

**UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA  
INSTITUTO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM IMUNOLOGIA**

**CARACTERIZAÇÃO DE ANTICORPOS MONOCLONais E DA P28  
DO VÍRUS DA ARTRITE ENCEFALITE CAPRINA (CAEV)**

**Camila Fonseca Lopes Brandão**

**Orientadora: Silvia Inês Sardi**

**Co-orientador: Gúbio Soares Campos**

**Salvador – Bahia**

**2009**

**CAMILA FONSECA LOPES BRANDÃO**

**CARACTERIZAÇÃO DE ANTICORPOS MONOCLONais E DA  
P28 DO VÍRUS DA ARTRITE ENCEFALITE CAPRINA (CAEV)**

**Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Imunologia do Instituto de Ciências da Saúde, da Universidade Federal da Bahia, como requisito para obtenção do grau de Mestre.**

**Orientadora: Silvia Inês Sardi**

**Co-orientador: Gúbio Soares Campos**

**Salvador – Bahia**

**2009**



ATA DA SESSÃO PÚBLICA DO COLEGIADO DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO  
EM IMUNOLOGIA PARA JULGAMENTO DA DISSERTAÇÃO DA MESTRANDA  
Camila Fonseca Lopes Brandão

Aos quatorze dias do mês de agosto do ano de dois mil e nove, às 14:00 horas, no auditório III no segundo andar do Instituto de Ciências da Saúde, em sessão pública, reúne-se a Banca Examinadora composta pelos Professores: Dra. Silvia Inês Sardi, Orientadora, Dra. Maria Fernanda Rios Grassi, Dr. Marcus Welby Oliveira Borges, com a finalidade de discutir, avaliar e julgar o trabalho de Dissertação intitulado: "Anticorpos Monoclonais para a p28 do vírus da Artrite Encefalite Caprina (CAEV)" da Pós-graduanda Camila Fonseca Lopes Brandão. Após a apresentação, foram feitos os comentários pelos examinadores. Havendo cumprido as exigências para a defesa, a Banca Examinadora conclui que a pós-graduanda teve a sua defesa de Dissertação Aprovada, emitindo pareceres individuais que serão anexados à ata. Nada mais havendo a tratar, encerra-se a sessão, da qual é lavrada a presente ata que após lida e aprovada vai assinada pelas componentes da Banca examinadora, pela Mestranda e pelo Coordenador do Programa de Pós-Graduação. Salvador, quatorze de agosto de dois mil e nove.

Profa. Dra. Silvia Inês Sardi  
Orientadora

Profa. Dra. Maria Fernanda Rios Grassi  
Banca Examinadora

Prof. Dr. Marcus Welby Borges Oliveira  
Banca Examinadora

Camila Fonseca Lopes Brandão  
Mestranda

Prof. Dr. Roberto José Meyer Nascimento  
Coordenador do PPGIm, em exercício

Dedico esta dissertação a minha mãe, Sandra, que me permitiu viver e sonhar, pelo amor sem dimensão, de cada momento e de cada capítulo de minha vida não ensaiados, mas vividos com emoção...

## AGRADECIMENTOS

A Deus, pelo dom da vida e pelas bênçãos que recebo a cada momento. Sabes de cada dificuldade, e em Ti busco forças para superar cada obstáculo. Obrigada!

A minha mãe e minha vida, Sandra, a mulher mais carinhosa, sensível e forte que conheço. Obrigada pelo cuidado, paciência, amizade e pelo seu amor... Ao meu pai, Humberto, pelos conselhos e pelos ensinamentos que sempre auxiliaram no meu crescimento e amadurecimento. Meu irmão, Tony, tão parecido comigo e o qual amo sem medidas, pela amizade e incentivo.

Ao meu avô, pelo exemplo de retidão e respeito, que contribuíram para a minha formação pessoal. A minha querida avó (*in memorian*). Sei que mesmo fisicamente ausente, continua a olhar por mim.

A minha madrinha e segunda mãe, Nilzeth, sempre presente e ajudando em qualquer situação. Aos meus tios e familiares, em especial Virgínia e Gilson, pelo apoio dado.

A Sérgio, pela paciência e compreensão. Suas palavras de força e incentivo sempre foram de fundamental importância nos momentos difíceis. Sei que estará sempre disposto a me apoiar e ver o meu crescimento. Obrigada pelo carinho e pelo seu amor.

A minha orientadora e amiga, Profa. Dra. Silvia Sardi. Não tenho palavras para agradecer! Por todos os anos de paciência e confiança, por todos os ensinamentos, pela atenção, pelo apoio profissional... Sempre foi mais que uma orientadora. Te quero muito bem e espero manter essa amizade por toda a vida. Ao meu co-orientador Gúbio Campos, pela orientação, pelos valiosos conhecimentos e amizade.

Aos amigos do Laboratório de Virologia. A Julianna, pela amizade, companhia e bons momentos; Patrícia, pelo carinho e paciência, principalmente nos primeiros passos na pesquisa; Dellane, pelo apoio de sempre; Michael pelo incentivo, a Naiara, Glauber, Gisele, Isa, Andréia, Lia, Margareth, Tereza e a todos os que passaram pelo Laboratório. Pessoas maravilhosas que enriqueceram meus dias, fazendo com que a minha jornada fosse mais alegre e prazerosa.

Aos meus amigos, pelo apoio e compreensão. Mesmo não podendo estar sempre juntos, sei que posso contar em qualquer circunstância.

Aos novos amigos conquistados no Instituto de Ciências da Saúde (ICS), em especial a Fúlvia Campos, pela boa vontade e auxílio e Dilcéa, pela paciência e ajuda.

Ao curso de Mestrado em Imunologia e a todos os professores, funcionários e amigos conquistados, pelos momentos de descontração e aprendizado.

Ao colega Vitor Dattoli, pela colaboração essencial na estatística do trabalho.

A Alex e Ana Luíza pela colaboração.

Ao Prof. Pita, pela atenção sempre que solicitado.

A Fundação de Amparo a pesquisa da Bahia (FAPESB) pela bolsa de estudos concedida durante o curso de mestrado.

A Agência de Defesa Agropecuária da Bahia (ADAB), pelo auxílio sempre que solicitado, em especial a Dr. Antônio Maia (ADAB – Salvador), a Dr. Paulo e Dr Mário (ADAB – Feira de Santana).

Ao Baby-Bode Empreendimentos Agropecuários, em especial a Flávia, pela colaboração.

A todos aqueles que auxiliaram e/ou participaram direta ou indiretamente do desenvolvimento deste trabalho, meu agradecimento.

“Sempre que te perguntarem se podes fazer um trabalho, responde que sim e te ponhas em seguida a aprender como se faz.”

**F. Roosevelt**

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO GERAL.....</b>	<b>16</b>
<b>2. REVISÃO DE LITERATURA.....</b>	<b>17</b>
<b>    2.1 VÍRUS DA ARTRITE-ENCEFALITE CAPRINA.....</b>	<b>17</b>
2.1.1 CLASSIFICAÇÃO.....	17
2.1.2 CARACTERÍSTICAS MORFOLÓGICAS.....	17
2.1.3 CICLO DE REPLICAÇÃO VIRAL.....	22
2.1.4 CÉLULAS HOSPEDEIRAS DO VÍRUS.....	25
2.1.5 RESTRIÇÃO DA REPLICAÇÃO VIRAL.....	26
2.1.6 ASPECTOS IMUNOLÓGICOS.....	26
2.1.6.1 Resposta imune humoral e imunopatologia.....	27
2.1.6.2 Resposta imune células e imunopatologia.....	28
<b>    2.2 ANTICORPOS MONOCLONais.....</b>	<b>29</b>
2.2.1 PROPRIEDADES DOS ACM.....	30
2.2.2 ANTICORPOS POLICLONais VERSUS AcM.....	32
2.2.3 APLICAÇÃO DOS AcM.....	33
<b>3. OBJETIVOS.....</b>	<b>35</b>
<b>    3.1 OBJETIVO GERAL.....</b>	<b>35</b>
<b>    3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....</b>	<b>35</b>
<b>4. MATERIAIS E MÉTODOS.....</b>	<b>36</b>
<b>    4.1 ANTICORPOS MONOCLONais (AcM).....</b>	<b>36</b>
4.1.1 ISOTIPIFICAÇÃO.....	36
4.1.2 DETERMINAÇÃO DA INTEGRIDADE DAS IG PRESENTES NO LÍQUIDO ASCÍTICO.....	36
4.1.3 TITULAÇÃO DAS IgG PRESENTES NO LÍQUIDO ASCÍTICO: ELISA DIRETO.....	37
4.1.4 IMUNODIFUSÃO EM GEL DE AGAROSE (IDGA): ATIVIDADE MONOVALENTE.....	37
<b>    4.2 DETECÇÃO DO ANTÍGENO VIRAL.....</b>	<b>38</b>
4.2.1 CULTIVOS CELULARES.....	38
4.2.2 PRODUÇÃO DO VÍRUS .....	38
4.2.2.1 CONCENTRAÇÃO DO VÍRUS .....	40

4.2.3 IMUNOFLUORESCÊNCIA INDIRETA.....	40
4.2.4 DOT-BLOT.....	40
4.2.5 WESTERN-BLOT.....	41
4.2.6 REATIVIDADE DOS AcM APÓS DIFERENTES TRATAMENTOS DO ANTÍGENO VIRAL.....	42
4.2.6.1 Tratamento do antígeno viral.....	42
a) SDS.....	42
b) β-ME .....	42
4.2.6.2 Padrão Eletroforético das proteínas virais.....	42
4.2.6.3 Western-blot.....	43
4.2.6.4 ELISA Indireto.....	43
4.2.7 REAÇÃO CRUZADA COM RETROVÍRUS HIV-1 E HIV-2.....	44
4.2.8 ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	44
<b>5. RESULTADOS.....</b>	<b>45</b>
<b>5.1 CARACTERIZAÇÃO IMUNOQUÍMICA DO AcM.....</b>	<b>45</b>
5.1.1 CARACTERÍSTICAS DAS IMUNOGLOBULINAS PRESENTES NOS AcM.....	45
5.1.2 IFI: REATIVIDADE PARA O ANTÍGENO VIRAL.....	48
5.1.3 DOT-BLOT: SENSIBILIDADE NA DETECÇÃO DO ANTÍGENO VIRAL..	48
5.1.4 WESTERN-BLOT.....	48
<b>5.2 ALTERAÇÕES NO EPÍTOPO DE RECONHECIMENTO DOS AcM.....</b>	<b>52</b>
5.2.1 PADRÃO ELETROFORÉTICO DAS PROTEÍNAS VIRAIS.....	52
5.2.2 WESTERN-BLOT.....	52
5.2.3 ELISA INDIRETO.....	53
<b>5.3 REAÇÃO CRUZADA COM RETROVÍRUS HIV-1 E HIV-2.....</b>	<b>54</b>
<b>6. DISCUSSÃO.....</b>	<b>58</b>
<b>7. CONCLUSÕES.....</b>	<b>61</b>
<b>8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>62</b>
<b>9. APÊDICES.....</b>	<b>74</b>

## LISTA DE ABREVIATURAS

<b>Ac</b>	<b>Anticorpos</b>
<b>AcM</b>	<b>Anticorpos monoclonais</b>
<b>AcP</b>	<b>Anticorpos policlonais</b>
<b>AgV</b>	<b>Antígeno viral sem tratamento</b>
<b>AgV-β-ME</b>	<b>Antígeno viral tratado com β-Mercaptoethanol</b>
<b>AgV-SDS</b>	<b>Antígeno Viral tratado com Dodecil Sulfato de Sódio</b>
<b>β -ME</b>	<b>β-Mercaptoetanol</b>
<b>CA</b>	<b>Capsídeo</b>
<b>CAE</b>	<b><i>Caprine arthritis-encephalitis</i></b>
<b>CAEV</b>	<b><i>Caprine arthritis-encephalitis virus</i></b>
<b>DAB</b>	<b>3,3'- Diaminobenzidina</b>
<b>DNA</b>	<b><i>Deoxyribonucleic acid</i></b>
<b>ELISA</b>	<b><i>Enzyme-linked immunosorbent assay</i></b>
<b>FITC</b>	<b>Fluoresceína</b>
<b>HIV</b>	<b><i>Human Immunodeficiency Virus</i></b>
<b>IDGA</b>	<b>Imunodifusão em Gel de Agarose</b>
<b>IFI</b>	<b>Imunofluorescência Indireta</b>
<b>IFN-LV</b>	<b>Interferon induzido por Lentivirus</b>
<b>LVPR</b>	<b>Lntivírus de Pequenos Ruminantes</b>
<b>MEM-D</b>	<b>Meio Essencial Mínimo de Dulbeco</b>

<b>MA</b>	<b>Matriz ou Proteína Associada a Membrana</b>
<b>MOI</b>	<b>Multiplicidade de Infecção</b>
<b>MSC</b>	<b>Membrana Sinovial Caprina</b>
<b>MVV</b>	<b>Virus Maedi-Visna</b>
<b>NC</b>	<b>Nucleocapsídeo ou Proteína Ligada ao Ácido Nucléico</b>
<b>PBS</b>	<b>Salina Tamponada com Fosfato</b>
<b>PBS-T</b>	<b>PBS acrescido de Tween 20 0,5%</b>
<b>PCR</b>	<b><i>Polymerase chain reaction</i></b>
<b>PR</b>	<b>Protease</b>
<b>RIA</b>	<b>Radioimunoensaio</b>
<b>RNA</b>	<b><i>Ribonucleic acid</i></b>
<b>SBF</b>	<b>Soro Bovino Fetal</b>
<b>SDS</b>	<b>Dodecil Sulfato de Sódio</b>
<b>SDS-PAGE</b>	<b>Eletroforese em gel de Poliacrilamida contendo SDS</b>
<b>SU</b>	<b>Glicoproteína de Superfície</b>
<b>TM</b>	<b>Glicoproteína Transmembrana</b>
<b>TMB</b>	<b>3,3',5,5' - Tetramethylbenzidine</b>
<b>TR</b>	<b>Transcriptase Reversa</b>
<b>Vsp</b>	<b>Vírus semi-purificado</b>

**LISTA DE FIGURAS**

<b>FIGURA 1:</b> Representação esquemática da estrutura e proteínas virais dos Retrovírus.....	20
<b>FIGURA 2:</b> Representação esquemática da estrutura do provírus de CAEV.....	21
<b>FIGURA 3 :</b> Ciclo de replicação dos Retrovírus .....	24
<b>FIGURA 4 :</b> Efeito citopático do CAEV em MSC .....	39
<b>FIGURA 5:</b> Perfil eletroforético das IgG dos AcM em SDS-PAGE 10%.....	46
<b>FIGURA 6:</b> Titulação das IgG presentes nos AcM.....	47
<b>FIGURA 7:</b> Imunofluorescência Indireta (IFI).....	49
<b>FIGURA 8:</b> Dot-blot: Sensibilidade dos AcM na detecção do AgV.....	50
<b>FIGURA 9:</b> Identificação de polipeptídeos do CAEV pelos AcM analisados por Western Blot.....	51
<b>FIGURA 10:</b> Perfil eletroforético das proteínas do CAEV: SDS-PAGE.....	55
<b>FIGURA 11:</b> Western-blot: Reatividade de AcM com polipeptídeos do CAEV após tratamentos que afetam a estrutura protéica.....	56
<b>FIGURA 12:</b> Determinação da reatividade dos AcM após tratamentos que afetam a estrutura protéica: ELISA Indireto .....	57

**LISTA DE QUADROS****Quadro 1:** Isotipificação dos AcM.....45**Quadro 2:** Reatividade dos AcM após alterações no epítopo de reconhecimento.....53

## RESUMO

CARACTERÍSTICAS DE ANTICORPOS MONOCLONais E DA p28 DO VÍRUS DA ARTRITE ENCEFALITE CAPRINA (CAEV). [CAMILA FONSECA LOPES BRANDÃO]. O CAEV é um vírus envelopado cuja cápside é formada por uma tripla camada protéica, dentro da qual se encontra a p28, proteína de maior número de unidades repetidas. Os AcM consistem em ferramentas de grande uso para fins diagnósticos ou de pesquisa para agentes virais. Neste trabalho AcM para a p28 do CAEV foram analisados na sua reatividade e característica imunológica. Dentre as características imunológicas, foi demonstrada que a imunoglobulina predominante foi a IgG, de cadeia leve κ, sem atividade precipitante segundo o ensaio de Imunodifusão. A atividade ou reatividade destes AcM em substratos celulares infectados com CAEV foi baixa, o que foi demonstrado pela imunofluorescência indireta. Por outro lado, a atividade destes AcM está direcionada para a p28 e seus precursores protéicos virais. O epítopo reconhecido na p28 poderia ser do tipo seqüencial pela maior reatividade ao desnaturar a proteína que o contém (Western-blot). Entretanto, a depender dessa desnaturação o reconhecimento do epítopo pode ser afetado, como demonstrado nos tratamentos do antígeno viral com agente surfactante (SDS) ou β-Mercaptoethanol. Estes resultados mostraram que o epítopo na p28 seria afetado com ambos os tratamentos, porém foi mais notável com o β-Mercaptoethanol, o que sugeriria que este determinante antigênico é rico em resíduos Cys.

Palavras-chave: Anticorpos Monoclonais, CAEV, Caracterização.

## ABSTRACT

CHARACTERISTICS OF MONOCLONAL ANTIBODIES AND p28 OF CAPRINE ARTHRITIS-ENCEPHALITIS VIRUS (CAEV). [CAMILA FONSECA LOPES BRANDÃO]. CAEV is an enveloped virus whose capsid is formed by a triple layer protein, within which is the p28 protein, with a greater number of repeating units. The MAbs tools consist of great use for diagnostic or search for viral agents. In this study, MAbs for CAEV p28 protein were analyzed in their immunological characteristics. Among the immunological characteristics, was demonstrated that the predominant immunoglobulin was IgG, light chain κ, without precipitating activity according to the immunodiffusion test. The activity or reactivity of these MAbs on substrates with CAEV infected cell was low, which was demonstrated by indirect immunofluorescence. Moreover, the activity of these MAbs are directed to the p28 protein and its precursor virus. The epitope recognized in p28 could be of the sequence by greater reactivity to denature the protein that contains (Western blot). However, depending on the denaturation of epitope recognition may be affected, as demonstrated in the treatment of viral antigen with agent surfactant (SDS) or β-Mercaptoethanol. These results showed that the epitope in p28 would be affected in both treatments, but was most notable with the β-Mercaptoethanol, which would suggest that this antigenic determinant is rich in Cys residues.

Keywords: Monoclonal Antibodies, CAEV, Characterization.

## 1. INTRODUÇÃO

Desde que Köhler e Milstein desenvolveram a tecnologia da produção dos anticorpos monoclonais (AcM) (KÖHLER; MILSTEIN, 1975), estes rapidamente se tornaram uma das ferramentas chaves da imunologia, revolucionando a ciência biológica por constituir reagentes homogêneos e altamente específicos (COLFOR; HALL, 1995; NELSON *et al.* 2000).

AcM são utilizados com fins diagnóstico ou de pesquisa para uma variedade de agentes vírais (LADYMAN; RITTER *et al.* 1995), como neste caso para o Vírus da Artrite-Encefalite Caprina (CAEV) (CAMPOS *et al.* 2007; SARDI, *et al.* 2006). O CAEV pertence a família *Retroviridae*, gênero *Lentivirus*, e sub-família *Lentivirinae* (CALLADO *et al.*,2001; GOFF, 2006), é um vírus envelopado que se caracteriza por apresentar um RNA diplóide (COFFIN, 2001; HUSO *et al.*,1988) o qual está protegido por uma tripla camada protéica: a matriz (MA), a proteína do capsídeo (CA), e a proteína ligada ao ácido nucléico (NC) (GOFF, 2006; MURPHY *et al.*, 1999). Recobrindo o capsídeo encontramos o envelope viral no qual se projetam as glicoproteínas responsáveis pela união a célula (COFFIN, 2001; HUSO *et al.*, 1988).

Existem vários registros na literatura determinando a soroprevalência do CAEV em diferentes partes do mundo (ROBINSON; ELIIS, 1986; DAWSON; WILLESMITH, 1985) e estados do Brasil (MELO; FRANKE, 1997; SELL, 2000). Na Bahia, a soroprevalência varia de 8,75% a 24% (TORRES *et al* 2009; ALMEIDA *et al*, 2001; EDEWEIS *et al* 2001). A doença causada por este vírus leva a grandes perdas econômicas que se caracterizam por morte de animais jovens, diminuição da produção láctea, perda de peso dos animais adultos, além de perdas indiretas como a desvalorização do rebanho e aumento das despesas com controle (CALLADO *et al.*,2001; COFFIN, 2001; PINHEIRO *et al.*, 2001; NARAYAN *et al.*, 1980). A resposta de anticorpos contra o CAEV em animais infectados é dirigida principalmente para as glicoproteínas de superfície (gp 135) e para a p28 (resposta de maior intensidade) (CONCHA-BERMEJILLO, *et al* 1995).

Dada a importância desta virose no país, este trabalho pesquisou as características imunológicas e a reatividade para a proteína viral p28 de AcM produzidos para CAEV (Laboratório de Virologia, ICS-UFBA).

## 2. REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1 VÍRUS DA ARTRITE-ENCEFALITE CAPRINA

#### 2.1.1 CLASSIFICAÇÃO

O CAEV pertence a família *Retroviridae*, gênero *Lentivirus*, e sub-família *Lentivirinae*. Este vírus se caracteriza por causar doenças degenerativas crônicas, com períodos de incubação prolongados, persistência e replicação viral na presença de resposta imune específica. Neste gênero, encontramos outros vírus de importância para animais domésticos, tais como o vírus Maedi-Visna (MVV) de ovinos, o vírus da Anemia Infecciosa Equina, o vírus da Imunodeficiência bovina, felina e símia e para o homem, o vírus da Imunodeficiência Humana do tipo I e do tipo II (HIV-1 e HIV-2). (COFFIN, 2001; GOFF, 2006; SMITH, 1993; NARAYAN *et al.*, 1980)

#### 2.1.2 CARACTERÍSTICAS MORFOLÓGICAS

O CAEV apresenta-se como um vírion envelopado de 80 a 100 nm de diâmetro contendo duas moléculas idênticas de ácido ribonucléico (RNA) e proteínas estruturais. Seu nucleocapsídeo está inserido em um capsídeo icosaédrico de aproximadamente 60 nm de diâmetro, e recobrindo este capsídeo encontramos o envelope viral que é derivado da membrana plasmática da célula hospedeira e neste envelope há a projeção de glicoproteínas. Apresentam uma grande quantidade de ácido siálico na superfície viral, o que lhe confere um importante grau de resistência para a degradação do vírus pelas enzimas proteolíticas e para a neutralização viral por anticorpos (COFFIN, 2001; GOFF, 2006; HUSO *et al.*, 1988).

Estudos filogenéticos realizados com amostras de Lentivírus de pequenos ruminantes (LVPR) indicam que estes vírus podem ser considerados como quasispécies virais, compartilhando

características genéticas, morfológicas, patogênicas e apresentando a possibilidade de infecção cruzada entre caprinos e ovinos (PASICK, 1998; LIMA *et al.*, 2004). Estas quasispécies, ocorrem principalmente devido as altas taxas de erros e a falta de mecanismos corretores da polimerase e como resultado, há a produção de numerosas partículas imperfeitas. Esta variabilidade auxilia na evasão do sistema imune, na produção de infecção persistente e na capacidade de atravessar as barreiras espécie- específicas, como no caso do CAEV e MVV (CHEEVERS *et al* 1993; STEINHAUER D. A. *et al* 1987; PASICK, 1998).

O genoma do CAEV consiste de duas moléculas idênticas de RNA, lineares, de fita simples, não complementares e de polaridade positiva, com o tamanho aproximadamente 7 a 11 kb de comprimento, incluindo o *cap* na região 5' e a poliadenilação na região 3'. É característico dos *Retrovirus* apresentar um RNA transportador específico, cuja função é de iniciador da replicação, além da capacidade de sintetizar uma enzima exclusiva, a Transcriptase reversa (TR), que atua como ácido desoxiribonucléico (DNA) polimerase RNA dependente. (SALTARELLI *et al*, 1990; COFFIN, 2001; GOFF, 2006; MURPHY *et al*, 1999).

Três genes estruturais (*gag*, *pol* e *env*) fazem parte do genoma do CAEV e originam polipeptídios precursores, que após clivagem pós-traducional dão origem as proteínas do vírion (CHEEVERS *et al.*, 1988). Esta clivagem é análoga a que ocorre em MVV, antigenicamente relacionado com o CAEV, e em outros retrovírus, nos quais a formação das proteínas estruturais envolve a síntese e processamento de vários precursores polipeptídicos (VIGNE *et al.*, 1982).

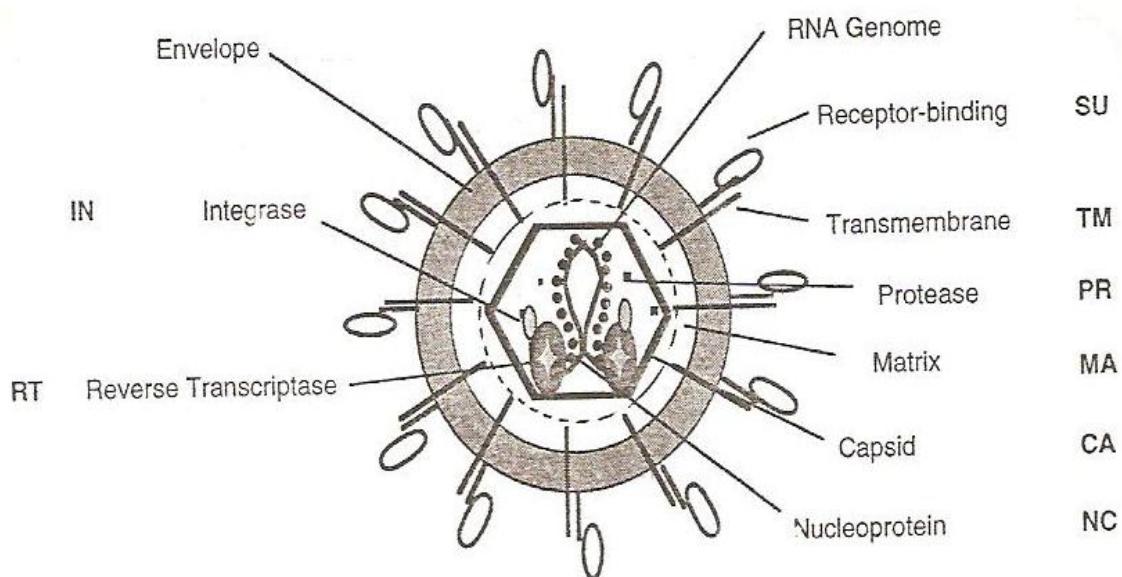
O gene *gag* (Group- specific Antigens) está localizado mais próximo a região 5' e codifica as proteínas do core do vírion. Estas, são formadas por vários polipeptídeos intermediários derivados de um precursor policistrônico primário comum de 51Kd a 55Kd, denominado Pr51<sup>gag</sup>-Pr55<sup>gag</sup> (SCHOBORG *et al.*, 2002; CHEEVERS *et al.*, 1988). Este produto primário do gen *gag* é subsequentemente clivado em 3 proteínas principais: a proteína da matriz ou proteína associada a membrana (MA), a proteína do capsídeo (CA), e a proteína ligada ao ácido nucléico (NC) (NARAYAN *et al.*, 1997; GOFF, 2006; MURPHY *et al.*, 1999). Alguns estudos mostraram que estas proteínas estruturais do core tem 15Kd a 18Kd , 21Kd a 30Kd e 13Kd a 14Kd, respectivamente (SCHOBORG *et al.*, 2002; CHEEVERS *et al.*, 1981; ADAMS *et al.*, 1985; GOGOLEWSKI *et al.*, 1985).

O gene *pol* geralmente apresenta um maior número de sequências conservadas, sendo frequentemente utilizado para a comparação entre diferentes lentivírus. Ele codifica três proteínas que contem atividade enzimática indispensável ao vírus no estágio pós-infecção: a Transcriptase reversa (TR), a Integrase (IN) e a Protease (PR). A TR tem atividade enzimática para converter uma fita simples de RNA em uma molécula de DNA de fita dupla, a IN é necessária para ligar covalentemente o DNA proviral ao DNA da célula hospedeira, formando o “provírus” e a PR é responsável pelas clivagens dos produtos dos genes *gag* e *pol* no precursor comum (GOFF, 2006; MURPHY *et al.*, 1999).

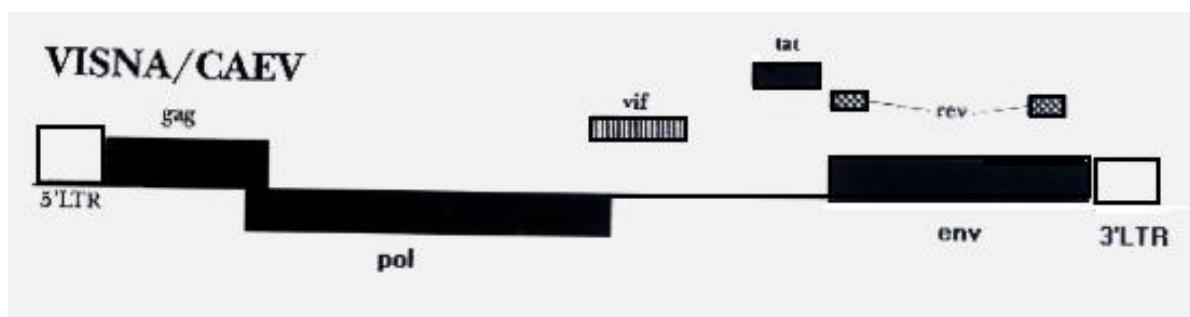
O gen *env* codifica duas glicoproteínas do envelope viral: a maior delas (135Kd), a glicoproteína de superfície (SU), responsável pelo reconhecimento dos receptores de superfície celular e a menor (90Kd), a transmembrana (TM), que ancora o complexo glicoprotéico ao envelope viral e contém domínios responsáveis pela fusão do vírus à membrana celular. A SU é formada pelo processamento e clivagem de um precursor glicosilado de 150Kd ( $\text{gPr}150^{\text{env}}$ ), derivado de um polipeptídio de 90Kd codificado pelo gen *env* (CHEEVERS *et al.*, 1988; KNOWLES *et al.*, 1991).

Um polipeptídio não glicosilado de 150K corresponde provavelmente ao grande precursor comum das proteínas relacionadas ao gen *gag* e da TR ( $\text{Pr}150^{\text{gag-pol}}$ ) encontrada em todos os retrovírus (VIGNE *et al.*, 1982). Os papéis precisos dos precursores intermediários na formação das proteínas do core não estão claros (CHEEVERS *et al.*, 1988).

Adicionalmente aos genes *gag*, *pol* e *env*, comuns a todo os retrovírus, os vírus pertencentes ao gênero *Lentivirus* codificam vários outros genes, referidos como genes acessórios. Esses incluem o gen *tat*, que codifica um potente transativador que associado a fatores da célula infectada, que aprimora a eficiência da transcrição pela RNA polimerase celular; o gen *rev*, que codifica a proteína que é envolvida na transcrição do RNA viral e seu transporte do núcleo para o citoplasma; o gen *nef*, que é essencial para replicação do vírus em macrófagos, regula a expressão de CD4 e IL-2 e pode também alterar o estudo de ativação de células alvo in vivo; e o gen *vif*, que está associado com a infectividade viral (COFFIN, 2001; GOFF, 2006; MURPHY *et al.*, 1999). (Figuras 1 e 2)



**Figura 1:** Representação esquemática da estrutura e proteínas virais dos Retrovírus (Goff, 2006).



**Figura 2:** Representação esquemática da estrutura do provírus de CAEV. LTR- long terminal repeat. Gene *gag* codifica 3 proteínas principais: MA, CA e NC. Gene *pol* codifica enzimas: TR e IN. Gene *env* codifica as GP SU e TM. Genes *vif*, *tat*, e *rev* codificam proteínas reguladoras.(Coffin, 2001)

### 2.1.3 CICLO DE REPLICAÇÃO VIRAL

O ciclo de replicação do CAEV se inicia com a interação entre a molécula receptora na superfície celular e a glicoproteínas do envelope (GP135) na superfície do vírus (Figura 3). A interação é complexa, envolvendo uma ligação inicial vírus-receptor, a drástica mudança conformatonal nas proteínas do envelope, a indução da fusão das membranas celular e viral e a subsequente internalização do core do vírion no citoplasma. Em alguns casos a entrada do vírus pode ocorrer por endocitose celular. (HULINGUER *et al.*, 1993; HARKISS, WATT, 1990; GOFF, 2006; MURPHY *et al.*, 1999). Células cronicamente infectadas por um vírus em particular, não podem ser infectadas por outro vírus que utilize o mesmo receptor, devido a fatores que envolvem a união intracelular dos produtos de *env* expressos e dos receptores. Este fenômeno é chamado de interferência viral ou de resistência a superinfecção (GOFF, 2006).

A disseminação da infecção celular pode também ocorrer via contato célula-célula, através da fusão celular induzida pelo vírus. Embora ambos os mecanismos citados possam ocorrer “*in vitro*”, a transmissão do vírus através da fusão célula-célula tem indicativo de ser mais importante “*in vivo*” (HARKISS, WATT, 1990; GOFF, 2006; MURPHY *et al.*, 1999).

A transcrição reversa normalmente se inicia após a entrada do core do vírion no citoplasma da célula infectada. O sinal para a síntese do DNA não é conhecido, podendo ser desencadeado por uma simples exposição do core viral a altos níveis de deoxirribonucleotídeos presentes no citoplasma. A partir daí, a TR copia o ácido ribonucléico (RNA) viral, sintetizando um ácido desoxirribonucléico (DNA) de fita dupla. O capsídeo é removido e o DNA viral é transportado ao núcleo, onde enzimas especializadas, incluindo a IN, fazem uma inserção randômica desse DNA viral no genoma da célula hospedeira, compondo o “provírus”. Este, uma vez integrado ao DNA celular é estável, e durante replicação celular é transmitido à progênie como parte do genoma celular (GOFF, 2006). Na forma de provírus, o vírus pode permanecer latente por meses ou anos (HARKISS, WATT, 1990). A integração do DNA linear retroviral, bem como a transcrição reversa são etapas cruciais no ciclo de replicação dos retrovírus. A integração é requerida para uma replicação eficiente, já que estudos com cepas mutantes que não se integram, não estabelecem uma infecção persistente (GOFF, 2006).

Em condições adequadas à replicação, o DNA proviral é transcrito em RNA genômico viral e RNA mensageiro, este último é traduzido nos ribossomos para a síntese de proteínas virais. O RNA genômico viral e as proteínas estruturais são montadas e a partícula viral recém formada “brota” através da membrana celular (HARKISS, WATT, 1990; GOFF, 2006; MURPHY, *et al.*, 1999). No CAEV a montagem e o brotamento são concomitantes (HAZIZA *et al.*, 2001).

Após o brotamento, as proteínas *gag*, *pol* e *env* que haviam sido sintetizadas juntas, são processadas e reorganizadas pela protease viral, modificando a estrutura do vírus, tornando-o uma partícula madura (HARKISS, WATT, 1990; GOFF, 2006; MURPHY, *et al.*, 1999). O vírus liberado no fluido celular é capaz de infectar outras células para iniciar um novo ciclo viral (HARKISS, WATT, 1990; GOFF, 2006; MURPHY, *et al.*, 1999).

Muitos retrovírus não são citopáticos (efeito visível de destruição celular) e não alteram dramaticamente o metabolismo da célula infectada, outros, replicam-se apenas em células em divisão, incluindo os do gênero *Lentivirus*, e estes causam morte celular, formação de sincícios e apoptoses. A infecção por Retrovirus geralmente não é lítica, porém pode levar a destruição celular através de diversos mecanismos: (1) morte celular mediada pelo sistema imune; (2) toxicidade direta por produtos dos genes virais; (3) replicação intensiva do vírus levando a uma opressão das funções necessárias à sobrevivência da célula e (4) efeitos indiretos dos produtos dos genes virais nas interações celulares necessárias às suas funções e sobrevivência (MURPHY, *et al.*, 1999).

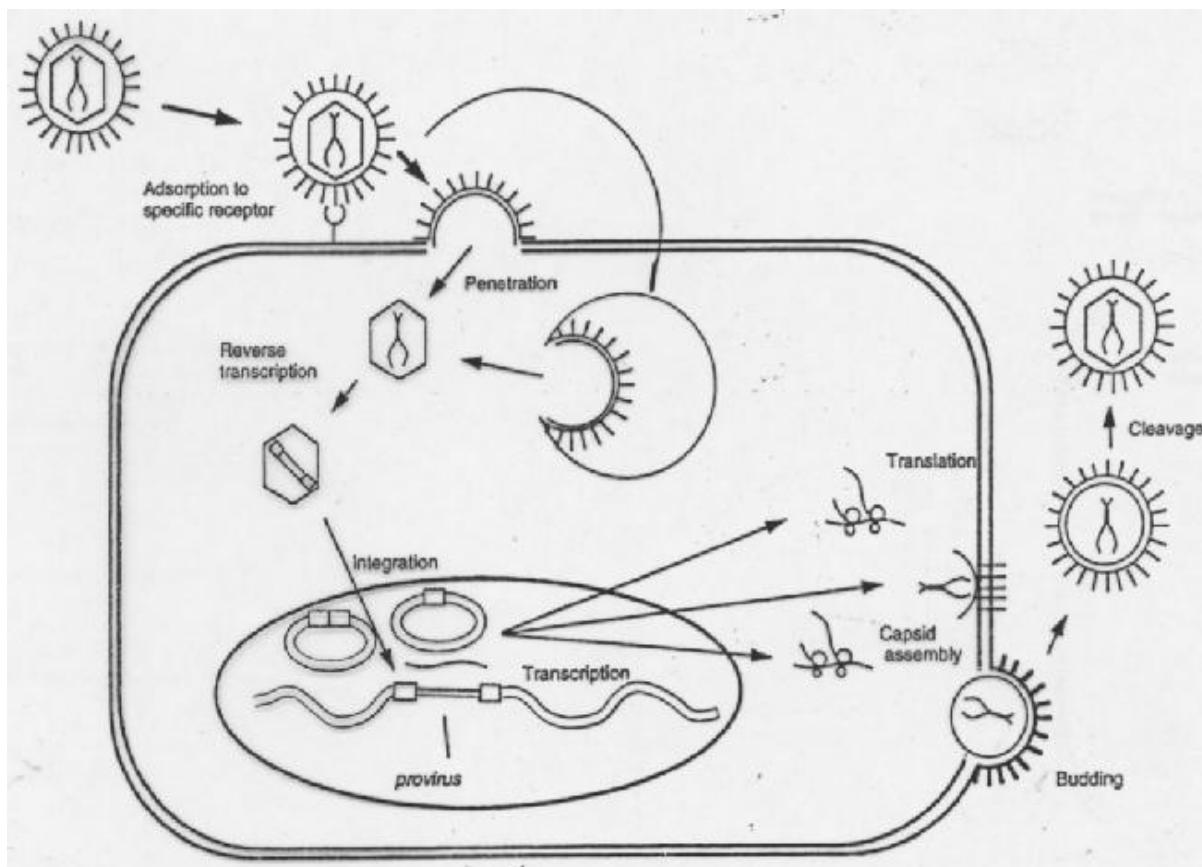


Figura 3: Ciclo de replicação dos Retrovírus (Goff, 2006).

#### 2.1.4 CÉLULAS HOSPEDEIRAS DO VÍRUS

O CAEV, assim como outros lentivírus, é conhecido por causar infecção persistente com um longo período de latência que pode se estender por toda a vida do animal. As células da linhagem monócito-macrófago são as principais células hospedeiras do CAEV, e a replicação viral e expressão de vírus infeccioso é dependente do nível de maturação/diferenciação da célula monocítica (MURPHY, *et al.*, 1999; PHELPS, SMITH, 1993; NARAYAN, *et al.*, 1982). Os macrófagos são a principal fonte do vírus em animais experimental ou naturalmente infectados e enquanto a montagem do vírion acontece intracelularmente em vacúolos citoplasmáticos, não é visível nenhuma alteração celular (NARAYAN *et al.*, 1982).

O genoma e/ou proteínas virais tem sido detectados *in vivo* ou *in vitro* em células semelhantes a macrófagos no pulmão, baço e linfonodos; em células de revestimento das veias do cérebro e sinoviais; células epiteliais das criptas intestinais, dos pulmões, da tireóide, dos túbulos renais, dos folículos tireoidianos, das glândulas mamárias e dos ovidutos; e em células da granulosa derivada dos ovários de cabras infectadas. (ZINK *et al.*, 1990; MSELLI-LAKHAL *et al.*, 1999; LAMARA *et al.*, 2001; LAMARA *et al.*, 2002; PHELPS, SMITH, 1993; FIENI *et al.*, 2003). Células epiteliais do leite de cabras também são suscetíveis a infecção por CAEV *in vivo* e *in vitro* (MSELLI-LAKHAL *et al.*, 1999).

Estudos mostraram que o CAEV pode passar diretamente de macrófagos com infecção produtiva para outras células não infectadas por fusão celular, sem a necessidade de receptores celulares específicos. A presença de transcritos virais em células epiteliais sugere que essas células podem ser infectadas por fusão randômica com macrófagos infectados nos tecidos. A possibilidade de penetração dos lentivirus em células infectadas tanto por endocitose mediada por receptores específicos, quanto por fusão, pode permitir um tropismo mais amplo de células hospedeiras (ZINK *et al.*, 1990).

A replicação do CAEV em células epiteliais de uma variedade de tecidos sugere o conceito de que o tropismo celular dos lentivirus pode estender-se além do estreito limite de linfócitos e macrófagos (ZINK *et al.*, 1990).

### 2.1.5 RESTRIÇÃO DA REPLICAÇÃO VIRAL

Estudos demonstraram que a replicação viral ocorre em menores taxas nos monócitos, e permanece nos estágios iniciais até que haja a maturação dessas células em macrófagos, completando assim o ciclo de replicação. Este fenômeno, conhecido como *restrição da replicação*, é um mecanismo que permite ao vírus permanecer nos monócitos por períodos prolongados e indetectável para outras células do sistema imune (BRODIE et al., 1995; MURPY et al., 1999; ZINK et al., 1990; GENDELMAN et al., 1986; ZINK et al., 1987).

A clivagem anormal da gp SU também restringiu a replicação do vírus em cultivos de fibroblastos infectados com CAEV (CHEBLOUNE et al., 1996). A falta de um receptor adequado e funcional na superfície desta célula hospedeira impede a penetração do vírus, funcionando assim como uma forma de restrição a replicação, desde que não haja caminhos alternativos para a entrada. Desta forma, pode-se observar que após a integração do DNA viral na célula hospedeira, o ciclo viral pode ser interrompido em diferentes estágios, demonstrando que muitas células podem conter o genoma proviral, mas não expressar o RNA viral. Isto pode explicar, em parte, a latência da doença clínica e a persistência da resposta imune, uma vez que as proteínas virais incorretamente processadas podem estimular e manter uma resposta imune ao vírus (MSELLI-LAKHAL et al. 2000).

### 2.1.6 ASPECTOS CLÍNICOS E PATOLÓGICOS

A infecção por CAEV é geralmente persistente, podendo causar afecção multissistêmica, de evolução crônica, com agravamento progressivo das lesões, perda de peso e debilidade até a morte (NARAYAN & CORK, 1985). A enfermidade se caracteriza por uma paralisia ascendente afebril em cabritos e artrite crônica em animais adultos (GARCIA, 1993). A grande maioria dos animais infectados permanece assintomática (REILLY et al., 2004), porém dependendo do vírus e de fatores genéticos do hospedeiro, aproximadamente um terço dos animais infectados com os LVPR podem desenvolver os sintomas da doença (RAVAZZOLO, et al., 2006).

Do ponto de vista clínico e anatomo-histopatológico, as apresentações clínicas das infecções por CAEV têm sido classificadas em quatro formas principais: artrítica, nervosa, respiratória e mamária. Dentre essas formas, a mais comumente observada é a artrítica, acometendo animais adultos (NARAYAN & CORK, 1985).

## 2.1.7 ASPECTOS IMUNOLÓGICOS

### 2.1.7.1 Resposta imune humoral e imunopatologia

A resposta de anticorpos contra o CAEV em animais infectados é detectada em torno da terceira semana após a infecção, e é dirigida principalmente à proteína CA; na quinta semana são produzidos anticorpos para as demais proteínas (NC, MA, TM e SU) (CONCHA-BERMEJILLO, *et al* 1995).

O papel dos anticorpos no controle de infecções por LVPR é controverso (Mc GUIRE, *et al* 1990; BERTONI, 2007). Apesar da resposta imune humoral ser direcionada para várias proteínas virais, a infecção por CAEV induz resposta principalmente para as glicoproteínas do envelope, que é mantida durante todo o curso da infecção (KNOWLES, *et al* 1990; BERTONI, *et al* 2000). Este tipo de resposta contra as glicoproteínas do envelope está associada com a artrite severa, já que os anticorpos tendem a ser pouco neutralizantes ou não neutralizantes (BERTONI, *et al* 2000) e geram mecanismos imunopatológicos que contribuem à doença induzida pelo vírus (KNOWLES, *et al* 1990).

Huso *et al* (2000) mostraram que a superfície externa das partículas infecciosas de CAEV é recoberta com ácido siálico, o que confere um notável grau de resistência para a neutralização por anticorpos, facilitando o escape viral à resposta imune humoral. Variantes de escape do CAEV resistentes a neutralização têm sido detectadas em cabras infectadas, sugerindo que os anticorpos impõem uma forte pressão seletiva no vírus (CHEEVERS, *et al* 1993; ELLIS, *et al* 1987). A recorrente estimulação antigênica causada pelo aparecimento de variantes resistentes a neutralização mostrou estar associada a severidade dos sintomas clínicos nas articulações (BERTONI, 2007; CHEEVERS, *et al* 1991)

O tempo entre o início da infecção e o aparecimento de anticorpos no sangue varia de semanas a meses, o que presumivelmente, reflete o nível de replicação viral em cada animal e dificulta o sorodiagnóstico dessas infecções (HARKISS; WATT, 1990; RIMSTAD, *et al* 1993). Os anticorpos passivos adquiridos pela ingestão de colostro persistem em níveis detectáveis no soro de cabritos por menos de seis meses (ADAMS, *et al* 1983).

#### 2.1.7.2 Resposta imune celular e imunopatologia

A resposta imune de células T desempenha um papel crucial no controle da infecção viral aguda e persistente (KELENERMAN, 2005). A resposta imune celular contra o CAEV é caracterizada pela redução na proporção de monócitos do sangue periférico, diminuição de linfócitos T CD4<sup>+</sup> e discreto aumento de linfócitos T CD8<sup>+</sup> (JOLLY, *et al* 1997; LICHTENSTEIGER, *et al* 1993). Esta resposta conduz a infiltração mononuclear de vários tecidos do organismo, em particular para a articulação do joelho (LECHNER, *et al* 1997). Durante a infecção pelo CAEV, o número de monócitos é reduzido (JOLLY, *et al* 1997) e a qualidade resposta de células T *helper* pode ser afetada (PERRY, *et al* 1995).

A resposta celular T CD4 tipo 2 (Th2) para antígeno *env* é caracterizada por uma resposta de interleucina 4 (IL4) dominante e uma reduzida expressão de interferon  $\gamma$  (IFN $\gamma$ ), segundo descrito em cabras infectadas que tiveram o desenvolvimento do processo de artrite clínica. Inversamente, animais infectados e assintomáticos, mostraram uma forte resposta IFN $\gamma$  sobre a estimulação antigênica em *env*, demonstrando o efeito benéfico da resposta de linfócitos T *helper* 1 (Th1) no controle da carga viral (CHEEVERS *et al* 1997).

Células T CD8<sup>+</sup> tem sido detectadas em cabras e ovelhas infectadas, e são consideradas importantes para o sucesso no controle da carga viral de animais persistentemente infectados (LICHTENSTEIGER, *et al* 1993; BIRD, *et al* 1993; BLACKLAWS *et al* 1994; BLACKLAWS *et al* 1995). Da mesma forma, foi observado que em indivíduos infectados com HIV1 e considerados como controladores de HIV (HIC), o controle da replicação viral tem sido associada com uma resposta de célula T CD8 específica, caracterizada por um fenótipo HLA-DR alto e CD-38 baixo. Os indivíduos HIC tem alta freqüência de células T CD8 específicas para HIV secretando IFN $\gamma$  (SÁEZ-CIRON *et al* 2007).

Os padrões de expressão de citocinas na CAE também foram similares aos achados na artrite reumatóide humana, com poucas células expressando as citocinas derivadas dos leucócitos - interferon  $\gamma$  (IFN $\gamma$ ) e interleucina 2 (IL-2) – e mais células expressando proteínas quimioatraentes de monócitos (MCP-1), IL-6 e fator de necrose tumoral (TNF) – alfa. Nenhum IFN $\gamma$  ou células expressando o vírus foram achadas nas articulações inflamadas (processo agudo), mas ambos foram detectados em cabras com severa artrite (LECHNER, *et al* 1997).

Lechner e colaboradores (1997) concluíram que na infecção pelo CAEV, macrófagos infectados respondem diferentemente de células não infectadas para estímulos exógenos, sugerindo que esse vírus pode modular as funções acessórias desses macrófagos, como mudar o padrão de expressão de citocinas ou a resposta imune antiviral *in vivo*.

## 2.2 ANTICORPOS MONOCLONIAIS

Anticorpos Monoclonais (AcM) são anticorpos de especificidade única, derivados de um único clone de células B e que respondem a um único epítopo.

A molécula de imunoglobulina é uma estrutura complexa formada por quatro cadeias de polipeptídeos, as cadeias pesadas de imunoglobulina (IgH) e as cadeias leves de imunoglobulina (IgL). Estas cadeias contêm domínios constantes, responsáveis pelas funções efetoras, e domínios variáveis, que se ligam ao epítopo antigênico. A caracterização da estrutura dos anticorpos e de seus genes, são a base para a sua engenharia (BERZOFSKY *et al* 2003).

Após o desenvolvimento da tecnologia da produção dos AcM, em 1975, por Georges Köhler e Cesar Milstein, os AcM tornaram-se rapidamente uma das ferramentas chaves da imunologia (KOHLER; MILSTEIN, 1975), sendo amplamente utilizados na medicina e nas pesquisas biomédicas básicas no diagnóstico de doenças e no tratamento de diversos problemas, tais como infecções e câncer (COLFOR; HALL, 1995; COOK; SELF, 1995).

A produção de AcM requer imunização de um animal, normalmente camundongos, obtendo células B produtoras de anticorpos e a fusão destes linfócitos B, que vivem poucos dias em cultura *in vitro*, com uma única célula de mieloma que tem a propriedade da imortalidade,

gerando o hibridoma, que pode secretar anticorpos da especificidade desejada e vive por tempo ilimitado (KOHLER; MILSTEIN, 1975).

A cultura contínua de hibridomas para a produção de AcM oferece como vantagens um suplemento inesgotável de imunoglobulinas com altos títulos, alta reprodutibilidade e evita o aparecimento de reações cruzadas. Conseqüentemente, o AcM permite o desenvolvimento de sistemas imunoensaios padronizados e seguros. Logo, AcM servem como poderosas ferramentas para a investigação de macromoléculas e células, e têm provido reagentes efetivos em termos de especificidade para testes diagnósticos clínicos (NELSON *et al.*, 2000). Entretanto, o custo da sua produção, a ocorrência de alguns relatos de toxicidade durante a sua utilização terapêutica e o funcionamento apenas sob determinadas condições, como a preservação dos epítopos a serem reconhecidos pelos anticorpos, ainda são problemas a serem superados. Inúmeros AcM encontram-se em fase de testes para a liberação do seu uso para fins diagnósticos e terapêuticos (GLENNIE; JOHNSON, 2000).

Uma tecnologia alternativa para a produção de AcM envolve o uso de bibliotecas de genes, tendo como vantagem a redução do uso de animais para as imunizações e a eliminação da fase de screening dos sobrenadantes contendo os anticorpos (BERZOFSKY *et al* 2003).

### 2.2.1 PROPRIEDADES DOS ACM

A caracterização de um AcM promove a análise do anticorpo produzido pelo hibridoma, em termos de reatividade e especificidade. Para tanto, é essencial a reclonagem dos hibridomas para evitar dados ambíguos, resultando em anticorpos de diferentes classes, especificidade e afinidade. Assim, a determinação do isotipo torna-se essencial para a identificação de misturas. A caracterização das imunoglobulinas também permite testar a reação dos AcM com uma grande variedade de抗ígenos ou preparações tissulares, bem como avaliar o seu uso em diferentes técnicas moleculares e imunológicas (NELSON *et al*, 2000).

O perfil do AcM para diferentes tipos de ensaios é um aspecto extremamente relevante durante a caracterização. Isso é especialmente pertinente para o potencial do anticorpo como reagente diagnóstico, já que alguns AcM reagem bem em alguns sistemas mas não em outros. Esse fenômeno, chamado de restrição de ensaio, define como um anticorpo reconhece um

epitopo alvo no contexto do tipo de ensaio usado, por que os epitopos poderão ser desnaturados ou tornar-se inacessível. Desta forma, é importante testar o AcM em diferentes ensaios imunoquímicos (NELSON *et al.*, 2000).

É notável que, embora um hibridoma seja o produto da fusão de uma única célula B e produza um AcM de excelente especificidade, esse mesmo anticorpo pode ter reação cruzada com outros抗ígenos ou exibir dupla especificidade. Isto pode ser devido ao reconhecimento de sítios combinados mais do que um determinante抗ígenico, por alguma similaridade na forma ou composição química. Conseqüentemente, uma rigorosa avaliação de um dado AcM e seus epitopos alvo se faz necessária (NELSON *et al.*, 2000).

Desta forma, a caracterização deve incluir dados bioquímicos, biológicos e imunológicos dos AcM.

#### 2.2.1.1 Especificidade, afinidade e avidez

A especificidade clara dos anticorpos se aplica ao reconhecimento de todas as classes de moléculas. Por exemplo, os anticorpos podem distinguir entre dois determinantes lineares protéicos cuja única diferença é uma única substituição de um aminoácido conservado que tem pouco efeito na sua estrutura secundária. Como os constituintes bioquímicos dos organismos vivos são fundamentalmente semelhantes, é necessário que se haja esse alto grau de especificidade para que os anticorpos gerados em resposta aos抗ígenos de um microorganismo em geral não reajam com moléculas do hospedeiro estruturalmente semelhante ou com抗ígenos de outros microorganismos. (ABBAS, 2005)

A medida da força de ligação de um anticorpo para um epitopo monovalente chama-se afinidade. Anticorpos com alta afinidade se ligam a quantidades maiores de抗ígenos com uma melhor estabilidade em menos tempo do que os que apresentam afinidade baixa e são os preferíveis para técnicas imunológicas. (LIPMAN, 2005)

A força com que um anticorpo multivalente liga-se a um antígeno multivalente (epitopos múltiplos) é denominada de avidez. Enquanto a afinidade reflete sua energia de ligação um único epitopo, a avidez reflete a intensidade de todas as ligações entre anticorpos e um antígeno multivalente.

## 2.2.2 ANTICORPOS POLICLONAIS VERSUS ACM

Os anticorpos são gerados pelo sistema imune diante de um estímulo antigênico após infecção natural ou após imunização. Desta maneira há a produção de uma mistura de moléculas de diferentes especificidades e afinidades conhecidas como anticorpos policloniais (AcP). Os AcP detectam uma multiplicidade de epitopos e, portanto, reconhecem抗ígenos diferentes, fato importante em testes cuja multivalência é essencial (imunoprecipitação). Em adição, reagentes policloniais são relativamente simples e baratos de produzir quando comparados com reagentes monoclonais. Além disso, o uso de animais como cavalo, cabra e coelho permite a recuperação de grandes volumes de soro rico em imunoglobulinas. Contudo, existem diferenças na reatividade e títulos dos anticorpos, e sofrem geralmente de uma falta de reproduzibilidade, devido à heterogeneidade dos anticorpos (NELSON *et al.*, 2000).

Inicialmente, quando os AcM foram descobertos, acreditava-se que eles seriam superiores aos AcP em todas as situações e atualmente sugere-se que isto depende do uso dos anticorpos. AcM quando reagem cruzadamente, não podem ser removidos por adsorção, enquanto que em um soro polyclonal, cada diferente anticorpo tem distinta gama de reatividade, e em casos de reação cruzada, há a possibilidade de remoção por adsorção (BERZOFSKY *et al* 2003).

Os AcP são mais estáveis as variações de pH e concentração de sais enquanto os AcM podem ser altamente susceptíveis a pequenas alterações em ambas. A principais vantagens dos AcM são sua homogeneidade e consistência, e após a obtenção do hibridoma desejado, os AcM são gerados como uma fonte constante e renovável enquanto os AcP produzidos para um mesmo antígeno usando diversos animais apresentam diferenças entre animais imunizados, além disso a quantidade destes anticorpos obtidos é limitado pelo tamanho do animal e pelo seu tempo de vida (LIPMAN, 2005).

Atualmente, os reagentes sorológicos, em muitos casos, utilizam uma mistura de AcM, o que o torna melhor definido e com maior reproduzibilidade que um soro policlonal, podendo ainda ter vantagens com relação a especificidade (BERZOF SKY *et al* 2003).

### 2.2.3 APLICAÇÕES DOS ACM

A produção fácil e em grande quantidade dos AcM possibilitaram seu uso em muitos experimentos ou práticas antes impossíveis.

Cromatografia de afinidade pode ser usada como um passo na purificação de espécies moleculares que são de difícil purificação química (BERZOF SKY *et al* 2003). Purificação com colunas de AcM têm sido aplicadas com sucesso para antígenos do MHC (complexo de histocompatibilidade principal) (GOLDSBY *et al.*, 2002)

Anticorpos homogêneos podem ser cristalizados sozinhos ou junto com o antígeno para permitir o estudo estrutural por difração de raio-X, ou podem ser muito valorosos no estudo da diversidade dos anticorpos. Tais análises têm mostrado sobre os papéis das mutações somáticas, alterações na afinidade, e mudanças na dominância clonal durante as respostas (BERZOF SKY *et al* 2003).

Além disso, os AcM são muito úteis como reagentes imunobiológicos. Algumas das suas aplicações incluem:

- a) Atividade catalítica: AcM tem sido usados como catalisadores químicos, servindo como uma alternativa enzimática que pode ser produzida e manipulada facilmente, em alguns casos (LERNER *et al*, 1991).
- b) Anticorpos biespecíficos: Várias técnicas tem sido desenvolvidas para preparar anticorpos biespecíficos híbridos com uma larga utilidade, unidos a outros domínios funcionais, tais como toxinas, enzimas ou citocinas, criando assim anticorpos bifuncionais (KRIANKUM *et al*, 2001).
- c) Análise funcional de moléculas de superfície celular e de moléculas secretadas: na pesquisa imunológica, os AcM que se ligam a moléculas de superfície celular e estimulam ou

inibem funções celulares são instrumentos inestimáveis para definir as funções das moléculas de superfície, incluindo os receptores de antígenos (ABBAS *et al.*, 2002)

- d) Identificação de marcadores fenotípicos únicos para tipos celulares em particular: A base da classificação moderna dos linfócitos e de outros leucócitos é a ligação da população específica de AcM. Esses têm sido usados para definir “clusters de diferenciação” (marcadores CD) para os vários tipos celulares (NELSON *et al.*, 2000).
- e) Imunodiagnóstico: O diagnóstico de muitas doenças infecciosas e sistêmicas baseia-se na detecção de antígenos e/ou de anticorpos particulares na circulação ou nos tecidos (COOK; SELF, 1995).
- f) Diagnóstico e tratamento de tumores: A produção de AcM contra proteínas presentes na membrana de células tumorais, permite sua utilização para detectar a presença dessas células em um tecido ou órgão ou para eliminá-las (COLFOR; HALL, 1995)
- g) Outras aplicações clínicas: Os possíveis usos clínicos dos AcM são variados. Podem ser utilizados em RIA e ELISA para mensurar substâncias em fluidos biológicos, como hormônios e toxinas; AcM conjugados a toxinas tem sido usados na remoção de células T da medula óssea antes de transplantes e também tem sido usados em uma variedade de condições imunológicas, tais como artrite reumatóide, rejeição de transplantes e como reagentes anti trombolíticos (VALLERA *et al.*, 1983; GLENNIE; JOHNSON, 2000).

Existem limitações para o uso de determinados anticorpos, uma vez que muitos funcionam bem apenas sob determinadas condições de aplicação e de especificidade antigênica. Como exemplo, o sucesso na imunohistoquímica depende da preservação de epítópos reconhecidos pelos anticorpos, o que algumas vezes só é possível com tecidos criopreservados. Esta necessidade de preservação dos determinantes antigênicos pode limitar o uso desses anticorpos na rotina diagnóstica, onde frequentemente o material é preservado em formalina e embebido em parafina o que pode ainda impossibilitar estudos retrospectivos com material de arquivos de anatomia patológica. A antigenicidade de muitas proteínas é reduzida ou perdida pelas fixações com formaldeído, que muda a estrutura bioquímica dos antígenos, tornando-os não identificáveis pelos AcM (SHI *et al.*, 1995)

### **3- OBJETIVOS**

#### **3.1 OBJETIVO GERAL**

Analisar as características de AcM para o Vírus da Artrite Encefalite Caprina (CAEV).

#### **3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

- Identificar a classe e quantificar as Ig presentes no líquido ascítico;
- Avaliar a especificidade e sensibilidade na detecção do antígeno viral;
- Determinar a reatividade contra os polipeptídeos virais;
- Estudar as características do epítopo reconhecido;
- Avaliar reação cruzada para proteínas de HIV-1 e HIV-2

## 4- MATERIAIS E MÉTODOS

### 4.1 ANTICORPOS MONOCLONAL (AcM)

Neste trabalho foram avaliados 06 (seis) AcM (F12, A9, B9, C7, G7 e H9) produzidos anteriormente no Laboratório de Virologia, ICS-UFBA (CAMPOS *et al* 2007; SARDI, *et al* 2006), e estocados sob a forma de líquido ascítico.

#### 4.1.1 ISOTIPIFICAÇÃO

Para determinar a classe de imunoglobulina dos AcM, utilizou-se um kit comercial (Bio Rad Catalog 172-2055), baseado na técnica de ELISA indireto.

#### 4.1.2 DETERMINAÇÃO DA INTEGRIDADE DAS IG PRESENTES NO LÍQUIDO ASCÍTICO.

Os AcM foram submetidas à eletroforese em condições desnaturantes e não desnaturantes pela técnica de SDS-PAGE (LAEMMLI, 1970) em um gel de poliacrilamida 10%. As amostras foram diluídas em tampão desnaturante ou não desnaturante de Laemmli e a corrida eletroforética das Ig se realizou durante 2,5 horas a 100 volts. Os pesos moleculares foram calculados usando-se o RF (Distância em centímetros de migração da proteína a partir do gel de corrida / distância da migração do corante *Coomassie blue* a partir do gel de corrida) segundo o padrão de peso molecular: Fosforilase B (97,4 kDa), Albumina Sérica Bovina (66 kDa), Anidrase Carbônica (29 kDa), Inibidor de Tripisina de Soja (20,1kDa) e  $\alpha$ -Lactalbumina (14,2 kDa) (AMERSHAM PHARMACIA BIOTECH).

#### 4.1.3. TITULAÇÃO DAS IgG PRESENTES NO LÍQUIDO ASCÍTICO: ELISA DIRETO

Microplacas de poliestireno de fundo chato (NUNC) foram sensibilizadas com diluições seriadas dos AcM (de 1:500 até 1:1600000) em PBS-Leite 0,5%, em tampão carbonato-bicarbonato ( $\text{Na}_2\text{CO}_3$  1,7g/l,  $\text{NaHCO}_3$  2,86g/l) 0,05M pH 9,6, e então, incubada por toda a noite a 4°C. Após 16 a 18 h, lavou-se 3 vezes com PBS-T 0,05% e se seguiu o bloqueio da placa com solução de PBS-leite a 5% durante 1 hora a 37°C. Após esse período, foi acrescentado anticorpo anti-IgG de camudongo (SIGMA) conjugado à peroxidase 1:5000 diluído em PBS-Leite 0,5%. A microplaca foi incubada por 1h a 37°C e lavou-se 3 vezes com PBS-T 0,05% e 1 vez com PBS. A reação foi revelada com uma solução de 3,3', 5,5'-Tetramethylbenzidine (TMB) (SIGMA CHEMICAL CO) na presença de peróxido de hidrogênio (10ml/3 $\mu$ l) e após 30 minutos, adicionou-se a solução stop (Ácido Fluorídrico 0,125%) para a leitura em espectrofotômetro (Microplate Reader BIO-RAD Model 550) com filtro de 630nm de comprimento de luz.

#### 4.1.4 IMUNODUFUSÃO EM GEL DE AGAROSE (IDGA): ATIVIDADE MONOVALENTE

O teste sorológico de IDGA foi realizado com um “kit” de uso comercial (“Biovetech”) seguindo-se as orientações do fabricante. Este teste utiliza um antígeno específico do CAEV que é a proteína do capsídeo (p28). A primeira leitura foi feita às 24 horas, e após 48 horas realizou-se a leitura confirmatória. A interpretação dos resultados foi realizada verificando a presença ou ausência de linhas de precipitação entre os AcM e o antígeno na agarose

## 4.2. DETECÇÃO DO ANTÍGENO VIRAL

### 4.2.1 CULTIVOS CELULARES

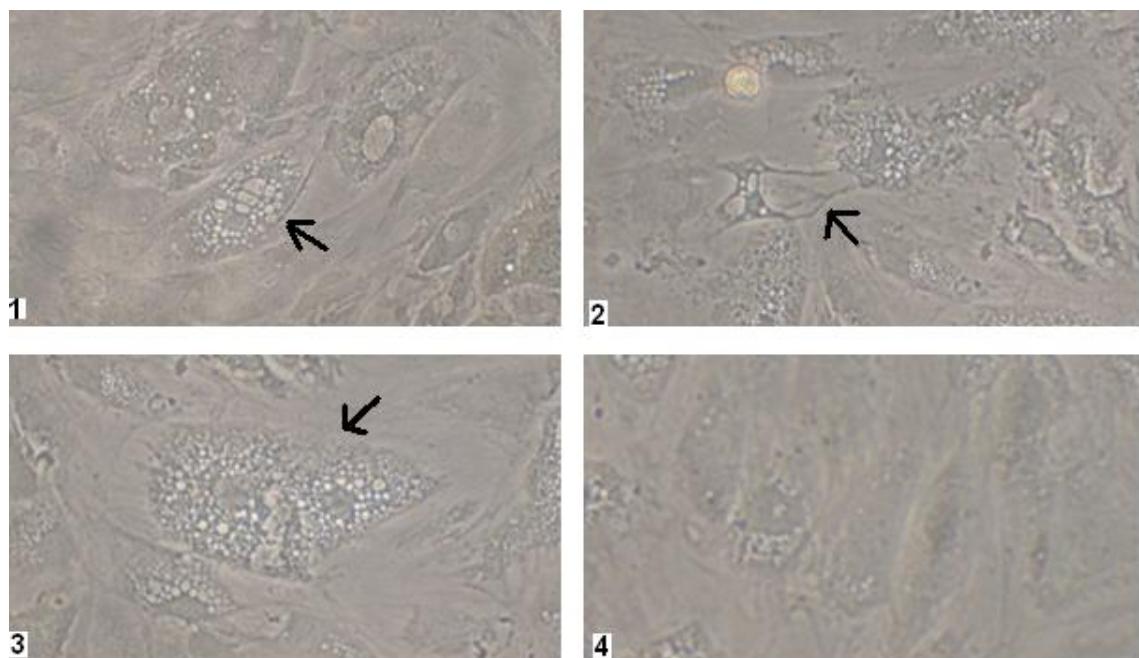
Os cultivos primários de membrana sinovial de cabra (MSC), utilizadas para replicação viral, foram obtidas segundo o descrito por Abreu et al.(1998). Após 15 a 20 dias de incubação, os explantes foram tripsinizados (Tripsina 1:250 GIBCO) e subcultivados para a obtenção de monocamadas celulares.

### 4.2.2 PRODUÇÃO DO VÍRUS

Neste trabalho foi utilizada a cepa DECENTE, isolada no Laboratório de Virologia, ICS-UFBA (TIGRE, *et al.* 2003)

Logo após o período de adsorção viral (1h a 37°C, MOI 1) a monocamada de MSC infectada foi incubada a 37°C com Meio MEM- D e 2% de SFB a 37°C até o aparecimento do efeito citopático viral, geralmente 10 a 15 dias (Figura 4). Posteriormente, as garrafas foram submetidas a dois ciclos de congelamento (-20°C) e descongelamento, e o sobrenadante e as células infectadas foram centrifugados a 10000g, durante 30 minutos a 4°C. O sobrenadante foi coletado e armazenado (-20°C) para a concentração viral. O precipitado celular foi ressuspensão em Salina Tamponada com Fosfato (PBS) (137 mM NaCl; 10mM fosfato; 2,7mM KCl; pH 7,4) e armazenado (-20 °C) para posterior utilização.

O título infeccioso foi de  $10^{4,5}$  DICT<sub>50</sub>/ml (Dose Infecciosa em Cultivo de Tecidos) (REED; MUENCH, 1938)



**Figura 4. Efeito citopático do CAEV em MSC:** Células de MSC infectadas (1, 2, 3). As setas indicam, respectivamente, a vacuolização citoplasmática, formação de “pontes” intracelulares e fusão celular induzida pelo vírus. Células de MSC não infectadas (4).

#### 4.2.2.1. CONCENTRAÇÃO DO VÍRUS

O sobrenadante do vírus, obtido segundo o item 4.2, foi submetido a concentração com Polietilenoglicol 8000, segundo o protocolo de Fontes et al, (2005). A concentração protéica foi avaliada utilizando um kit comercial baseado no método de Lowry (BIORAD) seguindo as indicações do fabricante. De acordo com esse método, foi obtida a concentração protéica de 1,0 mg/ml.

#### 4.2.3 IMUNOFLUORESCÊNCIA INDIRETA (IFI)

Lamínulas com células de MSC, cultivadas em tubos, foram infectadas com o CAEV (Materiais e métodos 4.2.1) e incubadas por 1:30h a 37°C para adsorção viral. Posteriormente acrescentamos meio MEM-D contendo 2% de Soro Fetal Bovino e incubou-se a 37°C. As lamínulas com células infectadas, foram retiradas da estufa após 10 dias, fixadas em acetona por 10min a -20°C e incubadas com o líquido ascítico dos AcM e, como controle positivo, o AcP (soro hiperimune de coelho) 1:50 (v/v PBS). Incubou-se por toda a noite a 4°C, lavou-se 3 vezes com PBS (10 min cada lavado) e adicionou-se anticorpo anti- IgG de camundongo 1/20 e anticorpo anti-IgG de coelho 1/100 marcado com FITC. Após 1h de incubação a 37°C repetiu-se as lavagens. As lamínulas foram montadas em lâminas com glicerina, observadas em microscópio de fluorescência e fotografadas

#### 4.2.4 DOT-BLOT

A sensibilidade dos AcM na detecção do CAEV, foi determinada através de *Dot-blot*. Células infectadas (Materiais e métodos 4.2.1) em diluições seriadas (1/10, 1/20, 1/40/ 1/80) foram adicionadas a uma membrana de nitrocelulose (Scheir & Schuell 0,45µm) com auxílio do filtro de multi-dot. Cortou-se a membrana longitudinalmente, em fitas com aproximadamente 5 mm de largura, e bloqueou-se com uma solução de PBS com 5% de leite em pó desnatado

(PBS-Leite 5%) por 1 h a temperatura ambiente, para evitar sítios livres de reação. Em seguida, colocou-se as fitas em sacos plásticos selados, adicionou-se individualmente o líquido ascítico dos AcM 1:5 (v/v em PBS-Leite 0,5%), e incubou-se por toda noite a temperatura ambiente. No dia seguinte, lavou-se as fitas 3 vezes com (PBS-T 0,05%) (10 min cada lavado) e adicionou-se anticorpo anti-IgG de camundongo 1:1000 (v/v PBS) marcado com peroxidase (SIGMA CHEMICAL CO). Após incubação por 1h a 37°C, lavou-se como citado anteriormente e mais uma vez com PBS. A revelação foi realizada com uma solução de 3,3'- Diaminobenzidina (DAB) (SIGMA CHEMICAL CO) em PBS (10mg/10ml) na presença de 0,015 % de peróxido de hidrogênio 30 vol. A reação foi interrompida com sucessivas lavagens com água destilada e as fitas foram secas e fotografadas.

#### 4.2.5 WESTERN-BLOT

A reatividade dos AcM com polipeptídeos virais foi determinada através de *Western-blot*. A corrida eletroforética das proteínas do Vírus purificado (VP) e do antígeno Viral (AgV) se realizou durante 2,5 horas a 80 volts em gel de poloacrilamida (SDS-PAGE) com gradiente de 5-15%. Em seguida as proteínas foram eletrotransferidas a uma membrana de nitrocelulose (AMERSHAM PHARMACIA BIOTHEC 0,45µm) segundo o método de Burnett (1981), utilizando uma cuba de transferência com buffer Glicina 192 mM, Tris 25 mM e Metanol 20%, a 100 volts durante 1 hora. A verificação da eletrotransferência das proteínas se realizou com a técnica de coloração de vermelho de Ponceau 10%. Uma vez constatada a transferência, as tiras de membrana de nitrocelulose foram bloqueadas com uma solução de leite em pó desnatado (NESTLÉ) 5% em PBS (PBS-leite a 5%) durante 1:30 hora para evitar sítios livres de reação. Posteriormente as fitas foram incubadas, individualmente, com os diferentes AcM (1:10 em PBS-Leite 0,5%), durante toda a noite a temperatura ambiente. Ao fim deste tempo, foram lavadas 3 vezes com PBS-T 0,05% (10 minutos cada lavado) e incubadas durante 1 hora a 37°C, com um anticorpo anti-IgG de camundongo conjugado à peroxidase 1:500 (v/v, PBS) (SIGMA CHEMICAL CO). Em seguida, foram feitas novas lavagens com PBS-T 0,05% e 1 lavagem final com PBS. A revelação foi feita com uma solução com 3'3' Diaminobenzidine (DAB) na presença de peróxido de hidrogênio (0,001%).

A reação foi interrompida com sucessivas lavagens com água destilada e as membranas foram secas e fotografadas.

#### 4.2.6 REATIVIDADE DOS AcM APÓS DIFERENTES TRATAMENTOS DO ANTÍGENO VIRAL

##### 4.2.6.1 Tratamento do antígeno viral

###### a) SDS

O antígeno viral foi tratado com solução 10% de Dodecil Sulfato de Sódio (SDS) a uma concentração final de 0,1% (v/v) (0,28M). Após 10 min e homogeneizações freqüentes, o material foi centrifugado por 15 min a 10000 rpm e o sobrenadante resultante foi conservado a -70° C até ser utilizado (TORRES, *et al.*, 2009; SIMARD, 2001).

###### b) $\beta$ -ME

O antígeno viral foi tratado com  $\beta$ -mercaptoetanol ( $\beta$  -ME) a uma concentração final de 1,2% (v/v). Após breve homogeneização, o material foi incubado a 37°C por 45 min e conservado a -70° C até ser utilizado (ABASS, *et al* 2006; HARITH, *et al*, 1995)

##### 4.2.6.2 Padrão eletroforético das proteínas virais

As amostras de VP (Materiais e métodos 4.2.1), controle (MSC) (Materiais e métodos 4.1), AgV (Materiais e métodos 4.2), o antígeno tratado com SDS (AgV-SDS) e o antígeno viral tratado com  $\beta$ -ME (AgV-  $\beta$  -ME) (Materiais e métodos 4.3.6.1), foram submetidas à eletroforese pela técnica de SDS-PAGE (LAEMMLI, 1970) em um gel de gradiente 5-15%. Inicialmente as amostras em tampão desnaturante de Laemmli foram levadas a 100°C durante 3 minutos e a corrida eletroforética das proteínas virais se realizou durante 2 horas a 100

volts. Foram colocados aproximadamente 15 µg de proteína viral por poço e usou-se como padrão de peso molecular: Fosforilase B (97,4 kDa), Albumina Sérica Bovina (66 kDa), Anidrase Carbônica (29 kDa), Inibidor de Tripisina de Soja (20,1kDa) e  $\alpha$ -Lactalbumina (14,2 kDa) (AMERSHAM PHARMACIA BIOTECH). Os pesos moleculares das proteínas virais foram calculados usando-se o RF.

#### 4.2.6.3 Western-Blot

A corrida eletroforética das proteínas virais (AgV, AgV-SDS, AgV-  $\beta$ -ME) e a electrotransferência se realizou segundo descrito em materiais e métodos 4.3.6.2. Uma vez constatada a transferência, as tiras de membrana de nitrocelulose foram bloqueadas com PBS-leite a 5% durante 1:30 hora a temperatura ambiente para evitar sítios livres de reação. Posteriormente as fitas foram incubadas, individualmente, com os AcM (1:10 em PBS-Leite 0,5%), o AcP (1:50 em PBS-Leite 0,5%), e com o soro de um caprino positivo para CAEV e com artrite (SC) (1:10 em PBS-Leite 0,5%), durante toda a noite a temperatura ambiente. Ao fim deste tempo, foram lavadas 3 vezes com PBS-T 0,05% (10 minutos cada lavado) e incubadas durante 1 hora a 37°C com um anticorpo anti-IgG de camundongo (1:500), anticorpo anti-IgG de coelho (1:700) e anticorpo anti-IgG de cabra (1:500), conjugados à peroxidase. Em seguida, foram feitas novas lavagens com PBS-T 0,05% e 1 lavagem final com PBS. A revelação foi feita com uma solução com o substrato DAB e peróxido de hidrogênio (0,001%). A reação foi interrompida com sucessivas lavagens com água destilada e as membranas foram secas e fotografadas.

#### 4.2.6.4 ELISA Indireto

O teste de ELISA Indireto utilizado foi descrito previamente por Torres *et al.* (2008). As placas de poliestireno de 96 poços (NUNC-MAXISORP TM) foi sensibilizada com o AgV, AgV-SDS e AgV-  $\beta$  -ME, na concentração protéica de 3,0 µg/100 µl (poço) em tampão carbonato-bicarbonato pH 9,6. A placa foi incubada toda a noite a 4°C. Passado esse período,

os poços foram lavados 5 vezes com uma solução de PBS-T 0,05%. Posteriormente foi adicionada uma solução de PBS-leite a 5% durante 1:30 hora a temperatura ambiente para o bloqueio de sítios livres reativos. Em seguida foram adicionados os AcM e os AcP em diluições seriadas (1:10, 1:40, 1:80, 1:160, 1:800, 1:1600, 1:3200 em solução de PBS-leite + 0,3% Tween 20), e a placa foi incubada toda a noite a 4°C. Passado esse período, a placa foi lavada como citado anteriormente e incubadas novamente durante 1h a 37°C, com anticorpo anti-IgG de camundongo e anticorpo anti-IgG de coelho marcado com peroxidase (SIGMA), na diluição de 1: 5000 e 1:10000, respectivamente, em PBS-leite + 0,3% Tween 20. A placa foi lavada como mencionado anteriormente. A revelação da reação foi feita com o substrato de TMB em presença de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (10ml/3μl) e após 30 min foi utilizado o ácido fluorídrico 0,125% para parar a reação e realizada a leitura da densidade óptica a 630nm.

#### 4.2.7 REAÇÃO CRUZADA COM RETROVIRUS HIV-1 E HIV-2

O teste de Western-Blot para observação de reação cruzada com HIV foi realizado com um “kit” de uso comercial Hangzhou Ausia Diagnostics (“AUSIA”) seguindo-se as orientações do fabricante. Este teste utiliza antígenos virais específicos do HIV-1 (gp160, gp120, p66, p55, p51, gp41, p31, p24, p17 ), separados por SDS-PAGE seguido de eletrotransferência, e combinados com um peptídeo sintético de HIV-2 (gp36). As tiras de nitrocelulose foram incubadas, individualmente, com os AcM (1:10) durante toda a noite a temperatura ambiente e ao fim deste tempo, foram lavadas e incubadas com um anticorpo anti-IgG de camundongo (1:500). Em seguida, foram feitas novas lavagens e a revelação foi feita com uma solução com o substrato DAB na presença de peróxido de hidrogênio (0,001%). A reação foi interrompida com sucessivas lavagens com água destilada.

#### 4.2.8 ANÁLISE ESTATÍSTICA

As análises estatísticas foram feitas utilizando SPSS Package Social Science, V.16.0, utilizando o teste não paramétrico de Mann-Whithney.

## 5.RESULTADOS

### 5.1 CARACTERIZAÇÃO IMUNOQUÍMICA DOS ACM

#### 5.1.1 CARACTERÍSTICAS DAS IMUNOGLOBULINAS (IG) PRESENTES NOS ACM

No Quadro 1, apresenta-se os resultados obtidos na isotipificação das Ig. Observou-se a presença de apenas uma classe de imunoglobulina, IgG1 e cadeias leves do tipo κ.

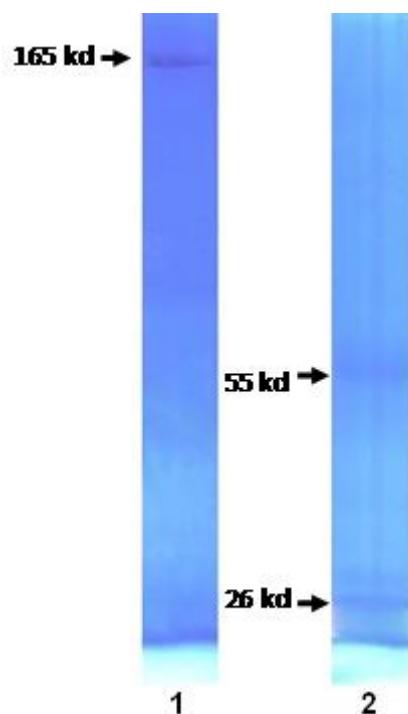
**Quadro 1:** *Isotipificação dos AcM.*

AcM	Isotipo	Tipo de Cadeia Leve
F12	IgG1	κ
C7	IgG1	κ
B9	IgG1	κ
H9	IgG1	κ
G7	IgG1	κ
A9	IgG1	κ

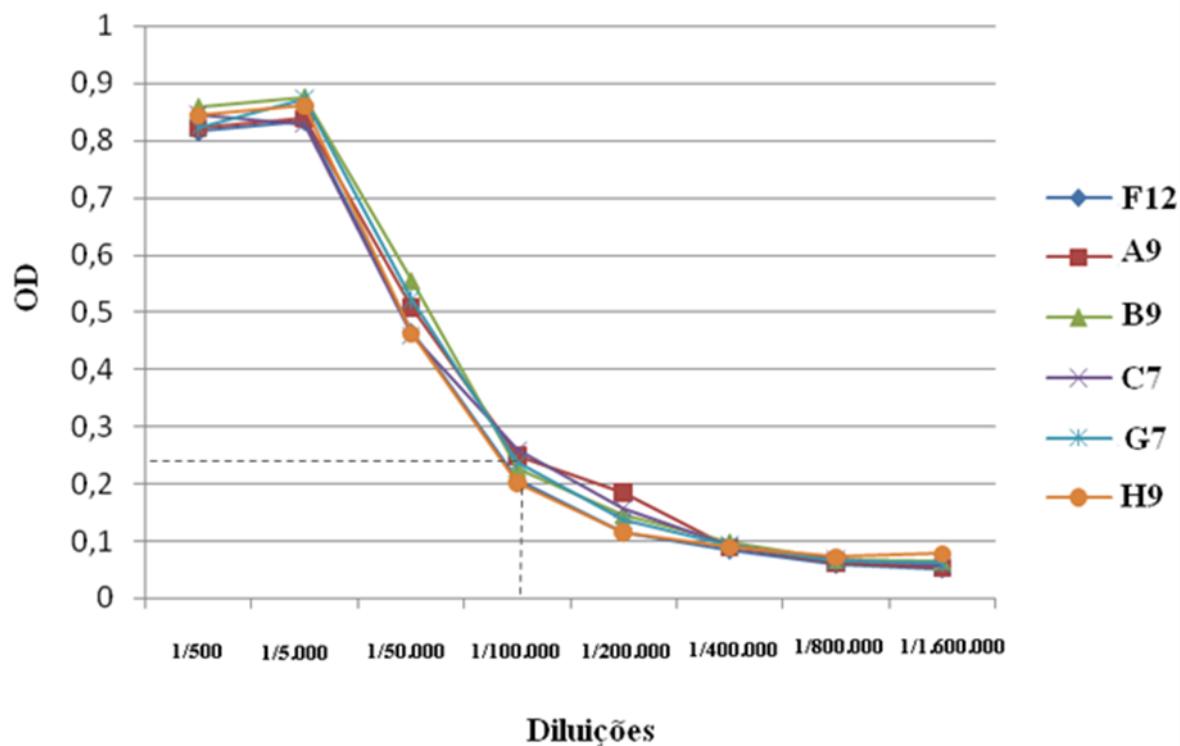
As Ig dos AcM submetidas a SDS-Page em condições não desnaturantes apresentaram o perfil eletroforético de uma única proteína de aproximadamente 165 Kd, condizente com o peso molecular (PM) da IgG íntegra, enquanto que em condições desnaturantes mostraram duas proteínas, de 26Kd e 55Kd correspondendo as cadeias leves e pesadas, respectivamente (Figura 5).

A quantificação destas IgG foi realizada pelo método do ELISA Direto, o qual mostrou que todos os AcM possuíam títulos de até 1:100.000 (ponto de inflexão da curva dose/resposta) (Figura 6), um valor esperado considerando que provém do líquido ascítico.

A atividade precipitante das Ig dos AcM foi analisada pela técnica de IDGA. Neste caso, a união antígeno-anticorpo não formou um complexo de precipitação visível a olho nu (linha de precipitação), comum em reações de imunoprecipitação, como aconteceu com o AcP de atividade multivalente (dado não mostrado).



**Figura 5: Perfil eletroforético das IgG dos AcM em SDS-PAGE 10%.** (1) AcM em condições não desnaturantes e (2) em condições desnaturantes. As setas indicam os PM da Ig íntegra (1) e das cadeias pesadas e leves (2).



**Figura 6: Titulação das IgG presentes nos AcM.** Todos os AcM tiveram um título de até 1:100.000. A linha pontilhada indica o ponto de inflexão da curva dose/resposta.

### 5.1.2 IFI: REATIVIDADE PARA O ANTÍGENO VIRAL

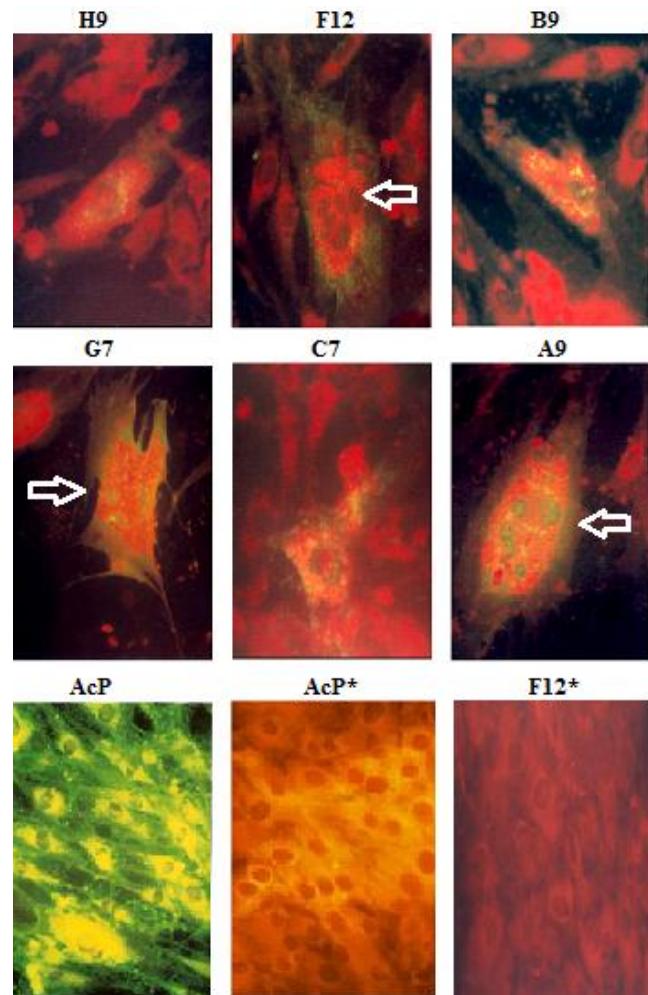
Todos os AcM (F12, A9, C7, G7, H9 e B9) demonstraram um menor sinal de fluorescência para os抗ígenos virais presentes nas células de MSC infectadas, com uma fraca fluorescência citoplasmática, comparado com o anticorpo policlonal (AcP), que teve uma resposta melhor, com uma forte fluorescência citoplasmática (Figura 7).

### 5.1.3 DOT-BLOT: SENSIBILIDADE NA DETECÇÃO DE ANTÍGENO VIRAL

Na técnica de Dot-Blot, observou-se que os AcM A9, H9, G7, C7 e B9 detectaram o抗ígeno viral de CAEV numa concentração de até 2,675 μg de proteínas totais, enquanto que o AcM F12 teve uma sensibilidade menor detectando uma concentração de até 5,35 μg de proteínas (Figura 8).

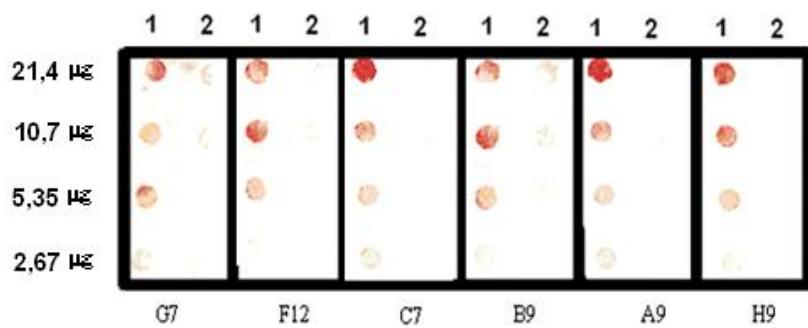
### 5.1.4 WESTERN-BLOT

A reatividade dos AcM com polipeptídeos virais foi determinada pela técnica de Western-blot e utilizou dois substratos virais: VP e AgV (Figura 9). Todos os AcM reconheceram epítópos de proteínas virais em condições desnaturantes. Com o VP, todos os AcM reagiram fortemente com a p28 (capsideo) e de forma fraca com o Pr 36<sup>gag</sup>. Com o AgV, os AcM reagiram fortemente com a p28, e com os Pr 36<sup>gag</sup>, Pr 44<sup>gag</sup>, e Pr 53<sup>gag</sup>, precursores protéicos de proteínas da cápside, considerando a origem celular do material.

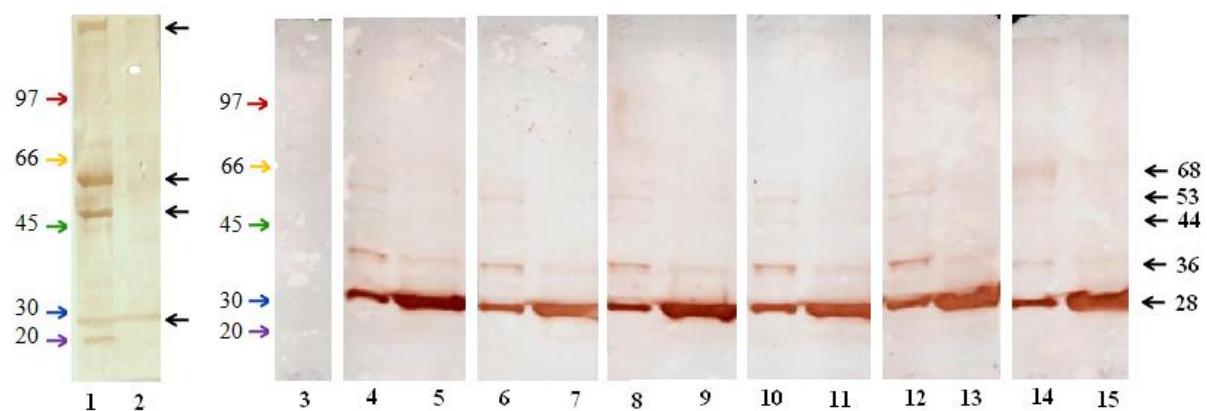


**Figura 7: Imunofluorescência Indireta (IFI).** MSC infectadas com CAEV incubadas com os AcM (H9, F12, B9, G7, C7 e A9) e com o AcP. Nas imagens, as setas indicam a fusão celular induzida pelo CAEV nas células.

\* Controle (MSC)



**Figura 8: Dot-blot.** Sensibilidade dos AcM na detecção do (1) AgV e (2) controle celular (MSC). Na margem esquerda, estão relacionados as concentrações protéicas (segundo Lowry) utilizadas para o ensaio.



**Figura 9: Identificação de polipeptídeos do CAEV pelos AcM analisados por Western Blot.**

Reatividade dos AcM com (1) AgV; (2) VP; (3) controle (MSC). Reatividade dos AcP. As setas a direita indicam o PM das proteínas do vírus reconhecidas pelos AcM.

## 2.ALTERAÇÕES NO EPÍTOPO DE RECONHECIMENTO DOS AcM

### 5.2.1 PADRÃO ELETROFORÉTICO DAS PROTEÍNAS VIRAIS

Na figura 10 observa-se o padrão eletroforético por SDS-PAGE das proteínas virais de CAEV. O VP mostra um padrão eletroforético de proteínas com PM aproximados entre 97 e 38 Kd, com destaque para o grupo de proteínas p28, Pr36<sup>gag</sup>, Pr44<sup>gag</sup>, Pr53<sup>gag</sup>. O AgV tem um perfil similar a este padrão, diferente do que foi observado no controle (MSC). Por outro lado, ao analisar o padrão eletroforético do AgV, e do antígeno após os tratamentos realizados com o SDS 0,1% (AgV-SDS) e com β-ME 1,2% (AgV- β -ME) (Linhas 2, 3 e 4), não há alteração no perfil protéico do vírus. A exceção ocorre com a p28, que não é visualizada após o tratamento com o β-ME.

### 5.2.2 WESTERN-BLOT

Os AcM foram avaliados após o antígeno viral sofrer diferentes tratamentos através da técnica de Western-blot (figura 11). No quadro 2 pode-se observar estas diferenças. Os AcM com o AgV reagiram com as proteínas p28, Pr36<sup>gag</sup>, Pr44<sup>gag</sup>, Pr53<sup>gag</sup>, mas também reagiram com a p22. Da mesma forma, quando com o AgV-SDS, os AcM reagiram com as proteínas p22, p28, Pr36<sup>gag</sup>, Pr53<sup>gag</sup> e fracamente com a Pr44<sup>gag</sup>. Quando os AcM foram enfrentados AgV- β-ME, estes reagiram com as proteínas p28, Pr44<sup>gag</sup> e fracamente com a Pr53<sup>gag</sup>, demonstrando menor reatividade após os tratamentos, principalmente com o β-ME. Quando o AcP foi incubado com o AgV e AgV-SDS, não foram observadas diferenças entre o reconhecimento das proteínas Pr53<sup>gag</sup>, Pr44<sup>gag</sup>, Pr36<sup>gag</sup> e p28. Na figura 11, observa-se o resultado do soro de um animal naturalmente infectado (SC), enfrentado com AgV, onde mostra-se a reatividade com a p28, Pr36<sup>gag</sup>, Pr44<sup>gag</sup>, e gp97 (glicoproteína TM). O tratamento com SDS modifica o perfil da resposta, havendo reação para gp97 e p28.

**Quadro 2: Reatividade dos AcM após alterações no epítopo de reconhecimento.**

AcM			
PROTEÍNA	AgV	AgV-SDS	AgV- $\beta$ -ME
p22	+	+	+
p28	+	+	+
pr36 <sup>GAG</sup>	+	+	-
pr44 <sup>AG</sup>	+	+/-	+
pr53 <sup>AG</sup>	+	+	+/-

Os resultados foram expressos como:

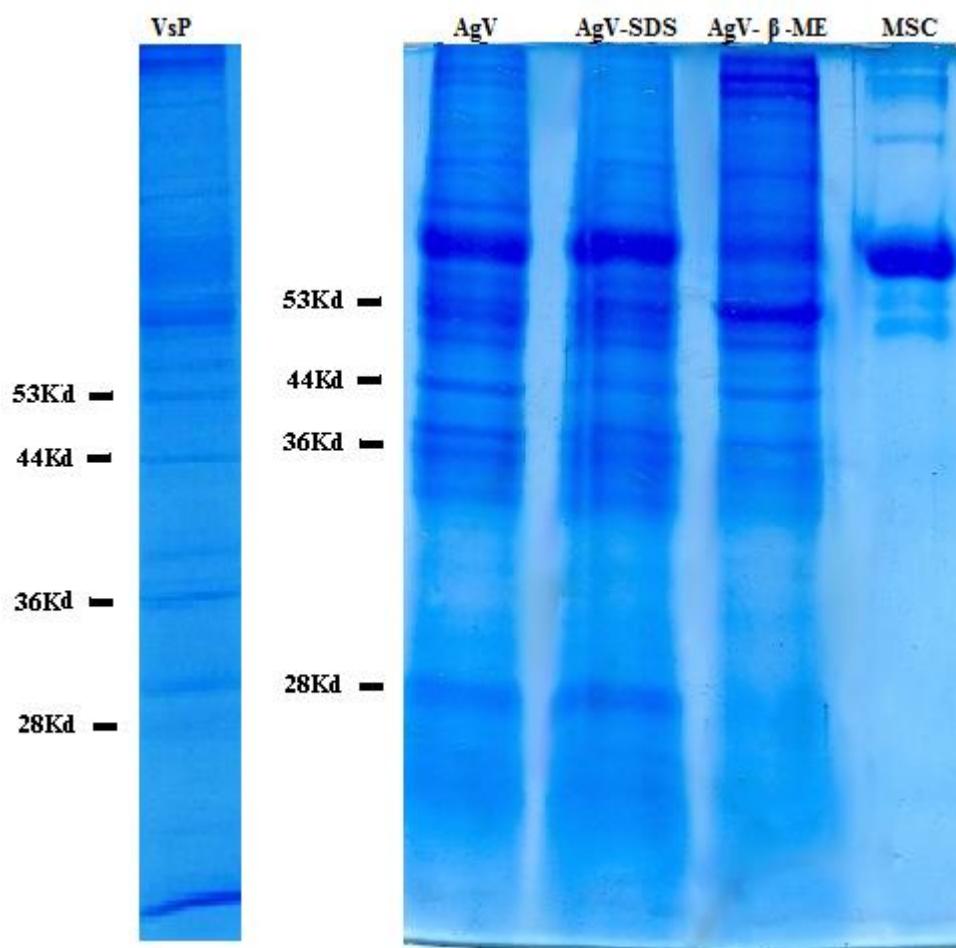
- (+) Forte reatividade;
- (+/-) Baixa reatividade;
- (-) Ausência de reatividade.

### 5.2.3 ELISA INDIRETO

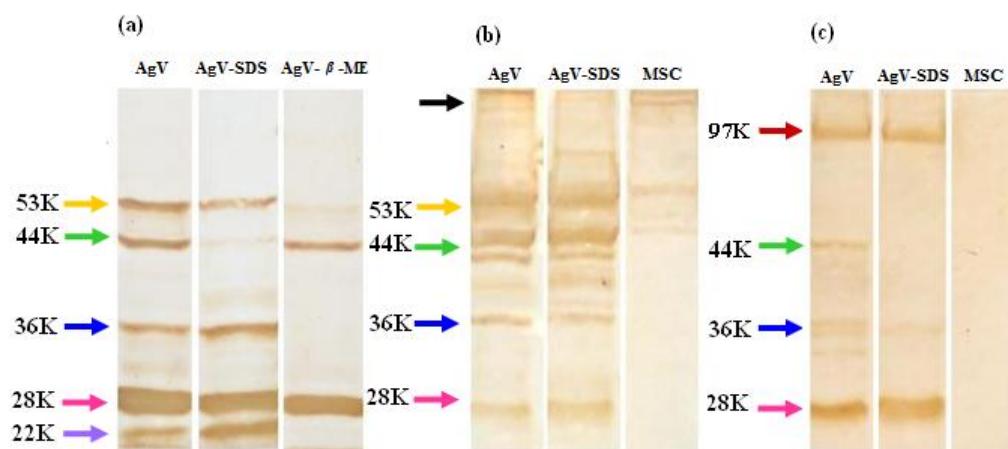
A reatividade dos AcM, com o antígeno viral após sofrer diferentes tratamentos, foi determinada através da técnica de ELISA Indireto. Observou-se uma redução estatisticamente significativa na reatividade dos AcM F12, A9, C7, B9 e H9 quando enfrentados com AgV-SDS e com o AgV-  $\beta$ -ME ( $p < 0,05$ ). Quando comparado aos outros AcM, o G7 sofre uma redução de reatividade não significativa quando enfrentado com o AgV-SDS ( $p > 0,05$ ). Após os tratamentos com o SDS e com o  $\beta$ -ME, todos AcM tiveram títulos de até 1:800 (ponto de inflexão da curva dose/resposta). Quando o AcP é testado, não há grande redução no reconhecimento do AgV e do AgV-SDS ( $p > 0,05$ ). Entretanto, quando o AcP é enfrentado com o AgV-  $\beta$ -ME, o reconhecimento é afetado de forma significativa ( $p < 0,05$ ) (Figura 12).

### 5.3. REAÇÃO CRUZADA COM HIV-1 E HIV-2

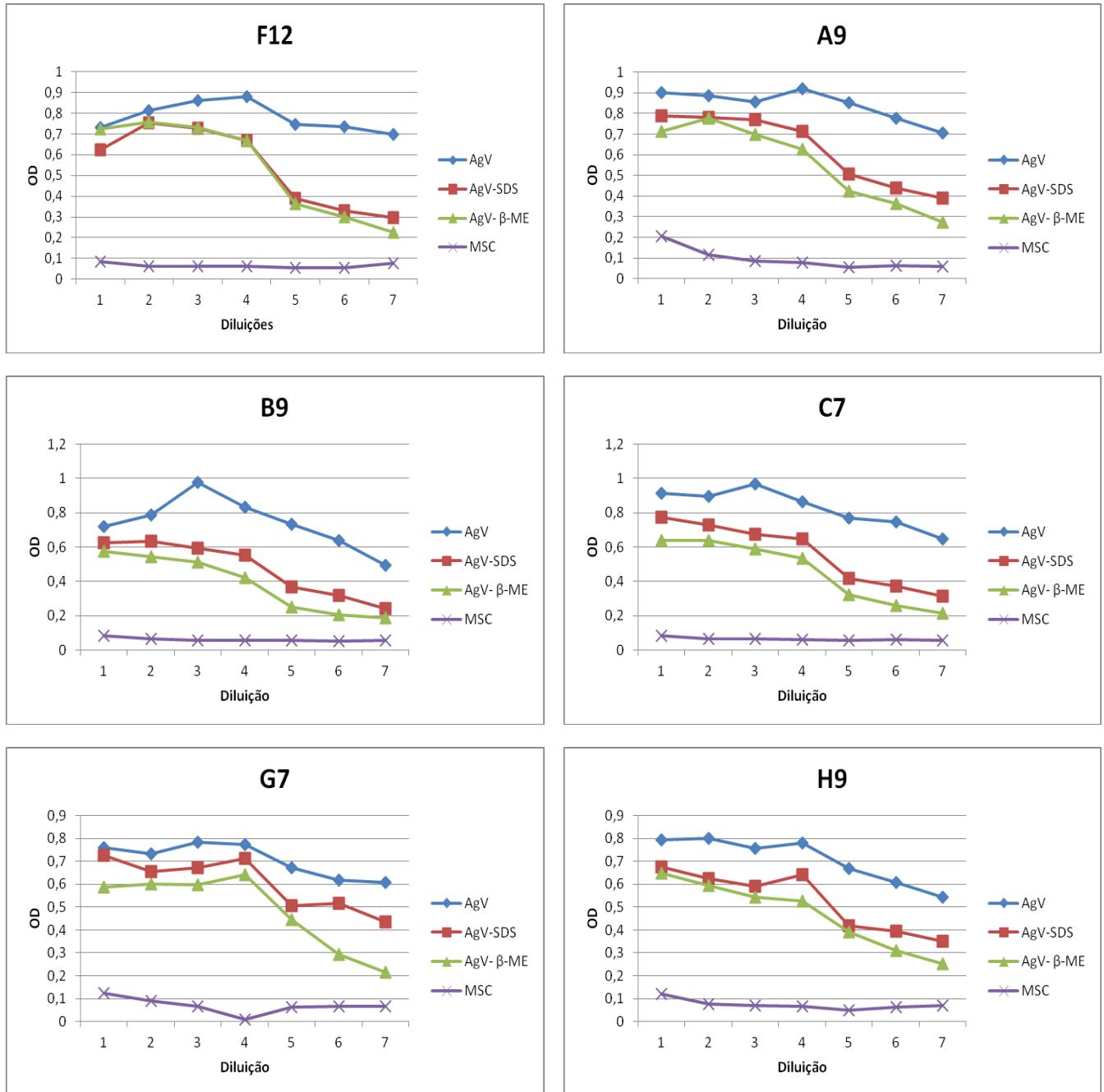
Quando os AcM foram testados através da técnica de Western-blot (Kit comercial) para observar a presença de reação cruzada com proteínas de HIV-1 e HIV-2, nenhuma reatividade foi observada, enquanto que, com o AcP, verificou-se o aparecimento de uma banda discreta de 66Kd que, segundo a interpretação indicada pelo fabricante do kit, é referente a TR do vírus ( dado não mostrado).



**Figura 10:** Perfil eletroforético das proteínas do CAEV: SDS PAGE. Eletroforese em gel de poliacrilamida em gradiente (5 -15%). Nas margens esquerdas estão relacionados os PM das proteínas virais.



**Figura 11:** *Western-blots: Reatividade de AcM com polipeptídeos do CAEV após tratamentos que afetam a estrutura protéica.* (A) AcM (F12); (B) AcP e (C) Soro Caprino.



**Figura 12:** Determinação da reatividade dos AcM após tratamentos que afetam a estrutura protéica: ELISA Indireto. Os AcM foram diluídos (1) 1:10, (2) 1:40, (3) 1:80, (4) 1:160, (5) 1:800, (6) 1:1600, (7) 1:3200 e enfrentados com o AgV, AgV- SDS, AgV- β-ME .

\* p<0,05

\*\* p>0,05

## 6. DISCUSSÃO

Após Köhler e Milstein desenvolverem a tecnologia da produção dos AcM (KÖHLER; MILSTEIN, 1975), estes rapidamente se tornaram uma das ferramentas chaves da imunologia (COLFOR; HALL, 1995; COOK; SELF, 1995). Neste estudo, AcM para CAEV foram avaliados quanto as suas características imunológicas e reatividade para a p28.

Os AcM analisados revelaram a presença de um tipo específico de imunoglobulina: IgG1 com cadeia leve  $\kappa$ . A presença de apenas anticorpos de classe IgG, deve-se possivelmente as repetidas imunizações, já que na resposta imune, inicialmente, há apenas a geração de resposta caracterizada por uma expansão clonal relativamente limitada, com anticorpos IgM e sem desenvolvimento de memória. Entretanto, a reexposição ao mesmo antígeno leva a indução de células B de memória e consequente mudança de classe de Ig (de IgM para IgG, IgA ou IgE) (resposta imune secundária). (LADYMAN; RITTER, 1995).

AcM são muito utilizados pela sua especificidade para o epítopo a ser reconhecido, porém, isto pode ser uma desvantagem em alguns ensaios. A sensibilidade depende, em parte, do espectro de epitopos que o antígeno expõe e da formação de um complexo antígeno-anticorpo estável. Esta estabilidade é aumentada se o anticorpo é multivalente permitindo reações entrecruzadas com a formação de complexos maiores. Um ensaio que depende desta multivalência com formação dos complexos precipitantes é a imunodifusão (MARGNI *et al*, 1996; PARKER, 1976). Neste caso a utilização do teste colocou em evidência uma característica do AcM: a monovalência, já que não houve a formação de complexo antígeno anticorpo precipitante visível, com uma linha de precipitação observada na agarose.

A monoespecificidade dos AcM é de grande valor quando estes são enfrentados com uma diversidade de proteínas, como ocorre com os substratos celulares. A especificidade da detecção da proteína viral foi observada usando células de MSC infectadas, através da Imunofluorescência Indireta. Provavelmente o reconhecimento por estes AcM de uma única proteína viral: a p28, possa justificar a baixa reatividade. A p28 é inicialmente produzida na forma de precursores intracelulares que, no momento do brotamento e maturação viral são clivados, dando origem ao capsídeo viral, localizado entre o nucleocapsídeo e as proteínas da matriz viral (NARAYAN *et al.*, 1997; GOFF, 2006; MURPHY *et al.*, 1999). A localização e

processamento intracelular da p28, sem exposição em superfície, poderia justificar a menor reatividade dos mesmos nesta técnica.

Ao melhorar a exposição dos epítópos protéicos, contribui-se para melhorar o reconhecimento antigênico. As proteínas ao adotar uma conformação secundária e/ou terciária, muitas vezes os determinantes antigênicos ficam internos, minimizando a exposição e o consequente acesso a esse epítopo (KARUSH, 1978). A desnaturação protéica, combinada com a redução, poderia expor aqueles epítópos não acessíveis. (CRUMPTON *et al.* 1974). A reatividade para os determinantes antigênicos, principalmente na p28, foi notável quando a proteína sofreu desnaturação. No Western-blot, todos os AcM reagiram fortemente com a proteína p28, descrita para CAEV com PM entre 21Kd a 30Kd (SCHOBORG *et al.*, 2002; CHEEVERS *et al.*, 1981; ADAMS *et al.*, 1985; GOGOLEWSKI *et al.*, 1985). Outras proteínas de 53Kd , 44Kd e 36Kd também foram detectadas pelos AcM. A proteína de 53Kd pode corresponder ao Pr55<sup>gag</sup>, precursor policistrônico da p28 (VIGNE *et al.*, 1982; ROBEY *et al.*, 1985; HENDERSON *et al.*, 1987), que é clivado rapidamente (CHEEVERS *et al.*, 1988) em fragmentos de Pr44<sup>gag</sup> e Pr36<sup>gag</sup> , como acontece com outros retrovírus (BELOV *et al.*, 1988; VIGNE *et al.*, 1982; ROBEY *et al.*, 1985; HENDERSON *et al.*, 1987). Sugere-se também que a proteína de 33Kd encontrada representaria um estágio intermediário no processo de maturação da partícula do viral (BELOV *et al.*, 1988).

Uma forma de estudar o epítopo protéico é através de modificações na sua estrutura de tal forma de afetar a conformação, integridade e/ou a exposição do mesmo (FILHO *et al.*, 1997; ABASS *et al.*, 2006). Foram aqui utilizados o SDS (ou NaDS) (TORRES, *et al.* 2009; SIMARD, 2001) e o β-ME (HARITH *et al.* 1995; ABASS *et al.* 2006) como agentes que afetam a estrutura protéica. O SDS é um surfactante aniônico que se liga a proteínas globulares por uma combinação de interações iônicas e hidrofóbicas, formando o complexo proteína-surfactante. A parte lipofílica da molécula de SDS interage com as regiões hidrofóbicas do interior das proteínas, causando a quebra da sua estrutura secundária e terciária. Também as interações iônicas entre moléculas de SDS (aniônicas) e resíduos de aminoácidos (catiônicos) contribuem para este processo. (VOLPE; PERLES, 2005; FILHO; VOLPE, 1997; FILHO; VOLPE, 1994). O β-mercaptopetanol contém HS- (H3C-CH2-SH) e é utilizado para desnaturar proteínas que na sua estrutura possuem pontes dissulfeto (C-S-S-C-), derivada do aminoácido Cisteína (Cys). O β-mercaptopetanol reage com estas ligações e as reduz, formando -C-SH e HS-C, perdendo a estrutura secundária e terciária da proteína com posterior desnaturação (HARITH *et al.* 1995).

Para observar os efeitos de tais alterações na estrutura do epítopo e no reconhecimento pelos AcM, o antígeno viral foi submetido a tratamentos com o SDS e com o  $\beta$ -ME. Ao utilizar um ensaio onde o antígeno viral protéico é fracionado por eletroforese (Western-blot), teve um bom reconhecimento do epítópo pelos AcM. Com o AgV-SDS, observou-se alterações com a reatividade para a Pr44<sup>gag</sup>, portanto o determinante antigênico pode estar sendo afetado por este tratamento. As perdas foram importantes nas proteínas Pr53<sup>gag</sup> e Pr36<sup>gag</sup> quando os AcM foram enfrentados com o AgV-  $\beta$ -ME. Possivelmente estes epítopos contém resíduos ricos em aminoácidos Cys e a clivagem nos locais com pontes dissulfeto alteraria a estrutura protéica de tal forma que poderia estar interferindo na integridade do epítópo a ser reconhecido. As perdas de reatividade não foram importantes quando o AcP foi utilizado com o AgV- SDS, pois provavelmente a multivalência dos AcP, permite que sejam reconhecidos vários outros epítopos não alterados ou pouco alterados pelos tratamentos.

Ao utilizar outro ensaio onde o antígeno viral é colocado na sua forma nativa (ELISA) sem fracionamento protéico por eletroforese, o reconhecimento do epítópo ficou claramente diminuído. A reatividade diminuída para o AgV-SDS e AgV- $\beta$ -ME no ELISA foi estatisticamente significante, o que mostra que a conformação nativa desse epítópo também sofreu alterações suficientes para reduzir o reconhecimento pelos AcM. Comparadamente, o AcP mostrou uma redução significativa na reatividade unicamente com o AgV-  $\beta$ -ME.

Através dos testes imunoquímicos propostos, conseguimos analisar os AcM e seu epítópo de reconhecimento. Sugere-se que o determinante antigênico para todos os AcM esteja localizado na proteína do capsídio (p28), compartilhado nos precursores protéicos desta proteína. O reconhecimento antigênico do epítópo é favorecido pela desnaturação protéica o que indica que é do tipo seqüencial. Sua alteração com o AgV-  $\beta$ -ME, ficou claramente demonstrada, o qual indicaria uma composição rica em resíduos Cys. Estudos subseqüentes seriam necessários para o conhecimento mais aprofundado das características destes AcM e/ou o seu epítópo de reconhecimento.

## 7. CONCLUSÕES

- A IgG1 , cadeia leve κ é a Ig predominante destes AcM .
- As Ig tiveram altos títulos e a ausência de formação de complexos antígeno-anticorpos precipitantes, sugere que os AcM apresentam atividade monovalente.
- A reatividade para a detecção de antígeno viral em células infectadas foi fraca.
- A reação positiva no Western-blot, sugere que todos os AcM reconhecem epítópos lineares localizados na p28 e em precursores protéicos desta proteína.
- Modificações do epítopo após tratamento com SDS de efeito surfactante na molécula, leva a uma redução de reatividade.
- Modificações na estrutura do epítopo após tratamento com β-ME, sugere que este determinante antigenico é rico em resíduos Cys.
- Os AcM não apresentaram reatividade cruzada com proteínas de HIV-1 e HIV-2

## 8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABBAS E. M.; MANSOUR, D.; MUTASIM, M. el; HUSSEIN, M.; HARITH, A. el.. β-mercaptopropano-modified ELISA for diagnosis of visceral leishmaniasis. **Journal of Medical Microbiology**. v.55, p.1193-1196. 2006.

ABREU, S.R.O.; CASTRO, R.S.; NASCIMENTO, S.A.; SOUZA, M.G. Produção de antígeno nucleoproteíco do vírus da artrite-encefalite caprina e comparação com o do vírus Maedi-Visna para utilização em teste de imunodifusão em Agar gel. **Pesq. Vet. Brás.** v.18, n.2,p.57-60, 1998.

ADAMS, D. S., CRAWFORD, T. B. & KLEVJER-ANDERSON, P. A pathogenic study of the early connective tissue lesions of viral caprine arthritis-encephalitis. **American Journal of Pathology** 99, 257-278. 1980.

ADAMS, D.S.; KLEVJER-ANDERSON, P.; CARLSON, J.L.; McGuire, T.C.; GORHAM, J.R. Transmission and control of caprine arthritis-encephalitis virus. **Am. J. Vet. Res.**, v.44, p.1670 – 1675, 1983.

ADAMS, D. S.; GOGOLEWSKI, R. P.; BARBET, A.F.; CHEEVERS, W.P.. Identification of caprine arthritis-encephalitis retrovirus proteins in immunodiffusion precipitin lines. **Journal of General Virology**. 66: 1139- 1143. 1985.

ALMEIDA, M. G. A. R.; ANUNCIAÇÃO, A. V. M.; FIGUEREDO, A.; MARTINEZ, T.C.N.; LABORDA S. S. Dados sorológicos sobre a presença e distribuição da artrite-encefalite caprina (CAE) no estado da Bahia, Brasil. Ver. Bras. Saúde Prod. An., v.1 (3), p.78-83, 2001.

BELOV, L.; WHALLEY, J. M.. Virus-specific Polypeptides of Caprine Arthritis-Encephalitis Virus Recognized by Monoclonal Antibodies to Virion Proteins p24 and p14 . **Journal of General Virology**. 69, 1097-1103. 1988.

BERTONI G, ZAHNO M.L., ZANONI R, VOGT H.R., PETERHANS E., RUFF G., CHEEVERS W.P., SONIGO P. & PACINO G. Antibody reactivity to the immuno-dominant

epitopes of the caprine arthritis-encephalitis virus gp38 transmembrane protein associates with the development of arthritis. **J. Virol.** 68:7139-7147. 1994.

BERTONI, G; HERTIG, C.; ZAHNO, M.L.; VOGT, H.R.; DURFOUR, S.; CORDANO, P.; PETERHANS, E.; CHEEVERS, W.P.; SONIGO, P.; PACINO G. B-cell epitopes of the envelope glycoprotein of caprine arthritis–encephalitis virus and antibody response in infected goats. **J. Gen Virol.**, v.81. p.2929-2940, 2000.

BERTONI, G. Recent advances in goat diseases. **International veterinary information service**. Tempesta M (Ed). Ithaca NY ([www.ivis.org](http://www.ivis.org)), Last updated; 24/07/2007.

BERZOFKY, J.A.; BERKOWER, I.J.; EPSTEIN, S.L.. Antigen-Antibody Interactions and Monoclonal Antibodies. In: PAUL, W. E. **Fundamental Immunology**. Six edition. Wolters Kluwer Health. Lippincott Williams & Wilkins. p.152- 191.2003.

BIRD, P.; BLACKLAWS, B. A.; REYBURN, H. T.; ALLEN, D.; HOPKINS, J.;SARGAN, D. Early events in immune evasion by the lentivirus maedi-visna occurring within infected lymphoid tissue. **J. Virol.**, v.67, p.5187-5197, 1993.

BLACKLAWS, B. A.; BIRD, P.; ALLEN, D.; MCCONNEL, I. Circulating cytotoxic T lymphocyte precursors in maedi-visna virus infected sheep. **J. Gen. Virol.**, v.75, p.1589-1596, 1994.

BLACKLAWS, B. A.; BIRD, P.; ALLEN, D.; ROY, D.J.; MACLENNAN, I.C.M.; HOPKINS, J. Initial lentivirus-host interactions within lymph nodes: a study of maedi-visna virus infection in sheep. **J. Virol.**, 69, p.1400-1407, 1995.

BRODIE S.J., PEARSON L., ZINK M., BICKLE H., ANDERSON B., MARCOM K. & DeMARTINI J. Ovine lentivirus expression and disease. Virus replication, but not entry, is restricted to macrophages of specific tissues. **Am. J. Pathol.** 146:250-263. 1995.

CALLADO, A.K.C.; CASTRO, R.S.; TEIXEIRA, M.F. da S. Lentivírus de pequenos ruminantes (CAEV e Maedi-Visna): revisão e perspectivas. **Pesq. Vet. Brás.** 21 : 87-97, 2001.

CAMPOS, G S ; Freitas,M.M. ; SILVA, A.C.R. ; TORRES, J A ; BRANDAO, C. F. L.; SARDI, S I . Production and characterization of monoclonal antibodies against the Caprine

Arthritis-Encephalitis virus and their use for diagnosis. In: **XI congreso Argentino de Microbiología.** v. 39. p. 141-141., 2007.

CASTRO, R.S.; LEITE,R.C.; AZEVEDO,E.O. de ;RESENDE, M.; GOUVEIA,A.M.G. Seroconversion and seroreactivity patterns of dairy naturally exposed to caprine arthritis-encephalitis virus in Brazil. **Ciência Rural**, 32: 603-607, 2002.

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

CHEEVERS, W. P.; ROBERSON, S.; KLEVJER-ANDERSON, P.; CRAWFORD, T. B.. Characterization of Caprine Arthritis-Encephalitis virus: a retrovirus of goats. **Archives of Virology**. 67: 111-117.1981.

CHEEVERS, W. P.; STEM, T. A.; KNOWLES, D.P.; McGuire, T. C.. Precursor Polypeptides of Caprine Arthritis-Encephalitis Lentivirus Structural Proteins. **Journal of General Virology**. 69; 675- 681. 1988.

CHEEVERS, W. P.; KNOWLES, D.P.; NORTON L. K.. Neutralization- resistant antigenic variants of caprine arthritis- encephalitis lentivirus associated with progressive arthritis. **J. Infect. Dis.**, v.164, p.679-685, 1991

CHEEVERS W., McGuire T., Norton L. K., CORDERY-COTTER R., KNOWLES D.. Failure of neutralizing to regulate CAE lentivirus expression in vivo. **Virology**. 196: 835-839. 1993.

CHEEVERS W.; BEYER, J. C.; KNOWLES, D.P.; Type 1 and type 2 cytokine gene expression by viral gp 135 surface protein- activated T lymphocytes in caprine arthritis-encephalitis lentivirus infection. **J. Virol.** V. 71(8), p. 6259-6263. 1997

COLFOR, A.;HALL, P.A. Monoclonal antibodies in oncology: diagnostic pathology In LADYMAN &RITTER (Eds.). **Monoclonal Antibodies-** Production, Engineering and Clinical application.. Cambridge: University Press, p. 209-246. 1997

CONCHA-BERMEJILLO, A. de la. Maedi-visna and ovine progressive pneumonia. **Vet. Clin. North Am. Food Anim. Pract.**, v.13, p.12-33,1997.

- COOFIN, J.M. Retroviridae : the viruses and their replication. In: FIELDS, B. Et al., **Virology**. 4th. ed. Philadelphia: Lippincott-Raven Publishers, v.2, p. 1767-1830. 2001.
- COOK, D. B.; SELF, C.H. Monoclonal Antibodies in diagnostic immunoassays. In LADYMAN & RITTER (Eds.). **Monoclonal Antibodies – Production, Engineering and Clinical Application**. Cambridge: University Press, p.180-208.1995.
- CRUMPTON, M. J. Protein antigens: the molecular basis of antigenicity and immunogenicity. In **The Antigens**, ed M Sela, New York. Academic Press. v.II, p.1-79.1974.
- DAWSON, M.; WILESMITH, J.W. Serological survey of lentivirus (maedi-visna / caprine arthritis-encephalitis) infection in British goat herds, **Vet. Rec.**, v.117, p.86-89, 1985.
- EDELWEIS, G.;TIGRE,D.M.; NORONHA,R.P.; QUEIRÓS, F.M.;CAMPOS,G.S.; SARDI, S. Ocorrencia de anticorpos contra o virus da artrite-encefalite caprina em caprinos jovens de diferentes municipios do estado da Bahia. In: **XXVIII Congresso Brasileiro de Medicina Veterinária**, Salvador. 2001.
- ELLIS, T. M.; WILCOX, G.E.; ROBINSON, W. F.. Antigenic variation of caprine arthritis-encephalitis virus during persistent infection of goats. **J. Gen Virol.**, v.68, p. 3145-3152, 1987.
- FIENI, F.; ROWE, K.; VAN HOOSER, K.; BURUCOA, C.; OPPENHEIM, S.; ANDERSON, G.; MURRAY, J.; BONDURANT, R. Presence of caprine arthritis-encephalitis virus (CAEV) proviral DNA in genital tract tissues of superovulated dairy goat does. **Theriogenology**, v. 59, p. 1515-1523, 2003.
- FILHO, E. A. S.; VOLPE, P. L. O.. Estudo microcalorimétrico da interação de tensoativos n-Alquil-Sulfato de Sódio com tripsina a 298 K. **Química Nova**. V.20 (2), p. 150-153, 1997.
- FILHO, E. A. S.; VOLPE, P. L. O.. Estudo da interação proteína- surfactante pelo método de equilíbrio de diálise. **Química Nova**. V.17 (2), p. 199-1204, 1994.
- FONTES, Lia Vale Queirós ; CAMPOS, Gúbio Soares ; BECK, Patrícia Araújo ; BRANDAO, C. F. L. ; SARDI, Silvia Ines . Precipitation of Bovine Rotavirus by Polyethylen Glycol and its application to produce Polyclonal and Monoclonal Antibodies. **Journal of Virological Methods**, Inglaterra, v. 123, p. 147-153, 2005.

GARCIA, M. Artrite-encefalite caprina: uma nova doença no Brasil. **A Hora Veterinária**, 76: 57-59, 1993.

GENDELMAN, H.E.; NARAYAN, O.; KENNEDY-STOSKOPF, S.; KENNEDY, P.G.E.; GHOTBI, Z.; CLEMENTS, J.E.; STANLEY, J.; PEZESHKPOUR, G. Tropismo of sheep lentiviruses for monocytes: susceptibility to infection and vírus genes expresion increased during maturation of to macrophages. **J. Virol.**, v.58, n.1, p. 67-74.1986.

Glennie MI, Johnson PW. Clinical trials of antibody therapy. **Immunol Today**; 21:403-10. 2000.

GOLDSBY, R.A., KINDT, T. J., OSBORNE B .A. **Kuby Imunologia**. 4º ed. Rio de Janeiro: Revinter, 2002.

GOFF, S. P. Retroviridae: the retroviruses and their replication. 2 ed, p. 1999-2069. In: **Fields Virology**, B. N., KNIPE, D. M., HOWLEY, P. N., 5 ed, 2006.

GOGOLEWSKI, R. P.; ADAMS, D.S.; McGuIRE,T. C.; BANKS, K.L.; CHEEVERS, W. P.. Antigenic cross-reactivity between caprine arthritis-encephalitis, visna and progressive pneumonia viruses involves all virion-associated proteins and glycoproteins. **Journal of General Virology**. v. 66, p. 1233-1240. 1985.

HARITH A EL HARITH, S CHOWDHURY, A AL-MASUM, S SEMIÃO-SANTOS, E KARIM, S EL-SAFI, AND I HAQUE. Evaluation of cleaving agents other than trypsin in direct agglutination test for further improving diagnosis of visceral leishmaniasis. **Journal of Clinical Microbiology**. 33(8): 1984–1988, 1995.

HARKISS, G.D.; WATT, N.J. Lentivirus infetions and their detection. **Goat Vet. Soc. J.**,11 (1): 19-25,1990.

HAZIZA, B.; CHAUVIN, J. P.; GLUSCHANKOF, P.; SUZAN M.. Caprine Arthritis-Encephalitis virus: Evidence for a B/D-Type Assembly Pathway in a C-Type Lentivirus Replication. **Virology**. 286: 434- 445. 2001.

HENDERSON, L. E.; SOWDER, R. C.; SMYTHERS, G. W.; OROSZLAN, S.. Chemical and immunological characterizations of equine infectious anemia virus gag-encoded proteins. **Journal of Virology**. 61(4): 1116-1124. 1987.

HULLINGER, G. A.; KNOWLES, D.P.; Mc GUIRE, T. C.; CHEEVERS, W. P. Caprine arthrititis-encephalitis Lentivirus SU is the ligand for infection of caprine synovial membrane cells. **Virology**, v. 192, p.328-331, 1993.

HUSSO, L.D.; NARAYAN, O.; HART, W.G. Sialic acid on the surface of caprine arthrititis-encephalitis virus define the biological properties of the virus. **J. Virol.**, 72: 1974-1980, 1988.

IBGE. Pesquisa Pecuária Municipal, 2003. Disponível em: <[http://www.ibge.gov.br/home/presidencia/noticias/noticia\\_visualiza.php?id\\_noticia=258](http://www.ibge.gov.br/home/presidencia/noticias/noticia_visualiza.php?id_noticia=258)>. Acesso em 16 de setembro de 2008.

IBGE. Pesquisa Pecuária Municipal, 2005. Disponível em: < [http://www.ibge.gov.br/home/presidencia/noticias/noticia\\_impressao.php?id\\_noticia=759](http://www.ibge.gov.br/home/presidencia/noticias/noticia_impressao.php?id_noticia=759)>. Acesso em 16 de setembro de 2008.

JOLLY, P.E.; GANGOPADHYAY, A.; CHIEN, S.; REDDY, P.G.; WEISS, H. L.; SAPP,W.J. Changes in the leukocyte phenotype profile of goats infected with the caprine arthrititis-encephalitis virus. **Vet. Immunol. Immunopathol.**, v. 56, p.97-106, 1997.

KARUSH, F. The affinity of antibody: range, variability and the role of multivalence In Comprehensive Immunology. **Immunoglobulins**, ed. G.W. Litman & R.A. Good. New York, Plenum Medical Book. v.5, p. 85-116, 1978.

KLENERMAN, P.; HILL, A.. T cells and viral percistence: lesions from diverse infections. **Nat. Immunol.** V.6, (9); p.873-879. 2005.

KNOWLES, D. P.; CHEEVERS W. P.; McGuIRE, T. C; STEM, T. A. and GORHAM J. R.. Severity of arthritis is predicted by antibody response to gp135 in chronic infection with caprine arthrititis-encephalitis virus. **J. Virol.** 64:2396–2398. 1990.

KNOWLES, D. P.; CHEEVERS W. P.; McGuIRE, T. C; BRASSFIELD, A. L; HARWOOD W. G.; STEM T. A.. Structure and genetic variability of envelope glycoproteins of two antigenic variants of caprine arthrititis-encephalitis lentivirus. **J. Virol.** 65:5744–5750.1991.

KÖHLER G, MILSTEIN C. Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity. **Nature**, v. 256, p.495-497, 1975.

- KRIANGKUM, J. X.U; NAGATA, L.P, et al. Bispecific and bifunctional single chain recombinant antibodies. **Biomol Eng.** V.18. p.31–40. 2001.
- LADYMAN, H. M.; RITTER, M.A. Monoclonal Antibodies- Production engineering, and clinical application. Cambridge University Press. p.480. 1995
- LAEMMILI, U.K. Cleavage of Structural Proteins during the Assembly of the Head of Bacteriophage T4. **Nature**, v. 227, p. 680-685, 1970.
- LAMARA, A.; FIENI, F.; MSELLI-LAKHAL, L.; TAINTURIER, D.; CHEBLOUE, Y.. Efficient replication of caprine arthritis- encephalitis virus in goat granulose cells. **Virus Research**, v. 79, p. 165-172. 2001.
- LAMARA, A.; FIENI, F.; MSELLI-LAKHAL, L.; TAINTURIER, D.; CHEBLOUE, Y.. Epithelial cells from goat oviduct are highly permissive for productive infection with of caprine arthritis- encephalitis virus (CAEV). **Virus Res.**, v. 87, n.1, p. 69-77, 2002.
- LECHNER, F.; MACHADO, J.; BERTONI, G.; SEOW, H.F.; DOBBELARE, D.A.E.; PETERHANS, E. Caprine arthritis-encephalitis vírus dysregulates the expression of cytokines in macrophages. **Journal of Virology**, v.71, n. 10, p. 7488-7497, 1997.
- LERNER, R. A.; BENKOVIC, S. J.; SCHULTZ, P. G.. At the crossroads of chemistry and immunology: catalytic antibodies **Science** 1991, 252, 659.
- LICHENSTEINGER, C.A. CHEEVERS, W.P.; DAVIS, W.C.. CD8+ cytotoxic T lymphocytes against antigenic variants of caprine arthritis-encephalitis virus. **J. Gen. Virol.**, v.74, p. 2111-2116. 1993.
- LIMA, P.P.; ROCHA, M. A.; STANCEK, D.; GOUVEIA, A. M. G.; OLIVEIRA, G.D.R.. Vírus da artrite-encefalite caprina: isolamento e caracterização de parte do gene gag. **Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.**.v.56, n.2: 135-142. 2004.
- LIPMAN, N.S; JACKSON, L.R; TRUDEL, L.J; WEIS-GARCIA, F. Monoclonal versus polyclonal antibodies: Distinguishing characteristics, applications, and information resources. **ILAR Journal.**, v. 46, n 3, 258-268, 2005.
- MARGNI, R. A. **Inmunología e Inmunoquímica** – Fundamentos. 5º Ed. Editora Médica Panamericana. Buenos Aires. p.176-200. 1996.

Mc GUIRE, T.C. The immune response to viral antigens as a determinant of arthritis in caprine arthritis-encephalitis virus infection. **Vet. Immunol. Immunopathol.**, 17 : 465-470, 1987.

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

MORRIS, R. J. Antigen-antibody interactions: how affinity and kinetics affect assay design and selection procedures. In: LADYMAN, H. M.; RITTER, M.A. **Monoclonal Antibodies**-Production engineering, and clinical application. Cambridge University Press. p.480. 1995

MSELLI-LAKHAL, L.; GUIGUEN, F.; FORNAZERO, C. DU J.; FAVIER, C.; DURAND, J.; GREZEL, D.; BALLEYDIER, S.; MORNEX, J. F.; CHEBLOUNE, Y.. Goat Milk epithelial cells are highly permissive to CAEV infection *in vitro*. **Virology**, v. 259, p.67-73, 1999.

MURPHY, F.A.; GIBBS, E.P.J.; HORZINEK, M.C.; STUDDERT, M.J. Retroviridae. In: **Veterinary Virology**, 3ed. USA: Academic Press, p.363-389. 1999.

NARAYAN, O.; CLEMENTS, J.E.; STRANDBERG, J.D.; CORK, L.C.; GRIFFIN, D.E. Biological characterization of the virus causing leukoencephalitis and arthritis in goats. **J. Gen. Virol.**, v.50, p. 69-79. 1980.

NARAYAN, O.; CORK, L.C. Lentiviral diseases of sheep and goats: chronic pneumonia leukoencephalomyelitis and arthritis. **Rev. Infect. Dis.** V.7, p. 89-98. 1985.

NARAYAN, O.; WOLINSKY, J. S.; CLEMENTS, J.E.; STRANDBERG, J.D.; GRIFFIN, D.E; CORK, L.C.. Slow virus replication: the role of macrophages in the persistence and expression of visna viruses of sheep and goats. **J.Gen. Virol.**, v.59, n.2, p. 345-356, 1982.

NARAYAN, O.; JOAG, S. V., CHEBLOUNE Y. *et al.* Visna-Medi: the prototype lentiviral disease. In: **Viral Viral Pathogenesis**. Nathanson, N. (Coord). P 657-668. 1997.

NELSON, P. N.; REYNOLDS, G. M.; WALDRON, E. E.; WARD, E.; GIANNOPoulos, K.; MURRAY, P. G. Monoclonal antibodies. **Journal Clinical of Pathology**, v. 53, p. 111-117, 2000.

PAISICK, J.. Maedi-Visna Virus and Caprine Arthritis-Encephalitis Virus: Distinct Species or Quasispecies and its Implications for Laboratory Diagnosis. In: **Can J. Vet Res.**; 62: 241-244. 1998.

PARKER, C. W.. "Radioimmunoassay of Biologically Active Compounds." Prentice-Hall, Englewood Cliffs, New Jersey, 1976.

PARKER, C.W. Immunoassays. In **Methods in enzymology**. Vol. 182. Guide to Protein Purification. Ed. DEUTSCHER, M. P.. Academic Press, San Diego, 1990.

PERRY, L.L.; WILKERSON, M.J.; HULLINGER, G. A.; CHEEVERS, W. P. Depressed CD4+ T lymphocyte proliferative responses and enhanced antibody to viral antigen in chronic lentivirus –induced arthritis. **J. Infect. Dis.**, v.171, p. 328-334, 1995.

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**, Santa Maria, v. 31, n. 3, p. 449-454, 2001.

PHELPS, S.L.; SMITH, M.S. **Caprine arthritis-encephalitis virus infection**. JAVMA., 203 (12) : 1663 1668, 1993.

RAVAZOLLO, A. P.; NENCI, C.; VOGT, H-R.; WALDVOGEL, A.; OBEXER-RUFF,G.; PETERHANS, E.; BERTONI, G. Virus load, organ distribution, histopathological lesions, and cytokine mRNA expression in goats infected with a molecular clone of the caprine arthritis-encephalitis virus. **Virology**, v.350, p. 116-127, 2006

REED,L.J., MUENCH,H. A Simple method of estimating 50 per cent and point. **Am. J. Hyg.**, 27:493-497,1938

REILLY, L.K.; BAIRD, A.N.; PUGH, D.G. Enfermidades do Sistema Musculoesquelético. In:. **Clínica de ovinos e caprinos**. São Paulo: Roca, p.251-286. 2004.

RIMSTAD, E.; EAST, N.; TORTEN,M.; HIGGINS, J. DEROCK, E.; PEDERSEN, N.C; Delayed seroconversion following naturally acquired caprine arthritis-encephalitis virus infection in goats. **Am. J. Vet. Res.**, v.54, p.1858-1862, 1993

ROBEY, W.G., *et al.* Project for prevention of human immunodeficiency virus infection: purified 120kDa envelope glycoprotein induces neutralizing antibody. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA.** V.83, p. 7023-7027. 1986

ROBEY, W.G., *et al.* Characterization of envelope and core structural gene products of HTLV-III with serum from AIDS patients. **Science.** V.228, p. 583-595.1985

ROBINSON, W.F.; ELLIS, T.M. Caprine arthritis-encephalitis virus infection: from recognition to eradication. **Aust. Vet. J.**, v 63: p. 237-241, 1986.

SÁEZ- CIRIÓN, A.; LACABARATZ, C.; LAMBOTTE, O.; VERSMISSE, P.; URRTIA, A.; BOUFUASSA, F.; BARRÉ-SINOUSSI, F.; DELFRAISSY, J-F.; SINET, M.; PANCINO, G.; VENET, A. HIV controllers exhibit potent CD8 T cell capacity to suppress HIV infection ex vivo and peculiar cytotoxic T lymphocyte activation phenotype, **PNAS**, v. 104, n. 16, 2007.

SALTARELLI, M. QUERAT, G. KONINGS, D. A. M. Nucleotide sequence and transcription analysis of molecular clones of CAEV which generate infectious virus. **Virology.** v. 179: 347-364. 1990.

SARDI, S I ; SILVA, A.C.R. ; TORRES, J A ; TIGRE, D M. ; BRANDAO, C. F. L. ; CAMPOS, G S . Produção e caracterização de anticorpos monoclonais e policlonais contra o vírus da Artrite Encefalite Caprina.. In: **XXXIII Conbravet - Congresso Brasileiro de Medicina Veterinária**, Cuabá, 2006.

SCHOBORG, R. V.. Analysis of caprine arthritis encephalitis virus (CAEV) temporal gene expression in infected cells. **Virus Research.** 90: 37-46. 2002.

SELL, B. E. Prevalência de anticorpos para o vírus da artrite-Encefalite Caprina em soros de caprinos no estado de Santa Catarana. 23f. Monografia (especialização em sanidade Animal) – Universidade do Estado de Santa Catarina Lages, 2000.

SHI, S.R.; IMAM, S.A.; YOUNG, L.; COTE , R.J.; TAYLOR, C.R. Antigen retrieval immunohistochemistry under the influence of pH using monoclonal antibodies. **Journal of Histochemistry & Cytochemistry.** V. 43 (2), p. 193-201.1995.

SIMARD, C.; KIBENGE, M.T.; SINGH, P.; DIXON, P. Simple and rapid method for production of whole-virus antigen for serodiagnosis of caprine arthritis-encephalitis virus by enzyme-linked Immunosorbent assay. **C. lin. Diag. Immunol.**, 8 (2) : 352-356. 2001.

SMITH, M. C., CUTLIP, R. Effects of infection with caprine arthritis-encephalitis virus on milk production in goats. **J. Am. Vet. Med. Assoc.**, v. 193, p. 63-7, 1988. B. P. Tratado de medicina veterinária interna de grandes animais. São Paulo: Manole., P.1138-1139.1993.

STEINHAUER, D.A., HOLLAND, J.J.. Rapid evolution of RNA viruses. **Ann Rev Microbiol.** v. 41: 409-433. 1987

TIGRE,D.M. Detecção do vírus da artrite-encefalite caprina através da técnica de Duble Nested PCR em amostras de sangue e leite. **Dissertação de Mestrado**. Dezembro 2003.

TORRES, J. A.; CAMPOS, G. S.; FREITAS M. M.; BRANDÃO, C. F. L.; SARDI, S.I..Produção de antígeno viral para o sorodiagnóstico de CAEV utilizando o teste imunoenzimático (ELISA). Aceito para publicação. **Rev. de Ciências Médicas e Biológicas**. V.8, nº especial, 2009.

VALLERA DA, ASH RC, ZANJANI ED, et al. Anti-T-cell reagents for human bone marrow transplantation: ricin linked to three monoclonal antibodies. **Science**;222:512–515. 1983.

VIGNE, R.; FILIPPI, P.; QUÉRAT, G.; SAUZE, N.; VITU, C.; RUSSO, P.; DELORI, P.. Precursor Polypeptides to Structural Proteins of Visna Virus. **Journal of Virology**. 42(3): 1046–1056. 1982.

VOLPE, P. L. O.; PERLES, C. E. Calorimetric study of the antibacterial activity of sodium n-alkylsulfates on the metabolism of *Chromobacterium violaceu*. **Journal of the Brazilian Chemical Society**. V. 16, n5. 2005

ZINK, M. C.; NARAYAN, O.;KENNEDY, P. G. E.; CLEMENTS, J. E.. Phatogenesis of visna/maedi and caprine arthritis-encephalitis: New leads on the mechanism of restricted virus replication and persistent inflammation. **Vet. Immunol. and Immunopathol.**, v.15, p. 167-180, 1987.

ZINK, M. C.; YAGER, J. A.; MYERS, J. D.. Phatogenesis of caprine arthritis-encephalitis virus. Cellular localization of viral transcripts in tissue of infected goats. **Am. J. Pathol.**, v 13, n.4, p 843-854, 1990.

**APÊNDICE 1- RESULTADOS OBTIDOS PELA TÉCNICA ELISA DIRETO COM OS AcM, UTILIZANDO COMO AgV E CONTROLE (MSC)**

<b>F12</b>	
Diluição	OD
1/500	0,808
1/5000	0,808
1/50.000	0,442
1/100.000	0,235
1/200.000	0,119
1/400.000	0,069
1/800.000	0,054
1/1.600.000	0,048

<b>A9</b>	
Diluição	OD
1/500	0,802
1/5000	0,825
1/50.000	0,612
1/100.000	0,245
1/200.000	0,206
1/400.000	0,086
1/800.000	0,062
1/1.600.000	0,053

<b>G7</b>	
Diluição	OD
1/500	0,828
1/5000	0,875
1/50.000	0,518
1/100.000	0,243
1/200.000	0,115
1/400.000	0,073
1/800.000	0,060
1/1.600.000	0,060

<b>C7</b>	
Diluição	OD
1/500	0,850
1/5000	0,833
1/50.000	0,447
1/100.000	0,263
1/200.000	0,160
1/400.000	0,080
1/800.000	0,060
1/1.600.000	0,058

<b>B9</b>	
Diluição	OD
1/500	0,867
1/5000	0,874
1/50.000	0,541
1/100.000	0,226
1/200.000	0,148
1/400.000	0,088
1/800.000	0,078
1/1.600.000	0,060

<b>H9</b>	
Diluição	OD
1/500	0,850
1/5000	0,867
1/50.000	0,543
1/100.000	0,190
1/200.000	0,113
1/400.000	0,095
1/800.000	0,076
1/1.600.000	0,071

**APÊNDICE 2- RESULTADOS OBTIDOS PELA TÉCNICA ELISA INDIRETO COM OS AcM e AcP, UTILIZANDO AgV, AgV-SDS E CONTROLE (MSC).**

<b>F12</b>				
Diluição	S.Trat	T. SDS	T. 2-ME	CN
1/10	0,730	0,624	0,723	0,086
1/40	0,812	0,752	0,757	0,061
1/80	0,863	0,728	0,732	0,061
1/160	0,880	0,668	0,667	0,061
1/800	0,747	0,389	0,363	0,053
1/1600	0,736	0,331	0,300	0,055
1/3200	0,699	0,295	0,224	0,076

<b>C7</b>				
Diluição	S.Trat	T. SDS	T. 2-ME	CN
1/10	0,916	0,776	0,640	0,083
1/40	0,897	0,728	0,637	0,067
1/80	0,968	0,674	0,591	0,067
1/160	0,863	0,649	0,536	0,061
1/800	0,771	0,417	0,323	0,058
1/1600	0,749	0,371	0,260	0,060
1/3200	0,648	0,313	0,217	0,055

<b>A9</b>				
Diluição	S.Trat	T. SDS	T. 2-ME	CN
1/10	0,902	0,787	0,712	0,204
1/40	0,886	0,780	0,777	0,116
1/80	0,856	0,769	0,698	0,084
1/160	0,921	0,714	0,628	0,076
1/800	0,853	0,508	0,424	0,056
1/1600	0,778	0,438	0,365	0,063
1/3200	0,704	0,388	0,273	0,058

<b>G7</b>				
Diluição	S.Trat	T. SDS	T. 2-ME	CN
1/10	0,761	0,725	0,589	0,123
1/40	0,734	0,655	0,601	0,090
1/80	0,785	0,671	0,598	0,068
1/160	0,773	0,712	0,641	0,105
1/800	0,672	0,507	0,444	0,064
1/1600	0,619	0,516	0,293	0,066
1/3200	0,607	0,436	0,217	0,066

<b>B9</b>				
Diluição	S.Trat	T. SDS	T. 2-ME	CN
1/10	0,721	0,626	0,576	0,082
1/40	0,790	0,634	0,546	0,064
1/80	0,977	0,595	0,512	0,058
1/160	0,833	0,555	0,424	0,058
1/800	0,733	0,367	0,253	0,059
1/1600	0,641	0,317	0,208	0,054
1/3200	0,493	0,244	0,189	0,058

<b>H9</b>				
Diluição	S.Trat	T. SDS	T. 2-ME	CN
1/10	0,795	0,676	0,650	0,119
1/40	0,800	0,624	0,596	0,076
1/80	0,758	0,591	0,544	0,070
1/160	0,779	0,640	0,528	0,067
1/800	0,668	0,420	0,391	0,049
1/1600	0,607	0,394	0,309	0,064
1/3200	0,545	0,352	0,252	0,069

<b>SH</b>				
Diluição	S.Trat	T. SDS	T. 2-ME	CN
1/10	0,837	0,874	0,798	0,867
1/40	0,825	0,853	0,714	0,858
1/80	0,846	0,877	0,693	0,867
1/160	0,853	0,876	0,610	0,879
1/800	0,853	0,829	0,338	0,375
1/1600	0,867	0,804	0,204	0,298
1/3200	0,837	0,677	0,108	0,204

**APÊNDICE 3- COLHEITA DAS ARTICULAÇÃO INTERCARPIAL DOS MEMBROS ANTERIORES DE CABRITOS PARA A PRODUÇÃO DE CULTIVOS CELULARES DE MSC.**



#### APÊNDICE 4- OBTENÇÃO DE CULTIVOS CELULARES DE MSC

