



**UNIVERSIDADE ESTADUAL DO CEARÁ
PRÓ-REITORIA DE PÓS-GRADUAÇÃO E PESQUISA
FACULDADE DE VETERINÁRIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS
VETERINÁRIAS**

CARLOS ALBERTO FURTADO LOPES JUNIOR

**PRODUÇÃO DE ANTÍGENOS DO VÍRUS DA ARTRITE
ENCEFALITE CAPRINA PARA IMUNODIAGNÓSTICO.**

FORTALEZA

2011

CARLOS ALBERTO FURTADO LOPES JUNIOR

PRODUÇÃO DE ANTÍGENOS DO VÍRUS DA ARTRITE
ENCEFALITE CAPRINA PARA IMUNODIAGNÓSTICO.

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-
Graduação em Ciências Veterinárias da Faculdade de
Veterinária da Universidade Estadual do Ceará,
como requisito parcial para a obtenção do grau de
Mestre em Ciências Veterinárias.

Área de Concentração: Sanidade Animal.
Linha de Pesquisa: Sanidade de pequenos ruminantes.
Orientador(a): Profa.Dra.Maria Fátima da Silva Teixeira

FORTALEZA

2011

L864p Lopes Junior, Carlos Alberto Furtado

Produção de antígenos do vírus d artrite encefalite caprina para imunodiagnóstico / Carlos Alberto Furtado Lopes Junior .- Fortaleza, 2011.

44p.;il.

Orientadora Prof^a. Dr^a Maria Fátima da Silva Teixeira

Co-orientador: Prof..Dr. Raymundo Rizaldo Pinheiro

Dissertação (Mestrado Acadêmico em Ciências Veterinárias) - Universidade Estadual do Ceará,

CARLOS ALBERTO FURTADO LOPES JUNIOR

PRODUÇÃO DE ANTÍGENOS DO VÍRUS DA ARTRITE
ENCEFALITE CAPRINA PARA IMUNODIAGNÓSTICO.

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-
Graduação em Ciências Veterinárias da Faculdade de
Veterinária da Universidade Estadual do Ceará,
como requisito parcial para a obtenção do grau de
Mestre em Ciências Veterinárias.

Aprovada em: ____/____/____

BANCA EXAMINADORA

Profa. Dra. Maria Fátima da Silva Teixeira
Universidade Estadual do Ceará
Orientadora

Dra. Tânia Valeska Medeiros Dantas
EMBRAPA/Examinadora

Dr. Raymundo Rizaldo Pinheiro
EMBRAPA Caprinos e Ovinos
Co-Orientador/ Examinador

A minha esposa

Larissa que ilumina os meus dias com
alegria que contagia

A minha família

Deuzinda, Edmar, Wander, Edmara,
Alexandro, Aleksandr, Yan e Regina
pelo apoio e carinho de cada um.

Aos meus irmãos

Davi, Hannah, Karl, Ioseph, Julia e Joanna
Por nunca deixarem me esquecer quem eu sou.

Aos meus pais e avós

Carlos, Cristina, Karl, Alzira, Vitória
e José (*in memoriam*)
por todas as minhas vitórias
porque também são suas.

Dedico

*“Um homem não pode fazer o certo numa área da vida,
enquanto está ocupado em fazer o errado em outra.
A vida é um todo indivisível.”*

Mahatma Gandhi

AGRADECIMENTOS

À UECE e ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias que propiciou a realização deste projeto.

À Embrapa e ao Centro Nacional de Pesquisa em Caprinos que disponibilizou as condições técnica e infraestrutura para a realização deste trabalho.

À FUNCAP pelo auxílio financeiro que possibilitou a realização deste trabalho

AGRADECIMENTOS

A Deus, pela força e paciência nos momentos mais difíceis.

A minha esposa por ser a melhor companheira que eu podia querer, por me ajudar em tudo o que é possível e impossível a minha mais sincera gratidão.

Aos meus pais, Carlos Alberto por suas lições de vida e Cristina por nunca deixar de acreditar em mim.

A minha grande amiga Regina Heloisa pelo exemplo de profissional, apoio quando me deparo com becos aparentemente sem saída.

Aos meus irmãos Davi, Hannah, Karl, Ioseph, Julia e Joanna por me acompanharem nas lutas da vida. A minha sogra Deuzinda, minha segunda mãe obrigado pela grande força no dia a dia pelo carinho e amor.

A minha cunhada Edmara por ter me estimulado a entrar neste mestrado que tanto me ensinou, por nunca dizer não (nem mesmo quando está atolada de trabalho! inclusive lendo esta dissertação) e por todas as suas ajudas incontáveis, o meu obrigado.

A professora Dra. Maria Fátima da Silva Teixeira minha orientadora pelo exemplo de caráter profissional, pelos conhecimentos, pela confiança depositada em mim e principalmente pela paciência.

Ao co-orientador Dr. Rizaldo da EMBRAPA por disponibilizar os recursos para execução desse projeto, pelos conhecimentos, por vibrar com os sucessos e estar sempre pronto a apoiar nos fracassos.

Ao colega de mestrado Ronaldo por ajudar diretamente nesse projeto, por disponibilizar sua casa para alojamento e por todas as outras ajudas que aqui não teriam espaço o suficiente para serem mencionadas. Aos colegas de mestrado Luís e Junior por todo apoio e suporte. A Dalva e Thalisson do laboratório de virologia da EMBRAPA.

A Dra. Alice e a todos os laboratoristas e colegas da EMBRAPA, em especial a Osmarilda, principalmente pela paciência.

A toda minha segunda família do Laboratório de virologia da UECE – LABOVIR, Allan, Apolliana, Dávila, Gabrielle, Marília, Wesley, Igor, Renan, Eliane e Daniel.

Ao meu melhor amigo e colega de mestrado Danilo e amiga Ana Luiza, pelos momentos de descontração melhores conversas.

O meu obrigado a todos os professores do PPGCV que contribuíram com minha formação. A todos que contribuíram de alguma forma e que não foram mencionados acima,

Obrigado!

RESUMO

Os Lentivírus de pequenos ruminantes são responsáveis por uma significativa perda econômica que proporcionou o desenvolvimento de eficientes programas de controle e monitoramento na Europa e em outros países. O diagnóstico da CAE é baseado principalmente em testes sorológicos. A Organização Mundial da Saúde Animal (OIE) recomenda a utilização da Imunodifusão em gel de agarose (IDGA) pelo baixo custo, alta especificidade e praticidade de execução. Os antígenos utilizados para o diagnóstico sorológico são compostos principalmente pelas proteínas estruturais p28 e gp135. O IDGA pode determinar resultados falsonegativos, por ser um teste de baixa sensibilidade. Nesse sentido a produção de antígenos virais é importante nos testes de detecção da CAE, pois, trata-se de um insumo crítico que influencia diretamente na sensibilidade dos testes sorológicos. No processo de extração e purificação de proteínas são utilizados sistemas contendo polímeros ou surfactantes. Os sistemas que contêm surfactantes são mais simples e menos onerosos. Atualmente o SDS (dodecil sulfato de sódio) tem sido o surfactante de preferência em trabalhos com a proposta de extrair e purificar antígenos oriundos de Lentivirus de pequenos ruminantes. Nesse sentido este trabalho por objetivo avaliar o desempenho de outros surfactantes na produção de antígenos do vírus da artrite e encefalite caprina em relação ao surfactante SDS. Nos tratamentos avaliados pelo método de diagnóstico IDGA observou-se uma melhoria na difusibilidade dos antígenos em relação ao controle não submetido ao tratamento com surfactantes. Os surfactantes CHAPS e Triton x-100 apresentaram reações tanto para o pellet quanto para o sobrenadante, mesmo com a presença de interferentes, como a albumina no sobrenadante, denotando a presença de proteínas virais. Entretanto, nos ensaios de Western Blotting apenas o tratamento com CHAPS apresentou um resultado satisfatório em todas as concentrações utilizadas.

Palavras Chave: CAEV, Surfactantes, Produção de Antígeno, Detergente, Caprinos

ABSTRACT

The small ruminant lentiviruses are responsible for a significant economic loss that enabled the development of efficient control and monitoring programs in Europe and other countries. The diagnosis of CAE is mainly based on serological tests. The World Organisation for Animal Health (OIE) recommends the use of agarose gel immunodiffusion (AGID) for its low cost, high specificity and practicality of implementation. The antigens used for serological diagnosis are composed mainly by structural proteins p28 and gp135. The AGID can determine false-negative results, due to be a test of low sensitivity. Thus the production of viral antigens is important in testing for CAE, for this is a critical input that may influence the sensitivity of serological tests. In the protein extraction process, purification systems are used containing polymers or surfactants. The systems containing surfactants are simpler and less expensive. Currently, the SDS (sodium dodecyl sulfate) has been the surfactant preferably to extract and purify small ruminant lentivirus antigens. Therefore, this work aim to evaluate the performance of other surfactants in the caprine arthritis and encephalitis virus antigens production in relation to the surfactant SDS. The treatments evaluated by diagnosis method AGID was observed an improvement in the diffusion capacity of the antigens compared to the control not added with surfactants. The CHAPS and Triton X-100 surfactants had reactions to both: pellet and supernatant, indicating the presence of viral proteins, even with the presence of interfering as albumin in the supernatant. However, in Western blotting assays only the treatment with CHAPS showed a satisfactory result at all concentrations used.

Keywords: CAEV, Surfactants, Antigen Production, Detergent, Goats

LISTA DE FIGURAS

	pág
Figura 1- Estrutura dos vírus da artrite encefalite caprina.....	19
Figura 2 Representação esquemática da estrutura gênica do DNA próviral de Lentivírus.....	19
Figura 3 Formação do agregado micelar.....	29
Figura 4 Imunodifusão em gel de agarose dos tratamentos com surfactantes.....	42
Figura 5 Western Blotting tratamento com surfactantes, Sobrenadante.....	43
Figura 6 Western Blotting tratamento com surfactantes, Pellet.....	43

LISTA DE TABELAS

	Pág.
Tabela 1 - Classificação dos surfactantes.....	30
Tabela 2 - Surfactantes utilizados em protocolos de purificação de antígenos de LVPR.....	31

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

%- Percentagem

FAO-Food and Agriculture Organization of United Nations

CAEV- Vírus da Artrite e Encefalite Caprina

MVV- Vírus Maedi-Visna

ELISA - Enzyme-Linked Immunosorbent Assays

HIV- Vírus da Imunodeficiência Humana

FIV- Vírus da Imunodeficiência Felina

BIV - Vírus da Imunodeficiência Bovina

SIV - Vírus da Imunodeficiência Simia

AIEV- Vírus da Anemia Infecciosa Equina

nM – nanômetro

RNA- Ácido ribonucleico

DNA- Ácido desoxirribonucleico

LVPR- Lentivírus de Pequenos Ruminantes

LTR- long terminal repeat

TR- Transcriptase reversa

MHC- complexo principal de histocompatibilidade

PCR- Reação em cadeia da polimerase

IDGA – Imunodifusão em gel de agarose

IgG- Imunoglobulina G

WB- Western Blotting

EDTA- Ácidoetileno-diaminotetracético

pH – potencial hidrogeniônico

PSM- Processos de separação por membranas

CHAPS - 3-Cloramidopropildimetilamonio-1-propanosulfonato

CMC- Concentração micelar crítica

SDS- Dodecil sulfato de sódio

OIE-Organização Mundial de Saúde Animal

CAE- Artrite Encefalite Caprina

MSC- Membrana sinovial de caprinos

MEM- Meio essencial mínimo

SFB- Soro fetal bovino

CO₂- Dióxido de carbono

°C- Grau centígrado

TCID- Dose infectante de cultivo de tecidos

Sbn- Sobrenadante

G- unidade de centrifugação

PAGE- gel de poliacrilamida

kDa- kiloDaltons

M- Molar

mM- milimolar

HCl- Ácido clorídrico

MN- Membrana de nitrocelulose

Tris- Tris hidroximetilaminometano

cm- centímetro

kg-Kilograma

min- Minuto

v/v- volume/volume

p/v- peso volume

Rf- Distância relativa

PBS- Tampão de Fosfato

DAB-Diaminobenzidine

H₂O₂- Peróxido de Hidrogênio

Sumário

1.INTRODUÇÃO	17
2-REVISÃO DE LITERATURA.....	18
2.1-Artrite encefalite caprina.....	18
2.2-Características gerais do vírus.....	18
2.3-Genoma.....	19
2.4-Classificação dos Lentivirus.....	20
2.5-Sinais Clínicos	20
2.6-Resposta Imune	21
2.7-Diagnóstico	23
2.8-Purificação de proteínas	25
2.8.1-Purificação de baixa resolução.....	26
2.8.2-Purificação de alta resolução.....	27
2.8.3-Acondicionamento final.....	28
2.9-Aditivos	29
3-JUSTIFICATIVA	31
4- HIPÓTESE CIENTÍFICA	31
5-OBJETIVOS	32
5.1-GERAL.....	32
5.2-ESPECÍFICOS	32
CAPÍTULO 1	33
INTRODUCTION	34
MATERIAL AND METHODS	35
RESULTS AND DISCUSSION.....	36
CONCLUSION	39
REFERENCES	39
6-PERSPECTIVAS.....	41
7-REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	41

1.INTRODUÇÃO

O rebanho caprino nacional detém aproximadamente 9,5 milhões de animais, que correspondem a 1,1 % do rebanho mundial de acordo com a FAO (2008). Em 2007 o Brasil ocupou a 19ª posição na produção de leite de cabra mundial, segundo a FAO (Food and Agriculture Organization of United Nations)

O vírus da artrite e encefalite caprina (CAEV) pertence à família Retroviridae e gênero dos *Lentivirus*, estes são constituídos de RNA fita simples. Esse grupo alberga, além do CAEV, o Maedi Visna (MVV) e ambos causam doenças inflamatórias crônicas que acometem pequenos ruminantes (Haase, 1986; Peterhans, 2004). Os Lentivírus de pequenos ruminantes são responsáveis por uma significativa perda econômica que proporcionou o desenvolvimento de eficientes programas de controle e monitoramento na Europa e em outros países (Peterhans, 2004; Leitner, 2010; Brinkhof, 2009).

O vírus da CAE compartilha no seu genoma seqüências homólogas com o MVV (Hötzel, 2003). O CAEV possui quatro grandes proteínas estruturais antigenicamente relacionadas com o Lentivirus de ovinos. A p28, p19, componentes internos da p16 e a gp135 (Cheevers, 1988).

Algumas estratégias de controle são amplamente utilizadas com o objetivo de erradicar o vírus no rebanho, tendo como base evitar as rotas de transmissão viral descritas por Blacklaws, 2004. Dentre as medidas destacamos o isolamento do neonato ao nascer, fervura dos colostros mesmo oriundos de animais aparentemente saudáveis, evitar o contato direto entre os animais e realizar diagnósticos em animais recém adquiridos antes de introduzi-los no rebanho (Blacklaws, 2004).

O monitoramento geralmente é feito através de métodos sorológicos indiretos como Imunodifusão em Ágar (IDGA) e ELISA (enzyme-linked immunosorbent assays), (Brinkhof, 2007). Para a realização do monitoramento através de testes sorológicos são necessários antígenos virais, que podem melhorar diretamente a sensibilidade dos testes de diagnósticos empregados. No processo de purificação de proteínas virais são utilizados aditivos como os surfactantes. O surfactante de rotina utilizado para purificação de proteínas de Lentivírus de pequenos ruminantes é o SDS (Heckert et al., 1992; Celler et al., 1998; Torres., 2009). Diante disso o objetivo desse trabalho foi avaliar a utilização de outros surfactantes na produção de antígenos do vírus da artrite e encefalite caprina.

2-REVISÃO DE LITERATURA

2.1-Artrite encefalite caprina

Breve Histórico

O CAEV foi descrito clinicamente pela primeira vez em 1959 na Suíça, quando caprinos adultos apresentaram artrite crônica (Stünzi et al., 1964), sendo isolado posteriormente de amostras oriundas de caprinos (Cork et al.,1974). Em 1980, a Artrite Encefalite Caprina foi reconhecida como uma virose e seu agente incluso na família *Retroviridae* (Crawford et al.,1980). Desde então, diversas técnicas sorológicas tem sido empregadas, com o objetivo de diagnosticar e realizar um levantamento epidemiológico, monitorando a prevalência ou ocorrência do vírus da CAE (Pinheiro; Gouveia; Alves, 2001).

No Brasil, a primeira descrição de Lentivírus de pequenos ruminantes em caprinos ocorreu no Rio Grande do Sul(Moojen et al. 1986). Estudos realizados na região Nordeste, especificamente no Ceará mostram que ocorrência de caprinos soropositivos para o CAEV de 40,73% (Melo; Franke, 1997). Nesse mesmo Estado, outro estudo aponta uma prevalência da infecção pelo CAEV de 1% (40/ 4019), destacando os caprinos com faixas etárias acima de três anos que representaram 32,5% dos animais soropositivos (Pinheiro; Gouveia; Alves, 2001).

2.2-Características gerais do vírus

O CAEV é um vírus RNA que pertence à família *Retroviridae* e subfamília *Orthoretrovirinae* albergando o gênero *Lentivirus*. No gênero *Lentivirus* estão inclusos, além do CAEV: Maedi-Visna vírus (MVV); os vírus das imunodeficiências felina (FIV), bovina (BIV), símia (SIV) e humana (HIV-1, HIV-2), também pertencem a esse gênero o vírus da anemia infecciosa equina (AIEV) e *Lentivirus puma* (ICTV, 2009).

Os Lentivírus apresentam-se, de modo geral, como partículas esféricas. Possuem envelopes de 100 nm de diâmetro, núcleo cônico e denso, com duas moléculas idênticas de RNA fita simples unidas por pontes de hidrogênio além de uma molécula de transcriptase reversa e proteínas do nucleocapsídeo (Gonda et al., 1986). O envelope está associado covalentemente com as glicoproteínas transmembranárias (TM) e de superfície (SU), Figura 1. Apresenta uma matriz que está situada entre o capsídeo e o envelope (Pepin et al., 1998).

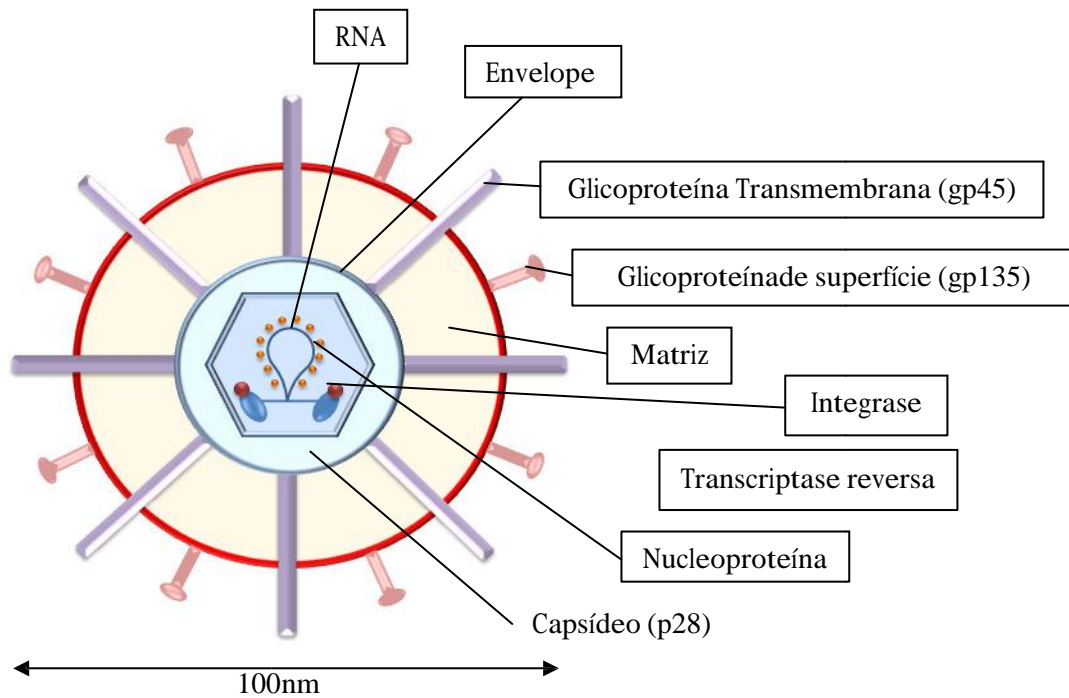


Figura 1 - Estrutura dos vírus da artrite encefalite caprina (Coffin, 1996), Adaptado.

2.3-Genoma

O genoma é composto por genes estruturais (*gag*, *env* e *pol*), genes de regulação (*tat*, *rev* e *vif*) e por duas regiões não traduzidas, únicas, situadas nas extremidades 5' (RU5) e 3' (RU3), que apresentam elementos promotores da transcrição do RNA viral, Figura 2. O DNA proviral resultante da retrotranscrição apresenta duas regiões terminais não codificadoras (LTR – *long terminal repeat*) (Clements; Payne, 1994). Segundo Narayan & Clements (1989), os genes *gag* e *pol* são os mais conservados enquanto *env* é mais heterogêneo.

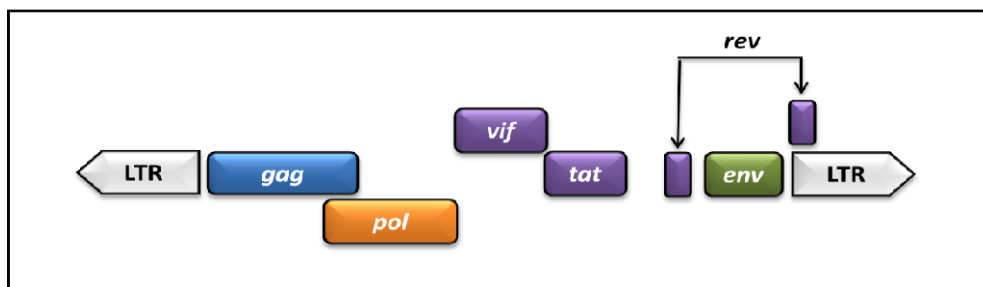


Figura 2- Representação esquemática da estrutura gênica do DNA proviral de Lentivírus (BOUZAR, 2003), Adaptado.

Os Lentivírus apresentam elevada taxa de mutação. Segundo Preston e Dougherty, (1996) as mutações decorrem, geralmente, de erros nas polimerizações durante o ciclo de replicação lentiviral mediante à: substituições de bases, arranjo genético, recombinação e hipermutações. A principal responsável pela ocorrência de erros é a transcriptase reversa (TR) que ao contrário das polimerases celulares, apresenta baixa fidelidade, devido à ausência da ação exonucleásica 3' – 5' necessária às correções de erros surgidos durante a polimerização celular.

2.4-Classificação dos Lentivirus

Recentemente, um estudo de Shahet al., 2004 propôs uma classificação para lentivírus de pequenos ruminantes(LVPR) baseada nas seqüências dos genes *gag* e *pol*, sendo classificados em quatro grupos equidistantes, A-D. O grupo A é subdividido em sete subtipos A1-A7, onde A1 é identificado pelos vírus Maedi-Visna por apresentar heterogeneidade genética e geográfica e o grupo B, refere-se ao tipo CAEV e compreende apenas dois subtipos distintos, B1 e B2. Os grupos C e D são representados por poucos isolados ou reconhecidos apenas pela seqüência *pol*. Em 2009 um novo grupo foi identificado em rebanho de caprinos em Roccaverano na Itália, designado como E. A análise do genoma desse protótipo revelou uma organização distinta dos outros grupos, apresentando deleção da subunidade dUTPase do gene *pol* e a ausência do gene *vpr*(previamente caracterizado como *tat*). Sendo ainda caracterizado como um lentivirus caprino de baixa patogenicidade (Reina et al., 2010).

2.5-Sinais Clínicos

A CAE possui alguns quadros clínicos principais de manifestação isolada ou simultânea: artrite, encefalite, mamite e pneumonia crônica. Podendo apresentar quadros secundários com o curso da doença como: Problemas de fertilidade (irregularidade ou ausência de cio), Problemas de parto (fracas contrações uterinas e diminuição no ganho de peso diário em cabritos (Franke, 1998).

Artrite

Esse é o quadro clínico mais freqüente da doença, sendo caracterizado por artrite degenerativa crônica envolvendo principalmente o carpo e o tarso, geralmente acometendo animais com mais de 1 ano de idade. Um agravamento do sintoma foi observado em cabras a partir da terceira lactação e a manifestação aguda em situações

de estresse prolongado (gestação, lactação e transporte por um longo período) impossibilitando o animal de locomoção. A artrite é frequentemente visível, causando dor e problemas de locomoção e conseqüentemente diminuindo a produtividade resultando no abate precoce dos animais (Perk, 1988; Franke, 1998).

A artrite reumatóide (AR) em humanos possui semelhança com quadro de inflamação crônica articular da CAE. Na AR pacientes apresentam níveis aumentados de óxido nítrico no soro e líquido sinovial da articulação em resposta do sistema imune à inflamação tecidual. Contudo um estudo utilizando animais infectados com CAEV observou a ausência de expressão de óxido nítrico (Lechner, 1999). A severidade da artrite nos animais soropositivos parece estar associada à resposta imunológica direcionada a proteína gp135 do vírus (Knowles, 1990)

Encefalite

A manifestação da encefalite pode ocorrer em todas as faixas etárias, contudo possui uma maior frequência em animais de 2-4 meses de idade. Os animais apresentam fraqueza e andar inseguro evoluindo para paralisia progressiva da musculatura dos membros posteriores estendendo-se até os membros anteriores. Os animais afetados são sacrificados para evitar o sofrimento prolongado (Franke, 1998).

Mamite

A mamite é freqüente, acarretando em grandes perdas econômicas para os caprinocultores, devido ao comprometimento da produção leiteira predispondo a glândula mamária à infecções secundárias. Foram observadas duas formas clínicas da mamite: A forma difusa, que ocorre tipicamente por ocasião do parto e a forma nodular (Smith et al. 1988; Lerondelle et al. 1988; Franke, 1998)

Pneumonia Crônica

A Pneumonia é rara em caprinos tendo maior frequência e gravidade em ovinos. Os sintomas são tosse, dispnéia após esforços físicos, taquipnéia, consolidação pulmonar, som úmido à auscultação e comprometimento do estado geral (Narayan e Cork 1985, Cutlip et al. 1988, Pereira 1995)

2.6-Resposta Imune

A resposta imune de um animal contra uma infecção vírica pode ser tanto do tipo natural (inespecífica) quanto adquirida (específica). A resposta imune natural, mediada por citocinas e células, inicia-se poucas horas após a infecção. Embora seja ineficaz para prevenir a infecção viral, seu papel é de enorme importância no controle da

intensidade da infecção até que o organismo comece a produzir elementos específicos de defesa, o que demanda entre cinco e sete dias. Os principais mecanismos da resposta imune natural consistem no bloqueio à infecção de novas células, inibição da replicação do vírus dentro das células e eliminação de células infectadas (Kreutz, 2001).

Os vírus da família *Retroviridae* podem persistir no hospedeiro durante toda a vida do animal, mesmo que esse manifeste resposta imune. Esse perfil de persistência resulta da capacidade do vírus de inserir cópias do seu genoma nos cromossomos das células hospedeiras e produzir a enzima denominada transcriptase reversa, que transcreve o genoma (RNA para DNA), mas não corrige seus próprios erros. Esse processo promove o surgimento, a cada ciclo, das *quasiespécies*, indivíduos com discretas diferenças genéticas (Flores, 2007).

A resposta imune humoral em caprinos infectados só pode ser detectada tardiamente após a infecção. Além disso, já foi demonstrada resistência à doença por animais portadores de certos haplótipos de complexo principal de histocompatibilidade (MHC) (Ravazzolo; Costa, 2007).

O vírus persiste no animal, apesar da resposta imune humoral e celular, a maioria dos animais infectados permanece assintomático por anos. Portanto, a identificação dos portadores dos vírus no rebanho pode basear-se na detecção de anticorpos específicos para CAEV. A resposta humoral contra as proteínas virais produzidas pelos genes *gag* e *env* aparece, inicialmente, após infecção natural e experimental, e varia muito de acordo com o curso da doença. Tem-se observado que os anticorpos direcionados contra p25, p16 e p14 desaparecerem em estágios tardios da doença (Fevereiro; Barros; Fagulha, 1999).

A resposta imune contra os vírus pode ser observada de duas formas principais: contra as próprias proteínas do vírus, principalmente as do capsídeo e as do envelope, como no caso do MVV ou pelo impedimento à infecção da célula - alvo pelo vírus. Esse impedimento à infecção celular pode ocorrer mediante o bloqueio da adsorção de um vírus recobrando a célula-alvo, iniciando a virólise mediada pelo complemento, causando agrupamento dos vírus, reduzindo assim o número de unidades infectantes disponíveis, ou pelo estímulo da fagocitose dos vírus pelos macrófagos (Tizard, 2002).

A habilidade para replicar em macrófagos e a dependência de replicação viral na maturação celular são os fatores-chave na patogênese de doenças causadas pelos lentivírus de ovinos e caprinos. Os macrófagos são células de vida longa que derivam de

pró-monócitos na medula óssea, circulam como monócitos no sangue e são distribuídos para todos os tecidos do corpo, onde são maturados e diferenciados em macrófagos teciduais. Pró-monócitos infectados latentemente podem ser detectados na medula óssea de animais infectados experimentalmente logo após inoculação e durante todo o curso da doença (Zink;Johnson, 1994).

Em decorrência de a replicação viral ser maturação dependente, essas células imaturas da linhagem macrófago podem permanecer persistentemente infectadas por longos períodos na ausência de expressão de antígeno viral, o sistema imune do hospedeiro é incapaz de detectar o vírus. A medula óssea então age como um reservatório de vírus, liberando de forma contínua e persistente monócitos infectados para o sangue periférico, os quais são distribuídos por todo o corpo. Quando as células maturam no tecido, a expressão gênica viral é regulada e o antígeno viral é então exibido para o sistema imune do hospedeiro (Zink; Johnson, 1994).

As células endoteliais vasculares infectadas *in vitro* apresentam capacidade de ligação aos leucócitos duas vezes maior do que as células não infectadas, elas mantêm a expressão de marcadores, aumentam, inicialmente, a expressão de antígeno MHC- I e, posteriormente, MHC – II. Tais eventos podem contribuir para a distribuição de células linfóides nos tecidos e demonstrar a ocorrência da resposta imune local na infecção do CAEV (Jan, 2000).

2.7-Diagnóstico

Vários métodos são utilizados no diagnóstico dessa enfermidade, destacando a imunodifusão em gel de agarose, recomendado pela Organização Mundial de Saúde Animal (OIE). Dentre os métodos sorológicos também utilizados estão: ELISA, Western Blot, Imunofluorescência indireta e Imunohistoquímica. Outros métodos são utilizados como o isolamento do vírus por cultivo celular, a reação em cadeia de polimerase (PCR), a e a microscopia eletrônica, contudo estes são utilizados com maior frequência nos laboratório de pesquisa (Dantaset al, 2008).

Reação em cadeia de polimerase (PCR)

Vários trabalhos demonstram com sucesso o uso da técnica de PCR na detecção do DNA proviral do CAEV. A PCR permite a identificação por amplificação direta de parte do ácido nucléico viral específica de fluidos e tecidos de um animal

infectado (Pinheiro,2001). Esta técnica é mais empregada em associação com métodos sorológicos em programas de controle avançados.

A detecção de infecção por CAEV mediante PCR é indicativa de uma infecção persistente e é dependente da quantidade amplificada da sequência- alvo e da especificidade do *primer*. Essa técnica, entretanto, poderá ser utilizada em programas de erradicação, quando identificar os animais não diagnosticados por sorologia. Em virtude do alto custo e dos resultados discordantes entre testes sorológicos e PCR, sugere-se que a PCR seja empregada para esclarecer resultados sorológicos indeterminados ou negativos (Knowles, 1997; Riet-Correa, 2001).

Imunodifusão em gel de agarose (IDGA)

Recomendado pela OIE, por ser de fácil aplicabilidade e não exigir equipamentos nem instalações sofisticadas, o IDGA é a forma diagnóstica mais utilizada em todo o mundo, principalmente em programas de controle da doença (Moojen et al., 1986). O IDGA tem alta especificidade, característica essa que o credencia a ser empregado como padrão no diagnóstico de triagem (Varea et al., 2001).

Segundo Vitu et al. (1982), o teste de IDGA é capaz de identificar animais experimentalmente infectados com CAEV cerca de quatro a cinco meses após a infecção. Os autores indicam ainda que esse teste mostrou-se mais sensível do que o teste de fixação do complemento e, ao ser comparado com o ELISA, mostrou resultados bastante correlacionados. Vale salientar que, ao se empregar o ELISA, a infecção pode ser identificada de modo mais precoce, até sete semanas após o período de incubação. Esse fato foi confirmado por Larsen; Hyllseth; Krogsrud, (1982), ao avaliarem caprinos experimentalmente infectados, afirmando a presença de anticorpos precipitantes, os quais podiam ser detectados de maneira mais precoce e com maior intensidade do que na fixação do complemento.

O teste IDGA pode ser utilizado para a detecção de anticorpos anti-CAEV tanto no soro sanguíneo quanto no colostro de animais infectados, e a presença de anticorpos no colostro pode ser utilizada na detecção da infecção no rebanho (Alkan; Tan, 1998).

Ensaio imunoenzimático (ELISA)

Nesse teste utilizam-se duas IgG, uma para reconhecer o antígeno e outra (anti-IgG) produzida em diferentes espécies de animal que reconhece a primeira IgG, com a qual

se ligará (Almeida; Lima, 2001). A especificidade dessa prova é garantida principalmente pela qualidade do antígeno adsorvido à placa (Madruga; Araújo; Soares, 2001). Vários métodos de ELISA indiretos usando vírus inteiro, proteínas do capsídeo CAEV ou recombinante têm sido descritos (Reyburnet al., 1992; Carey; Roy; Dalziel, 1993; Dantas et al, 2008). Esse teste permite a detecção de estirpes de um mesmo vírus que, embora sejam sorologicamente relacionadas, apresentam maior variação entre si (Almeida; Lima, 2001).

Western blotting ou imunoblotting

É uma técnica imunoenzimática de detecção de proteínas, foi largamente empregada em estudos bioquímicos e imunológicos, e, com o advento das técnicas de Biologia Molecular, tal método é aplicado como ferramenta valiosa nos estudos de expressão gênica. As análises de *Western blotting* são deveras úteis na identificação e quantificação de proteínas específicas, em uma mistura complexa de proteínas, com a vantagem de não se empregar qualquer marcação radioativa (Regitano; Coutinho, 2001).

2.8-Purificação de proteínas

A purificação de antígenos virais possui quatro etapas genéricas distintas: A clarificação separação das células e remoção de debris do meio de cultura; purificação de baixa resolução; purificação de alta resolução e acondicionamento do produto final. Na etapa de clarificação são empregadas principalmente a filtração e centrifugação. Para purificação de baixa resolução podem ser utilizados: precipitação e ultrafiltração; já a purificação de alta resolução principalmente as cromatografias (troca iônica, afinidade, imunoafinidade, interação hidrofóbica e exclusão molecular). Finalmente para o acondicionamento pode ser realizado a liofilização, secagem e cristalização (Pessoa Jr; Klikian; Vahan, 2005) Durante o processo de lise celular são liberados vários compostos altamente oxidantes como peróxido de hidrogênio e enzimas proteolíticas. Alguns aditivos podem ser acrescentados durante a obtenção das proteínas de interesse com para favorecer a extração de proteínas como os surfactantes ou com o intuito de evitar a degradação química ou enzimática. Entre os aditivos mais utilizados estão os agentes redutores (β -mercaptoetanol), estabilizantes (glicerol) e inibidores de protease como o ácido etileno-diaminotetracético (EDTA), um quelante, inibidor de enzimas dependentes de íons metálicos divalentes (Almeida e Kurtenbach, 2002).

2.8.1-Purificação de baixa resolução

Precipitação

As proteínas presentes na amostra possuem composições diferentes em aminoácidos ionizáveis e, como tal, têm pontos isoelétricos (valores de pH do meio para os quais a carga total das suas moléculas é zero) diferentes. Quando se ajusta o pH da amostra ao ponto isoelétrico de uma das proteínas presentes, as suas moléculas perdem a carga elétrica, pelo que desaparecem as forças de repulsão eletrostática existentes entre elas e coalescem, formando precipitados insolúveis. As restantes proteínas existentes na amostra, que possuem pontos isoelétricos acima ou abaixo permanecerão em solução. É este o princípio teórico da chamada precipitação isoelétrica. Outro método de precipitação utilizável consiste na elevação da força iônica do meio. A força iônica exprime a concentração e o número de cargas elétricas dos íons presentes numa solução. Os valores da força iônica a que se dá a precipitação variam de proteína para proteína, assim permitindo a separação das que tenham comportamentos substancialmente diferentes. As proteínas assim precipitadas podem ser posteriormente solubilizadas, sem que haja grande risco de desnaturação. Contudo, para se obterem graus de purificação razoáveis, torna-se necessário aplicar outros métodos mais precisos (Loreiro, 1991).

Filtração por membranas

Os processos de separação por membranas, PSMs, são operações que utilizam membranas no fracionamento de misturas, soluções e suspensões envolvendo espécies de tamanho e natureza química diferentes, com o objetivo de separar, purificar ou concentrar as substâncias presentes. As propriedades de separação das membranas dependem de fatores como: a natureza química do material constituinte, existência ou não de poros e, no caso de membranas porosas, o tamanho dos poros e sua distribuição. Outro fator que influi no desempenho das membranas é a forma como as membranas são acondicionadas em módulos (Habert, 2006). As membranas podem ser produzidas com diferentes tipos de materiais sendo classificadas em dois grupos: membranas orgânicas e membranas inorgânicas. As membranas inorgânicas têm na sua constituição materiais cerâmicos, vítreos e metálicos e as membranas orgânicas com materiais poliméricos sintéticos (polietersulfona, polissulfona e policarbonato) ou biológicos. De um modo geral, as membranas podem ser classificadas em duas grandes categorias: densas e porosas. A membrana é denominada porosa quando o transporte através da mesma ocorre devido à diferença de tamanhos entre as partículas e os poros da

membrana. As membranas densas, por sua vez, não possuem poros e o transporte dos componentes envolve adsorção e a difusão através do material que constitui a membrana. Tanto as membranas densas como as porosas podem ser simétricas ou assimétricas, dependendo se apresentam ou não as mesmas características morfológicas ao longo de sua espessura. As membranas assimétricas se caracterizam por uma região superior muito fina que pode ou não conter poros, denominada de pele, sendo suportada por uma estrutura porosa. Quando ambas as regiões são constituídas por um único material a membrana é do tipo assimétrica integral. Caso materiais diferentes sejam empregados no preparo de cada região da membrana é denominada de assimétrica composta (Matson, 2003). O processo de filtração de membranas podem ser classificados segundo o fluxo (estático ou tangencial em relação à membrana) e quanto a sua força motriz: diferença de pressão, diferença de concentração e diferença de potencial elétrico (Halbert, 2006). Um dos fatores limitantes dessa técnica é o declínio do permeado com o tempo, devido a formação de incrustações *fouling*s (Barros, 2002).

Ultracentrifugação

A ultracentrifugação é um método de separação protéica, em função das dimensões e massa molecular, sendo denominada ultracentrifugação em gradiente de densidade podem ser usadas não só com intuítos analíticos como também como técnicas preparativas. A amostra contendo as várias proteínas é colocada sobre um meio de centrifugação de densidade crescente em direção ao fundo do tubo. A velocidade angular do rotor da centrífuga gera uma força centrífuga atuante sobre as moléculas presentes na amostra, as quais migram em direção ao fundo do tubo através do gradiente de densidade. As moléculas protéicas tendem a dispor-se em bandas que correspondem às áreas em que a força centrífuga que as impele para o fundo é anulada pela força de atrito que se opõe ao movimento (Loureiro, 1991).

2.8.2-Purificação de alta resolução

Eletroforese

Na eletroforese a amostra é aplicada sobre uma fase sólida, a qual pode ser composta por papel, acetato de celulose, gel de amido, gel de poliacrilamida. No caso das proteínas, são os géis, principalmente os de poliacrilamida, os meios que dão melhores resoluções. A separação eletroforética em gel de poliacrilamida tem como base as diferenças de mobilidade das proteínas quando sujeitas a um campo elétrico, o que depende da carga e dimensões das respectivas moléculas, também se deve considerar

um efeito de filtração molecular através dos poros do gel. Num processo de purificação, a eletroforese em gel de poliacrilamida surge habitualmente como teste analítico para determinar a pureza de uma amostra após outros processos de separação ou para avaliar características físicas, químicas ou biológicas de uma proteína purificada (Loureiro, 1991). Entretanto as proteínas que se encontram imobilizadas no gel podem ser excisadas e eluídas obtendo assim frações de proteínas purificadas (Raymond,1964). Dessa forma caracterizando-se não apenas como método de análise.

Cromatografia

A cromatografia fundamenta-se na migração diferencial de componentes de uma mistura que ocorre devido diferentes interações entre duas fases imiscíveis, uma fase estacionária e uma fase móvel (Degani et al.,1998). Em relação à forma física do sistema, a cromatografia pode ser subdividida em cromatografia em coluna, na qual a fase estacionária é colocada em um tubo cilíndrico, e cromatografia planar, disposta sobre uma superfície planar(Aquino-Neto e Nunes, 2003). A classificação quanto à fase móvel, são três os tipos de cromatografia: a cromatografia gasosa, a cromatografia líquida e a cromatografia supercrítica (contendo vapor pressurizado, acima de sua temperatura crítica). Quanto à fase estacionária podem apresentar-se: sólidas, líquidas e quimicamente ligadas. No caso da fase estacionária ser constituída por um líquido, este pode estar simplesmente adsorvido sobre um suporte sólido ou imobilizado sobre ele. Suportes modificados são considerados separadamente, como fases quimicamente ligadas, por normalmente diferirem dos outros dois em seus mecanismos de separação (Collins et al., 1997). Destaca-se no processo de separação de proteínas a cromatografia líquida que nas últimas décadas desenvolveu-se com o acoplamento de espectrofotômetros de massa tornando possível a detecção da maioria dos compostos e análise de traços em amostras complexas, como sangue, urina, soro, alimentos, petróleo dentre outros (Maldaner e Jardim, 2009).

2.8.3-Acondicionamento final

Congelamento

O processo de congelamento é um das mais antigas técnicas de conservação, sendo amplamente empregado atualmente. Entretanto, durante o processo de congelamento as proteínas podem sofrer modificações que podem comprometer a sua funcionalidade. Soluções protéicas tamponadas podem sofrer mudanças de pH durante o processo de congelamento. Os sais constituintes dos tampões possuem diferentes solubilidades, e durante o processo de congelamento cristalizam-se em temperaturas diferentes. Podendo reduzir significativamente o pH da solução (Franks, 1990, 1993). Para mitigar os danos causados pelo processo de congelamento são utilizados crioprotetores que agem como estabilizantes estruturais (Timasheff, 1993).

Liofilização

A liofilização é o processo comum na produção de sólidos protéicos (Cleland et al., 1993; Fox, 1995). Este processo consiste duas etapas: resfriamento da solução protéica e secagem do sólido congelado. Na etapa de secagem ocorre remoção da água congelada e uma secagem secundária onde a água não congelada é removida (Arakawa et al., 1993). O processo de liofilização pode gerar uma variedade de estresses que tendem a desestabilizar ou desnaturar as proteínas. Nesse sentido são utilizados estabilizantes com o objetivo de reduzir o estresse causado. Contudo, algumas proteínas podem tolerar o estresse de congelamento (Kosekiet al., 1990).

2.9-Aditivos

Surfactantes

Os surfactantes, também denominados detergentes, têm etimologia na contração da frase em inglês “surfaceactiveagents”. Entre suas características destaca-se a formação de micelas acima de certas concentrações e solubilização de substâncias insolúveis em meio aquoso (Shinoda et al., 1963).

A estrutura química do surfactante pode ser representada como R-X, onde R é sua cadeia hidrocarbônica (região hidrofóbica) composta por 8-18 átomos de carbono e X é o grupo polar (região hidrofílica). Os surfactantes são classificados de acordo com sua polaridade, descritas na Tabela 1 (Pelizzetti Pramauro, 1985).

Tabela 1-Classificação dos surfactantes

Tipo de surfactante	Carga	Exemplos
Não-iônico	Sem carga	Triton X-100
Aniônico	Negativa	Dodecil sulfato de sódio (SDS)
Catiônico	Positiva	Brometo de cetiltrimetil amônio (CTAB)
Anfótero ou Zwitterionico	Positiva e Negativa	CHAPS

A partir de uma determinada concentração do surfactante ocorre a formação espontânea de micelas (chamada CMC concentração micelar crítica). A CMC é variável dependendo da estrutura química do surfactante e das condições de temperatura. A formação de micelas pode favorecer uma separação de fases em determinadas condições de força iônica e temperatura. Soluções micelares podem tornar-se turvas quando aquecidas, ao atingir uma temperatura específica (chamada temperatura do ponto nuvem). Acima desta temperatura a solução micelar separa-se em duas fases distintas: uma rica em surfactante e uma pobre em surfactante. O fenômeno de separação de fases é mais comum em detergentes do tipo não iônico (Hinzee Pramauro, 1996).

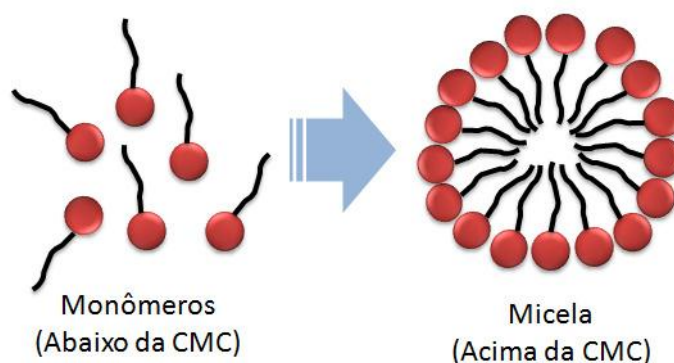


Figura 3- Formação do agregado micelar.(MANIASSO, 2001), Adaptado.

Nas últimas décadas vem ocorrendo grandes avanços na área de biotecnologia, especialmente na clonagem de genes. Entretanto, segundo Günduz (2001) a tecnologia de purificação de proteínas desenvolve-se mais lentamente em relação a clonagem gênica. Nesse sentido, existe a necessidade de aprimoramento e criação de novas tecnologias de purificação.

Atualmente para extração de proteínas são utilizados sistemas de duas fases compostos por polímeros e surfactantes. Os sistemas com surfactantes parecem ser mais simples, pois para gerar duas fases utiliza-se apenas um sistema binário (surfactante / água). Nos sistemas que utilizam polímeros são necessários sistemas ternários mais de um polímero e água ou adição de sais, formando sistemas mais complexos e onerosos (Taniet

al.,2001;Liu et al.,1998).Nos sistemas de duas fases, os surfactantes do tipo não-iônico têm atração preferencial por biomoléculas hidrofóbicas.Moléculas hidrofílicas não estarão concentradas na fase rica em surfactante. Para extração de biomoléculas hidrofílicas são utilizados ligantes de afinidade como a R-biotina juntamente com detergentes não iônicos (SAITOH e HINZE,1995).No processo de produção de antígenos de LVPR para diagnóstico sorológico o SDS é surfactante de rotina empregado nos trabalhos apresentados na Tabela 2.

Tabela 2-Surfactantes utilizados em protocolos de purificação de antígenos de LVPR.

Antígeno	Surfactante e concentração	Referência
MVV	SDS 0,1%	SIMMARD e BRISCOE, 1990
CAEV	SDS 0,1%	HECKERT et al., 1992
CAEV	SDS 0,1%	VANDER e SCHAILE et al.,1994
MVV	SDS 0,25%	CELLER et al.,1998
CAEV	SDS 0,1%	TORRES et al., 2009

Por ser um detergente aniônico forte, o SDS quebra as pontes dissulfídicas e de hidrogênio das proteínas, que assumem comportamento de polímeros não estruturados carregados negativamente (Watson et al., 2005).Em outro estudo,Simard e Briscoe et al. (1999) observaram que concentrações superiores a 0,25% de SDS embora permitam uma melhor visualização das subunidades protéicas, promovem perda de reconhecimento de epítópos.

3-JUSTIFICATIVA

Até o momento têm se utilizado apenas o surfactante SDS nos protocolos de purificação de antígenos de Lentivírus de pequenos ruminantes. A utilização de outros surfactantes pode melhorar a pureza dos antígenos virais e conseqüentemente aumentar a sensibilidade dos testes sorológicos atualmente empregados

4- HIPÓTESE CIENTÍFICA

A utilização de outros surfactantes na purificação de proteínas virais de Lentivírus de pequenos ruminantes pode apresentar resultados semelhantes ao SDS.

5-OBJETIVOS

5.1-GERAL

Avaliar a utilização de outros surfactantes na produção de antígenos do vírus da artrite e encefalite caprina.

5.2-ESPECÍFICOS

- Cultivar fibroblastos oriundo de MSC para replicação do CAEV;
- Separar após a etapa de clarificação, pellet e sobrenadante;
- Tratar pellet e sobrenadante com os surfactantes SDS, CHAPS, Triton X-100, Tween 20 e Tween 80;
- Avaliar sobrenadante e pellet tratados com surfactantes através de técnicas sorológicas.

CAPÍTULO 1

**AVALIAÇÃO DO USO DE SURFACTANTES NA PRODUÇÃO DE
ANTÍGENOS DO VÍRUS DA ARTRITE ENCEFALITE CAPRINA.**

**EVALUATE OF SURFACTANTS USE IN CAPRINE ARTHRITIS
ENCEPHALITIS VIRUS ANTIGEN PRODUCTION.**

EVALUATE OF SUFARCTANTS USE IN CAPRINE ARTHRITIS ENCEPHALITIS VIRUS ANTIGEN PRODUCTION.

Carlos Alberto F. Lopes Jr, Maria Fátima da Silva Teixeira, Raimundo Rizaldo Pinheiro, Alice Andriole, Ronaldo Pereira Dias, Luis Antonio de Oliveira Alves, Dalva Alana Aragão de Azevedo, Rosivaldo Quirino Bezerra Jr.

ABSTRACT

The small ruminant lentiviruses are responsible for a significant economic loss that enabled the development of efficient control and monitoring programs in Europe and other countries. The diagnosis of CAEV is mainly based on serological tests. The World Organisation for Animal Health (OIE) recommends the use of agarose gel immunodiffusion (AGID) for its low cost, high specificity and practicality of implementation. The antigens used for serological diagnosis are composed mainly by structural proteins p28 and gp135. The AGID can determine false-negative results, due to its low sensitivity. Thus the production of viral antigens is important in testing for CAE, for this is a critical input that may influence the sensitivity of serological tests. In the protein extraction process, purification systems are used containing polymers or surfactants. The systems containing surfactants are simpler and less expensive. Currently, the SDS (sodium dodecyl sulfate) has been the surfactant preferably to extract and purify small ruminant lentivirus antigens. Therefore, this work aims to evaluate the performance of other surfactants in the caprine arthritis and encephalitis virus antigens production in relation to the surfactant SDS. The treatments evaluated by diagnosis method AGID was observed an improvement in the diffusion capacity of the antigens compared to the control not added with surfactants. The CHAPS and Triton X-100 surfactants had reactions to both: pellet and supernatant, indicating the presence of viral proteins, even with the presence of interfering as albumin in the supernatant. However, in Western blotting assays only the treatment with CHAPS showed a satisfactory result at all concentrations used.

Keywords: CAEV, Surfactants, Antigen Production, Detergent, Goats

INTRODUCTION

The small ruminant lentiviruses: Caprine Arthritis Encephalitis virus and Maedi Visna virus are responsible for a significant economic loss that enabled the development of efficient control and monitoring programs in Europe and other countries (Peterhans, 2004; Brinkhof, 2009; Leitner, 2010). Among these viruses, the caprine arthritis encephalitis is a multisystemic viral infection, incurable, chronic and debilitating. This disease affects mainly goats in the joints, lungs and mammary gland (Cork, 1974). The diagnosis of Caprine Arthritis Encephalitis virus (CAEV) is mainly based on serological tests. The World Organisation for Animal Health (OIE) recommends using the Agarose Gel Immunodiffusion (AGID) for low cost, high specificity and practicality of implementation. However, the AGID can determine false-negative results, due to its low

sensitivity. Thus, production of viral antigens is important in caprine arthritis encephalitis disease diagnosis, is a critical input that directly influences the sensitivity of serological tests (Knowles, 1997). For the production of viral antigens in the process of extraction and purification of proteins are used mainly aqueous systems containing surfactants and polymers. The aqueous systems containing only surfactants are simpler and less expensive (Tani et al., 2001, Liu et al., 1998). Currently many studies with purpose of produce antigens of small ruminant lentivirus, have used the SDS (sodium dodecyl sulfate) as a surfactant in protein extraction protocols (Simmard and Briscoe, 1990, Heckert et al. 1992; Celler et al., 1998, Torres et al., 2009). Kobayashi et al. (2006) demonstrated that SDS increases the sensitivity of Latex immunoagglutination assay. This same result was observed by Balakrishnan et al., 2004 which noted that some surfactants improved the solubility and diffusibility of griseofulvin. However, Han et al. (2007) observed that although the SDS to enhance the diffusivity of particles, increasing the surface charge density, the sulfate region can form non-specific binding resulting in false-positive results. Another study by Simmard and Briscoe, 1990 found the use of concentrations above 0.25% SDS promotes the loss of recognition of epitopes. Thus this study aimed to evaluate the surfactant SDS as compared with other surfactants in caprine arthritis encephalitis virus antigens production.

MATERIAL AND METHODS

Cell Culture and Viral Inoculation

Cells from goats synovial membranes obtained from CAEV negative animals were cultured for viral replication (negative for Western Blot and PCR). The explants were placed into cell culture bottles, in MEM (Minimum Essential Medium) supplemented with fetal calf serum (FCS) and Penicillin and Streptomycin and Amphotericin B. After this were added 5 ml of MEM supplemented with 5% Fetal Calf Serum and incubated at 37 ° C in 5% CO₂ to the confluence of the cell monolayer. The cells were infected with viral CAEV strain-Cork sample with titration 1 x 10^{5.3} TCID / mL. From the 10th day post-inoculation, every seven days the culture supernatant of each bottle containing fibroblasts was collected and frozen, added to the 200mL bottles of MEM with 2% Fetal Calf Serum. The supernatant cell cultures were frozen and thawed three times to lyse the cells and exposing the viral particles, then centrifuged at 10,000 G for 15 min at 4 ° C. The pellet was resuspended in PBS. The resulting supernatant and pellet of this centrifugation were placed in falcon tubes and stored at -80 ° C.

Pellet and Supernatant

The pellet and supernatant had their protein concentration determined by Bradford method (Bradford, 1976). Subsequently the pellet and supernatant were separated into aliquots of 500µL to be treated with surfactants, in order to solubilize the viral proteins remaining. The surfactant selected are: SDS anionic detergent the most employees in work related to the production of antigens of small ruminants, Tween and Triton X-100

nonionic for hydrophobic molecules affinity and CHAPS zwitterionic molecules for affinity to both hydrophobic and hydrophilic. We used the surfactants SDS, CHAPS (concentrations 0.1%, 0.2% v/v and 0.2%, 0.3% w/v, respectively), Tween 20, Tween 80 and Triton X-100 (concentrations of 0.1%, 0.2% and 0.3% v / v) for 15 minutes and then stored at 4 ° C.

Viral proteins

Aliquots treated with surfactants were subjected to one-dimensional electrophoresis in polyacrylamide gel using 4% concentrating and 12% resolving gel, with standard broad-range (10 - 200kDa) (LAEMMI, 1970). The electrophoretic profile was determined in samples of antigen diluted in sample buffer (SDS 10%, 20% glycerol, 0.2% bromophenol blue, 0.5 M Tris-HCl, pH 6.8) the mixture was heated to 100 ° C for 3 minutes. The gel proteins were stained using Coomassie blue staining. The molecular weight of viral proteins was calculated using the relative distance of migration *R_f*. The aliquots treated with surfactant the Agarose Gel Immunodiffusion AGID test to verify the integrity of viral epitopes and diffusibility after treatment with surfactants. In this assay was used sera from animals positive (for Western Blot and PCR). AGID readings were made 24, 48 and 72 hours.

Evaluation of antigen

The supernatant and pellet treated by surfactants were fractionated by electrophoresis in a polyacrylamide gel (SDS-PAGE) (4% in the concentrating and 12% in the resolving gel) followed by passive antigen transference. The main gel was placed between two nitrocellulose sheets (Bio-Rad Laboratories) and three filter paper sheets all sandwiched between two glass slides. The package was wrapped in plastic film and aluminum foil, and a 12-kg weight placed over the package for 3 days at room temperature. Nitrocellulose sheets were then blocked with 25 ml phosphate buffer solution (PBS) with 1% albumin and were continuously stirred at room temperature for 1 h. Nitrocellulose sheets were cut into 3-mm strips, numbered, and placed in a assay tube with 5ml of the corresponding serum and 1 ml dilution buffer (washing buffer: PBS with 0.05% Tween-20) under constant stirring at room temperature for 1 h. For the immunoenzymatic assay, peroxidase-labeled-antigoat IgG (1:20,000) (Sigma) dissolved in 1 ml buffer dilution was used for each strip, incubating at room temperature for 1 h under constant stirring. The color reaction was developed with 12 mg of diaminobenzidine, 6 mg 4-chloronaftol in 12 ml of PBS and 12µl hydrogen peroxide (Tesouro-Cruz et al., 2009).

RESULTS AND DISCUSSION

The average protein concentration using the method of BRADFORD to the pellet was 0.5 mg / ml and 0.88 mg / ml in the supernatant. The electrophoretic profile of proteins in the supernatant had higher amounts of protein bands compared to the pellet. Treatments with the surfactant Tween 20 and Tween 80 had lower amounts of protein bands in both fractions, pellet and supernatant in relation to other treatments. In the evaluation of the readings with AGID antigen presented in figures 1 were performed

after 24 hours. The pellet without surfactant treatment showed no formation of precipitation line. The treatments of the pellet and supernatant who used SDS, CHAPS and Triton X-100 showed the formation of precipitation lines although less defined in the pellet, especially the SDS. Despite this treatment Tween 20 and Tween 80 did not

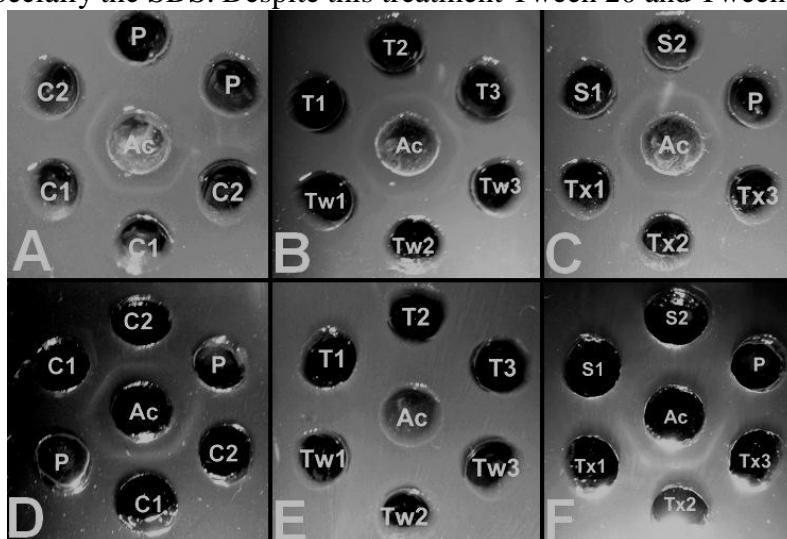


Figure 1- Agarose gel imunodiffusion of arthritis encephalitis caprine virus treated with surfactants- **A- (Supernatant)**Ac- Positive serum C1 – CHAPS 0,2% , C2- CHAPS 0,3% e P- sample without surfactant **B- (Supernatant)**Ac- Positive serum, T1-Tween 20 0,1% , T2-Tween 20 0,2 % ,T3-Tween 20 0,3%, Tw1- Tween 80 0,1%, Tw2- Tween 80 0,2% e Tw3 - Tween 0 0,3 % . **C- -(Supernatant)**S1-SDS 0,1%, S2- SDS 0,2%, Tx1- Triton X100 0,1%, Tx2-Triton X100 0,2% e Tx3-Triton x100 0,3% e P- sample without surfactant, **D-(Pellet)**Ac- Positive serum C1 – CHAPS 0,2% , C2- CHAPS 0,3% e P- sample without surfactant **E-(Pellet)**Ac- Positive serum, T1-Tween 20 0,1% , T2-Tween 20 0,2 % ,T3-Tween 20 0,3%, Tw1- Tween 80 0,1%, Tw2- Tween 80 0,2% e Tw3 - Tween 0 0,3 % . **F-(Pellet)**S1-SDS 0,1%, S2- SDS 0,2%, Tx1- Triton X100 0,1%, Tx2-Triton X100 0,2% e Tx3-Triton x100 0,3% e P- sample without surfactant.

show the formation of precipitation line in any of the concentration used for the pellet (Fig. 1 E). These data are consistent with a study by Han et al. (2006) that evaluated the addition of surfactant Tween 80 on latex immunoagglutination assay and this resulted in a low diffusivity of antigens. However in this study we could observe the formation of precipitation line in aliquots of supernatant without surfactant and subjected to treatments with Tween 20 and Tween 80 (Fig. 1 B and C). It was not possible view precipitation line in the pellet's rate that was not treated with surfactant (Fig.1F) unlike the supernatant where occurred the formation that line (Fig.1C). These results probably are due to the higher concentration of viral proteins in the supernatant over the pellet, most of which comes from the proteins present in cellular debris that sedimented during centrifugation. Despite the low concentration of protein in the pellet, compared to the supernatant, these results confirm the presence of viral proteins in the precipitate. WB of supernatant not treated with surfactant showed reactions corresponding to molecular weights 28 kDa and 14 kDa for the positive serum and 28 kDa for serum reagent (Fig. 2-3 and Fig.2-2).

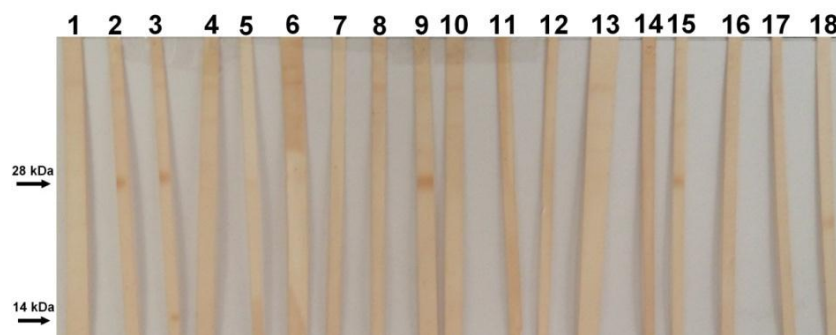


Figure 2 – Western Blotting of arthritis encephalitis caprine virus treated with surfactants (**Supernatant**) – **1** – sample without surfactant + negative serum, **2**- sample without surfactant + reagent serum, **3**- sample without surfactant + positive serum, **4**- SDS 0,1% + negative serum, **5**- SDS 0,1% + reagent serum, **6**- SDS 0,1% +positive serum, **7**- SDS 0,2%+ negative serum, **8**- SDS 0,2%+ reagent serum, **9**- SDS 0,2%+ positive serum, **10**-Triton X-100 0,1% + negative serum, **11**- Triton X-100 0,1% + reagent serum, **12**- Triton X-100 0,1%+ positive serum **13**- Triton X-100 0,2% + negative serum, **14**- Triton X-100 0,2%+ reagent serum, **15**- Triton X-100 0,2%+ positive serum, **16**- Triton X-100 0,3%+ negative serum, **17**- Triton X-100 0,3%+ reagent serum e **18**- Triton X-100 0,3%+ positive serum.

The pellet without added surfactant was positive in WB (Fig. 3), this fact shows that the absence of precipitation line in the pellet to the AGID may be probably related to problems in the diffusion of proteins in the pellet. The supernatant treated with surfactant SDS 0.2% and 0.2% Triton x100 showed the reaction time to 28 kDa for the positive serum (Fig.2-9 and Fig. 2-15).

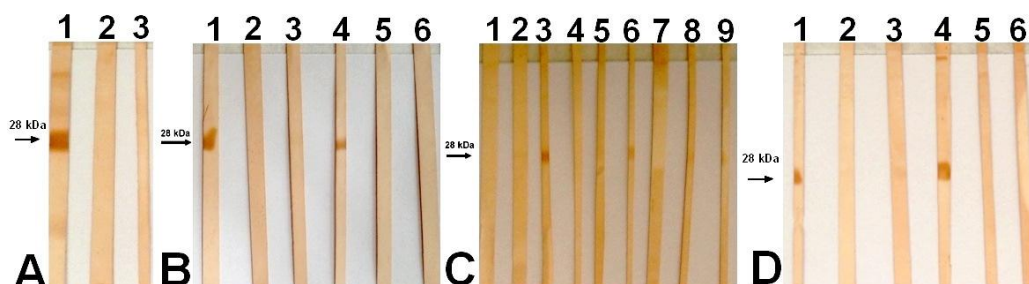


Figura 3-.Western Blottingof arthritis encephalitis caprine virus treated with surfactants **A (Pellet)** 1- sample without surfactant + positive serum, 2- sample without surfactant + reagent serum, 3- sample without surfactant + negative serum, **B(Pellet)** 1-CHAPS 0,2%+ positive serum, 2-CHAPS 0,2%+ reagent serum, 3-CHAPS 0,2%+ negative serum, 4-CHAPS 0,3% + positive serum, 5-CHAPS 0,3%+ reagent serum, 6-CHAPS 0,2%+ negative serum, **C (supernatant)** - 1-Tween 20 0,1%+ negative serum, 2-Tween 20 0,1%+ reagent serum,3-Tween 20 0,1%+ positive serum,4-Tween 20 0,2%+ negative serum,5-Tween 20 0,2%+ reagent serum, 6-Tween 20 0,2%+ positive serum, 7-Tween 20 0,3%+ negative serum, 8-Tween 20 0,3%+ reagent serum, 9-Tween 20 0,3%+ positive serum **D (Pellet)** 1-SDS 0,1%+ positive serum, 2-SDS 0,1%+ reagent serum, 3-SDS 0,1%+ negative serum, 4-SDS 0,2%+ positive serum, 5-SDS 0,2%+ reagent serum and 6-SDS 0,2%+ negative serum

There was also a reaction to the concentration of 0.3% Triton x100 lower than 28 kDa. The surfactants Tween 20 and 80 showed no reaction to the WB in the pellet fraction. Nevertheless, in the supernatant fraction of Tween 20 (at concentrations of 0.1 and 0.2%) showed a reaction in the region of 28 kDa (Fig. 3 C). In this study, SDS showed a weak resolution to IDGA pellet (Fig. 1 C). In addition, Han et al., 2006, and earlier studies by Palmer et al. 1971; Cho and Feng., 1974 verified the formation of precipitation lines in AGID reactions generated by SDS with nonspecific immunoglobulins complicate diagnosis.

CONCLUSION

The pellet with the addition of surfactants showed an improvement in the diffusibility of the antigens in the serologic test in relation to pellet without surfactant. The CHAPS and Triton X-100 surfactants had reactions to both: pellet and supernatant, indicating the presence of viral proteins, even with the presence of interfering as albumin in the supernatant. However, in Western blotting assays only the treatment with CHAPS showed a satisfactory result at all concentrations used. The SDS showed a weak precipitation line in comparison with other surfactants. However the use of SDS as a surfactant in the production of antigen must be made with caution since the SDS produces a specific reaction with the immunoglobulins.

However, other tests are needed to evaluate nonspecific reactions and standardization of tests with antigens treated with the surfactants mentioned above. At last, the use of surfactants should be done with caution since some may cause nonspecific reactions or influence the antigens diffusion.

REFERENCES

1. ADAMS D.S. and GORHAM Jr. The gp135 of caprine arthritis encephalitis virus affords greater sensitivity than the p28 in immunodiffusion serology. *Res Vet Sci.* 1986 Mar;40(2):157-60.
2. BRADFORD, M. A rapid and sensitive method for the quantiation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, v.72, p.248-254, 1976.
3. BRINKHOF, J.M.A., et al., Diagnostic performance of ELISA and PCR in identifying SRLV-infected sheep and goats using serum, plasma and milk samples and in early detection of infection in dairy flocks through bulk milk testing. *Vet. Microbiol.* (2009), doi:10.1016/j.vetmic.2009.09.060
4. CELER Jr, V.; CELER, V. and NEMCOVA, H.R. Serologic diagnosis of lentivirus by whole virus ELISA and AGID test. **Journal of Veterinary Medicine – Series B**, v. 45, p. 183-186, 1998. Evaluation of an Enzyme-linked Immunosorbent Assay for the Detection of Antibodies to Caprine Arthritis-Encephalitis Virus in Goat Serum. *Can J Vet Res* 1992; 56: 237-241.
5. HAN, J., KIM, K. and YOON, J. The enhanced diffusional mixing for latex immunoagglutination assay in a microfluidic device. *Analytica Chimica Acta* 584 (2007) 252–259
6. HARLON, E. and LANE, D. *Antibodies: a laboratory manual*. New York: Cold Spring Harbor Laboratory, 1988. 865p.
7. HECKERT, R. A. MCNAB, W. B. RICHARDSON, S. M. and BRISCOE, M. R.

8. KNOWLES, D. P. Laboratory diagnostic test for Retrovirus infections of small ruminants. *Veterinary Clinics of North American: Food Animal Practice*, v. 13, n.1, p. 1-11, 1997.
9. LAEMMI, U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, v.227, p.680-685, 1970.
10. LEITNER, G., KRIFUCKS, O., WEISBLIT, L., LAVI, Y., BERNSTEIN, S., MERIN, U. (2010) The effect of caprine arthritis encephalitis virus infection on production in goats. *Vet Journal* 183:328-331
11. LIU, C. L.;Kamei, D. T.;King,J. A.;Wang, D. I. C. and Blankstein, D. Separations of proteins and viruses using two-phase aqueous micellar systems. *Journal of Chromatography B*,v. 711, n.1-2, p.127-138,1998.
12. PETERHANS E, GREENLAND T, BADIOLA J, HARKISS G, Bertoni G, Amorena B, Eliaszewicz M, Juste RA, Kraßnig R, Lafont JP, Lenihan P, Petursson G, Pritchard G, Thorley J, Vitu C, Mornex JF, Pepin M (2004) Routes of transmission and consequences of small ruminant lentiviruses (SRLVs) infection and eradication schemes. *Vet Res* 35:257–274
13. SIMARD C. L. and BRISCOE M. R. An enzyme-linked immunosorbent assay for detection of antibodies to maedi-visna virus in sheep. II. Comparison to conventional agar gel immunodiffusion test. *Can J Vet Res*.1990 October;54(4): 451–456.
14. TANI, H., SUZUKI, Y.; MATSUDA, A. and KAMIDATE,T. Enhancement of excluded-volume effect in protein extraction using triblock copolymer-based aqueous micellar two-phase systems. *AnalyticaChimicaActa*, v.429, n.2, p.301-309, 2001.
15. TESORO-CRUZ,E. ,FERIA-ROMERO,I. A., OROZCO-SUÁREZ,S., HERNÁNDEZ-GONZÁLEZ,R.,Silva-García,R.,Valladares-Salgado,A., Bekker-Méndez,V. C.,BLANCO-FAVELA,F.and AGUILAR-SETIÉ, A. Frequency of the Serological Reactivity Against the Caprine Arthritis Encephalitis Lentivirus gp135 in Children Who Consume Goat Milk. *Archives of Medical Research* 40 (2009) 204-207
16. TORRES, J. A., CAMPOS,G. S.,FREITAS ,M. M. ,BRANDÃO, C. F. L. and SARDI, S. I .Produção de antígeno viral para o sorodiagnóstico da artrite-encefalite caprina utilizando um teste imunoenzimático (ELISA).*R. Ci. méd. biol., Salvador*, v.8, n.2, p.107-114, mai./ago. 2009

6-PERSPECTIVAS

A produção de antígenos virais de Lentivirus de pequenos ruminantes esteve restrita nesses últimos anos a apenas a utilização de um tipo de surfactante. Alguns trabalhos mencionam reações inespecíficas do dodecil sulfato de sódio de modo que são necessários mais estudos relacionados para garantir a fidelidade dos testes de diagnóstico que utilizam esses antígenos. Ainda outros surfactantes devem ser explorados como alternativa na produção de antígenos, buscando melhorar a sensibilidade dos testes sorológicos.

7-REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. ADAMS, D.S. GORHAM, J.R. The gp135 of caprine arthritis encephalitis virus affords greater sensitivity than the p28 in immunodiffusion serology. *Res. Vet. Sci.*, v.40, p.157-160,1986.
2. ALKAN, F.; TAN, M. T. A. A comparative study on the diagnosis of Maedi-Visna infection in serum and colostrum samples using agar gel immunodiffusion (AGID) technique. *Deutsche Tierärztliche Wochenschrift*, v. 105, n.7, p.276-278, 1998.
3. ALMEIDA, A. M. R.; LIMA, J. A. A. *Princípios e técnicas de diagnose em Fitovirologia*. Brasília/Fortaleza: Publicação SBF, 2001.186p.
4. ALMEIDA, M. S. KURTENBACH, E. Como purificar proteínas: O exemplo das defensinas antifúngicas de ervilhas. *Biotecnologia & Ciência*, nº 24,janeiro/fevereiro 2002.
5. AQUINO-NETO, F.R; NUNES, D.S.S. *Cromatografia: princípios básicos e técnicas afins*. Rio de Janeiro:Interciência, 2003, 187p.
6. ARAKAWA, T., PRESTRELSKI, S.J., KENNEY, W.C., CARPENTER, J.F. Factors affecting short-term and long-term stabilitiesAdv. Drug Deliv.Rev. v.10, p.1–28,1993.
7. BARROS, S.T.D. **Clarificação dos sucos de acerola e abacaxi por ultrafiltração: Modelagem e Simulação do Fluxo de Permeado e Determinação dos Mecanismos de Fouling**, 2002. Tese (Doutorado) - DTP/Unicamp, Campinas, 2002.
8. BLACKLAWS, B.A., BERRIATUA, E., TORSTEINSDOTTIR, S., WATT, N.J., de ANDRES, D., KLEIN, D. HARKISS, G.D. Transmission of small ruminant Lentiviruses. *Veterinary Microbiology*, v. 101, p.199-208, 2004.

9. BOUZAR, A. B.; GUIGUEN, F.; MORIN, T.; VILLET, S.; FORNAZERO, C.; GARNIER, C.; GALLAY, K.; GOUNEL, F.; FAVIER, C.; DURAND, J.; BALLEYDIER, S.; MORNEX, J. F.; NARAYAN, O.; CHEBLOUNE, Y. Specific G2 arrest of caprine cells infected with a caprine arthritis encephalitis virus expressing vpr and vpx genes from simian immunodeficiency virus. *Virology*, v.309, n. 1, p.41-52, 2003.
10. BRINKHOF, J., van MAANEN, C. Evaluation of five enzyme-linked immunosorbent assays and an agar gel immunodiffusion test for detection of antibodies to small ruminant lentiviruses. *Clin. Vaccine Immunol.* v.4, n. 9, 1210-1214, 2007.
11. BRINKHOF, J.M.A., et al., Diagnostic performance of ELISA and PCR in identifying SRLV-infected sheep and goats using serum, plasma and milk samples and in early detection of infection in dairy flocks through bulk milk testing. *Vet. Microbiol.* v.142 p.193-198, 2009.
12. BURNS, G. W. ; BOTTINO, P. J. *Genética*. 6ª Edição. Rio de Janeiro: Editora Guanabara Koogan, p.319-320, 1991.
13. CAREY, N.; ROY, D. J.; DALZIEL, R. G. Use of recombinant gp 135 to study pitopespecific antibody responses to Maedi-Visna virus. *Journal of Virological Methods*, v. 43, n.2, p. 221-323, 1993.
14. CHEEVERS, W. P., T. A. STEM, D. P. KNOWLES, and T. C. MCGUIRE..Precursor polypeptides of caprine arthritis-encephalitis lentivirus structural proteins. *J. Gen. Virol.* 69:675–681, 1988.
15. CLELAND, J.L., POWELL, M.F., SHIRE, S.J. The development of stable protein formulations: a close look at protein aggregation, deamidation, and oxidation. *Crit. Rev. Ther. Drug Carrier Syst.* v.10, p.307–377, 1993.
16. CLEMENTS J.E. ; PAYNE S. Molecular basis of the pathobiology of lentiviruses. *Viruses Res.* v.32 p.97-109, 1994.
17. CLEMENTS, J.E., NARAYAN, O., CORK, L.C. Biochemical characterization of the vírus causing leucoencephalitis and arthritis in goats. *J. Gen. Virol.* v. 50, p. 423-427, 1980.
18. COFFIN, J. M. Retroviridae: the virus their of replication. In: _____. *Fields Virology*. 3eds. Philadelphia: Lippincott-Raven, cap.5, p. 1767-1847, 1996.
19. COLLINS, C.H; BRAGA, G.L.; BONATO, P.L. *Introdução a métodos cromatográficos*. 7.ed. Campinas: Editora da Unicamp, p.279, 1997.
20. CORK, L. C.; HADLOW, W. J.; CRAWFORD, T. B.; GORHAM, J. R.; PIPER, R. C. Infectious leucoencephalomyelitis of young goats. *Journal Infectio Disease*, v. 129, n.2, p.134-141, 1974.

21. CRAWFORD, T. B., D. S. ADAMS, R. D. SANDE, J. R. GORHAM, and J. B. HENSON. The connective tissue component of the caprine arthritis-encephalitis syndrome. *Am. J. Pathol.* v.100, p.443-450, 1980.
22. CRAWFORD, T. B.; ADAMS, D. S.; CHEEVERS, W. P.; CORK, L. C. Chronic Arthritis in Goats Caused by a Retrovirus. *Science*, v. 207, n.4434, p. 997-999, 1980.
23. CREIGHTON, T. E. *Enciclopedia of Molecular Biology*.. New York: John Wiley; Sons Inc, v.1-4, p. 2878, 1999.
24. DAHLBERG, J. E.; GASKIN, J. M.; PERK, K. Morphological and immunological comparison of caprine arthritis encephalitis and ovine progressive pneumonia viruses. *The Journal of Virology*, v. 39, n. 3, p. 914-919, 1981.
25. DANTAS, T. V. M.; ARAÚJO, S. A. C.; PINHEIRO, R. R.; ARAGÃO, M. A. C.; SILVA, J.B. A.; RICARTE, A. R. F.; RIBEIRO, A. L.; TEIXEIRA, M. F. S. Desenvolvimento e padronização de ELISA indireto para Diagnóstico de Maedi Visna em ovinos. *Ciência Animal Brasileira*, v. 9, n. 1, p. 181-187, 2008.
26. DEGANI, A.L.; CASS, Q.B.; VIEIRA, P.C. Cromatografia – Um breve ensaio. *Química Nova*, São Paulo, 1998, n.7, p.21-25.
27. ELLIS, T. M.; WILCOX, G.E.; ROBINSON, W.F. Antigenic variation of caprine arthritis encephalitis virus during persistent infection of goats. *Journal of General Virology*, v.63, n.12, p. 3145-3152, 1987.
28. FAO- <http://www.fao.org/corp/statistics/en/> Acesso em:31/08/10
29. FEVEREIRO, M.; BARROS, S.; FAGULHA, T. Development of a monoclonal antibody blocking – ELISA for detection of antibodies against Maedi-Visna virus. *Journal of Virological methods*, v. 81, n. 1-2, p. 101-108, 1999.
30. FLORES, E. F. *Virologia Veterinária*. Santa Maria: UFSM, p. 888, 2007.
31. FOX, K.C. Putting proteins under glass. *Science* v.267, p.1922–1923, 1995.
32. FRANKS, F. Freeze-drying: from empiricism to predictability. *Cryo-Letters* v.11, p.93–110, 1990.
33. FRANKS, F. Solid aqueous solutions. *Pure Appl. Chem.* v.65, p.2527–2537, 1993.
34. GONDA, M. A.; BRAUM, M. J.; CLEMENTS, J. E.; PYPER, J. M.; WONGSTAAL, F.; GALLO, R. C.; GILDEN, R. V. Human T-cell lymphotropic virus type III shares sequence homology with a family of pathogenic lentiviruses. *Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America*, v. 83, n.11, p. 4007-4011, 1986.

35. GREGO, E.;BERTOLOTTI, L.; QUASSO, A.; PROFITI, M.; LACERENZA, D.; MUZ, D.;ROSATI, S.. Genetic characterization of small ruminant lentivirus in Italian mixed flocks: evidence for a novel genotype circulating in a local goat population. *Journal of general virology*, v.88, n. 12, p.3423-3427, 2007.
36. GÜNDOZ, U. Optimization of bovine serum albumin partition coefficient in aqueous two phase systems. *Bioseparation*, v.9 , n.5, p. 277-281, 2001.
37. HAASE, A.T. Pathogenesis of lentivirus infections. *Nature*.v.322 n.6075,p.130–136, 1986.
38. HABERT, A. C.; BORGES, C. P.;NOBREGA, R. Processos de separação por membrana. Rio de Janeiro. **E-papers**, p. 45, 2006.
39. HINZE, W. L.; PRAMAURO, E. A critical review of surfactant mediated phase separations (cloud-point extractions): theory and applications. **Critical Reviews in Analytical Chemistry**, v.24, n.2, p.133-177, 1993.
40. HOTZEL I, CHEEVERS WP. Caprine arthritis-encephalitis virus envelope surface glycoprotein regions interacting with the transmembrane glycoprotein: structural and functional parallels with human immunodeficiency virus type 1 gp120. *J Virol.*;v.77, p.11578–11587, 2003.
41. HUSO, L.D., NARAYAN, O., HART, W.G. Sialic acids on the surface of caprine arthritis-encephalitis virus define the biological properties of the virus. *J. Virol.*, v.62, p.1974-1980, 1988.
42. ICTV-International Comitee on Taxonomy of Viruses <http://www.ictvonline.org/virusTaxonomy.asp?version=2009> Acesso em :23/08/10
43. JAN, C. L.; GREENLAND, T.; GOUNEL, F.; BALLEYDIERS, S.; MORNEX, J. F. Activation of small ruminant aortic endothelial cells after in vivo infection by caprine arthritis-encephalitis virus. *Research in Veterinary Science*, v. 69, n. 3, p. 225-231, 2000.
44. JOAG, S. V.; STEPHENS, E. B.; NARAYAN, O. Lentiviroses. In: _____ FIELDS, M. D.; KNIFE, D. M. *Fields Virology*, 3^a Ed. New York: Raven Press, p.1977-1996, 1996.
45. KNOWLES, D. P. Laboratory diagnostic test for Retrovirus infections of small ruminants. *Veterinary Clinics of North American: Food Animal Practice*, v. 13, n.1, p. 1-11, 1997.
46. KOSEKI, T., KITABATAKE, N., DOI, E. Freezing denaturation of ovalbumin at acid pH. *J. Biochem.* v.107, p.389–394, 1990.
47. LARSEN, H. J.; HYLLSETH, B.; KROGSRUD, J. Experimental maedi virus infection in sheep: cellular and humoral immune response during three years following intranasal inoculation. *American Journal of Veterinary Research*, v. 43, n. 3, p. 384-389, 1982.

48. LEITNER, G., KRIFUCKS, O., WEISBLIT, L., LAVI, Y., BERNSTEIN, S., MERIN, U. The effect of caprine arthritis encephalitis virus infection on production in goats. **Vet Journal** v.183, p.328-331,2010.
49. LIU, C. L.;Kamei, D. T.;King,J. A.;Wang, D. I. C., Blankstein, D. Separations of proteins and viruses using two-phase aqueous micellar systems. **Journal of Chromatography B**,v. 711, n.1-2, p.127-138,1998.
50. LOREIRO, J. R. Temas e sessões internas. **Actas Bioquímica**. Vol5 Portugal, Lisboa, 1991.
51. MADRUGA, C. R.; ARAÚJO, F. R.; SOARES, C. O. Princípios, padronização e validação de provas sorológicas. In: _____MADRUGA, C. R.; ARAÚJO, F. R.; SOARES, C. O. *Imunodiagnóstico em medicina Veterinária*. Campo Grande: **EMBRAPA gado de corte** (Campo Grande- Mato Grosso do Sul-Brasil), p.145-175, 2001
52. MALDANER, L.; JARDIM, I.C.S.F. O estado da arte da cromatografia líquida de ultra eficiência. **Química Nova**, São Paulo, 2009, v.32, n.1, p.214-222.
53. MANIASSO, N. Ambientes micelares em Química analítica.**Quim. Nova**, Vol. 24, No. 1, 87-93, 2001.
54. MARCOM, K.A.; PEARSON, L.D.; CHUNG, C.S.; POULSON, J.M.; DeMARTINI, J.C.Epitope analysis of capsid and matrix proteins of North American ovine lentivirus Field isolates. **Journal of Clinical Microbiology**, v.29, n.7, p.1472-1479, 1991.
55. MATSON, S. L. Membrane separation and technology:**Principles and applications**. Third Edition. Elsevier,p. 377,2003
56. McGUIRE, T. C. The immune response to viral antigens as a determinant of arthritis in Caprine Arthritis-encephalitis infection.**Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 17, n. 1-4, p. 465-470, 1987.
57. MELO, A. C. M.; FRANKE, R. F. Soroprevalência da artrite-encefalite caprina (CAE) no rebanho caprino leiteiro da região da grande Fortaleza, Ceará, Brasil. **Ciência Rural**, v.27, n.1, p. 113-117, 1997.
58. MOOJEN, V.; SOARES, H. C.; RAVAZZOLO, A. P.; PIZZOL, M.; GOMES, M. Evidência de infecção pelo lentivírus (Maedi/Visna - Artrite Encefalite Caprina) em caprinos no Rio Grande do Sul, Brasil. **Arquivos da Faculdade de Medicina Veterinária da UFRGS**, v. 14, p.77-78, 1986.
59. PELIZZETTI, E.e PRAMAURO, E. Analytical applications of organized molecular assemblies.**Analytica Chimica Acta**, v.169, p 1-29, 1985

60. PEPIN, M.; VITU, C.; RUSSO, P.; MORNEX, J. F.; PETERHANS, E. Maedi-visnavirus infection in sheep: a review. *Veterinary Research*, v. 29, n.3-4, p. 341-367, 1998.
61. PESSOA JR, A. KILIKIAN, VAHAN, B. **Purificação de Produtos Biotecnológicos**. Manole, São Paulo, p. 444, 2005.
62. PETERHANS E, GREENLAND T, BADIOLA J, HARKISS G, Bertoni G, Amorena B, Eliaszewicz M, Juste RA, Kraßnig R, Lafont JP, Lenihan P, Petursson G, Pritchard G, Thorley J, Vitu C, Mornex JF, Pepin M Routes of transmission and consequences of small ruminant lentiviruses (SRLVs) infection and eradication schemes. *Vet Resv*.35 p.257–274, 2004.
63. PINHEIRO, R. R.; GOUVEIA, A. M. G.; ALVES, F. S. F. Prevalência da infecção pelo Vírus da Artrite-Encefalite Caprina no estado do Ceará, Brasil. *Ciência Rural*, v. 31, n. 3, p. 449 – 454, 2001.
64. PRESTON, B., DOUGHERTY, J. P. Mechanisms of retroviral mutation. *Trends Microbiology*, v. 4, p. 16-21, 1996.
65. RAVAZZOLO, A.P.; COSTA, U. Retroviridae. In: ___ FLORES, E. F. *Virologia Veterinária*. Santa Maria: UFSM, 2007. p. 809-830.
66. RAYMOND, S. Protein purification by elution convection eletroforese. *Science* v. 146, p.406, 1956.
67. REGITANO, L. C. A.; COUTINHO, L. L. *Biologia molecular aplicada à produção animal*. Brasília: EMBRAPA. Informação tecnológica, p.215, 2001
68. REYBURN, H. T.; ROY, D. J.; BLACKLAWS, B. A.; SARGAN, D. R.; McCONNELL, I. Expression of Maedi-visna virus major core protein p. 25: development of a sensitive p 25 antigen detection assay. *Journal of Virological Methods*, v. 37, n. 3, p. 305-320, 1992.
69. RIET-CORRÊA, F. *Doenças de Ruminantes e Eqüinos*., São Paulo: Varela, , v.1, p.998, 2001.
70. SAITOH, T., HINZE, W. L. Use of surfactant-mediated phase separation (cloud point extraction) with affinity ligands for the extraction of hydrophilic protein. *Talanta*, v.42, n.1, p.119-127, 1995.
71. SALTARELLI, M.; QUERAT, G.; KONINGS, D. A.; VIGNE, R.; CLEMENTS, J. E. Nucleotide sequence and transcriptional analysis of molecular clones of CAEV which generate infectious virus. *Virology*, v.179, n.1, p.347-64, 1990.
72. SAMBROOK, J.; RUSSEL, D.W. *Molecular Cloning: A laboratory manual*, 3 ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press: USA. p.1445, 2001.
73. SCHUMANN, W.; FERREIRA, L. C. S. Production of recombinant proteins in Escherichia coli. *Genetics and Molecular Biology*, v.27, n.3, p.442-453, 2004.

74. SHAH, C., BONI, J., HUDER, J.B., VOGT, H.R., MUHLHERR, J., ZANONI, R., MISEREZ, R., LUTZ, H., SCHUPBACH, J.,. Phylogenetic analysis and reclassification of caprine and ovine lentiviruses based on 104 new isolates: Evidence for regular sheep-to-goat transmission and worldwide propagation through livestock trade. **Virology** v.319 n.1 ,p.12–26, 2004.
75. SHINODA, K.; Nakagawa, T.; Tamamushi, B. I. and Isemura, T. **Colloidal surfactants: some physicochemical properties**. New York: Academic Press, p. 1-96.1963
76. TANI, H., SUZUKI, Y.; MATSUDA, A.;KAMIDATE,T. Enhancement of excluded-volume effect in protein extraction using triblock copolymer-based aqueous micellar two-phase systems. **Analytica Chimica Acta**, v.429, n.2, p.301-309, 2001.
77. TIMASHEFF, S.N., The control of protein stability and association by weak interactions with water: how do solvents affect these processes? **Annu. Rev. Biophys. Biomol.Struct.**v.22, p.67–97,1993.
78. TURNER, P.C.; McLENNAN, A. G.; BATES, A. D.; WHITE, M. R. H. **Biologia Molecular**. 2ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, p.2872004.
79. VAREA, R.; MONLEON, E.; PACHECO, C.; LUJAN, L.; BOLEA, R.; VARGAS, M. A.;VAN EYNDE, G.; SAMAN, E.; DICKSON, L.; HARKISS, G.; AMORENA, B.; BADIOLA,J. J. Early detection of maedi-visna (ovine progressive pneumonia) virus seroconversion in field sheep samples.**Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v. 13, n.4, p. 301-307, 2001.
80. VITU, C.; RUSSO, P.; VIGNE, R.; QUERAT, G.; GIAUFFRET, A. An ELISA Test For Detection Of Maedi- Visna antibodies. Comparative study with Gel Immunodiffusion na complement fixation test. **Comparative Immunology and Microbiology Infectious Disease**,v.4, n.5, p .469-481, 1982.
81. ZINK, M. C.; JOHNSON, L. K. Pathobiology of lentivirus infections of sheep and goats.**Virus Research**, v.32, n.2, p. 13