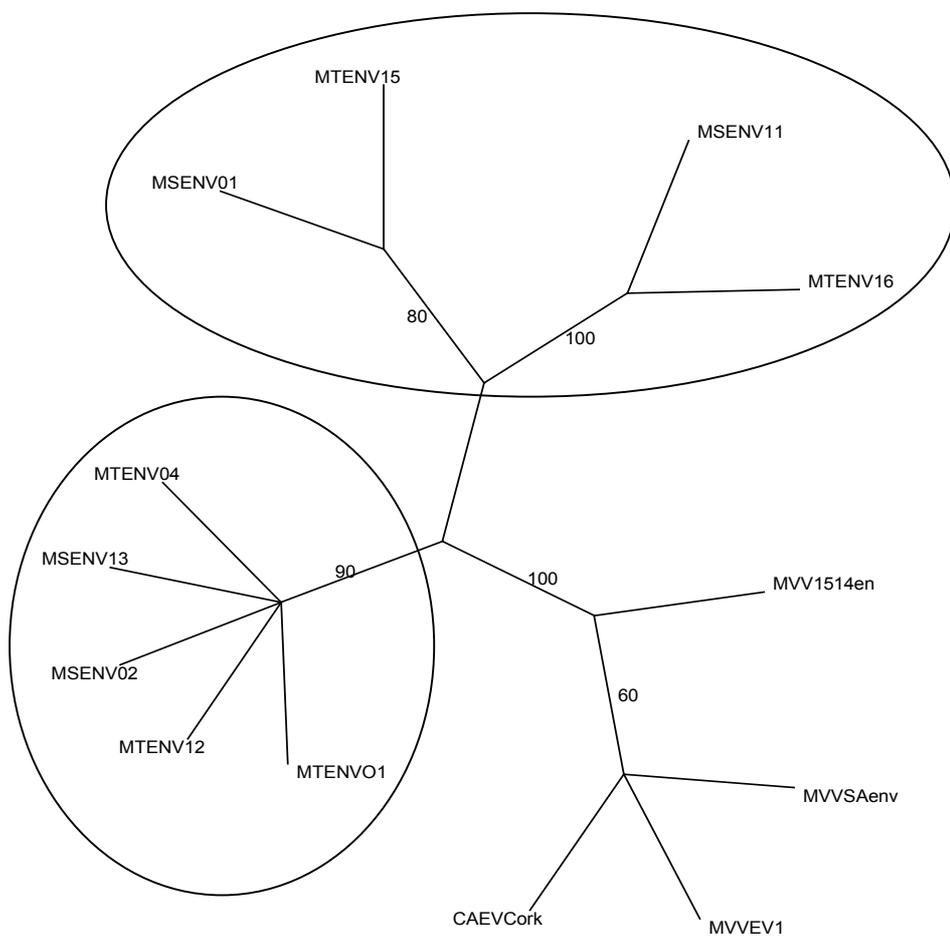
Semelhante ao observado com o vírus da artrite encefalite caprina, não foi possível separar populações distintas (Figura 19) para as seqüências obtidas a partir da

inoculação do MVV, nos diferentes tipos de células. As seqüências de MVV mostraram-se relacionadas as amostras padrões.



A árvore gerada a partir das seqüências de aminoácidos de Env do MVV (Figura 20) também apresentou semelhança ao observado com as seqüências de nucleotídeos,

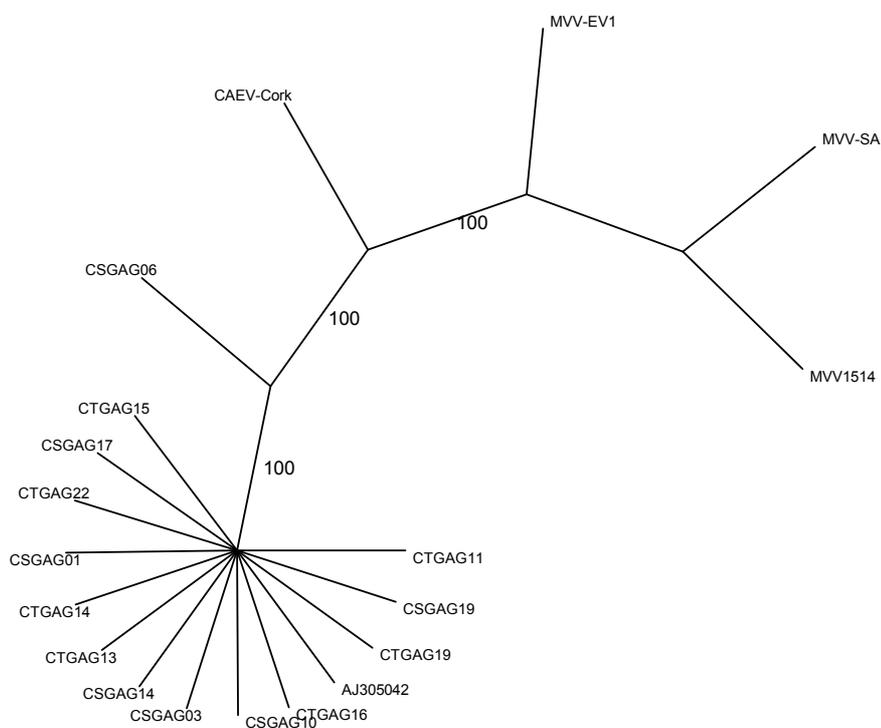
ou seja, não foi possível separar populações distintas dos clones provenientes de células MSO<sub>50</sub> ou TMSOpSV1 inoculados com o vírus MVV. As amostras padrões, tanto do MVV como do CAEV formaram um grupo distinto das amostras utilizadas no trabalho. Entre as amostras obtidas neste trabalho, pode-se observar a formação de três subgrupos com altos valores de concordância.



**Figura 20.** Árvore filogenética construída pelo método *Maximum Likelihood* a partir das seqüências de aminoácidos de Env do MVV. Os valores presentes nas bifurcações representam o valor de *bootstrap* (100 interações). As linhas demarcam sub-grupos.

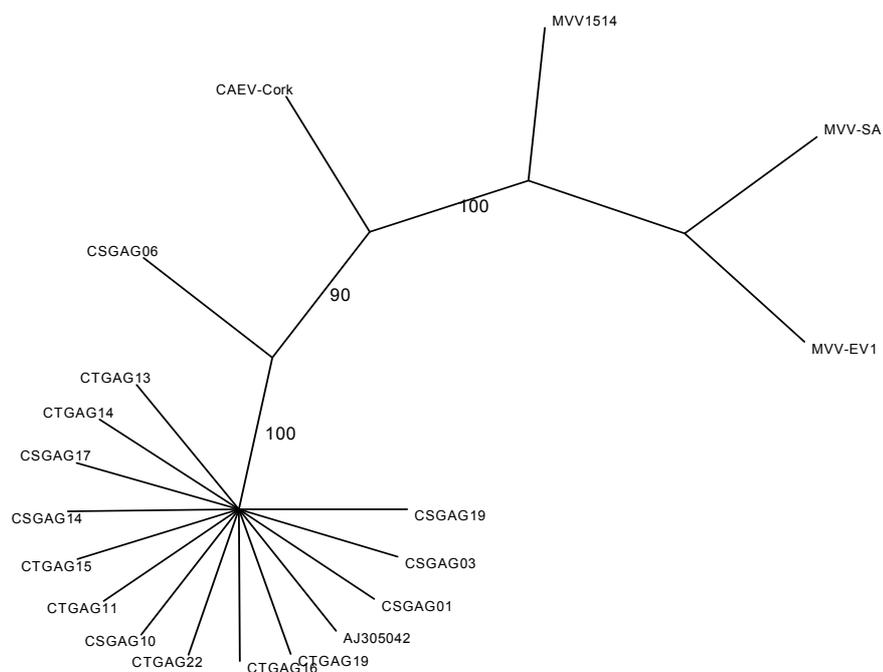
#### 4.5.2 Gene *gag*

Para a análise do gene *gag* do CAEV, foi incluído no alinhamento a seqüência AJ305042. Esta seqüência corresponde ao mesmo isolado (C767) e aos mesmos fragmentos utilizados, e foi descrito por Ravazzolo *et al.* (2001), antes da geração das seqüências que deram origem a este trabalho.



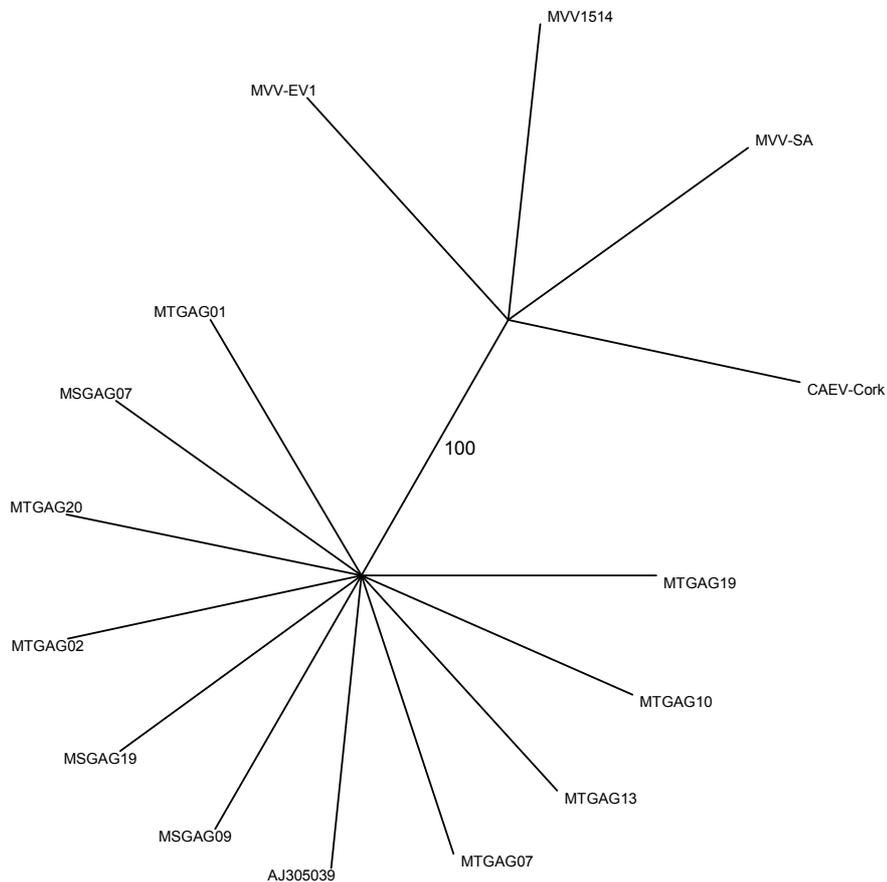
**Figura 21.** Árvore filogenética construída pelo método *Maximum Likelihood* a partir das seqüências de nucleotídeos do gene *gag* do CAEV. Os valores presentes nas bifurcações representam o valor de *bootstrap* (100 interações).

Quando as seqüências provenientes do gene *gag* foram analisadas, observou-se que além de não ocorrer a formação de grupos distintos, conforme o tipo de célula utilizado, as mesmas mostraram-se muito mais relacionadas, com altos valores de *bootstrap*, formando um grupo homogêneo (Figura 21).



**Figura 22.** Árvore filogenética construída pelo método *Maximum Likelihood* a partir das seqüências de aminoácidos da seqüência de Gag do CAEV. Os valores presentes nas bifurcações representam o valor de *bootstrap* (100 interações).

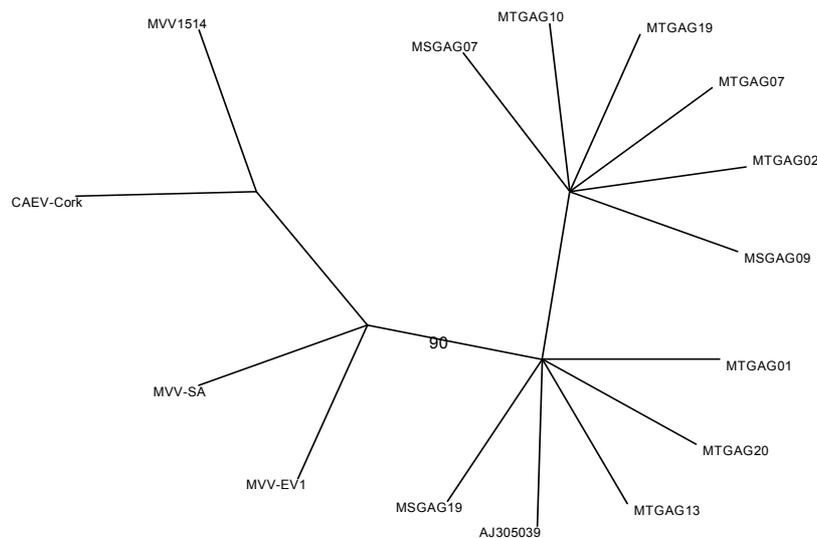
Para a análise da seqüência de aminoácidos, a seqüência de nucleotídeos das amostras utilizadas e da amostra AJ305042 foram traduzidas. A árvore gerada a partir da seqüências de aminoácidos de Gag do CAEV (Figura 22), mostrou-se com topologia semelhante a observada na Figura 21. Uma amostra (CSGAG06) mostrou uma concordância de 100%, na seqüência de nucleotídeos, com as amostras padrões.



**Figura 23.** Árvore filogenética construída pelo método *Maximum Likelihood* a partir das seqüências de nucleotídeos do *gag* do MVV. Os valores presentes nas bifurcações representam o valor de *bootstrap* (100 interações).

A árvore obtida a partir do gene *gag* do MVV (Figura 23), inoculado em diferentes tipos de células, mostrou-se com topologia similar a observada no CAEV. Desta maneira não foi possível distinguir seqüências oriundas de células MSO<sub>50</sub> ou

TMSOpSV1. Resultado semelhante foi observado na árvore gerada a partir da seqüência de aminoácidos do MVV (Figura 24).



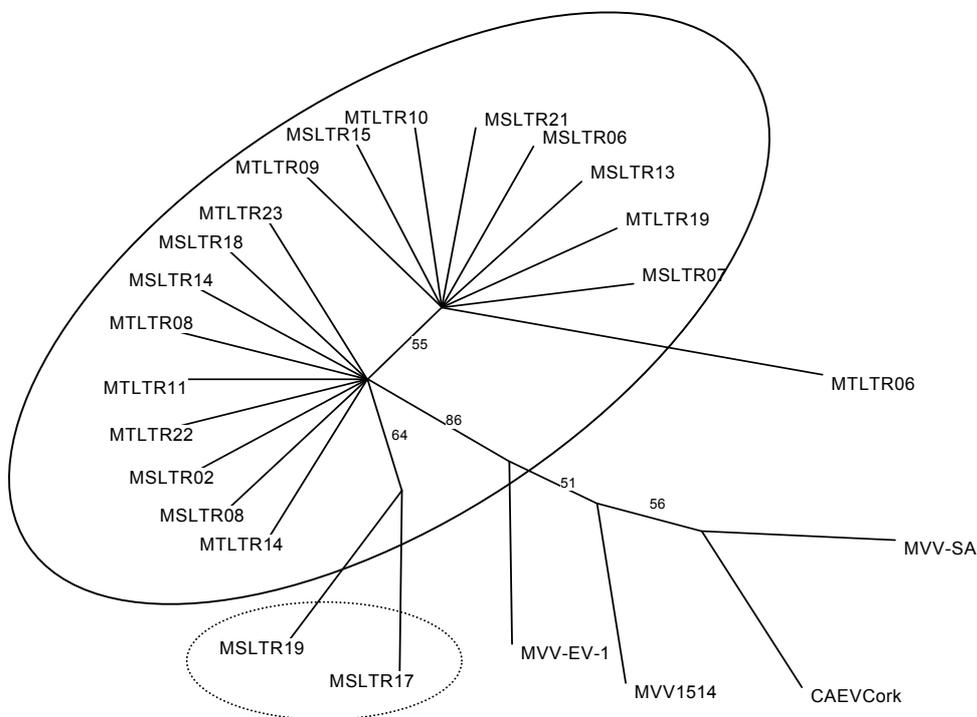
**Figura 24.** Árvore filogenética construída pelo método *Maximum Likelihood* a partir das seqüências de aminoácidos de Gag do MVV. Os valores presentes nas bifurcações representam o valor de *bootstrap* (100 interações).

Assim como foi feito com CAEV, nos alinhamentos e na construção da árvore filogenética do MVV, foi utilizada a seqüência AJ305039 já descrita anteriormente. Esta seqüência corresponde ao mesmo isolado (V27) utilizado neste trabalho bem como a mesma região de *gag* e foi descrito por Ravazzolo, *et al.* (2001).

Assim como observado no CAEV, tanto o fragmento de aminoácidos como o de nucleotídeos da seqüência AJ305039, mostraram-se altamente relacionados às amostras utilizadas neste trabalho.

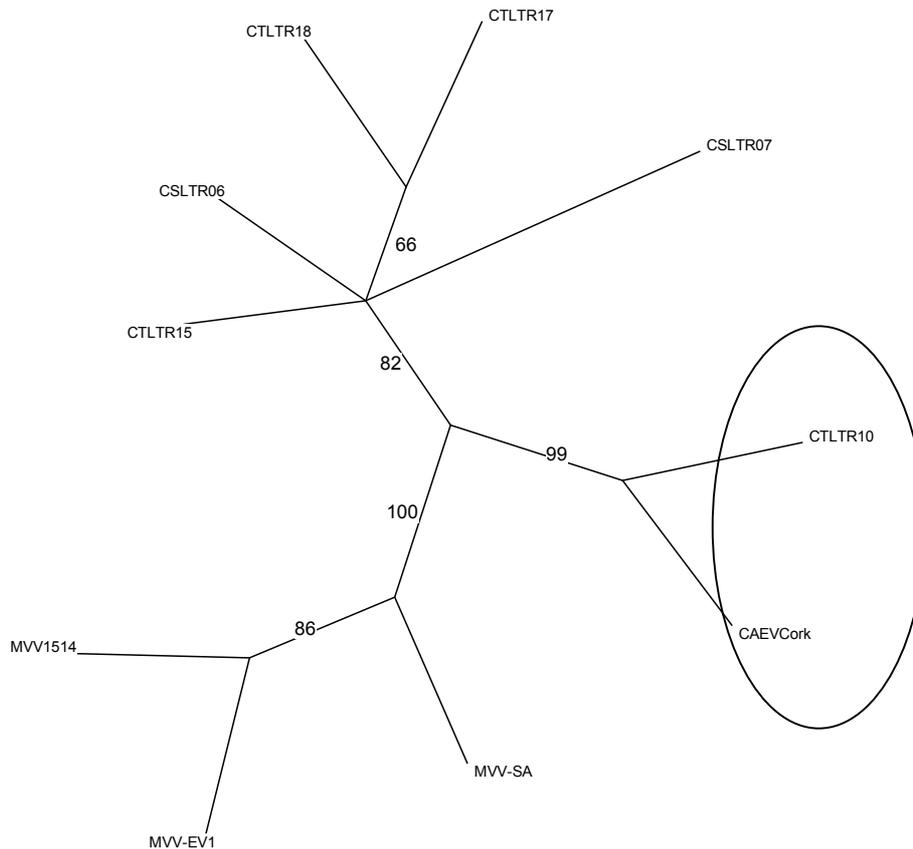
### 4.5.3 LTR (Long Terminal Repeats)

A árvore gerada a partir dos clones das seqüências de LTR do MVV, inoculadas em células MSO<sub>50</sub> ou TMSOpSV1, não geraram grupos distintos (Figura 25). Porém, dois clones provenientes de células de cultivo secundário (MSLTR17 e MSLTR19) mostram-se formando um subgrupo.



**Figura 25.** Árvore filogenética construída pelo método *Maximum Likelihood* a partir de seqüências do LTR, do MVV inoculado em células MSO<sub>50</sub> e TMSOpSV1. Os valores presentes nas bifurcações representam o valor de *bootstrap* (100 interações). Não há a formação de grupos relacionados quando considerado o tipo de célula usado (linha fechada), porém observou-se a presença de um subgrupo gerado a partir do cultivo secundário (linha pontilhada).

Na árvore gerada da seqüência de LTR do CAEV (Figura 26), um dos clones isolados (CTLTR10) apresentou uma alta homologia à amostra padrão CAEV-Cork com uma alta repetibilidade (99%) na topologia obtida. Igualmente ao observado no LTR do MVV, não foi possível separar as seqüências conforme o tipo de célula utilizado (Figura 25).



**Figura 26.** Árvore filogenética construída pelo método *Maximum Likelihood* a partir de seqüências do LTR, do CAEV inoculado em células MSO<sub>50</sub> e TMSOpSV1. Os valores presentes nas bifurcações representam o valor de *bootstrap* (100 interações). A amostra CTLTR10 mostrou-se com uma alta similaridade a seqüência CAEV-Cork.

As seqüências originadas a partir do LTR do MVV, tanto de células MSO<sub>50</sub> como de TMSOpSV1, foram alinhadas e submetidas ao programa TFSEARCH, para busca de regiões de ligação a fatores de transcrição celulares (Figura 27).

A análise destas seqüências mostrou que não há uma separação clara entre amostras inoculadas nos diferentes tipos celulares com relação as regiões de ligação a fatores de transcrição celular.

Foram observadas seqüências fixadoras das proteínas ativadoras AP-1, AP-4, do fator NFkB, da seqüência TATAA box e da proteína p300. Igualmente, uma região de fixação do fator GATA-1 foi observada.

Durante a análise, pode ser observada a presença de uma seqüência diferenciada na amostra padrão MVVK1514 (posição 169 a 180 da Figura 27). Esta seqüência quando submetida ao programa TFSEARCH, não apresentou homologia com nenhuma seqüência conhecida, presente no banco de dados do programa. Por outro lado, uma deleção de 13 nucleotídeos nas amostras de MVV (posição 265 a 277 na Figura 27) pode ser observada em relação a amostra CAEV padrão.

Outro fato observado é a presença de uma seqüência AP-4 entre as seqüências AP-1, mas somente nas seqüências MVV-EV1, MVV-SA e CAEV Cork. Nas demais amostras e na seqüência MVVK1514, na mesma posição, aparece uma seqüência diferente das descritas para o fator AP-4 no banco de dados do programa TFSEARCH.

	1					50
MSLTR06	.....	.....	.....	.....	.....	TTCCGC
MSLTR07	.....	.....	.....	.....	.....	TTCCGC
MSLTR13	.....	.....	.....	.....	.....	TTCCGC
MSLTR15	.....	.....	.....	.....	.....	TTCCGC
MSLTR21	.....	.....	.....	.....	.....	TTCCGC
MTLTR10	.....	.....	.....	.....	.....	TTCCGC
MTLTR06	.....	.....	.....	.....	.....	TTCCGC
MTLTR09	.....	.....	.....	.....	.....	TTCCGC
MTLTR19	.....	.....	.....	.....	.....	TTCCGC
MSLTR14	.....	.....	.....	.....	.....	TTCCGC
MSLTR02	.....	.....	.....	.....	.....	TTCCGC
<b>MVV1514</b>	.....	.....	.....	.....	.....	TTCTGC
MSLTR08	.....	.....	.....	.....	.....	TTCCGC
MSLTR18	.....	.....	.....	.....	.....	TTCCGC
MTLTR23	.....	.....	.....	.....	.....	TTCCGC
MTLTR22	.....	.....	.....	.....	.....	TTCCGC
MTLTR14	.....	.....	.....	.....	.....	TTCCGC
MTLTR11	.....	.....	.....	.....	.....	TTCCGC
MTLTR08	.....	.....	.....	.....	.....	TTCCGC
MSLTR19	.....	.....	.....	.....	.....	TTCCAC
MSLTR17	.....	.....	.....	.....	.....	CATAAC
<b>MVV-EV-1</b>	.....	.....	.....	.....	.....	.....
<b>MVV-SA</b>	.....	.....	.....	.....	.....	TTCCGC
<b>CAEVCork</b>	.....	.....	.....	.....	.....	TGCTG
	51					100
		<b>AP-1</b>	<b>AP-4</b>	<b>GATA-1</b>	<b>AP-1</b>	
MSLTR06	TTAAATGCGC	TAAGTCATGT	AGCAGCTGAT	GCTTAAGTCA	TAACCGCAAT	
MSLTR07	TTAAATGCGC	TAAGTCATGT	AGCAGCTGAT	GCTTAAGTCA	TAACCGCAAT	
MSLTR13	TTAAATGCGC	TAAGTCATGT	AGCAGCTGAT	GCTTAAGTCA	TAACCGCAAT	
MSLTR15	TTAAATGCGC	TAAGTCATGT	AGCAGCTGAT	GCTTAAGTCA	TAACCGCAAT	
MSLTR21	TTAAATGCGC	TAAGTCATGT	AGCAGCTGAT	GCTTAAGTCA	TAACCGCAAT	
MTLTR10	TTAAATGCGC	TAAGTCATGT	AGCAGCTGAT	GCTTAAGTCA	TAACCGCAAT	
MTLTR06	TTAAATGCGC	TAAGTCATGT	AGCAGCTGAT	GCTTAAGTCA	TAACCGCAAT	
MTLTR09	TTAAATGTGC	TAAGTCATGT	AGCAGCTGAT	GCTTAAGTCA	TAACCGCAAT	
MTLTR19	TTAAATGTGC	TAAGTCATGT	AGCAGCTGAT	GCTTAAGTCA	TAACCGCAAT	
MSLTR14	TTAAATGTGC	TAAGTCATGT	AGCAGCTGAT	GCTTAAGTCA	TAACCGCAAT	
MSLTR02	TTAAATGCGC	TAAGTCATGT	AGCAGCTGAT	GCTTAAGTCA	TAACCGCAAT	
<b>MVV1514</b>	TTTTTTGCGC	TGAGTCATGT	AGCAGCTGAT	GGTTAAGTCA	TAACCGCAGA	
MSLTR08	TTAAATGCGC	TAAGTCATGT	AGCAGCTGAC	GCTTAAGTCA	TAACCGCAAT	
MSLTR18	TTAAATGCGC	TAAGTCATGT	AGCAGCTGAT	GCTTAAGTCA	TAACCGCAAT	
MTLTR23	TTAAATGCGC	TAAGTCATGT	AGCAGCTGAT	GCTTAAGTCA	TAACCGCAAT	
MTLTR22	TTAAATGCGC	TAAGTCATGT	AGCAGCTGAT	GCTTAAGTCA	TAACCGCAAT	
MTLTR14	TTAAATGCGC	TAAGTCATGT	AGCAGCTGAT	GCTTAAGTCA	TAACCGCAAT	
MTLTR11	TTAAATGCGC	TAAGTCATGT	AGCAGCTGAT	GCTTAAGTCA	TAACCGCAAT	
MTLTR08	TTAAATGCGC	TAAGTCATGT	AGCAGCTGAT	GCTTAAGTCA	TAACCGCAAT	
MSLTR19	TTAAATGCGC	TAAGTCATGT	AGCAGCTGAT	GCTTAAGTCA	TAACCGCAAT	
MSLTR17	CGCAATGCGC	TAAGTCATGT	AGCAGCTGAT	GCTTAAGTCA	TAACCGCAAT	
<b>MVV-EV-1</b>	.....GCG	GT	ATCAGCTGAT	GCTTAAGTCA	TAACCACAAT	
<b>MVV-SA</b>	TTGTAAACGC	TAAATCATGT	ATCAGCTGAT	GCTTAAGTCA	TAACCGCAAT	
<b>CAEVCork</b>	ACAGATGTAA	CAGCTGACAT	ATCAGCTGAT	GCTT GCTCA	TG.CTGACAC	

Figura 27 continua

	TATA box			AP-1	R +1
	101				150
MSLTR06	TGTAAAC..A	AGTGCCTTAT	AAA.AGCTGC	TTGCTGGATG	AGTTAAGGCA
MSLTR07	TGTAAAC..A	AGTGCCTTAT	AAA.AGCTGC	TTGCTGGATG	AGTTAAGGCA
MSLTR13	TGTAAAC..A	AGTGCCTTAT	AAA.AGCTGC	TTGCTGGATG	AGTTAAGGCA
MSLTR15	TGTAAAC..A	AGTGCCTTAT	AAA.AGCTGC	TTGCTGGATG	AGTTAAGGCA
MSLTR21	TGTAAAC..A	AGTGCCTTAT	AAA.AGCTGC	TTGCTGGATG	AGTTAAGGCA
MTLTR10	TGTAAAC..A	AGTGCCTTAT	AAA.AGCTGC	TTGCTGGATG	AGTTAAGGCA
MTLTR06	TGTAAAC..A	AGTGCCTTAT	AAA.AGCTGC	TTGCTGGATG	AGTTAAGGCA
MTLTR09	TGTAAAC..A	AGTGCCTTAT	AAA.AGCTGC	TTGCTGGATG	AGTTAAGGCA
MTLTR19	TGTAAAC..A	AGTGCCTTAT	AAA.AGCTGC	TTGCTGGATG	AGTTAAGGCA
MSLTR14	TGTAAAC..A	AGTGCCTTAT	AAA.AGCTGC	TTGCTGGCTG	AGTTAAGGCA
MSLTR02	TGTAAAC..A	AGTGCCTTAT	AAA.AGCTGC	TTGCTGGCTG	AGTTAAGGCA
<b>MVV1514</b>	TGTAAAC..A	AGTTGCCTAT	ATA.AGCCGC	TTGCTAGCTG	<b>GGGAAAAGCA</b>
MSLTR08	TGTAAAC..A	AGTGCCTTAT	AAA.AGCTGC	TTGCTGGCTG	AGTTAAGGCA
MSLTR18	TGTAAAC..A	AGTGCCTTAT	AAA.AGCTGC	TTGCTGGCTG	AGTTAAGGCA
MTLTR23	TGTAAAC..A	AGTGCCTTAT	AAA.AGCTGC	TTGCTGGCTG	AGTTAAGGCA
MTLTR22	TGTAAAC..A	AGTGCCTTAT	AAA.AGCTGC	TTGCTGGCTG	AGTTAAGGCA
MTLTR14	TGTAAAC..A	AGTGCCTTAT	AAA.AGCTGC	TTGCTGGCTG	AGTTAAGGCA
MTLTR11	TGTAAAC..A	AGTGCCTTAT	AAA.AGCTGC	TTGCTGGCTG	AGTTAAGGCA
MTLTR08	TGTAAAC..A	AGTGCCTTAT	AAA.AGCTGC	TTGCTGGCTG	AGTTAAGGCA
MSLTR19	TGTAAAC..A	AGTGCCTTAT	AAA.AGCTGC	TTGCTGGCTG	AGTTAAGGCA
MSLTR17	TGTAAAC..A	AGTGCCTTAT	AAA.AGCTGC	TTGCTGGCTG	AGTTAAGGCA
<b>MVV-EV-1</b>	TGTAAAC..A	TGCTGCCTAT	AAA.AGCTGC	TTGCTCGCTG	<b>.GTTGAGGCA</b>
<b>MVV-SA</b>	TGTAAAC..A	AGTTGCCTAT	AAA.AGCTGC	TTGCTAGCTG	<b>GGAGAGATCA</b>
<b>CAEVCork</b>	TGTAGCTCTG	AGCTGTATAT	AAGGAGAAGC	TTGCTGCTTG	<b>...CACTTCA</b>
				<b>NFκB</b>	
	151				200
MSLTR06	GAGTGCTTGG	GAGAACTC..	.....	TCCCTGGCCT	CTCCTGCCTG
MSLTR07	GAGTGCTTGG	GAGAACTC..	.....	TCCCTGGCCT	CTCCTGCCTG
MSLTR13	GAGTGCTTGG	GAGAACTC..	.....	TCCCTGGCCT	CTCCTGCCTG
MSLTR15	GAGTGCTTGG	GAGAACTC..	.....	TCCCTGGCCT	CTCCTGCCTG
MSLTR21	GAGTGCTTGG	GAGAACTC..	.....	TCCCTGGCCT	CTCCTGCCTG
MTLTR10	GAGTGCTTGG	GAGAACTC..	.....	TCCCTGGCCT	CTCCTGCCTG
MTLTR06	GAGTGCTTGG	GAGAACTC..	.....	TCCCTGGCCT	CTCCTGCCTG
MTLTR09	GAGTGCTTGG	GAGAACTC..	.....	TCCCTGGCCT	CTCCTGCCTG
MTLTR19	GAGTGCTTGG	GAGAACTC..	.....	TCCCTGGCCT	CTCCTGCCTG
MSLTR14	GAGTGCTTGG	GAGAACTC..	.....	TCCCTGGCCT	CTCCTGCCTG
MSLTR02	GAGTGCTTGG	GAGAACTC..	.....	TCCCTGGCCT	CTCCTGCCTG
<b>MVV1514</b>	GAGTGCTTTG	GAGAGCTCGA	<u>AGGAAAGAGT</u>	CTCCGGCCT	CTCCTGCCTG
MSLTR08	GAGTGCTTGG	GAGAACTC..	.....	TCCCTGGCCT	CTCCTGCCTG
MSLTR18	GAGTGCTTGG	GAGAACTC..	.....	TCCCTGGCCT	CTCCTGCCTG
MTLTR23	GAGTGCTTGG	GAGAACTC..	.....	TCCCTGGCCT	CTCCTGCCTG
MTLTR22	GAGTGCTTGG	GAGAACTC..	.....	TCCCTGGCCT	CTCCTGCCTG
MTLTR14	GAGTGCTTGG	GAGAACTC..	.....	TCCCTGGCCT	CTCCTGCCTG
MTLTR11	GAGTGCTTGG	GAGAACTC..	.....	TCCCTGGCCT	CTCCTGCCTG
MTLTR08	GAGTGCTTGG	GAGAACTC..	.....	TCCCTGGCCT	CTCCTGCCTG
MSLTR19	GAGTGCTTGG	GAGAACTC..	.....	TCCCTGGCCT	CTCCTGCCTG
MSLTR17	GAGTGCTTGG	GAGAACTC..	.....	TCCCTGGCCT	CTCCTGCCTG
<b>MVV-EV-1</b>	GAGTGCTTGG	GAGAGAACC.	.....C	TCCCT	GCTTG
<b>MVV-SA</b>	GAGCACTCTT	GGGAGTGGAA	.....GC	TCCCGGTCT	CTCCTGCCTG
<b>CAEVCork</b>	GAGTTCT.AG	GAGAGTCC..	.....	CTCCTAGTCT	CTCCTCTCCG

Figura 27 continua

	201					250
MSLTR06	C.....CT	GGAGA.....	AATAAAGGAG	T...TA	ACTG	AGTTCTGAGC
MSLTR07	C.....CT	GGAGA.....	AATAAAGGAG	T...TA	ACTG	AGTTCTGAGC
MSLTR13	C.....CT	GGAGA.....	AATAAAGGAG	T...TA	ACTG	AGTTCTGAGC
MSLTR15	C.....CT	GGAGA.....	AATAAAGGAG	T...TA	ACTG	AGTTCTGAGC
MSLTR21	C.....CT	GGAGA.....	AATAAAGGAG	T...TA	ACTG	AGTTCTGAGC
MTLTR10	C.....CT	GGAGA.....	AATAAAGGAG	T...TA	ACTG	AGTTCTGAGC
MTLTR06	C.....CT	GGAGA.....	AATAAAGGAG	T...TA	ACTG	AGTTCTGAGC
MTLTR09	C.....CT	GGAGA.....	AATAAAGGAG	T...TA	ACTG	AGTTCTGAGC
MTLTR19	C.....CT	GGAGA.....	AATAAAGGAG	T...TA	ACTG	AGTTCTGAGC
MSLTR14	C.....CT	GGAGA.....	AATAAAGGAG	T...TA	ACTG	AGTTCTGAGC
MSLTR02	C.....CT	GGAGA.....	AATAAAGGAG	T...TA	ACTG	AGTTCTGAGC
<b>MVV1514</b>	C.....CT	GAAAAGCTC.	AATAAAGGAG	T...TG	GCTG	ATATCTGAGC
MSLTR08	C.....CT	GGAGA.....	AATAAAGGAG	T...TA	ACTG	AGTTCTGAGC
MSLTR18	C.....CT	GGAGA.....	AATAAAGGAG	T...TA	ACTG	AGTTCTGAGC
MTLTR23	C.....CT	GGAGA.....	AATAAAGGAG	T...TA	ACTG	AGTTCTGAGC
MTLTR22	C.....CT	GGAGA.....	AATAAAGGAG	T...TA	ACTG	AGTTCTGAGC
MTLTR14	C.....CT	GGAGA.....	AATAAAGGAG	T...TA	ACTG	AGTTCTGAGC
MTLTR11	C.....CT	GGAGA.....	AATAAAGGAG	T...TA	ACTG	AGTTCTGAGC
MTLTR08	C.....CT	GGAGA.....	AATAAAGGAG	T...TA	ACTG	AGTTCTGAGC
MSLTR19	C.....CT	GGAGA.....	AATAAAGGAG	T...TA	ACTG	AGTTCTGAGC
MSLTR17	C.....CT	GGAGA.....	AATAAAGGAG	T...TA	ACTG	AGTTCTGAGC
<b>MVV-EV-1</b>	CA.....CT	GGAGAGTT..	AATAAAGGAG	T...TG	GCTG	.TTCCTGAGC
<b>MVV-SA</b>	A.....CT	GTGGAGAC..	AATAAAGGAG	T...TAC	TTT	ACAACCTGCC
<b>CAEVCork</b>	AGGAGGTACC	GAGACCTCAA	AATAAAGGAG	TGATTGCCTT		ACTGCCGAGT
	251					300
MSLTR06	TG.GCCTGGT	TATT.....	.....ATC	GGGATTCGTC		ACTAATTCCG
MSLTR07	TG.GCCTGGT	TATT.....	.....ATC	GGGATTCGTC		ACTAATTCCG
MSLTR13	TG.GCCTGGT	TATT.....	.....ATC	GGGATTCGTC		ACTAATTCCG
MSLTR15	TG.GCCTGGT	TATT.....	.....ATC	GGGATTCGTC		ACTAATTCCG
MSLTR21	TG.GCCTGGT	TATT.....	.....ATC	GGGATTCGTC		ACTAATTCCG
MTLTR10	TG.GCCTGGT	TATT.....	.....ATC	GGGATTCGTC		ACTAATTCCG
MTLTR06	TG.GCCTGGT	TATT.....	.....ATC	GGGATTCGTC		ACTAATTCCG
MTLTR09	TG.GCCTGGT	TATT.....	.....ATC	GGGATTCGTC		ACTAATTCCG
MTLTR19	TG.GCCTGGT	TATT.....	.....ATC	GGGATTCGTC		ACTAATTCCG
MSLTR14	TG.GCCTGGT	TATT.....	.....ATC	GGGATTCGTC		ACTAATTCCG
MSLTR02	TA.GCCTGGT	TATT.....	.....ATC	GGGATTCGTC		ACTAATTCCG
<b>MVV1514</b>	TT.GCCTGGT	TATT.....	.....ATC	GGGATTCGTT		ACTAATTCCG
MSLTR08	TG.GCCTGGT	TATT.....	.....ATC	GGGATTCGTC		ACTAATTCCG
MSLTR18	TG.GCCTGGT	TATT.....	.....ATC	GGGGTTCGTC		ACTAATTCCG
MTLTR23	TG.GCCTGGT	TATT.....	.....ATC	GGGATTCGTC		ACTAATTCCG
MTLTR22	TG.GCCTGGT	TATT.....	.....ATC	GGGATTCGTC		ACTAATTCCG
MTLTR14	TG.GCCTGGT	TATT.....	.....ATC	GGGATTCGTC		ACTAATTCCG
MTLTR11	TG.GCCTGGT	TATT.....	.....ATC	GGGATTCGTC		ACTAATTCCG
MTLTR08	TG.GCCTGGT	TATT.....	.....ATC	GGGATTCGTC		ACTAATTCCG
MSLTR19	TG.GCCTGGT	TATT.....	.....ATC	GGGATTCGTC		ACTAATTCCG
MSLTR17	TG.GCCTGGT	TATT.....	.....ATC	GGGATTCGTC		ACTAATTCCG
<b>MVV-EV-1</b>	TG.GTCTGGT	TTTT.....	.....TTC	GGGATCCGTT		ACTAATTCCG
<b>MVV-SA</b>	TA.GCCTGGT	TATT.....	.....ATC	GGGATTCGTC		ACTAATTCTG
<b>CAEVCork</b>	GGAGAGTGAT	TACTGAGCGG	CCGGTGTATC	GGGATTCGTC		CCTTAATCTG

Figura 27 continua

	301	318
MSLTR06	TGCAAAACCG	GAGCGGAT
MSLTR07	TGCAAAACCG	GAGCGGAT
MSLTR13	TGCAAAACCG	GAGCGGAT
MSLTR15	TGCAAAACCG	GAGCGGAT
MSLTR21	TGCAAAACCG	GAGCGGAT
MTLTR10	TGCAAAACCG	GAGCGGAT
MTLTR06	TGCAAAACCG	GAGCGGAT
MTLTR09	TGCAAAACCG	GAGCGGAT
MTLTR19	TGCAAAACCG	GAGCGGAT
MSLTR14	TGCAAAACCG	GAGCGGAT
MSLTR02	TGCAAAACCG	GAGCGGAT
<b>MVV1514</b>	<u>TGCAACACCG</u>	GAGCGGAT
MSLTR08	TGCAAAACCG	GAGCGGAT
MSLTR18	TGCAAAACCG	GAGCGGAT
MTLTR23	TGCAAAACCG	GAGCGGAT
MTLTR22	TGCAAAACCG	GAGCGGAT
MTLTR14	TGCAAAACCG	GAGCGGAT
MTLTR11	TGCAAAACCG	GAGCGGAT
MTLTR08	TGCAAAACCG	GAGCGGAT
MSLTR19	TGCAAAACCG	GAGCGGAT
MSLTR17	TGCAAAACCG	GAGCGGAT
<b>MVV-EV-1</b>	TGCAATACCG	GAGCGGGT
<b>MVV-SA</b>	<u>TGCAACACCA</u>	GAGCGGAT
<b>CAEVCork</b>	<u>TGCAATACCA</u>	GAGCGGCT

**Figura 27.** Alinhamento da seqüência de nucleotídeos do fragmento de LTR das seqüências do Maedi-Visna inoculada nas células MSO<sub>50</sub> e TMSOpSV1. As caixas e os sombreados representam as seqüências de fixação ligadoras de fatores de transcrição celular. O sítio de início da transcrição da amostra K1514 está assinalado (seta). Uma seqüência do MVV K1514, distinta das demais, está sublinhada (linha simples) e uma seqüência pertencente somente a LTR isolado do CAEV-Cork está sublinhada (linha dupla).

Semelhante ao realizado para o LTR do maedi visna, as seqüências do LTR do CAEV, após alinhamento, foram submetidas a análise no programa TFSEARCH (Figura 28).

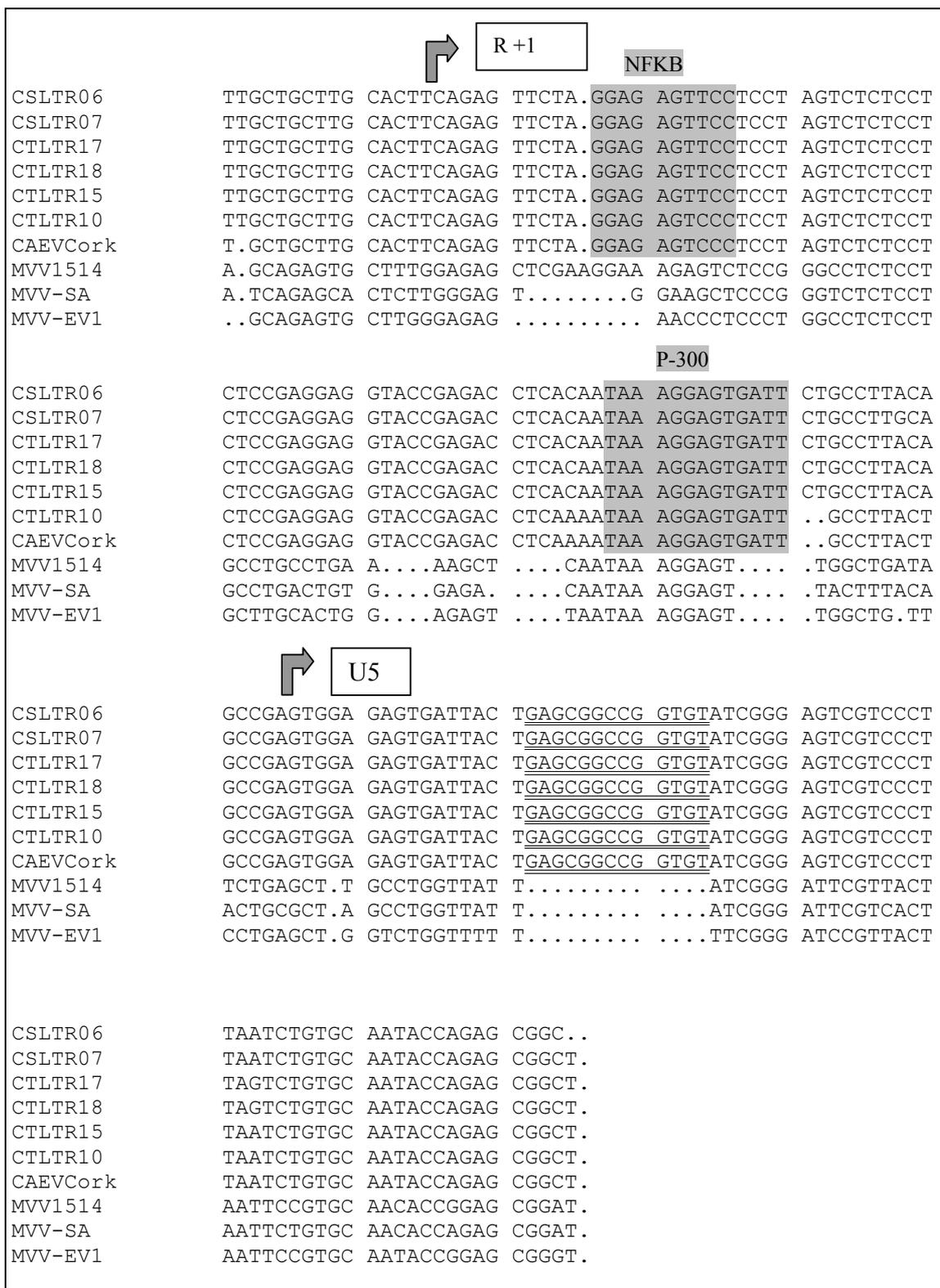
Não foi possível visualizar diferença entre as amostras provenientes de cultivos secundários ou transformados.

Na análise das seqüências do LTR, das amostras provenientes do isolado CAEV767, foi possível observar a presença dos mesmos sítios fixadores de fatores de transcrição já observados para as amostras de MVV vistas anteriormente.

Foi possível verificar uma deleção de 13 nucleotídeos (Figura 28, posição 272 a 284) nas amostras de MVV, quando comparadas as amostras de CAEV,.

	U3	AP-1	AP-1	AP-4	GATA-1
CSLTR06	.....	...TGCTGAC	AGTTGTAACA	GCTGACAC . T	CAGCTGATGC
CSLTR07	.....	...TGCTGAC	AGTTGTAACA	GCTGACAC . T	CAGCTGATGC
CTLTR17	.....	...TGCTGAC	AGTTGTAACA	GCTGACAC . T	CAGCTGATGC
CTLTR18	.....	...TGCTGAC	AGTTGTAACA	GCTGACAC . T	CAGCTGATGC
CTLTR15	.....	...TGCTGAC	AGTTGTAACA	GCTGACAC . T	CAGCTGATGC
CTLTR10	.....	...TGCTGAC	AGATGTAACA	GCTGACATAT	CAGCTGATGC
CAEVCork	.....	...TGCTGAC	AGATGTAACA	GCTGACATAT	CAGCTGATGC
MVV1514	TTCTGCTTTT	TTGCGCTGAG	TCATGTAGCA	GCTGATGG . T	TAAGTCATAA
MVV-SA	.....	..ACGCTAAA	TCATGTATCA	GCTGATGC . T	TAGGTCATAA
MVV-EV1	.....	..GCGCAAAG	TCATGTATCA	GCTGATGC . T	TAAGTCATAA
				TATA	
CSLTR06	TTGCTCATGC	TGACATTGTA	GCTTTGCA . .	CTGTATATAA	AAGGGAAGCT
CSLTR07	TTGCTCATGC	TGACATTGTA	GCTTTGCA . .	CTGTATATAA	A . GGAAGCT
CTLTR17	TTGCTCATGC	TGACATTGTA	GCTTTGCA . .	CTGTATATAA	A . GGAAGCT
CTLTR18	TTGCTCATGC	TGACATTGTA	GCTTTGCA . .	CTGTATATAA	A . GGAAGCT
CTLTR15	TTGCTCATGC	TGACATTGTA	GCTTTGCA . .	CAGTATATAA	A . GGAAGCT
CTLTR10	TTGCTCATGC	TGACACTGTA	GCTCTGAG . .	CTGTATATAA	G . GAGAAGCT
CAEVCork	TTGCTCATGC	TGACACTGTA	GCTCTGAG . .	CTGTATATAA	G . GAGAAGCT
MVV1514	CCGCAGATGT	AAACAAGTTG	CCTATATAAG	CCGCTTGCTA	GCTGGGGAAA
MVV-SA	CCGCAATTGT	AAACAAGTTG	CCTATAAAAAG	CTGCTTGCTA	GCTGGGAGAG
MVV-EV1	CCACAATTGT	AAACATGCTG	CCTATAAAAAG	CTGCTTGCTC	GCTGGTTGAG

Figura 28. continua



**Figura 28.** Alinhamento da sequência de nucleotídeos do fragmento de LTR das sequências do CAEV inoculada nas células MSO<sub>50</sub> e TMSOpSV1. As caixas e sombreamentos representam as sequências de fixação ligadoras de fatores de transcrição celular. O sítio de início da transcrição está representado (seta) baseado na sequência do CAEV-Cork. Uma região específica das amostras de CAEV está sublinhada (linha dupla)

## 5. DISCUSSÃO

Células da linhagem monócito/macrófago são as principais células alvo dos SRLV. Entretanto, um grande número de tipos celulares permite a replicação do CAEV e do MVV.

No Brasil o primeiro isolamento do CAEV foi realizado através do cultivo de um explante de membrana sinovial de um animal naturalmente infectado (Hötzel *et al.*, 1993) e o primeiro isolamento do vírus Maedi-Visna foi realizado por Moojen *et al.* (1996) a partir de explantes de membrana sinovial e plexo coróide de um ovino sem sinais clínicos.

Células de membrana sinovial foram utilizadas por Reischak *et al.* (2002) no desenvolvimento de um teste de imunofluorescência para o diagnóstico sorológico da infecção por lentivírus em caprinos.

A dificuldade na obtenção de cultivos celulares primários e secundários para uso permanente e a necessidade de linhagens celulares estáveis e devidamente caracterizadas, para isolamentos e produção de testes de diagnóstico e antígenos virais, torna mister a obtenção de novos cultivos de linhagem. Igualmente, considerando-se a variabilidade genética dos lentivírus, faz-se necessário conhecer o comportamento viral em novos tipos celulares.

Tanto o CAEV quanto replicam em cultivos primários de membrana sinovial caprina (MSC) (Johnson *et al.*, 1992; Chebloune *et al.*, 1996). O uso de células

de membrana sinovial de origem ovina (MSO<sub>50</sub>), mostrou-se igualmente permissível à replicação, tanto do CAEV como do MVV.

A susceptibilidade das células MSO<sub>50</sub>, à infecção pelos SRLV, pode ser comprovada através da observação de CPE e da reação da polimerase em cadeia, onde foi possível amplificar seqüências dos genes *gag* e *env* e LTR.

Com o objetivo de obter uma linhagem celular permissível à infecção e replicação dos SRLV, células de MSO foram transfectadas com um plasmídeo (pSV1) apresentando a origem de replicação e as seqüências codificantes para o Ag T maior e t menor do SV40. O uso do Ag T do SV40 na obtenção de células de linhagem tem sido utilizado por vários autores (Ferris *et al.*, 2002; Walen, 2002; Zheng & Zhao, 2002). A transformação de células susceptíveis a replicação dos SRLV já foi igualmente realizada por Mselli-Lakhal *et al.* (2001) e Teixeira *et al.* (1997).

Após a transfecção, as células obtidas foram denominadas TMSOpSV1. Como o plasmídeo não apresentava uma seqüência que promovesse a seleção das células transformadas, a seleção foi baseada em características morfológicas e de crescimento.

As células TMSOpSV1 apresentaram uma cinética de crescimento superior quando comparadas ao cultivo secundário. Este resultado apresenta semelhança com o comportamento de outras células transformadas com o Ag T (Teixeira *et al.*, 1997; Mselli-Lakhal *et al.*, 2001 e Zheng & Zhao, 2002). Esta alteração no crescimento pode estar relacionada com a interação do antígeno T com proteínas responsáveis pela regulação do ciclo celular como pRB, p107, p130 e p53 (Sladek *et al.*, 2000).

A presença da seqüência do mRNA codificante do Ag T, nas células transformadas, foi verificada através de RT-PCR. Estes resultados sugerem que possa estar ocorrendo a expressão do antígeno T nas células transformadas. Embora não tenhamos realizado nenhum experimento para verificar a presença da proteína, outros

autores utilizando imunohistoquímica verificaram a presença do Ag T em células transformadas (Mselli-Lakhal *et al.*, 2001; Zheng & Zhao, 2002).

Trabalhos tentando verificar a presença do Ag T no núcleo ou no citoplasma das células infectadas ou transformadas apresentam resultados variáveis, assim como a tentativa de verificar se o gene codificante do Ag T apresenta-se sob a forma integrada ou epissomal apresenta resultados discordantes (da Silva Teixeira *et al.*, 1997; Butel & Lednicky, 1999; Mselli-Lakhal *et al.*, 2001; Weingartl *et al.*, 2002; Zheng & Zhao, 2002;). A presença do plasmídeo codificante do Ag T no núcleo ou citoplasma da célula TMSOpSV1 apresentou um resultado ambíguo. Foi possível observar a presença de DNA do Ag T tanto no núcleo como no citoplasma. Isto pode ser explicado pela possibilidade do DNA estar presente tanto na forma integrada como na forma epissomal e, no último caso, estar presente na forma epissomal nos dois lugares. Outra possibilidade é que tenha ocorrido contaminação entre o material de origem nuclear e citoplasmático, porém considerando-se o gene utilizado como controle (GAPDH), a contaminação foi mínima.

Depois da confirmação da presença do Ag T, buscou-se verificar possíveis alterações genéticas nas células transformadas. Para isto, foram analisados os cromossomos das células TMSOpSV1. Na análise das células mitóticas a observação de translocações pode estar relacionada ao estado de transformação da célula analisada uma vez que o rearranjo estrutural mais comum encontrado em tumores é a translocação, principalmente em leucemias e linfomas (Sheer, 1990).

Após a obtenção do cultivo transformado e da confirmação da susceptibilidade destas células aos isolados de SRLV, buscamos verificar a ocorrência de seleção viral nos diferentes tipos de cultivo.

Não foi possível observar, filogeneticamente, uma separação clara entre as amostras obtidas de cultivos secundários e transformados. Entretanto, a partir dos clones puderam ser obtidas várias seqüências distintas, para cada gene analisado, demonstrando a presença de diferentes populações virais.

A presença de uma maior heterogeneidade nas populações provenientes do cultivo transformado pôde ser observada. Por exemplo, nas 12 seqüências consenso obtidas para o gene *env* do CAEV, 8 foram oriundas do cultivo transformado e somente 4 do cultivo secundário. Esta observação repetiu-se para o *env* e *gag* do MVV e para o LTR do CAEV. A variação pode estar relacionada ao comportamento do vírus nas células transformadas, ou outrossim, ao fato de que os isolados utilizados já apresentavam uma adaptação ao cultivo secundário, tendo em vista terem sido isolados e mantidos há bastante tempo em cultivos secundários no laboratório.

Outra observação interessante foi o aparecimento, em todos os clones de MVV, de uma deleção de dois resíduos na seqüência de aminoácidos de Gag. Este fato já havia sido observado por Ravazzolo *et al.* (2001), sendo sugerido inclusive como uma forma de diferenciação entre os isolados de origem ovina e caprina. Além disso, este resultado confirma que não houve contaminação durante a manipulação dos isolados CAEV e MVV.

Observando-se as árvores filogenéticas geradas a partir das seqüências do MVV obtidas neste trabalho, verifica-se que quando comparadas às amostras padrões, estas apresentam-se ora relacionadas com a amostra EV-1, ora com K1514, dependendo do gene analisado. Especificamente com relação ao gene *gag* nossos resultados mostram-se concordantes aos resultados obtidos por Ravazzolo *et al.* (2001). As árvores geradas a partir das seqüências do CAEV, relacionaram-se com a amostra padrão Cork.

Apesar de não ter sido possível a separação das amostras de acordo com o tipo celular utilizado, pôde ser observado a formação de sub-grupos dentro das amostras, principalmente quando analisadas as seqüências provenientes do gene *env*. Quando observada, por exemplo, a topografia da árvore originada das seqüências de nucleotídeos de *env* do CAEV, pode-se verificar a formação de um grupo separado, mais relacionado as amostras de MVV.

von Briesen *et al.* (1999), analisando um fragmento de *env* do HIV-1, proveniente da inoculação de amostras em diferentes células de cultivo primário, observaram o aparecimento de variantes virais em todos os tipos celulares utilizados. Os autores observaram também a seleção de determinados genótipos conforme o tipo de célula utilizado.

De forma semelhante, analisando uma região de *env* de um isolado de HIV-1, Vartanian *et al.* (1991) observaram o aparecimento e seleção de diferentes populações de acordo com o tipo de célula utilizado.

Em ambos os trabalhos, os autores analisaram as seqüências obtidas somente através das diferenças encontradas nos alinhamentos, sem entretanto realizarem uma abordagem filogenética.

Já as seqüências procedentes do gene *gag*, tanto de CAEV como MVV, mostraram uma maior homologia, como pode ser observado pela topologia das árvores filogenéticas. Os valores de *bootstrap* mostram-se sempre altos com relação ao agrupamento das diferentes amostras em relação às amostras padrões.

Esta menor variabilidade está relacionada, provavelmente, a baixa variabilidade existente no gene *gag*. Este fato foi comprovado por Zanoni (1998) que, examinando diferentes regiões do genoma de várias amostras de SRLV, observou uma menor divergência entre as amostras quando considerados os gene *gag* e *pol* (16%).

As seqüências AJ305042 e AJ305039 provenientes da mesma região e amostras e obtidas anteriormente a realização deste trabalho, foram incluídas na análise como amostras iniciais, anteriores a inoculação nos diferentes cultivos. Como observado, esta amostra agrupou-se junto as demais, indicando uma baixa variabilidade entre o início e o final do experimento no que se refere ao gene *gag*.

Semelhante ao observado nos genes *gag* e *env*, quando analisamos o fragmento obtido a partir do LTR, não foi possível uma distinção entre amostras inoculadas em cultivo secundário ou transformado. Entretanto, as seqüências originaram a formação de diferentes grupos. A árvore filogenética gerada a partir do LTR do MVV, mostra o aparecimento de dois grupos e cada um apresenta amostras divergentes do grupo principal (MTLTR06 e MSLTR17 e 19).

Nas amostras de LTR do CAEV, a amostra CTLTR10, mostrou uma alta homologia com a seqüência do CAEV-Cork, apresentando um alto valor de *bootstrap* (99%) na árvore filogenética.

Esta formação de grupos dentro das amostras podem estar relacionadas a variabilidade existente no LTR dos retrovírus. Zaroni (1998) analisando seqüências de diferentes isolados de SRLV, verificou que a maior divergência ocorreu entre os fragmentos de LTR (35%). Em seu trabalho, observou que devido a estrutura do LTR viral, com possibilidade de rearranjos e repetições de seqüências funcionais, o alinhamento e a quantificação de divergências não podem ser realizados com o alinhamento múltiplo utilizado habitualmente.

Enfim, foi realizado o alinhamento das seqüências obtidas para verificar a presença de variações no promotor viral.

No alinhamento das seqüências provenientes do LTR do MVV, foi possível observar a presença de duas seqüências fixadoras do fator AP-1, comum aos isolados de

Maedi-Visna EV-1 e K1514. Porém, nos isolados MVV EV-1, MVV-SA e CAEV-Cork, aparece entre os sítios AP-1 um sítio AP-4, que não é visto nos clones analisados nem na seqüência MVV K1514. A ausência deste sítio pode estar relacionada a uma característica própria destas amostras ou então a uma nova seqüência AP-4 ainda não descrita no banco de dados do programa TFSEARCH. As proteínas ativadoras da transcrição (AP) representam um grupo de proteínas que são ativadas por uma série de estímulos (estresse celular, danos no DNA, ligação de linfócitos T ou B a antígenos, citocinas, entre outros) e estão envolvidas em vários processos biológicos como expressão gênica viral e celular, proliferação e diferenciação celular e tumorigênese.

Essa diferença pode ser observada quando analisados em conjunto os trabalhos de Andrésson *et al.* (1993) e Sargan *et al.* (1995). No primeiro os autores mostram o alinhamento da amostra padrão K1514 e de um clone neurotrópico proveniente da mesma amostra, onde é possível observar os dois sítios AP-1, mas sem referência ao sítio AP-4. No segundo trabalho, os autores descrevem a seqüência do LTR do isolado MVV EV-1 e o sítio AP-4 aparece entre os sítios AP-1.

Foram observados, igualmente, outros sítios fixadores de fatores de transcrição celulares, tais como o sítio fixador do NF $\kappa$ B e da p300 e também a região TATA *box* foi localizada.

O fator NF $\kappa$ B é ativado por uma série de agentes, entre eles citocinas como IL-1 e TNF- $\alpha$ , lipopolissacarídeos bacterianos, algumas proteínas virais como Tax do HTLV-1 e LMP1 do EBV, alguns receptores relacionados de linfócitos T e B, radiação ultra violeta, entre outros. Os genes regulados pela família de fatores de transcrição NF $\kappa$ B são tão diversos como seus ativadores e incluem genes envolvidos na resposta imune, na resposta inflamatória, na adesão celular, no crescimento e morte celulares. A seqüência TATA é uma pequena seqüência composta basicamente de nucleotídeos T e

A e é conhecida com TATA *box*. Esta seqüência é um componente encontrado em quase todos os promotores utilizados pela polimerase II e normalmente está localizada a 25 nucleotídeos antes do sítio de início da transcrição. A p300 interage com uma variedade de fatores celulares incluindo p53, mdm2 e uma subunidade de NFkB, estando envolvida em múltiplas funções e agindo tanto no crescimento como na transformação celular (Alberts *et al.*, 1997).

Igualmente, foi observada uma seqüência fixadora do fator GATA-1. O fator de transcrição GATA-1 é essencial para a sobrevivência das células progenitoras da linhagem eritróide bem como para a diferenciação final dos eritrócitos.

Uma observação interessante, foi a deleção de 13 nucleotídeos no LTR das amostras de MVV quando comparadas às amostras de CAEV. Esta deleção, assim como observado nas seqüências geradas a partir do gene *gag*, pode servir como um ponto diferencial entre os isolados caprinos e ovinos. Entretanto, mais isolados devem ser analisados no intuito de confirmar esta observação.

No alinhamento das seqüências do LTR do CAEV, foram encontradas seqüências fixadoras de fatores de transcrição, semelhantes às encontradas no MVV. Pôde-se igualmente confirmar a deleção de 13 nucleotídeos nas seqüências de MVV, uma vez que tanto a amostra CAEV Cork, como as outras de origem caprina utilizadas apresentaram essa seqüência.

Embora não tenha sido possível separar os clones analisados neste trabalho de acordo com o tipo de célula utilizado, fica evidente o aparecimento de diferentes populações virais, bem como a complexidade envolvida na análise de seqüências dos SRLVs.

## 6 CONCLUSÕES

De acordo com os resultados obtidos neste trabalho podemos concluir que:

1. Células de membrana sinovial ovina, transformadas com um plasmídeo contendo a seqüência dos antígenos T maior e t menor do SV40, são permissivas a replicação dos isolados de SRLV.
2. As células transformadas podem ser utilizadas para isolamento e produção de partículas virais, de amostras de CAEV e MVV, para seqüenciamento e análise de variabilidade.
3. O RNA mensageiro do Ag T está presente nas células transformadas utilizadas neste trabalho.
4. Embora preliminares, os resultados obtidos neste trabalho sugerem a presença do DNA do Ag T no núcleo e no citoplasma das TMSOpSV1.
5. As células transformadas apresentaram um padrão de crescimento alterado, com uma dinâmica de crescimento superior as células não transformadas, compatível com o observado na literatura para células transformadas pelo Ag T.
6. Não foi observada seleção de populações virais, nas seqüências de nucleotídeos, em função do tipo de célula usada para propagação viral.

7. Os isolados brasileiros de origem ovina e caprina, utilizados neste trabalho, mostraram-se relacionados com as respectivas às amostras padrões
8. O fragmento utilizado do gene *env* apresentou uma maior variabilidade comparado ao *gag*, dentro das populações estudadas.
9. No fragmento utilizado do LTR, uma região de 13 nucleotídeos mostrou-se como potencial alvo para diferenciação dos isolados de origem ovina e caprina.

## **7 PERSPECTIVAS**

- Empregar diferentes técnicas, como sondas de DNA, para estudo da localização do plasmídeo utilizado para transformação das células de membrana sinovial ovina.
- Avaliar a capacidade tumorigênica das TMSOpSV1
- Utilizar o plasmídeo empregado na transformação de outros tipos de células (origem epitelial, endotelial, etc).
- Verificar a expressão do Ag T nas células transformadas.
- Avaliar as diferenças na expressão de fatores de transcrição de cultivos secundários comparados com os transformados.
- Comparar os títulos virais nos dois tipos celulares.
- Analisar novos isolados brasileiros quanto à presença das deleções nos genes *gag* e no LTR.
- Tentar utilizar estas deleções para um estudo com enzimas de restrição, em amostras obtidas diretamente de animais infectados.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADAMS, D.S.; KLEVJER-ANDERSON, P.; CARLSON, J.L.; McGUIRE, T.C.; GORHAM, J.R. Transmission and control of caprine arthritis-encephalitis virus. **American Journal of Veterinary Research**. v. 44, n. 9, p. 1670-1675, 1983.

ALBERTS, B.; BRAY, D.; LEWIS, J.; RAFF, M.; ROBERTS, K.; WATSON, J.D. **Biologia Molecular da Célula**. Terceira edição, Artes Médicas, Porto Alegre, Brasil, 1997.

ALI, S.H. & DeCAPRIO, J.A. Celular transformation by SV40 large T antigen: interaction with host proteins. **Seminars in Cancer Biology**. v. 11, p. 15-22, 2001.

ANDRÉSDÓTTIR, V.; TANG, X.; AGNARSDÓTTIR, G.; ANDRÉSSON, O.S.; GEORGSSON, G.; SKRABAN, R.; TORSTEINSDÓTTIR, S.; RAFNAR, B.; BENEDIKTSÓTTIR, E.; MATTHÍASDÓTTIR, S.; ÁRNADÓTTIR, S.; HÖGNADÓTTIR, S.; PÁLSSON, P.A.; PÉTURSSON, G. Biological and genetic differences between lung- and brain-derived isolates of Maedi-Visna virus. **Virus Genes**. v. 16, n. 3, p. 281-293, 1998.

ANDRÉSSON, O.S.; ELSE, J.E.; TOBIN, G.J.; GREENWOOD, J.D.; GONDA, M.A.; GEORGSSON, G.; ANDRÉSDÓTTIR, V.; BENEDIKTSÓTTIR, E.; CARLSDÓTTIR, H.M.; MÄNTYLÄ, E.O.; RAFNAR, B.; PÁLSSON, P.A.; CASEY, J.W.; PÉTURSSON, G. Nucleotide sequence and biological properties of a pathogenic proviral molecular clone of neurovirulent visna virus. **Virology**. n. 193, p. 89-105, 1993.

BALIN, A.K.; FISHER, A.J.; ANZELONE, M.; LEONG, I.; ALLEN, R.G. Effects of establishing cell cultures and cell culture conditions on the proliferative life span of human fibroblasts isolated from different tissues and donors of different ages. **Experimental Cell Research**. v. 274, p. 275-287, 2002.

BELINO, E.D. & EZEIFEKA, G.O. Maedi-Visna antibodies in sheep and goats in Nigeria. **The Veterinary Record**. v. 114, n. 23, p. 570, 1984.

BERGSAGEL, D.J.; FINEGOLD, M.J.; BUTEL, J.S.; KUPSKY, W.J.; GARCEA, R.L. DNA sequences similar to those of simian virus 40 in ependymomas and choroid plexus tumors of childhood. **The New England Journal of Medicine**. v. 326, n. 15, p. 988-993, apr. 1992.

BUTEL, J.S. & LEDNICKY, J.A. Cell and molecular biology of simian virus 40: implications for human infections and disease. **Journal of the National Cancer Institute**. Jan 20; 91(2): 119-134, 1999.

BUTEL, J.S. Simian virus 40, poliovirus vaccines, and human cancer: research progress versus media and public interests. **Bulletin of the World Health Organization**. v. 78, n.2, p. 195-198, 2000.

CASTRO, R.S.; GREENLAND, T.; LEITE, R.C.; GOUVEIA, A.; MORNEX, J.F.; CORDIER, G. Conserved sequence motifs involving the *tat* reading frame of Brazilian caprine lentiviruses indicate affiliations to both caprine arthritis-encephalitis virus and visna-maedi virus. **Journal of General Virology**. v. 80, p. 1583-1589, 1999.

CASTRO, R.S.; NASCIMENTO, S.A.; ABREU, S.R.O. Evidência sorológica de infecção pelo vírus da artrite-encefalite caprina em caprinos leiteiros do estado de Pernambuco. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**. v. 46, n. 5, p. 571-572, 1994.

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

COFFIN, J.M. **Retroviridae: the viruses and their replication**. In.: Fields Virology. FIELDS, B.N. (coord.) 3. ed. Philadelphia: Lippincott-Raven Publishers, 1996. p. 1767-1847.

COLE, C.N. **Polyomavirinae: the viruses and their replication**. In.: Fields Virology. FIELDS, B.N. (coord.) 3. ed. Philadelphia: Lippincott-Raven Publishers, 1996. p. 1997-2020.

CONCHA-BERMEJILLO, A. Maedi-Visna and ovine progressive pneumonia. **The Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice**. v.13, n. 1, p. 13-33, 1997.

CONCHA-BERMEJILLO, A.; MAGNUS-CORRAL, S.; BRODIE, J.; DeMARTINI, J.C. Veneral Shedding of ovine lentivirus in infected rams. **American Journal of Veterinary Research**. v.57, n. 5, p. 684-688, 1996.

CRAIG, L.E.; NEALEN, M.L.; STRANDBERG, J.D.; ZINK, M.C. Differential replication of ovine lentivirus in endothelial cells cultured from different tissues. **Virology**. n. 238, p. 316-326, 1997.

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

CUNHA, R. G. & NASCIMENTO, M.C. Ocorrência de anticorpos para o vírus da artrite-encefalite caprina em soros de caprinos do estado do Rio de Janeiro. **Revista Brasileira de Medicina Veterinária**. v. 17, n. 2, p. 72-75, 1995.

CUTLIP, R.C.; JACKSON, T.A.; LAIRD, G.A. Immunodiffusion test for ovine progressive pneumonia. **American Journal of Veterinary Research**. v. 33, n. 7, p. 1081-1084, 1977.

DAL PIZZOL, M.; RAVAZZOLO, A.P.; GONÇALVES, I.P.D.; HÖTZEL, I.; FERNANDES, J.C.T.; MOOJEN, V. Maedi-Visna: evidência de ovinos infectados no Rio Grande do Sul, Brasil, 1987-1989. **Arquivos da Faculdade de Veterinária da UFRGS**. v. 17, p. 65-76, 1989.

DALTABUIST TEST, M.; CONCHA-BERMEJILLO, A.; ESPINOSA, L.E.; LOZA RUBIO, E.; AGUILAR SETIEN, A. Isolation of caprine arthritis-encephalitis virus from goats in Mexico. **Canadian Journal of Veterinary Research**. v. 63, n. 3, p. 212-215, 1999.

DAWSON, M.; LYSONS, R.E.; KNOWLES, D.P. Caprine arthritis/encephalitis and Maedi-Visna, in: Manual of Standards for Diagnostic Tests and Vaccines. Third edition. **Office International des Epizooties**. Paris, p. 369-371, 1996.

DEVILLECHASSE, P. Lentivirus de petits ruminants: préférer la cohabitation? **La Semaine Vétérinaire**. v. 649, p. 24, 1992.

DEZAN, C.P. **Levantamento epidemiológico da artrite-encefalite caprina em municípios do Triângulo Mineiro e Alto Paranaíba**. Uberlândia: MG, 1996. 67p. Monografia. Escola de Veterinária, Universidade Federal de Uberlândia.

DICKSON, J. & ELLIS, T. Experimental caprine retrovirus infection in sheep. **The Veterinary Record**. v. 125, p. 649, 1989.

DIMMOCK, N.J.; EASTON, A.J.; LEPPARD, K.N. **Introduction to Modern Virology**. Fifth edition, Blackwell Science, London, UK, 2001.

DOMINGO, E.; ESCARAMÍS, C.; SEVILLA, N.; MOYA, A.; ELENA, S.F.; QUER, J.; NOVELLA, I.S.; HOLLAND, J.J. Basic concepts in RNA virus evolution. **The FASEB Journal**. v. 10, p. 859-864, jun 1996.

EAST, N.E.; ROWE, J.D.; MADEWELL, B.R.; FLOYD, K. Serologic prevalence of caprine arthritis-encephalitis virus in California goat dairies. **Journal of American Veterinary Medical Association**. v. 190, n. 2, p. 182-186, 1987.

EGBERINK, H. & HORZINEK, M.C. Animal immunodeficiency viruses. **Veterinary Microbiology**. v. 33, p. 311-331, 1992.

FELSENSTEIN, J. **Phylip**: Phylogenetic inference package. Version 3.6, 2002. Department of Genome Sciences, University of Washington, USA. <http://evolution.gs.washington.edu/phylip.html>

FERRARI, M.; SCALVINI, A.; LOSIO, M.N.; CORRADI, A.; SONCINI, M.; BIGNOTTI, E.; MILANESI, E.; AJMONE-MARSAN, P.; BARLATI, S.; BELLOTTI, D.; TONELLI, M. Establishment and characterization of two new pig cell lines for use in virological diagnostic laboratories. **Journal of Virological Methods**. v. 107, p. 205-212, 2003.

FERRIS, N.P.; HUTCHINGS, G.H.; MOULSDALE, H.J.; GOLDING, J.; CLARKE, J.B. Sensitivity of primary cells immortalised by oncogene transfection for the detection and isolation of foot-and-mouth disease and swine vesicular disease viruses. **Veterinary Microbiology**. v. 84, p. 307-316, 2002.

FEUCHTER, A.E.; MAGER, D.L. SV 40 large T antigen trans-activates the long terminal repeats of a large family of human endogenous retrovirus-like sequences. **Virology**; 187: 242-250, 1992.

FEVEREIRO, M. Prevalência da infecção Maedi-Visna nos ovinos em Portugal. **Revista Portuguesa de Ciências Veterinárias**. v. XC, n. 514, p. 66-70, 1995.

FITERMAN, I.R. Constatação de complexo artrite-encefalite em um plantel de caprinos no estado da Bahia. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE MEDICINA VETERINÁRIA, 21., 1988, Salvador. **Anais...** Salvador: Sociedade Baiana de Medicina Veterinária, 1988. p. 91.

FRESHNEY, R.I. **Culture of Animal Cells. A Manual of Basic Technique**. 3<sup>a</sup> ed. Wiley-Liss Inc., NY. 1994.

GARCIA, M.; GALHARDO, M.; ARAUJO, W.P.; D'ANGELINO, J.L.; BASTOS, P.S.; ROSSINI, A.J. Caprine arthritis-encephalitis (CAE). Occurrence of positive sera in goats raised in Brazil. **Tropical Animal Health Production**. TAP 2181A, 1992.

GONDA, M.A. Molecular biology and virus-host interactions of lentiviruses. **Annals of the New York Academy of Science**. v. 724, p. 22-42, 1994.

GONOS, E.S.; DERVENTZI, A.; KVEIBORG, M.; AGIOSTRATIDOU, G.; KASSEM, M.; CLARK, B.F.C.; JAT, P.S.; RATANN, S.I. Cloning and identification of genes that associate with mammalian replicative senescence. **Experimental Cell Research**. v. 240, p. 66-74, 1998.

GONZALES, L.; GELABERT, J.L.; MARCO, J.C.; SAEZ DE OKARIZ, C. Caprine arthritis-encephalitis in the Basque country, Spain. **The Veterinary Record**. v. 120, n. 5, p. 102-109, 1987.

GREENWOOD, P.L.; NORTH, R.N.; KIRKLAND, P.D. Prevalence, spread and control of caprine arthritis-encephalitis virus in dairy goats herds in New South Wales. **Australian Veterinary Journal**. v. 72, n. 9, p. 341-345, 1995.

HALL, T.A. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. **Nucleic Acids Symposium**. Ser. 41:95-98, 1999.

HARMACHE, A.; VITU, C.; RUSSO, P.; BOUYAC, M.; HIÉBLOT, C.; PEVERI, P.; VIGNE, R.; SUZAN, M. The caprine arthritis encephalitis virus *tat* gene is dispensable for efficient viral replication in vitro and in vivo. **Journal of Virology**. v. 69, p. 5445-5454, 1995.

HAYFLICK, L. & MOOREHEAD, P.S. The serial cultivation of human diploid cell strains. **Experimental Cell Research**; 25: 585-621, 1961.

HAYFLICK, L. The limited *in vitro* lifetime of human diploid cell strains. **Experimental Cell Research**. v. 37, p. 614-636, 1965.

HÖTZEL, I.; BASTOS, E.S.; RAVAZZOLO, A.P.; MOOJEN, V. Caprine arthritis-encephalitis virus: isolation and identification in Rio Grande do Sul, Brazil. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**. v. 23, p. 1175-1179, 1993.

HUANG, K.; YAMASAKI, E.F.; SNAPKA, R.M. Maintenance of episomal SV40 genomes in GM637 human fibroblasts. **Virology**. v. 262, p. 457-469, 1999.

JENSEN, H.L. & NORRILD, B. The effects of cell passages on the cell morphology and the outcome of herpes simplex virus type 1 infection. **Journal of Virological Methods**. v. 84, p. 139-152, 2000.

JOAG, S.V.; STEPHENS, E.B.; NARAYAN, O. **Lentiviruses**. In.: Fields Virology. FIELDS, B.N. (coord.) 3. ed. Philadelphia: Lippincott-Raven Publishers, 1996. p. 1977-1993.

JOHNSON, L.K.; MEYER, A.L.; ZINK, M.C. Detection of ovine lentivirus in seronegative sheep by *in situ* hybridization, PCR, and cocultivation with susceptible cells. **Clinical Immunology and Immunopathology**. v. 65, n. 3, p. 254-260, 1992.

KELLY, T.J. Jr; LEWIS, A.M. Jr. Use of nondefective adenovirus-simian virus 40 hybrids for mapping the simian virus 40 genome. **Journal of Virology**. v. 12, n. 3, p. 643-652, 1973.

KNOWLES, D.P. Laboratory diagnostic tests for retrovirus infection of small ruminants. **The Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice**. v. 13, n. 1, p. 1-11, 1997.

KORKE, R.; RINK, A.; SEOW, T.K.; CHUNG, M.C.M.; BEATTIE, C.W.; HU, W.S. Genomic and proteomic perspectives in cell culture engineering. **Journal of Biotechnology**. v. 94, p. 73-92, 2002.

LAMONTAGNE, L.; ROY, R.; GIRARD, A.; SAMAGH, B.S. Seroepidemiological survey of Maedi-Visna virus infection in sheep and goat flocks in Quebec. **Canadian Journal of Comparative Medicine**. v. 47, n. 3, p. 309-315, 1983.

LARA, M.C.C.S.H.; BIRGEL JUNIOR, E.H.; REISCHAK, D.; MOOJEN, V.; GREGORY, L.; OLIVEIRA, J.C.F., BIRGEL, E.H. Identificação imuno-sorológica de anticorpos anti-vírus da artrite-encefalite dos caprinos: comparação das técnicas de imunodifusão em gel de ágar, ensaio imunoenzimático e imunofluorescência indireta. **Arquivos do Instituto Biológico**. São Paulo, v. 69, n 4, p. 1-15, 2002.

LEDNICKY, J.A. & BUTEL, J.S. Polyomaviruses and human tumors: a brief review of current concepts and interpretations. **Frontiers in Bioscience**. v. 4, p. d153-164, feb.1999.

LEDNICKY, J.A. & BUTEL, J.S. Simian virus 40 regulatory region structural diversity and the association of viral archetypal regulatory regions with human brain tumors. **Seminars in Cancer Biology**. v. 11, p. 39-47, 2001.

LERONDELLE, C.; GODET, M.; MORNEX, J.F. Infection of primary cultures of mammary epithelial cells by small ruminant lentiviruses. **Veterinary Research**. v. 30, p. 467-474, 1999.

LEROUX, C.; CHASTANG, J.; GREENLAND, T.; MORNEX, J.F. Genomic heterogeneity of small ruminant lentiviruses: existence of heterogeneous populations in sheep and of the same lentiviral genotypes in sheep and goats. **Archives of Virology**. v. 142, p. 1125-1137, 1997.

LEWIS Jr, A.M.; ALLING, D.W.; BANKS, S.M.; SODDU, S.; COOK, J.L. Evaluating virus-transformed cell tumorigenicity. **Journal of Virological Methods**. v. 79, p. 41-50, 1999.

LUBINIECKI, A.S. & PETRICCIANI, J.C. Recent trends in cell substrate considerations for continuous cell lines. **Current Opinion in Biotechnology**. v. 12, p. 317-319, 2001.

LUCIW, P.A. **Human Immunodeficiency viruses and their replication**. In.: Fields Virology. FIELDS, B.N. (coord.) 3. ed. Philadelphia: Lippincott-Raven Publishers, 1996. p. 1881-1933.

MALIM, M.H.; BOHNLEIN, S.; HAUBER, J.; CULLEN, B.R. Functional dissection of the HIV-1 Rev trans-activator--derivation of a trans-dominant repressor of Rev function. **Cell**. v. 58, n. 1, p. 205-214, 1989.

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. **Pesquisa Veterinária Brasileira**. v. 18, n. 3/4, p. 119-126, 1998.

McINTOSH, K. **Diagnostic Virology**. In.: Fields Virology. FIELDS, B.N. (coord.) 3<sup>a</sup> ed. Philadelphia: Lippincott-Raven Publishers, 1996. p. 401-430.

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

MILCZEWSKI, V.; SOTOMAIOR, C.; REISCHAK, D.; VON GROLL, A. Relato do primeiro isolamento do vírus Maedi-Visna no estado do Paraná. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE MEDICINA VETERINÁRIA, 25., 1997, Gramado. **Anais...** Gramado: Sociedade de Veterinária do Rio Grande do Sul, 1997, p. 179.

MONTANO, X.; MILLIKAN, R.; MILHAVEN, J.M.; NEWSOME, D.A.; LUDLOW, J.W.; ARTHUR, A.K.; FANNING, E.; BIKEL, I.; LIVINGSTON, D.M. Simian virus 40 small tumor antigen and an amino-terminal domain of large tumor antigen share a common transforming function. **Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America**. v. 87, p. 7448-7452, 1990.

MOOJEN, V.; BARTH, O.M.; RAVAZZOLO, A.P.; VON GROLL, A.; CORTES, L.M. Maedi-Visna virus: first isolation and identification from a naturally infected lamb in Brazil. In: CONGRESSO ARGENTINO DE VIROLOGIA, 5., 1996. Tandil. **Anais...** Tandil: Sociedad Argentina de Virologia. 1996. p. 89.

MOOJEN, V.; SOARES, H.C.; RAVAZZOLO, A.P.; DAL PIZZOL, M.; GOMES, M. Evidência de infecção pelo lentivirus (maedi-visna/artrite-encefalite caprina) em caprinos no Rio Grande do Sul, Brasil. **Arquivos da Faculdade de Veterinária da UFRGS**. v. 14, p. 77-78, 1986.

MSELLI-LAKHAL, L.; GUIGUEN, F.; FORNAZERO, C.; FAVIER, C.; DURAND, J.; GREZEL, D.; MOUSSA, A.; MORNEX, J.F.; CHEBLOUNE, Y. Immortalized goat milk epithelial cell lines replicate CAEV at high level. **Veterinary Research**. v. 32, p. 429-440, 2001.

MURPHY, F.A.; GIBBS, E.P.J.; HORZINEK, M.C.; STUDDERT, M.J. **Veterinary Virology**. Third edition, Academic Press, California, USA, 1999.

NARAYAN, O. & CORK, L.C. Lentiviral diseases of sheep and goats: chronic pneumonia leukoencephalomyelitis and arthritis. **Reviews in Infectious Diseases**. v. 07, n. 1, p. 89-98, jan-feb 1985.

NEWMAN, J.S.; BASKIN, G.B.; FRISQUE R.J. Identification of SV40 in brain, kidney and urine of healthy and SIV-infected rhesus monkeys. **Journal of Neurovirology**. v. 4, n. 4, p. 394-406, aug. 1998.

NICHOLAS, K.B. & NICHOLAS, H.B.Jr. **GeneDoc**: a tool for editing and annotating multiple sequence alignments. Distributed by the author. 1997.  
[www.psc.edu/biomed/genedoc](http://www.psc.edu/biomed/genedoc).

NORKIN, L.C.; STEINBERG, V.I.; KOSZ-VNENCHAK, M. Humam glioblastoma cells persistently infected with Simian Virus 40 carry nondefective episomal viral DNA and acquire the transformed phenotype and numerous chromosomal abnormalities. **Journal of Virology**. v. 53, n. 2, p. 658-666, 1985.

OLIVARES, I.; SHAW, G.; LOPEZ-GALINDEZ, C. Phenotypic switch in a spanish HIV type 1 isolate on serial passage on MT-4 cells. **AIDS Research and Human Retroviruses**. v. 13, n. 11, p. 979-984, 1997.

OLIVER, R.; CATHCART, A.; McNIVEN, R.; POOLE, W.; ROBATI, G. Infection of lambs with caprine arthritis encephalitis virus by feeding milk from infected goats. **The Veterinary Record**. v. 19, p. 83, 1985.

PAGE, R.D.M. **TreeView**. version 1.6.6. 2001. Department of Zoology, University of Glasgow, UK. Free on <http://taxonomy.zoology.gla.ac.uk/rod/rod.html>.

PASIK, J. Maedi-Visna virus and caprine arthritis-encephalitis virus: distinct species or quasispecies and its implications for laboratory diagnosis. **Canadian Journal of Veterinary Research**. v. 62, p. 241-244, 1998.

PEDEN, K.; EMERMAN, M.; MONTAGNIER, L. Changes in growth properties on passage in tissue culture of viruses derived from infectious molecular clones of HIV-1<sub>LAI</sub>, HIV-1<sub>MAL</sub> and HIV-1<sub>ELI</sub>. **Virology**. v. 185, p. 661-672, 1991.

PÉPIN, M.; VITU, C.; RUSSO, P.; MORNEX, J.F.; PETERHANS, E. Maedi-Visna virus infection in sheep: a review. **Veterinary Research**. v. 29, p. 341-367, 1998.

PEREIRA, J.M. & TAVARES, L. Estrutura e ciclo biológico dos retrovirus. **Revista Portuguesa de Ciências Veterinárias**. p. 32-37, 1999.

PEREIRA, L.A.; BENTLEY, K.; PEETERS, A.; CHURCHILL, M.J.; DEACON, N.J. A compilation of cellular transcription factor interactions with the HIV-1 LTR promoter. **Nucleic Acids Research**. v. 28, n. 3, p. 663-668, 2000.

PERRIN, G. & POLACK, B. L'arthrite encéphalite caprine (A.E.C.). Étude sérologique, anatome-clinique - Procédures d'assainissement. **Bulletin de l'Académie Vétérinaire de France**. v. 60, p. 125-136, 1987.

PÉTURSSON, G.; ANDRÉSDOTTIR, V.; ANDRÉSSON, O.; TORSTEINSDÓTTIR, S.; GEORSSON, G.; PÁLSSON, P.A. Human and ovine lentiviral infections compared. **Comparative immunology, microbiology and infectious diseases**. v. 14, n. 4, p. 277-287, 1991.

PHELPS, S.L. & SMITH, M.C. Caprine arthritis-encephalitis virus infection. **Journal of American Veterinary Medical Association**. v. 203, n. 12, p. 1663-1666, 1993.

PORRÁS, A.; GAILLARD, S.; RUNDELL, K. The simian virus 40 small-t and large-T antigens jointly regulate cell cycle reentry in human fibroblasts. **Journal of Virology**. v. 73, n. 4, p. 3102-3107, apr. 1999.

POWELL, A.J.; DARMON, A.J.; GONOS, E.S.; LAM, E.W-F.; PEDEN, K.W.C.; JAT, P.S. Different functions are required for initiation and maintenance of immortalization of rat embryo fibroblast by sv40 large T antigen. **Oncogene**. v. 18, p. 7343-7350, 1999.

PRESTON, B.D. & DOUGHERTY, J.P. Mechanisms of retroviral mutation. **Trends in Microbiology**. v. 4, n. 1, p. 16-21, jan. 1996.

PRITCHARD, G.C.; SPENCE, J.B.; ARTHUR, M.J.; DAWSON, M. Maedi-Visna virus infection in commercial flocks of indigenous sheep in Britain. **The Veterinary Record**. v. 115, n. 17, p. 427-429, 1984.

RAVAZZOLO, A.P.; DAL PIZZOL, M.; GONÇALVES, I.P.D.; MOOJEN, V. Evidência de infecção pelo vírus da artrite-encefalite dos caprinos, em caprinos em alguns municípios do Rio Grande do Sul. In: CONGRESSO ESTADUAL DE MEDICINA VETERINÁRIA, 10., 1988, Porto Alegre. **Anais...** Porto Alegre: Sociedade de Veterinária do Rio Grande do Sul, 1988. p. 68.

RAVAZZOLO, A.P.; REISCHAK, D.; PETERHANS, E.; ZANONI, R. Phylogenetic analysis of small ruminant lentiviruses from southern Brazil. **Virus Research**. v. 79, p. 117-123, 2001.

REDDY, P.G.; SAPP, W.J.; HENEINE, W. Detection of caprine arthritis-encephalitis virus by polymerase chain reaction. **Journal of Clinical Microbiology**. v. 31, n. 11, p. 3042-3043, nov. 1993.

REED, L.J. & MUENCH, H. A simple method of estimating fifty per cent endpoints. **American Journal of Hygiene**. v. 27, p. 493-497, 1938.

REISCHAK, D.; RAVAZZOLO, A.P.; MOOJEN, V. Imunofluorescência utilizando isolados brasileiros no diagnóstico sorológico de infecção por lentivírus em caprinos. **Pesquisa Veterinária Brasileira**. v. 22, n. 1, p. 7-12, jan.-mar. 2002.

RHIM, J.S. Development of human cell lines from multiple organs. **Annals of the New York Academy of Sciences**. v. 919, p. 16-25, 2000.

ROSATI, S.; KWANG, J.; KEEN, J.E. Genome analysis of North American small ruminant lentiviruses by polimerase chain reaction and restriction enzyme analysis. **Journal of Veterinarian Diagnostic Investigation**. v. 7, p. 437-443, 1995a.

ROSATI, S.; MANNELLI, A.; MERLO, T.; PONTI, N. Characterization of the immunodominant cross-reacting epitope of visna maedi virus and caprine arthritis-encephalitis virus capsid antigen. **Virus Research**. v. 61, p. 177-183, 1999.

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

RUNDELL, K. & PARAKATI, R. The role of the SV40 ST antigen in cell growth promotion and transformation. **Seminars in Cancer Biology**. v. 11, p. 5-13, 2001.

RUSSO, P.; VITU, C.; BOURGOGNE, A.; VIGNONI, M.; ABADIE, G.; DAVID, V.; PÉPIN, D.M. Caprine arthritis-encephalitis virus: detection of proviral DNA in lactoserum cells. **The Veterinary Record**. v. 140, n. 18, may 1997.

RUTKOSKI, J.K.; WERENICZ, R.; REISCHAK, D.; WENDELSTEIN, A.C.; MOOJEN, V.; RAVAZZOLO, A.P. Detecção da infecção pelo vírus da artrite-encefalite caprina: imunodifusão em ágar e reação em cadeia da polimerase com *primers* degenerados. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**. v. 53, n. 6, p. 635-640, 2001.

SAMBROOK, J.; FRITSCH, E.F.; MANIATIS, T. **Molecular Cloning. A Laboratory Manual**. 2<sup>a</sup> ed. Cold Spring Harbor Laboratory. Cold Spring Harbor, NY. 1989.

SARAIVA NETO, A.O.; CASTRO, R.S.; BIRGEL, E.H.; NASCIMENTO, S.A. Estudo soro-epidemiológico da artrite-encefalite caprina em Pernambuco. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 15, n. 4, p. 121-124, 1995.

SARGAN, D.R.; SUTTON, K.A.; BENNET, I.D.; McCONNELL, I.; HARKISS, G.D. Sequence and repeat structure variants in the long terminal repeat of Maedi-Visna virus EV-1. **Virology**. v. 208, p. 343-348, 1995.

SHAY, J.W.; Van Der HAEGEN, B.A.; YING, Y.; WRIGHT, W.E. The frequency of immortalization of human fibroblasts and mammary epithelial cells transfected with SV40 large T-antigen. **Experimental Cell Research**. v. 209, p. 45-52, 1993.

SHEER, D. **Cromossomos e Câncer**. In.: Introdução a Biologia Celular e Molecular do Câncer. FRANKS, L.M. & TEICH, N. (coord.) 1<sup>a</sup> ed. Livraria Roca LTDA. São Paulo, Brasil. Traduzido do original *Introduction to the Cellular and Molecular Biology of Cancer* (1<sup>a</sup> ed. 1987)

SIGURDARDÓTTIR, B. & THORMAR, H. Isolation of a viral agent from the lungs of sheep affected with maedi. **The Journal of Infectious Diseases**. v. 114, n. 1, p. 55-60, 1964.

SINGLE, B.; LEIST, M.; NICOTERA, P. Simultaneous release of adenylate kinase and cytochrome c in cell death. **Cell Death and Differentiation**. v.5, p. 1001-1003, 1998.

SLADEK, T.L.; LAFFIN, J.; LEHMAN, J.M.; JACOBBERGER, J.W. A subset of cells expressing SV40 large T antigen contain elevated p53 levels and have an altered cell cycle phenotype. **Cell Proliferation**. v. 33, p. 115-125, 2000.

STANBRIDGE, E.J. Human tumor suppressor genes. **Annual Review of Genetics**. v. 24, p. 615-657, 1990.

STORCH, G.A. Diagnostic Virology. **Clinical Infectious Diseases**. v. 31, p. 739-751, 2000.

STRAUSS, B.E. & COSTANZI-STRAUSS, E. Efficient retrovirus-mediated transfer of cell-cycle control genes to transformed cells. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**. v.32, p. 905-914, 1999.

TAVARES, L. & PEREIRA, J.M. Importância das infecções por retrovírus da sub-família lentivirinae no homem e nos animais. **Revista Portuguesa de Ciências Veterinárias**. vol. XCIV, n. 529, p. 9-27, 1999.

TEIXEIRA, M.F.S.; LAMBERT, V.; MSELLI-LAKAHL, L.; CHETAB, A.; CHEBLOUNE, Y.; MORNEX, J.F. immortalization of caprine fibroblasts permissive for replication of small ruminant lentiviruses. **American Journal Veterinary Research**. v. 58, n. 6, p. 579-584, 1997.

THOMPSON, J.D.; HIGGINS, D.G.; GIBSON, T.J. **CLUSTAL W**: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position specific gap penalties and weight matrix choice. Version 1.83. 1994. European Molecular Biology Laboratory, Meyerhofstrasse, Heidelberg, Germany.

TURNER, B.G.; SUMMERS, M.F. Structural biology of HIV. **Journal of Molecular Biology**. v. 285, p. 1-32, 1999.

VALAS, S.; BENOIT, C.; BAUDRY, C.; PERRIN, G.; MAMOUN, R.Z. Variability and immunogenicity of caprine arthritis-encephalitis virus surface glycoprotein. **Journal of Virology**. v. 74, n. 13, p. 6178-6185, July 2000.

VAN'T WOUT, A.B.; RAN, L.J.; KUIKEN, C.L.; KOOTSTRA, N.A.; PALS, S.T.; SCHUITMAKER, H. Analysis of the temporal relationship between human immunodeficiency virus type 1 quasispecies in sequential blood samples and various organs obtained at autopsy. **Journal of Virology**. v. 72, n. 1, p. 488-496, Jan. 1998.

VARTANIAN, J.P.; MEYERHANS, A.; ASJÖ, B.; WAIN-HOBSON, S. Selection, Recombination, and G→A hypermutation of human immunodeficiency virus type 1 genomes. **Journal of Virology**. v. 65, n. 4, p. 1779-1788, 1991.

von BRIESEN, H.; GREZ, M.; RUPPACH, H.; RAUDONAT, I.; UNGER, R.E.; BECKER, K.; PANHANS, B.; DIETRICH, U.; RÜBSAMEN-WAIGMANN, H. Selection of HIV-1 genotypes by cultivation in different primary cells. **AIDS**. v. 13, n. 3, p. 307-315, 1999.

WALEN, K.H. The origin of transformed cells: studies of spontaneous and induced cell transformation in cell cultures from marsupials, a snail, and a human amniocytes. **Cancer Genetics and Cytogenetics**. v. 133, p. 45-54, 2002.

WASHBURN, K.E.; STREETER, R.N.; SALIKI, J.T.; LEHENBAUER, T.W.; PRADO, M.E. Photodynamic inactivation of an RNA enveloped virus in goat colostrum. **Small Ruminant Research**. v. 42, p. 31-37, 2001.

WEINGARTL, H.M.; SABARA, M.; PASICK, J.; van MOORLEHEM, E.; BABIUK, L. Continuous porcine cell lines developed from alveolar macrophages: partial characterization and virus susceptibility. **Journal of Virological Methods**. v. 104, p. 203-216, 2002.

WHO (WORLD HEALTH ORGANIZATION). Requirements for the use of animal cells as *in vitro* substrates for the production of biologicals (requirements for biological substances n. 50). **Biologicals**. v. 26, p. 175-193, 1998.

WILDEMAN, A. Transactivation of both early and late simian virus 40 promoters by large tumor antigen does not require nuclear localization of the protein. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**. v. 86, p. 2123-2127, 1989.

WRIGHT, W.E.; PEREIRA-SMITH, O.M.; SHAY, J.W. Reversible cellular senescence: implications for immortalization of normal human diploid fibroblasts. **Molecular and Cellular Biology**. v. 9, n. 7, p. 3088-3092, jul. 1989.

YAMADA, K-I.; TAKASAKI, T.; NAWA, M.; KURANE, I. Virus isolation as one of the diagnostic methods for dengue virus infection. **Journal of Clinical Virology**. v. 24, p. 203-209, 2002.

ZANONI, R.; PAULI, U.; PETERHANS, E. Detection of caprine arthritis-encephalitis and Maedi-Visna viruses using the polymerase chain reaction. **Experientia**. v. 46, p. 316-319, 1990.

ZANONI, R.G. Phylogenetic analysis of small ruminant lentiviruses. **Journal of General Virology**. v. 79, p. 1951-1961, 1998.

ZHANG, Y.; FREDRIKSSON, R.; McKEATING, J.A.; FENYÖ, E.M. Passage of HIV-1 molecular clones into different cell lines confers differential sensitivity to neutralization. **Virology**. v. 238, p. 254-264, 1997.

ZHENG, W. & ZHAO, Q. Establishment and characterization of an immortalized Z310 choroidal epithelial cell line from murine choroid plexus. **Brain Research**. v. 958, p. 371-380, 2002.

ZINK, M.C.; YAGER, J.A.; MYERS, J.D. Pathogenesis of caprine arthritis-encephalitis virus. **American Journal of Pathology**. v. 136, n. 4, p. 843-854, 1990.

**ARTIGO SUBMETIDO A PUBLICAÇÃO**

Título:

*Establishment and partial characterization of an ovine synovial membrane cell line obtained by transformation with Simian Virus 40 T antigen*

Periódico:

*Journal of Virological Methods*

**Establishment and partial characterization of an ovine synovial membrane cell line  
obtained by transformation with Simian Virus 40 T antigen**

**U.M. Costa <sup>a</sup>, D. Reischak <sup>b</sup>, J. da Silva <sup>c</sup>, A.P. Ravazzolo <sup>a, \*</sup>**

<sup>a</sup> *Departamento de Patologia Clínica Veterinária, Faculdade de Veterinária,  
Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brasil.*

<sup>b</sup> *LARA/SP, Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, Campinas, SP,  
Brasil.*

<sup>c</sup> *Programa de Pós-graduação em Ensino de Ciências e Matemática / PPGECIM -  
Curso de Biologia / ULBRA, Canoas, RS, Brasil.*

\* Corresponding author. Phone number 55 51 33166926. Fax 55 51 33167309.

*E-mail address:* [anapr@dna.cbiot.ufrgs.br](mailto:anapr@dna.cbiot.ufrgs.br) (A.P. Ravazzolo)

## **Abstract**

Ovine synovial membrane (OSM) secondary cell culture was used to obtain a transformed cell line by transfection with a plasmid containing the SV40 large T antigen gene. Small ruminant lentiviruses (SRLV), caprine arthritis encephalitis virus (CAEV) and Maedi Visna virus (MVV) are currently isolated and propagated using secondary synovial membrane cells. In comparison to secondary cells, transformed ovine synovial membrane (TOSM) cells obtained in this work presented a higher rate of growth as well as a more homogenous population of fibroblast-like cells. Karyotype analysis has indicated the induction of many random chromosome changes, leading to a decrease in the chromosome number. The presence of SV40 DNA was detected in the nucleus and the cytoplasm of TOSM. The putative expression of large T antigen was presumed by the detection of the corresponding mRNA. Finally, the TOSM cells showed to be permissive to SRLV, and are proposed as a cell line to isolation and propagation of these viruses.

*Keywords:* Synovial membrane; Cell line; Transformation; SV40; Small ruminant lentiviruses

## **1. Introduction**

The establishment of cell cultures has been the first step to virus isolation and characterization in the early decades of the 20th century (Levine, 1996). Since then, several types of mammary cells have been adapted to culture, as well as different media and supplements were used. Despite the effort in obtaining permissive cells and the great number of cell lines available commercially, some viruses are still difficult or impossible to isolate and/or propagate by cell inoculation (Podzorski, 2002).

Small ruminant lentiviruses (SRLV), represented by Maedi Visna virus (MVV) and caprine arthritis encephalitis virus (CAEV), are examples of viruses to which primary or secondary cell cultures are needed to isolation and propagation (Hötzel et al., 1993). CAEV first isolation was done by synovial membrane explant from an arthritic goat (Crawford et al., 1980).

Primary and secondary cell cultures are sometimes difficult and laborious to obtain and the number of passages they support are limited. Furthermore, the passages could induce cell modifications that alters virus pattern of infection (Jensen and Norrild, 2000).

In order to overcome the limitations of primary cell culture, cell lines could be obtained. There are different methods to the establishment of cell lines: natural genetic mutations that arise during propagation of secondary cultures; the action of chemical and physical agents and by transformation with a tumorigenic virus (Rhim, 2000). One of these viruses is the simian virus 40 (SV40), largely used in cell transformation (Teixeira et al., 1997; Butel and Lednicky, 1999; Mselli-Lakhal et al., 2001; Ferris et al., 2002; Weingartl et al., 2002; Zheng and Zhao, 2002). The viral protein implicated in immortalization is mainly the large T antigen, although some authors have described cell proliferation induction by small t antigen (Sontag et al., 1993). The immortalization

by SV40 is a rare event and it seems dependent of cell origin. Shay et al.(1993) have estimated the frequency of transformation by SV40 large T antigen was around  $3 \times 10^{-7}$  and  $10^{-5}$  to human fibroblast and mammary epithelial cells, respectively.

The main goal of this work was to obtain an ovine synovial membrane immortalized cell by transfection with a plasmid containing the SV40 large T antigen sequence. These cells were characterized regarding their morphology, their SRLV susceptibility, the karyotype and the presence of SV40 DNA and mRNA.

## **2. Materials and methods**

### *2.1. Cell cultures*

Ovine synovial membrane primary cells (OSM) were obtained by explantation of a carpal articulation collected at a slaughterhouse. The tissue was from a negative animal to Maedi Visna virus infection, confirmed by serology and PCR, using total blood as DNA source. Cells were cultivated in minimum essential medium (MEM) containing penicillin (200 U/ml) and streptomycin (200 µg/ml), supplemented with 10% fetal calf serum (FCS) (Cultilab, São Paulo, Brazil). After 5-10 days, the cells were desegregated with a solution of 0.05% trypsin and incubated in 25 cm<sup>2</sup> flasks at 37°C to obtain confluence. At the 7<sup>th</sup> passage OSM cells were frozen and maintained in liquid nitrogen.

COS-1 cells (ATCC -RL 1650) were used as a control of SV40 expression and maintained in MEM with antibiotics, supplemented with 5% FCS.

### *2.2. Transfection*

OSM cells were transfected with a plasmid (pSV1) expressing both T and t antigen of SV40 (provided by Gilles Quérat, U372-I.N.S.E.R.M., Marseille, France). OSM cells ( $5 \times 10^5/25$  cm<sup>2</sup>) were tripsinized 24 hours before transfection to obtain around 80% of confluence. Transfections were carried out with Lipofectamine

(Invitrogen), as recommended by the manufacturer. Briefly, 2 µg of pSV1 were incubated with 15 µl of Lipofectamine for 45 minutes at room temperature in a total volume of 200 µl of MEM without serum. The complex, in a total volume of 2 ml, was then incubated with the cells at 37°C during 5 hours when 10% FCS MEM was added. Twenty four hours after transfection the medium was replaced by freshly prepared 10% FCS MEM. After transfection, OSM cells were propagated and observed by inverted optical microscopy visualization. Serial passages were performed to obtain a homogenous population.

### *2.3. Morphology*

Secondary OSM and transformed ovine synovial membrane (TOSM) cells (40<sup>th</sup> passage) were submitted to Giemsa staining to observe morphology under microscopy visualization.

### *2.4. Small ruminant lentivirus infection*

In order to evaluate the susceptibility of the transformed OSM (TOSM) cells to small ruminant lentiviruses (SRLV), 10<sup>4</sup> TCID<sub>50</sub> and 10<sup>4,65</sup> TCID<sub>50</sub> of CAEV and Maedi Visna virus, respectively, were used to inoculate 10<sup>6</sup> cells in 25 cm<sup>2</sup> flasks. The inoculated cultures were observed by microscopy to detect the characteristic cytopathic effect (CPE) - syncytium formation or multinucleated giant cells.

### *2.5. Growth analysis*

OSM and TOSM cells (1.5 × 10<sup>5</sup>/well) were seeded in 6 wells plates and the growth analysis was determined by counting total viable cells at 24, 48 and 72 hours after seeding. The cells were maintained in MEM supplemented with 10% FCS. For each time point, counting was performed in duplicate. Five independent experiments were carried out for both cell types and the average of total counting was plotted.

### *2.6. Karyotype analysis*

To define the chromosome patterns during immortalization process, karyotype analysis was performed in OSM cells at passage 36 and in TOSM cells at passage 40. Briefly, two 75 cm<sup>2</sup> flasks of OSM cells and two of TOSM cells presenting more than 80% confluence were treated by trypsin (0.05%) and the cell suspensions submitted to centrifugation after the addition of MEM 10% FCS to inactivate trypsin activity. The cell pellet per flask was resuspended in 5 ml of MEM containing 5 ng of colchicin and 100 ng of ethidium bromide. Cell suspension was incubated at 37°C for 2 h. After, it was treated with hipotonic solution KCl 0.75 M for 30 minutes at 37°C. Fixation was done by the addition of a solution methanol: acetic acid (2:1, v/v) and over night incubation at 4°C. Finally, cells were washed with the fixation solution three times before seeding them on a microscope slide (two slides/flask) previously immersed in cold ethanol. Air dried slides were stained by Giemsa 5% in a phosphate buffer (pH 8) and visualized by light microscopy.

Metaphase cells of 40 randomly selected cells (20 cells from each of two replicate slides) were analyzed from each flask.

### *2.7. SV40 DNA localization*

DNA from cytoplasm and nucleus from TOSM cells were extracted according to Single et al. (1998).  $4 \times 10^6$  TOSM cells were submitted to lysis with one mililiter of 75 mM NaCl, 1 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 8 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 250 mM sucrose and digitonin 35 µg/ml under vigorous vortexing. After centrifugation, 5 µl of supernatant were used in the polymerase chain reaction (PCR) to detect SV40 cytoplasmic DNA. Nuclear DNA extraction was carried out with DNAzol (GIBCO-BRL), essentially as described by the manufacturer, using the pellet obtained after lysis and centrifugation.

PCR was performed using SV40 T Ag specific primers and the protocol described elsewhere (Bergsagel et al., 1992).

As a control of nuclear and cytoplasmic extraction, PCR to detect the constitutive glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) gene was done with the same samples. The primers used were 5'-GGCAAGTTCCATGGCACAGT-3' as forward and 5'-GTCCCTCCACGATGCCAAAG-3' as reverse. PCR conditions consisted of an initial denaturation of 94°C for 5 min and then 40 cycles of denaturation at 94°C for 1 min, annealing at 58°C for 1 min and extension at 72°C for 1 min. A final extension at 72°C for 7 min was performed at the end of the cycles.

PCR products were visualized at an UV source by ethidium bromide staining after electrophoresis through 2.5% agarose gels.

#### *2.8. SV40 mRNA detection*

Total RNA of  $5 \times 10^6$  TOSM cells was extracted with TRIzol (GIBCO-BRL), as recommended by the manufacturer. In order to isolate messenger RNA, the PolyAtract mRNA Systems III kit (Promega) was used. Total RNA equivalent to  $5 \times 10^6$  TOSM cells was submitted to isolation, following manufacturer instructions. The mRNA obtained was recovered according to the manufacturer's protocol. RNase-free water and plastic supplies were kept under contamination-free conditions.

Reverse transcription reaction (RT) was performed using 5  $\mu$ l of mRNA suspension and 130 ng of the specific SV40 reverse primer. This mixture was incubated at 70°C for 5 min. After cooling at 4°C, enzyme buffer, 10 nM of each dNTP, RNase inhibitor (RNAguard – GIBCO-BRL) and the RT M-MuLV (GIBCO –BRL) enzyme were added. The reaction was carried out by incubating at 37°C for 60 min in a total volume of 20  $\mu$ l.

PCR, as well as product analysis, were performed as described above (SV40 DNA localization) with 2  $\mu$ l of the RT reaction (1/10).

### **3. Results**

### *3.1. Morphology and growth were different between OSM and TOSM cells*

The morphology of OSM and TOSM cells are shown in Fig. 1. OSM cells (Fig. 1A) are more heterogeneous than TOSM cells (Fig. 1B), although both presented a fibroblast-like aspect.

The growth kinetic differences have been demonstrated by counting total viable cells (Fig. 2). The average cell number, 72 hours after seeding equal quantity of secondary and transformed cells, was  $3.8 \times 10^5$  to OSM and  $1.4 \times 10^6$  to TOSM. This result represents 3.7 folds more TOSM cells than OSM. Indeed, confluence of TOSM cells was obtained more quickly than OSM cells, which have led to perform passages at different intervals: one week to the secondary cells and two days to the transformed cells.

### *3.2. TOSM cells were permissive to SRLV*

When infected by SRLV, confirmed by PCR (data not shown), the syncytium observed showed only slightly differences with less nuclei per giant cell in the TOSM cells (Fig. 1C and 1D) in comparison to OSM cells.

### *3.3. Metaphase cell analysis*

The diploid number of OSM cells is 54 and was consistent in all 80 metaphases (Fig. 3A). The data from 80 metaphases of TOSM cultures indicate a predominance of 47 chromosomes (31 %) (Fig. 3B) with a distribution of 43-54.

### *3.4. SV40 DNA was detected in the nucleus and the cytoplasm of TOSM cells*

In order to evaluate first, the presence of SV40 plasmid in TOSM and second, in which compartment it was, a protocol of DNA extraction was used to obtain cytoplasmic and nuclear DNA separately. PCR to detect T antigen nucleotide sequence was performed and the results are shown in Fig. 4A. The fragment of 105 bp was

detected in both compartments of TOSM cells (lanes 1 and 2). In contrast, as expected, the corresponding 380 bp of GAPDH was only detected in the nuclear DNA (lane 3).

### *3.5. T antigen mRNA was detected in TOSM cells*

The putative expression of SV40 antigen was analyzed by RT-PCR (Fig. 4B). It was possible to observe the corresponding fragment after cDNA amplification of TOSM and COS-1 cells mRNA, previously submitted to reverse transcription (lanes 1 and 3, respectively). No PCR product was detected in OSM cells (lane 2).

## **4. Discussion**

Primary cells have a limited proliferative life span before reaching a permanent growth arrest, known as replicative senescence (Hayflick, 1965). Immortalization of cells by overexpression of oncogenes, such as the SV40, is an interesting approach to obtain relevant cell lines.

Synovial membrane cells are routinely used to isolate and propagate small ruminant lentiviruses, CAEV and MVV. Secondary cell cultures, in general, presented a limited lifespan and, in the case of herpes simplex virus infection, the number of passages could influence the pattern of virus expression and morphogenesis (Jensen and Norrild, 2000). Although permissive cell lines to SRLV were already described, they were not from synovial membrane origin (Teixeira et al., 1997; Mselli-Lakhal et al., 2001). This work was developed in order to obtain an ovine synovial membrane cell line.

The TOSM cells were established by the transfection of SV40 large T antigen. The mechanism by which this antigen induce transformation is not totally elucidated, although the induction of mutations, the inactivation and/or increased expression of p53 were described (Sladek et al., 2000).

About metaphase cells analysis, the OSM karyotype shows an expected chromosome number,  $2n=54$ , similar with diploid number described to ovine (Crihiu et al., 2001). TOSM cells exhibited many random chromosomal changes. Analysis showed characteristic balanced chromosomal rearrangements rather than loss of chromosomal material. In most cell types, these immortalized cell lines present important genomic modifications, maybe due to karyotypic changes. Functional telomerases are essential for chromosomal integrity, and recent reports suggest an association between them and cellular senescence (Darimont et al., 2002). However, Schiller et al. (1998) demonstrated that original tumorigenic cells were reverted to the nontumorigenic karyotype with in vitro increase of passages. If genomic modifications can lead to limited life span of cell lines, more studies are necessary to better understand the karyotype of TOSM cells.

The inactivation of p53 is probably done by association with large T antigen (Zhu et al., 1991), which seems to be expressed in TOSM cells as detected by RT-PCR. Besides, SV40 DNA was present in the nucleus and in the cytoplasm. If the nuclear DNA detected corresponded to integrated DNA is not known, although the integration was described in cell lines transformed by SV40 (Cole, 1996). Regarding the presence of SV40 DNA in cytoplasm, we speculate the possibility of an episomal presentation. The pSV1 plasmid used for transfection, besides containing both small t and large T antigens, is also composed by the *ORI* region. The persistence of an episomal form in TOSM cells could be attributed to this region, the viral origin of DNA replication (Cole, 1996). Moreover, mixed integrated and episomal forms were already described to others small DNA tumor viruses, as human papillomavirus 16 (Matsukura et al., 1989; Cullen et al., 1991).

Although only large T was analyzed by PCR and RT-PCR, the expression of small t antigen cannot be excluded as it is present in pSV1. Porrás et al. (1999) have demonstrated the cooperation between the two proteins in regulating cell growth.

The morphology and growth changes induced by transformation might influence virus pattern of infection. Slightly differences in SRLV induced syncytium were observed in TOSM cells comparing to OSM cells (data not shown). Mselli-Lakhal et al. (2001) have obtained three epithelial cell lines from caprine milk cells and one of them, although producing high titers of CAEV, have not shown the characteristic syncytium. Whether this CPE pattern is related to changes in cell protein expression induced by SV40 large T antigen is not known and it should be interesting to analyze if there is a selection of specific virus populations in transformed cells compared to the secondary ones.

### **Acknowledgements**

This work was partially supported by grants from the Ministério da Ciência e Tecnologia do Brasil, PRONEX em Virologia Veterinária. We thank CAPES, Ministério da Educação, for funding U. M. Costa (doctoral-fellowship).

## References

- Bergsagel, D.J., Finegold, M.J., Butel, J.S., Kupsky, W.J., Garcea, R.L., 1992. DNA sequences similar to those of simian virus 40 in ependymomas and choroid plexus tumors of childhood. *N. Engl. J. Med.* 326, 988-993.
- Butel, J.S., Lednicky, J.A., 1999. Cell and molecular biology of simian virus 40: implications for human infections and disease. *J. Natl. Cancer Inst.* 91, 119-134.
- Cole, C.N., 1996. Polyomavirinae: the viruses and their replication. In.: Fields, B.N., Knipe, D.M., Howley, P.M. et al. (Eds), *Fields Virology*, 3<sup>rd</sup> edition, Vol. 2, Lippincott-Raven Publishers, Philadelphia, pp. 1997-2025.
- Crawford, T.B., Adams, D.S., Cheevers, W.P., Cork, L.C., 1980. Chronic arthritis in goats caused by a retrovirus. *Science* 207, 997-999.
- Cribiu, E.P., Di Berardino, D., Di Meo, G.P., Eggen, A., Gallagher, D.S., Gustavsson, I., Hayes, H., Iannuzzi, L., Popescu, C.P., Rubes, J., Schmutz, S., Stranzinger, G., Vaiman, A., Womack, J., 2001. International System for Chromosome Nomenclature of Domestic Bovids (ISCNDB 2000). *Cytogenet. Cell Genet.* 92, 283-299.
- Cullen, A.P., Reid, R., Champion, M., Lorinez, A.T., 1991. Analysis of the physical state of different human papillomavirus DNAs in intraepithelial and invasive cervical neoplasm. *J. Virol.* 65, 606-612.
- Darimont, C., Avanti, O., Tromvoukis, Y., Vautravers-Leone, P., Kurihara, N., Roodman, G.D., Colgin, L.M., Tullberg-Reinert, H., Pfeifer, A.M.A., Offord, E.A., Mace, K., 2002. SV40 T antigen and telomerase are required to obtain immortalized human adult bone cells without loss of the differentiated phenotype. *Cell Growth Differ.* 13, 59-67.
- Ferris, N.P., Hutchings, G.H., Moulds, H.J., Golding, J., Clarke, J.B., 2002. Sensitivity of primary cells immortalized by oncogene transfection for the detection and

isolation of foot-and-mouth disease and swine vesicular disease viruses. *Vet. Microbiol.* 84, 307-316.

Hayflick, L., 1965. The limited in vitro lifetime of human diploid cell strains. *Exp. Cell Res.* 37, 614-636

Hötzel, I., Bastos, E.S., Ravazzolo, A.P., Moojen, V., 1993. Caprine arthritis encephalitis virus: isolation and identification in Rio Grande do Sul, Brazil. *Braz. J. Med. Biol. Res.* 23, 1175-1179.

Jensen, H.L., Norrild, B., 2000. The effects of cell passages on the cell morphology and the outcome of herpes simplex virus type 1 infection. *J. Virol. Methods* 84, 139-152.

Levine, A.J., 1996. The origins of virology. In.: Fields, B.N., Knipe, D.M., Howley, P.M. et al. (Eds), *Fields Virology*, 3rd edition, Vol. 1, Lippincott-Raven Publishers, Philadelphia, pp. 1-14.

Matsukura, T., Koi, S., Sugase, M., 1989. Both episomal and integrated forms of human papillomavirus type 16 are involved in invasive cervical cancers. *Virology* 172, 63-72.

Mselli-Lakhal, L., Guiguen, F., Fornazero, C., Favier, C., Durand, J., Grezel, D., Moussa, A., Mornex, J.F., Chebloune, Y., 2001. Immortalized goat milk epithelial cell lines replicate CAEV at high level. *Vet. Res.* 32, 429-440.

Podzorski, R.P., 2002. Molecular testing in the diagnosis and management of hepatitis C virus infection. *Arch. Pathol. Lab. Med.* 126, 285-290.

Porrás, A., Gaillard, S., Rundell, K., 1999. The simian virus 40 small-t and large-T antigens jointly regulate cell cycle reentry in human fibroblasts. *J. Virol.* 73, 3102-3107.

Rhim, J.S., 2000. Development of human cell lines from multiple organs. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 919, 16-25.

Schiller, J.H., Bittner, G., Wu S.Q., Meisner, L., 1998. Karyotypic changes associated with spontaneous acquisition and loss of tumorigenicity in a human transformed

bronchial epithelial cell line: evidence for in vivo selection of transformed clones. In *Vitro Cell Dev. Biol. Anim.* 34, 283-289.

Shay, J.W., Van Der Haegen, B.A., Ying, Y., Wright, W.E., 1993. The frequency of immortalization of human fibroblasts and mammary epithelial cells transfected with SV40 large T-antigen. *Exp. Cell Res.* 209, 45-52.

Single, E.B., Leist, M., Nicotera, P., 1998. Simultaneous release of adenylate kinase and cytochrome c in cell death. *Cell Death Differ.* 5, 1001-1003.

Sladek, T.L., Laffin, J., Lehman, J.M., Jacobberger, J.W., 2000. A subset of cells expressing SV40 large T antigen contain elevated p53 levels and have an altered cell cycle phenotype. *Cell Prolif.* 33, 115-125.

Sontag, E., Federov, S., Kamibayashi, C., Robbins, D., Cobb, M., Mumby, M., 1993. The interaction of SV40 small tumor antigen with protein phosphatase 2A stimulates the map kinase pathway and induces cell proliferation. *Cell* 75, 887-897.

Teixeira, M.F.S., Lambert, V., Mselli-Lakahl, L., Chetab, A., Chebloune, Y., Mornex, J.F., 1997. Immortalization of caprine fibroblasts permissive for replication of small ruminant lentiviruses. *Am. J. Vet. Res.* 58, 579-584.

Weingartl, H.M., Sabara, M., Pasick, J., van Moorlehem, E., Babiuk, L., 2002.

Continuous porcine cell lines developed from alveolar macrophages: partial characterization and virus susceptibility. *J. Virol. Methods* 104, 203-216.

Zheng, W., Zhao, Q., 2002. Establishment and characterization of an immortalized Z310 choroidal epithelial cell line from murine choroid plexus. *Brain Res.* 958, 371-380.

Zhu, J., Rice, P.W., Abate, M., Cole, C.N., 1991. The ability of SV40 large T antigen to immortalize primary mouse embryo fibroblasts co-segregates with its ability to bind p53. *J. Virol.* 65, 6872-6880.

### Figure legends

Fig. 1. Morphology of OSM **(A)** and TOSM **(B)** cells. Cytopathic effect was observed in MVV **(C)** and CAEV **(D)** TOSM inoculated cells. White arrows indicate multinucleated cells. (Stained by Giemsa, 200X).

Fig. 2. Growth curves of OSM **(A)** and TOSM **(B)** cells. TOSM cells showed 3.7 folds higher cell count than OSM cells at 72 h after seeding.

Fig. 3. Metaphase chromosomes of OSM **(A)** and TOSM **(B)** cells. The OSM metaphase contains 54 and TOSM metaphase shown contains 47 chromosomes. (Stained by Giemsa, 1000 x).

Fig. 4. SV40 DNA and mRNA detection in TOSM cells. The presence of SV40 DNA **(A)** was evaluated by PCR in two cellular compartments: the nucleus (lane 1) and the cytoplasm (lane 2). GAPDH was used as DNA extraction control: nuclear DNA (lane 3) and cytoplasmic DNA (lane 4). RT-PCR was performed to detect SV40 mRNA **(B)** in TOSM (lane 1) and OSM cells (lane 2). As a positive control, RNA extracted from COS-1 cells were submitted RT-PCR using the same protocol (lane 3). Lane 4: PCR negative control. m: 100 bp DNA ladder.

Figure 1

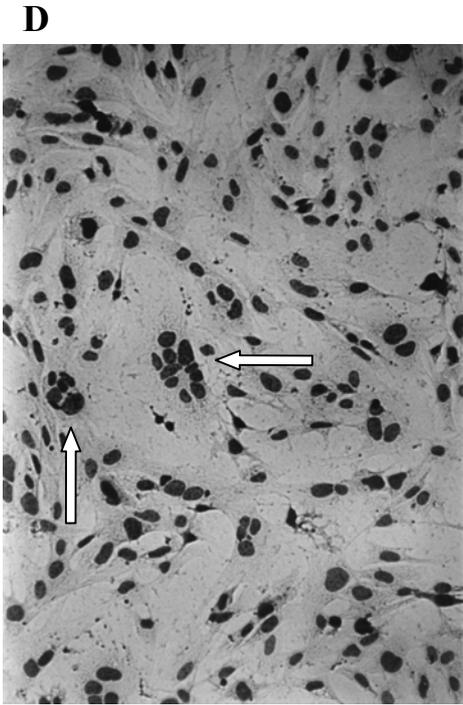
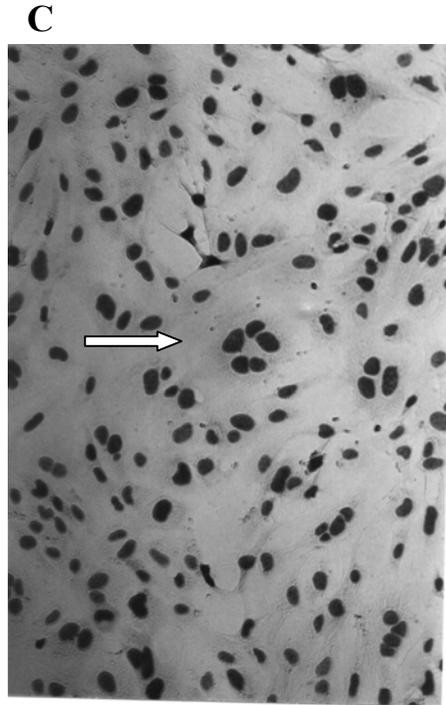
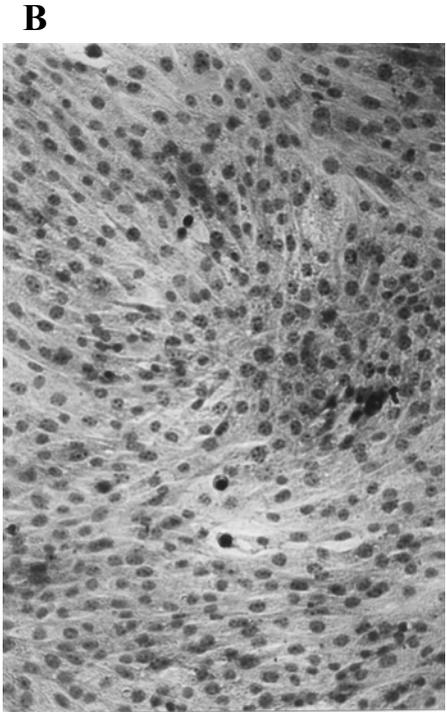
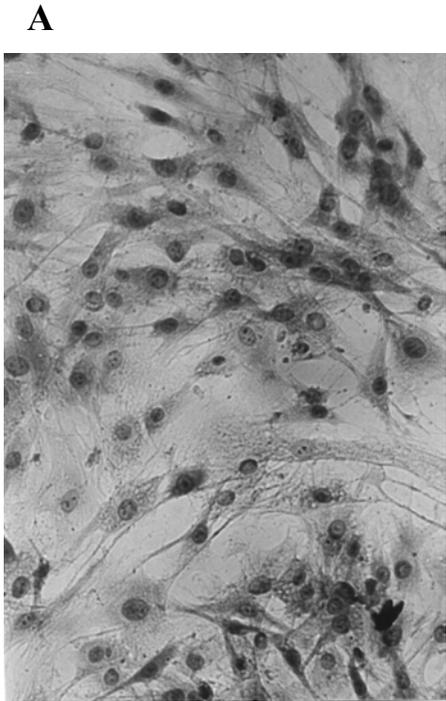


Figure 2

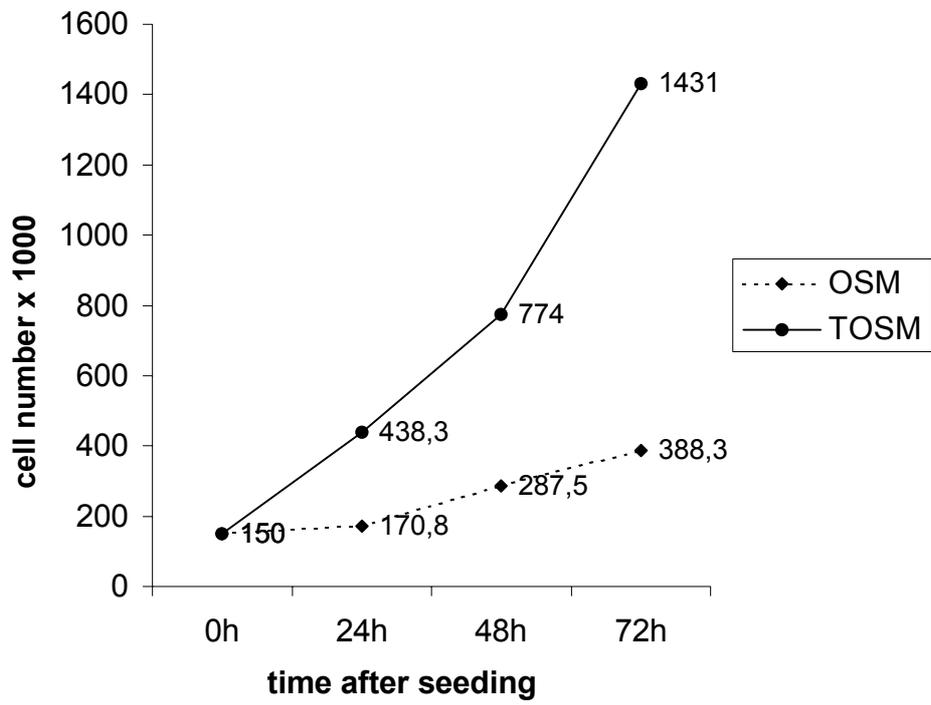


Figure 3

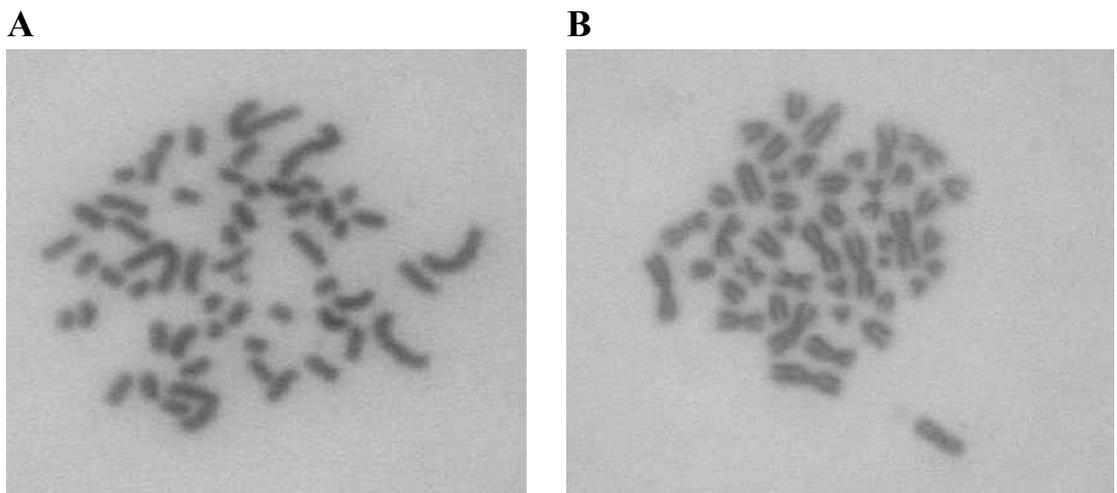
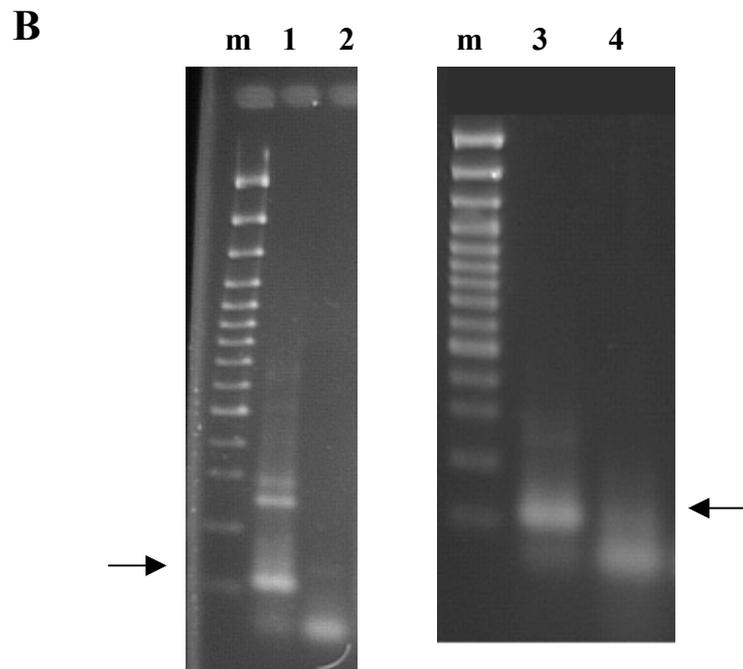
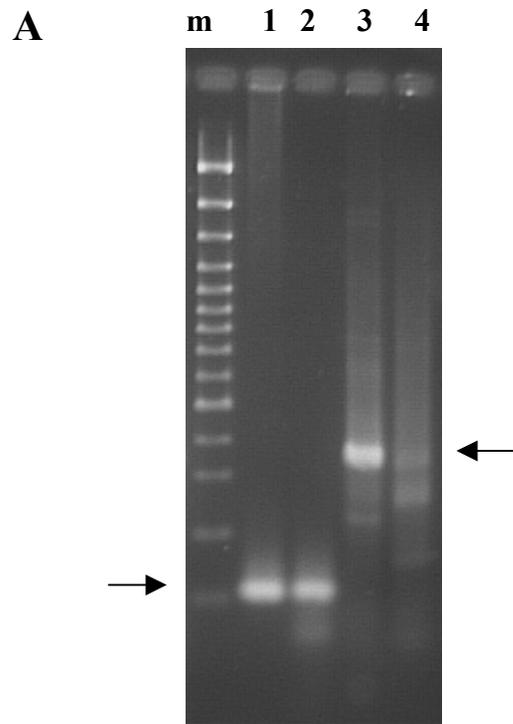


Figure 4



## ANEXO 1

### Protocolo do *Kit PolyATtract mRNA Systems*®

#### A) Anelamento

1. Em um tubo de 1,5 mL coloque 0,1 a 1,0 mg de RNA total, em um volume final de 500 microlitros de água livre de RNase.
2. Coloque o tubo em banho-maria a 65 °C por 10 minutos.
3. Adicione ao RNA 3 µL da sonda oligo (dt)-biotinilada e 13 µL de SSC 20x. Misture gentilmente e incube, a temperatura ambiente até o resfriamento completo. Isto pode levar 10 minutos ou menos.

#### B) Preparação das soluções estoque

1. Prepare 1,2 mL de SSC 0,5x misturando 30µL de SSC 20x com 1.170 mL de água livre de RNase, em tubo estéril e também livre de RNase.
2. Prepare 1,4 mL de SSC 0,1x misturando 7 µL de SSC 20x com 1.393 mL de água livre de RNase

#### C) Lavando as partículas de estreptavidina-paramagnéticas

1. Ressuspenda um tubo de partículas de estreptavidina-paramagnéticas (SA-PMPs), para cada isolamento, agitando gentilmente o fundo do tubo até que as partículas fiquem completamente dispersas, então capture-as colocando o tubo na estante magnética até que as SA-PMPs fiquem presas na lateral do tubo (aproximadamente 30 segundos).
2. Remova cuidadosamente o sobrenadante. Não centrifugue as partículas.
3. Lave as SA-PMPs 3 vezes com o SSC 0,5x (300 µL por lavagem), a cada lavagem capture-as usando a estante magnética e remova o sobrenadante cuidadosamente.
4. Ressuspenda as SA-PMPs lavadas em 100 µL de SSC 0,5x

#### D) Captura e lavagem dos híbridos anelados Oligo(dt)-mRNA

1. Adicione o conteúdo completo da reação de anelamento ao tubo contendo as SA-PMPs lavadas.
2. Incube a temperatura ambiente por 10 minutos. Misture gentilmente por inversão a cada 1-2 minutos.

3. Capture as SA-PMPs usando a estante magnética e gentilmente remova o sobrenadante sem mexer na SA-PMPs.
4. Lave as partículas quatro vezes como SSC 0,1x (300  $\mu$ L por lavagem) agitando gentilmente o fundo do tubo até que as partículas fiquem suspensas. Após a última lavagem, remova o máximo de sobrenadante possível sem agitar as partículas.

#### E) Eluição do mRNA

1. Ressuspenda (com o dedo) o pelete final das SA-PMPs em 100  $\mu$ L de água livre de RNase.
2. Capture magneticamente as SA-PMPs e transfira o mRNA eluído para um novo tubo livre de RNase.
3. Repita a eluição com nova ressuspensão das SA-PMPs em 150  $\mu$ L de água livre de RNase. Coloque o eluído no mesmo tubo anterior (volume final do eluído 250 $\mu$ L).
4. Armazenar o mRNA à  $-80^{\circ}\text{C}$ .

## ANEXO 2

### Protocolo do *QIAquick gel extraction Kit Protocol* -Qiagen®

1. Retire o fragmento de DNA do gel de agarose com uma lâmina limpa e afiada.
2. Pese o gel em um tubo transparente. Adicione 3 volumes do tampão QG para cada volume do gel (100 mg ~ 100µL).
3. Incube por 10 minutos a 50 °C (ou até que o gel esteja completamente dissolvido). Para acelerar a dissolução do gel submeter o tubo ao vortex a cada 2-3 minutos durante a incubação.
4. Após a dissolução completa do gel observar a cor da solução. Deve estar amarela semelhante a cor do tampão QG.
5. Adicione 1 volume do gel de isopropanol e misture.
6. Coloque a coluna de purificação em um tubo de 2 mL.
7. Deposite a solução com o DNA na coluna e centrifugue por um minuto.
8. Descarte o líquido do tubo e reposicione a coluna novamente.
9. Adicione 0,5 mL do tampão QG à coluna e centrifugue por um minuto.
10. Lave a coluna acrescentando 0,75 mL do tampão PE e centrifugue por um minuto.
11. Descarte o líquido do tubo, reposicione a coluna e faça um centrifugação adicional de um minuto a 17.900 xg.
12. Coloque a coluna em um tubo limpo.
13. Para eluir o DNA, adicione 50 µL do tampão EB ou água ultrapura, no centro da membrana da coluna e centrifugue por um minuto.

### ANEXO 3

#### Protocolo do Wizard® PCR Preps DNA Purification System

1. Retire o fragmento de DNA do gel de agarose com uma lâmina limpa e afiada.
2. Transfira o fragmento do gel (deve ter aprox. 300 mg) para um tubo de 1,5 mL e incube a 70 °C até a agarose dissolver completamente.
3. Adicione um mL de resina e misture vigorosamente por 20 segundos, não utilize vortex.
4. Para cada amostra prepare uma minicoluna, adaptando uma seringa à minicoluna.
5. Deposite a solução contendo a resina e o DNA na seringa e pressione o êmbolo suavemente, fazendo a solução passar pela minicoluna.
6. Retire a seringa da minicoluna, remova o êmbolo, recoloque a seringa no minicoluna. Adicione 2 mL de isopropanol 80% na seringa e pressione o êmbolo suavemente, para lavar a minicoluna.
7. Remova a seringa e transfira a minicoluna para um novo tubo de 1,5 mL. Centrifugue a minicoluna por 2 minutos a 10.000 xg para secar a resina.
8. Transfira a minicoluna para um novo tubo. Adicione 50 µL de água e aguarde um minuto. Centrifugue a minicoluna por 20 segundos a 10.000 xg para eluir o DNA.
9. Descarte a minicoluna. O DNA pode ser armazenado a 4 °C ou -20 °C.

## ANEXO 4

Protocolo de clonagem com o TOPO TA CLONING – INVITROGEN®

### Preparação para a transformação.

- para cada transformação é necessário uma ampola com as bactérias competentes e duas placas seletivas (LB + ampi).
- Equilibrar o banho-maria a 42° C.
- Colocar o meio SOC a temperatura ambiente.
- Aquecer as placas seletivas a 37° C por 30 min.
- Espalhar 40 µl de X-gal (40mg/ml) em cada placa com LB e incubar a 37° C até o momento do uso.
- Descongelar no gelo uma ampola de bactérias (One Shot cells) para cada transformação.

Reagentes	<i>E. coli</i> competente
Produto de PCR	0,5 a 4 µl
Solução salina	1 µl
Água estéril	qsp 5 µl
Vetor TOPO*	1 µl
Volume final	6 µl

\* A solução do Vetor apresenta uma coloração vermelha para melhor visualização.

### Reação de transformação

- Misturar suavemente a reação de ligação e incubar por 5 min a temperatura ambiente (a incubação pode variar de 30 seg a 30 minutos conforme a necessidade).
- Colocar a reação no gelo.

### Transformação química das bactérias

- Acrescentar 2 µl da reação de ligação no tubo das bactérias e misturar suavemente (não pipetar).
- Incubar no gelo por 5 a 30 min.
- Colocar as bactérias a 42° C por 30 segundos, sem agitar.
- Transferir imediatamente os tubos para o gelo.
- Adicionar 250 µl de meio SOC a temperatura ambiente.

- Fechar bem o tubo e por no agitador a 37° C por 1 hora (200 rpm)
- Espalhar 10-50 µl de cada transformação em uma placa seletiva pré-aquecida e incubar na estufa a 37° C overnight. Se o volume for muito pequeno pode acrescentar 20 µl de meio SOC. Semear 2 placas com quantidades diferentes para garantir que não haja uma sobreposição de colônias
- No dia seguinte selecionar as colônias brancas (podem ser também as azuis claras)

## ANEXO 5

### Meio 2xYT

Bacto-triptona	16 g
Bacto-yeast	10 g
NaCl	05 g
H <sub>2</sub> O destilada qsp	1000 mL