

AMANDA SOARES DE VASCONCELOS

**INFLUÊNCIA DA INFECÇÃO PELO LENTIVÍRUS CAPRINE
ARTHRITIS – ENCEPHALITIS VÍRUS NOS LIPÍDEOS
PLASMÁTICOS DE CAPRINOS**

Recife, fevereiro de 2005

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO

CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

MESTRADO EM BIOQUÍMICA

**INFLUÊNCIA DA INFECÇÃO PELO LENTIVÍRUS CAPRINE
ARTHRITIS – ENCEPHALITIS VÍRUS NOS LIPÍDEOS
PLASMÁTICOS DE CAPRINOS**

AUTOR: Amanda Soares de Vasconcelos.

ORIENTADOR: Prof^ª. Dr^a Vera Lúcia de Menezes Lima, PhD.

Recife, fevereiro de 2005

AMANDA SOARES DE VASCONCELOS

**INFLUÊNCIA DA INFECÇÃO PELO LENTIVÍRUS CAPRINE ARTHRITIS –
ENCEPHALITIS VÍRUS NOS LIPÍDEOS PLASMÁTICOS DE CAPRINOS**

Dissertação apresentada para
cumprimento parcial das exigências
para, obtenção do título de Mestre em
Bioquímica pela Universidade Federal
de Pernambuco.

Recife – 2005

FICHA DE APROVAÇÃO

Dissertação defendida e aprovada pela banca examinadora

Orientador:

Dr^a Vera Lúcia de Menezes Lima

(Universidade federal de Pernambuco)

Examinadores

1 Examinador:

2. Examinador:

3. Examinador:

Data da aprovação: _____/_____/2005

ATA DA DEFESA DA DISSERTAÇÃO

Ata da defesa de dissertação do mestrando **Amanda Soares de Vasconcelos**, realizada em 24 de fevereiro de 2005, como requisito final para obtenção do título de Mestre em Bioquímica.

Às 14:15 minutos do dia 24 de fevereiro de 2005, foi realizada, no Auditório Prof. Marcionilo Lins, a defesa de dissertação de **Amanda Soares de Vasconcelos**, aluna do Curso de Mestrado em Bioquímica. Iniciando, a Profa. Dra. Vera Lúcia de Menezes Lima (Coordenadora do Curso supra citado), fez a apresentação da aluna, de sua orientadora, ela própria, e da Banca Examinadora composta pelos professores doutores: Profa. Dra. Vera Lúcia de Menezes Lima, na qualidade de Presidente, Profa. Dra. Maria Tereza dos Santos Correia, Profa. Dra. Luana Cassandra Breitenbach Barroso Coelho, as três do Depto. de Bioquímica/UFPE, e Profa. Dra. Helena Coutinho Franco de Oliveira, do Instituto de Biologia/UNICAMP. Após as apresentações, a Sra. Presidente convidou a aluna para a apresentação de sua dissertação intitulada: "**Influência da Infecção pelo Lentivirus "Caprine Arthritis Encefalitis Vírus" nos Lipídios Plasmáticos de Caprinos.**", e informou, que de acordo com o Regimento Interno do Curso, o candidato dispõe de até 50 (cinquenta) minutos para apresentação do trabalho e o tempo de arguição para cada examinador, juntamente com o tempo gasto pelo aluno para responder às perguntas será de 30 (trinta) minutos. A aluna procedeu a sua apresentação em 35 (trinta e cinco) minutos. Após a apresentação, a Sra. Presidente convidou os membros da Banca Examinadora para ocupar seus lugares, passando a palavra para a Profa. Dra. Helena Coutinho Franco de Oliveira, em seguida para a Profa. Dra. Maria Tereza dos Santos Correia e finalmente para a Profa. Dra. Luana Cassandra Breitenbach Barroso Coelho. Concluídas suas arguições, deram-se por satisfeitas, deram algumas sugestões e parabenizaram a mestranda e sua orientadora. Daí a Sra. Presidente, na qualidade de orientadora, fez algumas considerações e a sessão foi suspensa para o julgamento pela Banca Examinadora, que se reuniu na Secretaria do Curso. Após alguns comentários, a Banca decidiu, por unanimidade, conceder a menção "**Aprovada com Distinção**". Nada mais havendo a tratar, lavrei a presente ata que vai assinada por mim, Secretário, e demais membros da Banca Examinadora. Recife, 24 de fevereiro de 2005.

[Assinaturas manuscritas das membros da Banca Examinadora: Maria Tereza dos Santos Correia, Helena Coutinho Franco de Oliveira, Luana Cassandra Breitenbach Barroso Coelho, e Vera Lúcia de Menezes Lima.]

A PRESENTE CÓPIA CONFERE
COM O DOCUMENTO ORIGINAL.

RECIFE, 18/04/2005

[Assinatura manuscrita de Djalma Gomes da Silva.]
 **Djalma Gomes da Silva**
Assessor da Coordenação do Curso de
Mestrado em Bioquímica / CCB / UFPE

ÍNDICE ANALÍTICO

	Pág.
Agradecimentos	I
Lista de figuras	II
Lista de tabelas	II
Resumo	III
Abstract	IV
I. Introdução	01
II. Objetivos	09
Geral	09
Específicos	09
III. Resultados	10
IV. Conclusão	32
V. Referências	33
XI. Anexos	38

AGRADECIMENTOS

Primeiramente a Deus, Pai amoroso e bom, que nos permite estar vivos e nos dá a cada minuto a oportunidade de sermos melhores.

A Prof^ª. Dra. Vera Lúcia de Menezes Lima por sua amizade, por ter me mostrado o vasto mundo da bioquímica e por ter contribuído imensamente para o meu amadurecimento pessoal e profissional.

A Eduardo (marido), meu grande incentivador, por sua paciência, carinho, respeito, colaboração e amor a mim devotados, em todas as circunstâncias da minha vida.

Aos meus pais, que não mediram esforços para a minha realização como pessoa e como profissional e a minha irmã pelo incentivo de todas as horas.

As companheiras de caminhada, Bianka e Joelma, por tantos momentos de alegria compartilhados e pela força mútua em todos os momentos de “stresse”.

Aos amigos do Laboratório de Lipídios, Ana Catarina, César e Flávio por seu companheirismo nas horas de tristeza e de alegria, por terem se tornado para mim realmente grandes amigos.

Aos meninos da iniciação científica, Bruno, Thiago, Adenor e Ana Lenira pelas mãozinhas e pelas risadas nos momentos de aperto.

Ao professor Nicácio, pela amizade, pelo incentivo e por ter contribuído para a conclusão deste trabalho.

Aos funcionários do Departamento de Bioquímica, Neide, Djalma, Miron, Dona Helena, Dona Iolanda, Ademar e em especial a “seu” João por estarem sempre prontos a ajudar, permitindo, assim, que este trabalho fosse concluído com sucesso.

A todos os amigos do mestrado em bioquímica, Ana Helena, Lino, Clébia, Carlos, Eduardo, Gil, Márcio, Mônica, que lutaram, que sorriram e choraram comigo, que me ensinaram e que também aprenderam, fazendo, assim, com que os momentos vividos juntos se tornassem inesquecíveis.

LISTA DE FIGURAS

	Pág.
Figura 1: Distribuição da infecção pelo lentivírus de pequenos ruminantes no Brasil	03
Figura 2: Cabra soropositiva para lentivírus de pequenos ruminantes, com artrite	04
Figura 3: Inflamação artrítica causada pelo CAEV	05
Figure 1: Phospholipid levels from plasma of dry female goats infected by CAEV. Total phospholipids (TP), lysophosphatidylcholine (LPC), sphingomyelin (SPH), phosphatidylcholine (PC) and phosphatidylethanolamine (PE) were determined by phosphorus analysis from plasma lipid extracts.	31
Figure 2: Comparison of the molar ratio of lipoprotein cholesterol to total cholesterol in plasma from goats infected by CAEV. HDL/LDL, LDL/HDL, total cholesterol/HDL, total cholesterol/LDL.	31

LISTA DE TABELAS

	Pág.
Tabela 1: Etiologia e principais patologias das infecções por Lentivírus	01
Tabela 2: Constituintes lipídicos do plasma de algumas espécies animais	07
Table 1: Triglyceride, total cholesterol and lipoproteins-cholesterol levels in plasma of goats infected by CAEV.	29

RESUMO

A infecção pelo lentivirus “Caprine arthritis-encephalitis vírus” (CAEV) causa doença progressiva crônica caracterizada por artrite, lesões no tecido linfóide, sistema nervoso e em outros órgãos, e o processo clínico é marcado por perda de peso, fragilidade e morte do animal. No Brasil, a infecção pelo CAEV, vem sendo considerada um problema de saúde pública que envolve vários rebanhos de caprinos do país. O presente estudo tem como objetivo avaliar o efeito da infecção pelo CAEV sobre o colesterol, fosfolipídios e triglicerídeos do plasma de caprinos de Pernambuco / Brasil. O plasma dos animais de diversos rebanhos foi analisado por método de imunodifusão em agar gel para detectar a presença de anticorpos para o lentivirus CAEV. Foram selecionados animais infectados pelo CAEV, sem sintomatologia clínica. Animais do grupo controle foram selecionados de rebanhos saudáveis da mesma região e com similar manipulação. Lipoproteína de alta densidade (HDL) plasmática foi isolada por precipitação seletiva das lipoproteínas de baixa (LDL) e muito baixa densidade (VLDL) com ácido fosfotungstico (1,4 mmol/L) e MgCl (53 mmol/L). Colesterol livre e esterificado, bem como, as subclasses de fosfolipídios foram separados por cromatografia em camada fina. Colesterol total e da HDL (HDL-C), bem como, triglicerídeos do plasma foram quantificados por ensaios enzimáticos, enquanto o colesterol das lipoproteínas VLDL e LDL (VLDL-C e LDL-C) foi determinado pela Equação de Friedwald. Os fosfolipídios totais e subclasses foram analisados por método químico. Animais infectados por CAEV apresentaram um aumento significativo nos níveis de colesterol total, ester de colesterila, fosfolipídeos totais e LDL-C. Os níveis plasmáticos de triglicerídeos, HDL-C e VLDL-C foram similares aos valores encontrados para o grupo controle. As concentrações de lisofosfatidilcolina, fosfatidicolina e fosfatidiletanolamina, subclasses de fosfolipídeos, foram aumentadas significativamente no plasma dos animais infectados, em comparação com o grupo controle. Contudo, nenhuma alteração foi observada em outra subclasse dos fosfolipídeos plasmáticos dos animais infectados: a esfingomiélin. Os resultados indicam que a infecção pelo CAEV afeta o metabolismo lipídico animal. Os resultados deste trabalho servirão como teste laboratorial auxiliar do diagnóstico e prognóstico clínico/veterinário, importantes para os pequenos e grandes criadores de caprinos.

ABSTRACT

Caprine arthritis-encephalitis virus (CAEV) infection is a progressive chronic disease characterized by arthritis, lesions in lymphoid tissue, nervous system and in other organs, weight loss, weakness and death of the animals. The present study aimed to evaluate the cholesterol, phospholipids and triglycerides levels in caprine flock from Pernambuco/Brazil. Plasma of animals was analyzed by immunological method (ELISA) for the presence of lentivirus, and it was selected animals infected by CAEV without clinical signals. The control group was selected from health flocks from the same region and similar management condition. Plasma low density lipoprotein (LDL) and very low density lipoprotein (VLDL) were precipitated from high density lipoprotein (HDL) by the addition of 1.4 mM sodium phosphotungstate with 53.0 mM magnesium chloride. Neutral lipids and phospholipid subclasses were separated by thin layer chromatography. Plasma cholesterol, HDL cholesterol (HDL-C) and triglycerides were analyzed by enzymatic assays, whilst VLDL cholesterol (VLDL-C) and LDL cholesterol (LDL-C) was measured by Friedwald Equation. The total phospholipids and its subclasses were measured by chemical method. Animals infected by CAEV showed significant increase in total cholesterol, cholesteryl ester, total phospholipids and LDL-C. However, the concentration of triglycerides, HDL-C and VLDL-C were similar to those found for the control group. The phospholipid subclasses, lysophosphatidylcholine, phosphatidylcholine and phosphatidyletanolamine, were significantly higher in plasma from infected animals than in plasma of the control group. However, sphingomyeline level in plasma of infected animals appears similar to those from control group. The results show that the increase in plasma total cholesterol and in the main phospholipid subclasses concentrations in CAEV. The increase in plasma phospholipids found in the CAEV infected goats may lead to an abnormal composition of cell membrane, and consequently may alter the cell function. Furthermore, the increase in low density lipoprotein-cholesterol in animals infected by CAEV could predispose this group to hypercholesterolemia and to coronary heart disease, and this may have a clinical relevance, particularly, to those goats post-parturition and/or to those involved in the milk production.

I. INTRODUÇÃO

Lentivirose são viroses não oncogênicas transmitidas por vírus de RNA, envelopados, que participam da família dos retrovírus e são conhecidos por infectar primariamente as células do sistema imune. Eles causam infecção persistente e doença degenerativa crônica em seus hospedeiros (Haase, 1986). Os lentivírus compõem um grupo taxonômico de patógenos que inclui vários vírus de interesse veterinário e médico (Legastelois *et al.*, 1996), conforme demonstrado na tabela.

Tabela 1. Etiologia e principais patologias das infecções por Lentivírus
(Legastelois *et al.*, 1996)

Hospedeiro	Vírus	Enfermidade
Ungulados pequenos ruminantes	Maedi visna e CAEV	Pneumonia intersticial difusa, encefalomielite, artrite, mamite e emagrecimento.
Bovinos	BIV JDV	Linfadenopatia e linfocitose Emagrecimento, febre, anorexia, linfadenopatia e anemia.
Equídeos	EIAV	Pneumonia intersticial difusa, encefalite, febre, emagrecimento e anemia.
Primates Macacos	SIV	Imunodeficiência, infecções oportunistas, síndrome neurológica, pneumonia intersticial difusa e artrite.
Homens	HIV	Imunodeficiência, infecções oportunistas, linfadenopatia, síndrome neurológica, pneumonia intersticial difusa.
Carnívoros Felídeos	FIV	Imunodeficiência, infecções oportunistas, linfadenopatia, síndrome neurológica e emagrecimento.

CAEV-caprine arthritis-encephalitis virus; BIV-bovine immunodeficiency virus; JDV-jembrana disease virus; EIAV-equine infectious anaemia virus; SIV-simian immunodeficiency virus; HIV-human immunodeficiency virus; FIV-feline immunodeficiency virus.

O lentivírus Caprine Arthritis-Encephalitis Vírus (CAEV) tem sido isolado de caprinos e encontra-se fortemente relacionado com Human Immunodeficiency Vírus (HIV) e a lentivirose causada pelo Simian Immunodeficiency Virus (SIV), além de possuir frações de seqüências e organização do genoma em homologia com o Maedi-Visna Vírus (MVV), que infecta ovinos.

Os lentivírus compartilham três características gerais que promovem a persistência da infecção em seus hospedeiros. Primeiro, após a transcrição reversa do RNA viral nas células infectadas, o DNA proviral se integra no genoma celular, permitindo que o vírus escape dos mecanismos de defesa do hospedeiro e preserve o seu genoma. Segundo, os lentivírus se multiplicam em células do sistema imunológico normalmente responsáveis pela eliminação de células infectadas, por isso, o hospedeiro não consegue desenvolver resposta imunológica curativa. Além disso, a restrição da expressão viral, sem produção de partículas virais, permite que as células infectadas pelo vírus escapem do sistema imunológico (Narayan *et al.*, 1997; Callado *et al.*, 1999). Terceiro, esses vírus acumulam alta taxa de mutação durante o processo de replicação, devido a falhas da transcriptase reversa em corrigir as novas seqüências de nucleotídeos, resultando em variabilidade genética e, consequentemente fenotípica, que permite escapar do sistema imunológico do hospedeiro (Cheevers *et al.*, 1993).

As denominadas lentivirose de pequenos ruminantes, comumente transmitidas pelos vírus CAEV e o MVV, geralmente levam anos para se desenvolverem e são progressivas. A soroconversão pode também ser demorada, acontecendo num período que pode variar de algumas semanas até dois anos pós-infecção. As lentivirose de pequenos ruminantes são caracterizadas por promoverem uma infecção permanente *in vivo* (Narayan *et al.*, 1997) e por possuírem um tropismo por células da linhagem monocítico-fagocitária, servindo a medula óssea como um reservatório de células infectadas (Gendelman *et al.*, 1986). Logo após infectar uma célula, o vírus entra em um estado latente ou restrito de replicação (Haase, 1986). A concentração do vírus é usualmente muito baixa no sangue e nas secreções. No sangue, por exemplo, encontramos em torno de 10^6 células brancas tipicamente infectadas. Porém, apesar de se mostrarem aparentemente poucos, os vírus são transmitidos, não somente entre mãe e prole, mas também, entre animais adultos. Apesar das investigações, não está claro como operam essas rotas de transmissão ou qual é a mais importante (Blacklaws *et al.*, 2004). O CAEV, por exemplo, pode ser difundido através de ingestão do colostro ou leite de mães infectadas para seus

Figura 1. Distribuição da infecção pelas lentivirose de pequenos ruminantes no Brasil. (●) Estados de ocorrência.

Os lentivírus de pequenos ruminantes têm sido identificados em diversos países, com prevalências mais elevadas naqueles em que a ovino e a caprinocultura são mais tecnificadas, causando perdas econômicas decorrentes da diminuição da vida produtiva e da produção leiteira, predisposição da glândula mamária às infecções bacterianas, retardo no crescimento das crias, desvalorização comercial dos produtos de criatórios com animais positivos e despesas com programas de controle (Greenwood, 1995; Concha-Bermejillo, 1997).

A artrite encefalite caprina foi reconhecida clinicamente pela primeira vez, em 1959, na Suíça, onde foi observada a artrite crônica (Figura 2) em animais adultos (Stünzi *et al.*, 1964). Também foram relatados casos na Índia, em 1964, por Rajya & Singh e no Japão, em 1971, por Nakagawa. O indício de que a doença era causada por vírus foi confirmado quando foi detectado, por microscopia eletrônica, partículas virais semelhantes às do vírus Maedi-Visna, em células do plexo coróide caprino (Weinhold *et al.*, 1974). Primariamente, a artrite-encefalite caprina (CAE) foi caracterizada por apresentar artrite progressiva em animais adultos e encefalomielite desmielinizante em cabritos de menos de seis meses (Cork *et al.*, 1974). O reconhecimento internacional da CAE como uma virose ocorreu em 1980, após a identificação do agente etiológico, como sendo um lentivírus da família Retroviridae, tendo sido denominado CAEV (Crawford *et al.*, 1980, Narayan *et al.*, 1980).

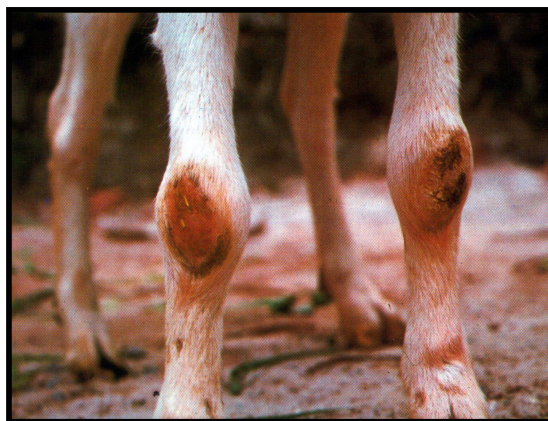


Figura 2. Cabra soropositiva para lentivirose de pequenos ruminantes, com artrite.

No Brasil, a primeira descrição de lentivirose de pequenos ruminantes foi feita no Rio Grande do Sul, com identificação de caprinos (Moojen *et al.*, 1986) e ovinos (Ravazzolo *et al.*, 1995; Sotomaior & Milczewski, 1997) soropositivos. A presença de um vírus foi confirmada pelo posterior isolamento do vírus de caprinos (Castro *et al.*, 1999b).

As patologias causadas pelos lentivirus exibem uma série de manifestações dramáticas em seus hospedeiros específicos (Clements and Zink, 1996). Enquanto HIV enfraquece o sistema imune humano, com conseqüências devastadoras, o CAEV, causa doença degenerativa crônica em caprinos e ovinos de todas as raças e idades (Narayan *et al.*, 1997).

O CAEV causa inflamação crônica e doença degenerativa principalmente nas juntas (Figura 3) e glândulas mamárias; ocasionalmente infecta os pulmões e o sistema nervoso central dos caprinos. Em contraste com o HIV e o SIV, o CAEV não induz imunodeficiência nos animais infectados, esta propriedade está correlacionada com a inabilidade deste vírus para causar infecção produtiva dos linfócitos T CD4+ (Gorrel *et al.*, 1992). Além de infectar células das linhagens monócítico-fagocitárias também infectam células dendríticas (Narayan, 1989; Ryan *et al.*, 2000). É interessante ressaltar que os macrófagos pulmonares também são relatados como células alvo, sendo que o número de macrófagos infectados presentes no fluido pulmonar está correlacionado com o grau de patologia do pulmão (Brodie *et al.*, 1992). A diferenciação dos monócitos em macrófagos se faz necessária para estimular a expressão dos vírus CAEV (Gendelman *et al.*, 1986).



Figura 3. Inflamação artrítica causada pelo CAEV

O CAEV pode se replicar em culturas de fibroblastos primários derivados do plexo coróide ou da membrana sinovial. Por isso essas células são comumente usadas para detectar e estudar as infecções pelo CAEV e MVV. Em estudos recentes foi demonstrado que a membrana sinovial de caprinos pode ser o primeiro material de referência para detectar e estudar as infecções pelo CAEV, assim como também para estudos de biologia celular e molecular (Rolland *et al.*, 2004).

Apesar das óbvias diferenças nos sintomas das doenças, os lentivirus podem compartilhar algumas propriedades biológicas, tais como, estrutura similar e organização genética (Clements & Zink, 1996; Miller *et al.*, 2000). Reações cruzadas entre o HIV e outras lentivirose animais foram relatadas por Jacobs *et al.* (1992). No referido trabalho foram encontrados no soro de vacas anticorpos contra bovine immunodeficiency virus (BIV) que reagiram contra as proteínas p51 e p63 do HIV. Reações antigênicas cruzadas entre Maedi visna vírus (MMV) e HIV (Maslak & Schemerr, 1993), bem como MMV e CAEV (Ruby *et al.*, 1985; Pyper, *et al.*, 1986), e também entre as glicoproteínas de superfície de 135 kDa de lentivírus de ovinos e caprinos têm sido reportadas (Dahlberg *et al.*, 1981). A entrada do vírus na célula alvo é mediada pelo envelope de glicoproteínas. O envelope proteico do CAEV é chamado gp 135 e possui muitas similaridades estruturais com o gp 120 do HIV, fato que foi demonstrado pela capacidade dos anticorpos gp 135 específicos apresentarem reação cruzada com o gp 120 (Louie *et al.*, 2003). Tesoro-Cruz *et al.* (2003) observou uma reação positiva mais intensa do soro humano para a gp135 do que a do soro de cabras para a gp120 do HIV.

O perfil lipídico tem sido usado para avaliar problemas periparto (Sandabe *et al.*, 2004), alterações metabólicas provenientes de patologias causadas por vírus (Constans *et al.*, 1994), parasitas (Ramos *et al.*, 2004) ou pelo estado nutricional dos animais (Lima *et al.*, 1986; Lima, *et al.*, 1998).

O colesterol, precursor de ácidos biliares, fundamentais na digestão dos lipídeos e síntese de hormônios esteróides, agentes essenciais nos processos reprodutivos (McLachlan *et al.*, 2002), também é um constituinte de grande importância das membranas celulares, e seu transporte através do sangue é mediado pelas lipoproteínas plasmáticas. Brown e Goldstein (1992) demonstraram que as células obtêm colesterol principalmente por meio da endocitose mediada por receptores da lipoproteína da baixa densidade (LDL).

Em conjunto com a LDL, a lipoproteína de muito baixa densidade (VLDL), e lipoproteína de alta densidade (HDL) são as principais lipoproteínas transportadoras dos lipídeos de origem endógena. A VLDL é produzida pelo fígado e tem a função de transportar principalmente os triglicerídeos. A LDL resulta do catabolismo da VLDL e é a principal responsável pelo transporte de colesterol na circulação humana, e como descrito acima pode ser endocitada por células do fígado ou de tecidos extrahepáticos; modificações nesta partícula induzem sua internalização por macrófagos levando à formação de células espumosas (Goldstein e Brown, 1977).

As lipoproteínas interagem com as membranas celulares possibilitando a transferência de lipídeos. O colesterol livre em excesso na membrana celular é transferido à HDL para ser transportado para o fígado pelo processo conhecido como transporte reverso do colesterol (Jonas, 2000), onde, pela reação da enzima plasmática lecitina: colesterol aciltransferase (LCAT) é esterificado e posteriormente transferido pela proteína transferidora de ésteres de colesterol (CETP) para partículas aceptoras como LDL em troca de triglicerídeos (Lima *et al.*, 2004). A concentração do colesterol e dos fosfolipídeos, bem como do colesterol de algumas lipoproteínas do plasma sanguíneo varia de acordo com a espécie animal (Tabela 2).

Tabela 2 – Constituintes lipídicos do plasma de algumas espécies animais

Classes de Lipídeos	Camundongo*	Gato*	Cão*	Homem**
	(mg/dl)	(mg/dl)	(mg/dl)	(mg/dl)
Triglicerídeos	79,0 ± 9,0	30,5 ± 12,5	23,0 ± 4,6	<180
Colesterol total	65,0 ± 4,0	130,0 ± 10,5	186,0 ± 4,7	<200
Colesterol da HDL	49,0 ± 2,0	75,5 ± 14,4	151,0 ± 18,3	>40
Colesterol da LDL	11,5 ± 1,3	42,0 ± 11,4	16,0 ± 1,8	<120

LDL – Lipoproteína de baixa densidade; HDL – Lipoproteína de alta densidade.

*Valores obtidos de Maldonado *et al.*, (2002); ** Valores obtidos de LABTEST, 2003.

No homem o metabolismo lipídico tem sido alvo de atenção em pacientes infectados com o HIV (Meyer *et al.*, 1998; Hadigan *et al.*, 1999; Yanovski *et al.*,

1999) nesses pacientes têm sido observadas alterações metabólicas importantes. Suas lipoproteínas diferem em tamanho, densidade e composição química (lipídica e protéica). Estudos realizados por Constans *et al.*, (1994) em pacientes HIV infectados encontraram níveis significativamente baixos de colesterol total e colesterol das HDL e LDL, bem como a apolipoproteína A-I (Apo A-I), em comparação com indivíduos controle de mesma faixa etária. Entretanto, nos mesmos pacientes as concentrações de triglicerídeos mostraram-se significativamente aumentadas.

O desenvolvimento de pesquisas científicas que tenham por objetivo determinar a influência de algumas patologias sobre o metabolismo animal é de grande valor, tendo em vista a crescente importância da caprinocultura para o nordeste brasileiro, principalmente no que diz respeito à produção de leite e carne desses animais. Cabras infectadas pelo CAEV têm sido alvo de alguns estudos que trazem como objetivo principal os índices de produção e a composição do seu leite (Ryan *et al.*, 1993; Greenwood, 1995; Nord & Adnoyt, 1997). Por outro lado, pouco se conhece sobre as alterações metabólicas voltadas para o metabolismo lipídico nos animais infectados pelo CAEV com ou sem desenvolvimento das alterações clínicas características dessa infecção viral (Gainer *et al.*, 1989; Ryan *et al.*, 1993).

II. OBJETIVOS

Geral

Descrever possíveis alterações nos níveis de lipídios e na composição de colesterol das lipoproteínas plasmáticas em caprinos infectados com o lentivirus caprine arthritis – encephalitis vírus (CAEV).

Específicos

Analisar a concentração de colesterol total, triglicerídeos, bem como os níveis de colesterol das lipoproteínas de muito baixa, baixa e alta densidade, isoladas do plasma de caprinos infectados com o CAEV e de animais não infectados (controles), provenientes do mesmo rebanho;

Analisar os níveis dos fosfolipídeos totais e suas subclasses (lisofosfatidilcolina, esfingomielina, fosfatidilcolina e fosfatidiletanolamina), bem como os níveis dos lipídios neutros no plasma de animais controle e infectados.

III. RESULTADOS

Trabalho a ser submetido ao Periódico:

I. “The Veterinary Journal”

Fator de Impacto: 1.250

**Título do artigo: INFLUENCE OF CAPRINE ARTHRITIS-
ENCEPHALITIS VIRUS (CAEV) ON THE LIPID
PROFILE FROM PLASMA OF GOATS
NATURALLY INFECTED.**

**INFLUENCE OF CAPRINE ARTHRITIS-ENCEPHALITIS VIRUS
(CAEV) ON THE LIPID PROFILE FROM PLASMA OF GOATS
NATURALLY INFECTED.**

**Amanda S. Vasconcelos^a, Ana K. C. Callado^b, Roberto S. Castro^c,
Vera L. de M. Lima^{a*}**

^aDepartamento de Bioquímica. Universidade Federal de Pernambuco, Av.
Prof. Moraes Rego, s/n, CEP50670-420, Recife, PE, Brazil..

^bLaboratório de Apoio Animal do MARA – LAPA/RECIFE. Recife, PE.

^cUniversidade Federal Rural de Pernambuco – Departamento de Medicina
Veterinária. Recife-PE.

*Corresponding author. Tel.: +55 81-2126-8541, fax: +55 81-2126-
8576.

E-mail address: vlml@ufpe.br (V.L.M.Lima)

Running title: Lipids in plasma of CAEV infected goat.

ABSTRACT

The present study aimed to evaluate the plasma cholesterol, phospholipids and triglycerides levels in dry female goats infected by caprine arthritis-encephalitis virus (CAEV). The infection in dry female goats was detected by agar gel immunodiffusion. Control goats were selected from healthy flocks and similar management conditions. Animals infected by CAEV showed significant increase in total cholesterol, cholesteryl ester, total phospholipids and LDL-C. However, concentration of triglycerides, HDL-C and VLDL-C were similar to those found for control group. Unlike, lysophosphatidylcholine, phosphatidylcholine and phosphatidyletanolamine were significantly higher in plasma of infected animals. The increase in plasma cholesterol and phospholipids from infected goats likely reflect high tissue demands for virus replication. Furthermore, the increase in low density lipoprotein-cholesterol upon infection by CAEV could predispose this group to hypercholesterolemia and to coronary heart disease, and this may have clinical relevance, particularly, to goats post-parturition and/or to those involved in milk production.

Keywords: Plasma lipids, Low density lipoprotein cholesterol, Phospholipid subclasses, CAEV infection, Lentivirus infection.

INTRODUCTION

Caprine arthritis-encephalitis virus (CAEV) is a lentivirus of the Retroviridae family, which includes, among others, human immunodeficiency virus (HIV), and it is closely related to maedi-visna virus of sheep, but more distantly related to the human HIV-1, although Miller (2000) described that CAEV have structural and biological similarities to the HIV. The lentivirus has similarities in ultra structure, genomic organization, and disease progression, and CAEV causes persistent infection. However, unlike the human, simian, and feline lentiviruses, CAEV does not cause immune deficiency, but instead induces chronic mononuclear inflammation of various tissues, because it has preferential tropism for the monocyte/macrophage lineage cell (Narayan *et al.*, 1989). CAEV infection causes chronic inflammatory disease mainly in joints and mammary glands and occasionally in the lung and central nervous system of the infected goats (Narayan *et al.*, 1989). However, some infected animals, which can transmit the disease, may never show clinical symptoms (Trujillo *et al.*, 2004).

It is not clear which routes of transmission are operational and which are the most important, but direct or close contact between animals is important factor in virus transmission besides ingestion of colostrums and milk (Blacklaws *et al.*, 2004). It was demonstrated that goat milk epithelial cells are permissive to CAEV infection both in vitro and in vivo (Mselli-Lakhal *et al.*, 1999). Recently, maedi visna virus capsid antigen has been detected in lambs fed maternal colostrum and in macrophages cultured from colostrums. It appears that the viral absorption occurs by intestinal epithelial cells in the small intestine and mesenteric nodes are the sites of entry and propagation of the lentivirus in lambs fed colostrums from infected ewes (Preziuso *et al.*, 2004).

Some studies (Krieg, & Peterhans, 1990, Smith & Cutlip, 1988) suggest that indurative mastitis is the most economically significant component of CAEV because of the effect of this type of mastitis on milk production, fat production and others components. The lipids are necessary energy component for the metabolic process (Bauman, *et al.*, 2003). Thus, the fat content of milk is of economic importance because milk is sold on the basis of fat. Triglycerides account for 98.3% of milk fat. Other classes of lipids include phospholipids (0.8%) that are mainly associated with the fat globule membrane, and cholesterol (0.3%), which is mostly located in the fat globule core. Lipids necessary for milk production are transported to the secretory cells via the blood and lymph (Goff, 2005). Cholesterol transport in the circulation is carried out mainly by high density lipoproteins (HDL) and low density lipoproteins (LDL). The latter transports cholesterol from the liver to peripheral tissues, whereas HDL is strongly involved in the transport of cholesterol from peripheral tissues to the liver for excretion as bile salts and to steroidogenic synthesis of steroid hormones (Jonas, 2000). This reverse transport of cholesterol by HDL is intimately dependent on the action of the plasma enzyme lecithin cholesterol-acyltransferase known as LCAT (Lima *et al.*, 2004). Previous studies on lipid metabolism have introduced new knowledge on the pathophysiology of diseases, such as parturition problems (Sandabe *et al.*, 2004), modification of metabolism due to parasites (Ramos *et al.*, 2004, Lima *et al.*, 1998) and viruses (Constans *et al.*, 1994) infections, or nutritional conditions of animal (Bauman, *et al.*, 2003, Lima *et al.*, 1986).

In Brazil, as in several other countries (Erasmus *et al.*, 2004, Németh *et al.*, 2004, Callado *et al.*, 2001), the goat culture has become a very important source of animal protein from milk and meat of these animals, and has real economic potential for many producers, mainly in rural zone. On a worldwide basis, more people drink

milk from goats than from any other animal (Haenlein, 2005). Due to the easily digestible fat and protein content goat milk has increased its importance to infant diets (both human and animal), as well as to invalid and convalescent diets, than cow milk. Goat milk is used for drinking and to make cheese, butter, ice cream, yogurt, candy, soap and other body products (Bruhn, 2002). Consequentially, CAEV lentivirus infection is considered a health problem of flock populations.

Therefore, the development of scientific studies with the purpose to determine the influence of some diseases on the animal metabolism is very important. Thus, the aim of the present work was to evaluate the influence of CAEV infection, in naturally infected goats, on neutral lipids, phospholipids and its subclasses, and lipoproteins cholesterol contents in plasma of caprine flock from Pernambuco, Brazil, in order to get more insights into the pathophysiology of CAEV infection.

MATERIAL AND METHODS

Animals. The experimental animals were 30 Anglo-Nubian dry adult female goats, aged 2 to 4 years old. Plasma of 2700 animals was analyzed for the presence of lentivirus antibodies by using the agar gel immunodiffusion (AGID) test, which is one of the most frequent immunological method used for the diagnosis of the disease (Adams & Gorham, 1986, Abreu *et al.*, 1998). Animals infected by CAEV but without clinical symptoms of the viruses were selected to be included in the infected group. For the control group it was selected age matched female dry goats from healthy flocks, which were in the same region and similar management condition, including weight and nourishment, as the infected group.

Plasma samples. Blood samples were taken from animals were obtained by jugular venipuncture following the first meal, between 15:00 - 16:00 h and anticoagulated with EDTA for lipid analysis. Plasma was isolated by centrifugation at 2,500 x g, for 15 min (Lima *et al.*, 1998).

Extraction and isolation of plasma lipids. Plasma lipids were extracted with chloroform: methanol (Folch, 1957), and aliquots of the extracts were taken for the determination of total cholesterol and total phospholipids, and for isolation of neutral lipids and phospholipids subclasses by thin layer chromatography (Ramos *et al.*, 2004, Maldonado *et al.*, 2002). Phospholipids subclasses were isolated with chloroform: methanol: acetic acid: water (50: 10: 10: 5, by vol.), the bands were located by using I₂ vapor and directly scraped into tubes for analysis (Lima *et al.*, 1998). Neutral lipids were isolated with hexane: diethyl ether: acetic acid (90: 25:1, by vol.), and after hexane elution of the identified bands, aliquots of free cholesterol, cholesteryl ester and triglycerides were taken for quantification. Plasma VLDL and LDL were precipitated from high-density lipoprotein (HDL) by the addition of 1.4 mM sodium phosphotungstate with 53.0 mM magnesium chloride, as previously reported (Lima *et al.*, 1998).

Quantification of plasma lipids. Total phospholipids and its subclasses were determined by the chemical method of Bartlett (1959). Cholesterol and triglyceride concentrations were measured by the standard enzymatic colorimetric method used in clinical settings. Cholesterol in the samples was determined by the CHOD-PAP method using the enzymes cholesterol esterase, cholesterol oxidase and peroxidase, according to the manufacturer's instructions (Labtest, MG - Brazil). Triglyceride was measured by the GPO-PAP method using a combination of the reactions catalyzed by lipase, glycerokinase, glycerol phosphate oxidase and peroxidase, as described in

previous work (Sena *et al.*, 2001). VLDL-cholesterol level was estimated as one-fifth of the concentration of triglyceride (Friedewald *et al.*, 1972), and the concentration of LDL-cholesterol was calculated by subtraction of the concentration of HDL-cholesterol plus VLDL-cholesterol from the total plasma cholesterol level (Bergmeyer, 1974).

Statistical analysis. All the analyze were done in duplicate samples. Data are presented as mean $\pm$ SD. Comparison between the groups was performed with Student's *t*-test. The level of significance was set at $P < 0.05$.

RESULTS

Total cholesterol, cholesteryl ester, triglyceride, HDL-cholesterol, LDL-cholesterol and VLDL-cholesterol levels in plasma of animals infected by CAEV is shown in table 1. HDL-cholesterol in plasma of healthy goats was slightly higher than the LDL-cholesterol. Total cholesterol and LDL-cholesterol levels from plasma of infected animals were significantly ($P < 0.005$) increased by 24% and 48%, respectively, in comparison to the control group. Similarly, the concentration of cholesteryl ester was also significantly increased by 14%, in plasma of the infected group ($P < 0.05$). The plasma concentration of triglyceride, HDL-cholesterol and VLDL-cholesterol were similar to those found for the control group.

Figure 1 compares the composition of total phospholipids and its subclasses from plasma of infected goats with those from plasma of control group. Total phospholipids levels in plasma of infected animals were significantly ($p = 0.03$) increased by 20%, in comparison with the control group. The major phospholipid component phosphatidylcholine showed a significant ($P = 0.012$) increase by 15.6%,

in plasma of animals infected by CAEV. Similarly, the concentrations of lysophosphatidylcholine and phosphatidyletanolamine were also significantly increased by 32.9% and 76.7%, respectively, in plasma of the infected group, in comparison to the control group ($P = 0.002$, and $P < 0.0001$, respectively). However, sphingomyeline, the second major phospholipid subclass, from plasma of infected animals was essentially similar to those from plasma of health goats.

Figure 2 compares the molar ratio of lipoprotein cholesterol to total cholesterol in plasma from goats infected by CAEV. HDL/LDL, LDL/HDL, total cholesterol/HDL, total cholesterol/LDL. Plasmas of the infected animals have LDL/HDL molar ratio cholesterol which was significantly higher ($P = 0.02$) than in control group. However, the ratio HDL/LDL from plasma of infected animals was essentially decreased to those from plasma of healthy goats ($P=0.02$).

DISCUSSION

Although CAEV infection is a common virus infection in goats, studies of these goats have given considerable insight into the virus infection but not into the lipoprotein metabolism. Goats with CAEV infection have been reported from a wide geographical distribution including Europe, America and Africa. As far as known, the influence of CAEV infection on the serum lipids of infected goats has not been demonstrated. The animals investigated in this study come from the semi-arid region of Pernambuco, Brazil. It was necessary to search for CAEV infection in a high number of dry female goats ($N = 2700$), in order to select the infected group (without clinical symptoms) and the control group from healthy flocks having the same

management conditions and being sex- and age matched, important to avoid environmental influences on the goat lipids.

Although the content and proportion of plasma lipoproteins differ between mammals (Maldonado *et al.*, 2002), in the vast majority of them, HDL is the predominant fraction (Terpstra *et al.*, 1982, Chapman, 1986). In several mammalian species, the HDL accounts for 50% or more of the total particles of density < 1.21 g/ml in plasma (Chapman, 1986).

Previous works has demonstrated that the macrophage cell is infected by CAEV *in vivo* (Zink and Johnson, 1994) and *in vitro* (Lechner, *et al.*, 1997) and this may interfere in the macrophage functions such as dysregulation of cytokines expression. Previous work has been demonstrated that when macrophages were infected by CAEV the expression of interleukin 8 increases and the binding activity of activator protein-I decreases (Lechner *et al.*, 1997). Previous works in HIV-positive patients demonstrated that two types of cytokines, IL-6 and TNF- α , leads to hyperlipidemia (Constans *et al.*, 1994). TNF- α has been found to play a role in the peroxidation of plasma lipoproteins and lipids in experimental animals and in patients by stimulating the production of reactive oxygen species (Gil *et al.*, 2003). Oxidative modification of plasma red blood fatty acids cells have been found in human infected by HIV (Constans, *et al.*, 1995) and by parasite (Facundo, *et al.*, 2004). Moreover, recent reports describe the presence of oxidized LDL in synovial fluid from rheumatoid arthritis (Dai *et al.*, 1997). Several experimental observations support the role of reactive oxygen species in rheumatoid arthritis, such as increase of lipid peroxidation products and traces of catalytic iron salts in synovial fluid (Rowley *et al.*, 1984), and decrease of ascorbate in serum and synovial fluid (Lunec and Blake, 1985). Due to histopathological similarities, CAEV-induced arthritis serves as a

model for rheumatoid arthritis in humans (Milhau, *et al.*, 2005). Macrophages are the target cells for CAEV infection, and this cell is also responsible for the elimination of LDL from the blood circulation, mainly when LDL is oxidized (Lusis, 2000). Lipid peroxidation may, in part, explain the alteration of cholesterol metabolism in plasma of CAEV infected goats. The increase in LDL-cholesterol may also be explained by a reduction on its clearance. On the other hand, recent evidences indicate that HIV-1 buds selectively from glycolipids-enriched membranes lipids rafts, and host cell cholesterol within these domains are present in high concentration in the viral envelope. Recently, studies have demonstrated that decreasing the levels of antibodies against heat shock proteins in HIV infection, the cholesterol was markedly decreased toward normal values (Füst *et al.*, 2005).

In this study, CAEV infection induced an increase in goat plasma total cholesterol, which was essentially located in the LDL fraction.

The significant increase in plasma total phospholipids characterized by an increase in its main subclass phosphatidylcholine can be related to the inflammatory process, in which CAEV is leashes. The infection by CAEV causes many lesions in various types of cells. It is important to note that phospholipids subclassess are essential component of the cells membranes and the increase in plasma phospholipids found in the CAEV infected goats may lead to an abnormal composition of cell membrane, and consequently may alter the cell function.

Whether the abnormal content of cholesterol within the LDL affects the action of lecithin:cholesterol acyltransferase, an enzyme responsible for the cholesterol esterification in plasma (Lima *et al.*, 2004), remains to be investigated. Nevertheless, the phospholipid substrate for LCAT reaction, phosphatidylcholine, was significantly increased in the CAEV infected goats. LCAT converts free cholesterol

into long-chain cholesteryl esters on HDL (Lima *et al.*, 2004, Glomset, 1972), and promotes free cholesterol movement from tissues to HDL (Jonas, 2000). In subsequent transfers, excess cholesteryl esters are transferred from HDL to LDL. Several studies have clearly demonstrated that high levels of plasma cholesterol associated to the high LDL/HDL cholesterol ratio is a very important risk factor for atherosclerosis (Lusis, 2000). A primary initiating event in atherosclerosis is the accumulation of LDL in the subendotelial matrix. Accumulate on is greater when levels of circulating LDL are raised, and both the transport and retention of LDL are increased in the preferred sites for lesion formation (Lusis, 2000).

Despite the results of this study indicate that there are phospholipids abnormalities and hypercholesterolemia in animals infected by lentiviruse CAEV, the mechanism to which the viruses affect the plasma lipids and/or lipoprotein metabolism remains to be understood. Therefore, new studies are necessary in order to investigate the relationship between plasma lipid concentration and CAEV infection in goats.

Finally, the increase in low density lipoprotein-cholesterol upon infection by CAEV could predispose this group to hypercholesterolemia and to coronary heart disease, and this may have clinical relevance, particularly, to goats post-parturition and/or to those involved in milk production and also in the life expectance this animals.

REFERENCES

Abreu, S.R.O., Castro, R.S., Souza, M.G. (1998). Produção de antígeno nucleoproteico do vírus da artrite - encefalite caprina e comparação com o vírus maedi visna para utilização em teste de imunodifusão em ágar gel. *Pesquisa Veterinária Brasileira*. 18, 57-60.

Adams, D.S. e Gorham, J.R. (1986). The gp 135 of caprine arthritis – encephalitis virus affords greater sensitivity than the p28 in immunodifusion serology. *Research Veterinary Science*. 40, 157-160.

Bartlett, G.R. (1959). Phosphorus assay in column chromatography. *Journal of Biological chemistry*, 243, 466-468.

Bauman, D.E., Perfield, J. W., Veth, M.J., Lock, A.L (2003) New perspectives on lipid digestion and metabolism in ruminants. *Proc. Cornell Nutrition Conference*. 175-189.

Bergmeyer, H. V. *Met. Enzym. Anal.* (1974). 2nd Ed. 4, 1890-1893. Verlag Chemie.

Blacklaws, B.A., Berriatua, E., Torsteinsdottir, S., Watt, N.J., De Andres, D., Klein, D., Harkiss, G.D. Transmission of small ruminant lentiviruses (2004). *Veterinary Microbiology*, 101, 199-208.

Bruhn, J. C. (2003) Dairy research and information center (DRINC). Department of Food Science & Technology, University of California, Davis.
<http://drinc.ucdavis.edu/index.html>

Callado, A.K.C., Castro, R.S. & Teixeira, M.F.S. (2001). Lentivírus de pequenos ruminantes. *Pesquisa Veeterinária Brasileira*. 21, 87-97.

Chapman, M.J. (1986). Comparative analysis of mammalian plasma lipoproteins. In: Segrest, J.P., Alberts, J.J. (Eds), *Methods in Enzymology*. 128A, Academic Press Inc, 70-143.

Constans, J., Pellegrin, J. L., Peuchant, E., Dumon, M.F., Pellegrin, I., Sergeant, C., Simonoff, M., Brossard, G., Barbeau, P., Fleury H., Clerc, M., Leng, B., Conri, C. (1994). Plasma lipids in HIV-infected patients: a prospective stud in 95 patients. *Euopean. Journal of Clinical Investingation*. 24, 416-420.

Constans, J., Peuchant, E., Pellegrin, J. L., Sergeant, C., Hamon, C., Dubourg, L., Thomas, M. J., Simonoff, M., Pellegrin, I., Brossard, G., Barbeau, P., Fleury H., Clerc, M., Leng B., Conri C. (1995). Fatty acids and plasma antioxidants in HIV-positive patients: Correlation with nutritional and immunological status. *Clinical Biochemistry*. 28(4), 421-426.

Dai, L., Zhang, Z., Winyard, P.G., Gaffney, K. Jones, H., Blake, D.R. (1997). A modified form of low density lipoprotein with increased alectronegative charge is

present in rheumatoid arthritis synovial fluid. *Free Radical Biology Medical*. 22, 705-710.

Erasmus, L.J., Bester, Z., Fourie, T., Coertze, R.J., Hall, L (2004). Effect of level of rumen protected CLA supplementation on milk yield and composition in Saanen goats. *South African Journal of Science*. 34, 42-45.

Facundo, H.T.F., Brandt, C.T., Owen, J.S., Lima, V.L.M. (2004). Elevated levels of erythrocyte-conjugated dienes indicate increased lipid peroxidation in schistosomiasis mansoni patients. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, ABDC, 37, 957-962.

Folch, J., Lees, M., Sloane – Stanley, G.H. (1957) A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissue. *Journal of Biological Chemistry*. 226: 497-509.

Friedewald W.T., Levy R.I., Fredrickson D.S. (1972). Estimation of the concentration of low-density lipoprotein cholesterol without the use of preparative ultracentrifuge. *Clinical Chemical*, 18, 499-405.

Füst, G., Beck, Z., Bánhegyi, D., Kocsis, J., Bíró, A., Prohászka, Z. (2005).

Antibodies against heat shock proteins and cholesterol in HIV infection. *Molecular immunology*. 42, 79-85.

- Gil, L., Martínez, G., González, I., Tarinas, A., Álvarez, A., Giuliani, A., Molina, R., Tápanes, R., Pérez, J., León, O.S. (2003). Contribution to characterization of oxidative stress in HIV/AIDS patients. *Pharmacological Research*. 47(3), 217-224
- Glomset, J. A. in: Nelson, G. J (1972). (Ed). Plasma lipids and lipoproteins, *Wiley Interscience*, New York, p. 745-787.
- Goff, D (2005). Dairy Science and Technology – education, University of Guelph, Canada. <http://www.foodsci.uoguelph.ca/dairyedu/chem.html>.
- Haenlein, G.F.W. (2005). Atlas of Goat products – Book Review. In: *Small Ruminant Research*. Available on line: www.elsevier.com/locate/smallrumres.
- Jonas, A. (2000). Lecithin cholesterol acyltransferase. *Biochimica and Biophysica Acta*. 1529, 245-256.
- Krieg, A., and E. Peterhans (1990). Caprine arthritis – encephalitis in Switzerland: epidemiologic and clinical studies. *Schweiz. Archives. Tierheilkd*. 132:345.
- Lechner, F., Machado, J., Bertoni, G., Seow, H.F., Dobbelaere, D.A.E., Peterhans, E (1997). Caprine arthritis encephalitis virus dysregulates the expression of cytokines in macrophages. *Journal of Virology*. 71(10), 7488–7497.

Lima, V. L. M., Gillett, M. P. T., Silva, M. N., Maia, M. M. D., Filho, M. C. (1986). Changes in the lipid composition of erythrocytes during prolonged fasting in lizards (*tropidurus torquatos*) and rat (*rattus norvegicus*) *Comparative Biochemistry and Physiology* 83B (3), 691-695.

Lima, V. L. M., Sena, V. L. M., Stewart, B., Owen, J. S., Dolphin, P. J. (1998). An evaluation of the marmoset *Callithrix jacchus* as an experimental model for the dyslipoproteinemia of human *Schistosomiasis mansoni*. *Biochimica and Biophysica Acta*. 1393, 235-243.

Lima, V.L.M., Coelho, L.C.B.B., Kennedy, J.F., Owen, J.S., Dolphin, P.J. (2004). Lecithin-cholesterol acyltransferase (LCAT) as a plasma glycoprotein: an overview. *Carbohydrates Polimers*. 55, 179 – 191.

Lunec, J., Blake, D. (1985). The determination of dehydroascorbic acid in the serum and synovial fluid of patients with rheumatoid arthritis (RA). *Free Radical Research Communications*. 1, 31-39.

Lusis, A.J. (2000). Atherosclerosis. *Nature*. 407, 233-241.

Maldonado, E.N., Casanave, E.B., Aveldaño, M.I (2002). Major plasma lipids and fatty acids in four HDL mammals. *Comparative Biochemistry and Physiology* 132, 297 – 303.

Milhau, N., Renson, P., Dreesen, I., Greenland, T., Bellaton, C., Guiguen, F., Mornex, J.F., Le Jan C (2005). Viral expression and leukocyte adhesion after in vitro infection of goat mammary gland cells with caprine arthritis-encephalitis virus. *Veterinary Immunology and Immunopathology* 103 93–99.

Mselli-Lakhal, L., Guiguen, F., Fornazero, C., Du, J, Favier, C., Durand, J., Grezel, D., Balleydier, S., Mornex, J.F, Chebloune, Y. (1999). Goat milk epithelial cells are Highly permissive to CAEV infection in vitro. *Virology*. 259, 67-73.

Miller, R.J., Cairns, J.S., Bridges, S., Sarver, N. (2000). Human immunodeficiency virus and AIDS: insights from animal lentiviruses. *Journal of Virology*. 74(16), 7187–7195.

Narayan, O (1989). Immunopathology of lentiviral infections on ungulate animals. *Current Opinion Immunology*. 2, 399-402.

Németh, T., Branduse, L., Ábrahám, M. & Kukovics, S (2004). Factors affecting the profitability of different goat farm sizes in Hungary. *South African Journal of Animal Science*, 34 (Suppl. 1) 126-129.

Preziuso, S., Renzoni, G., Allen, T.E., Taccini, E., Rossi, G., DeMartini, J.C. & Braca, G. (2004). Colostral transmission of maedi visna virus: sites of viral entry in lambs born from experimentally infected ewes. *Veterinary Microbiology* 104: 157–164.

Ramos, T.M.B., Vasconcelos, A.S., Carvalho, V.C.O., Lima, V.L.M. (2004). Alterações nos níveis de colesterol, triglicerídeo e fosfolípídeo total em plasma de *Callithrix jacchus* (sagüi) reinfestado por *Schistosoma mansoni*. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*. 37, 37-40.

Rowley D., Gutteridge J.M.C., Blake, D., Farr, M., Halliwell, B. (1984). Lipid peroxidation in rheumatoid arthritis: thiobarbituric – acid reactive material and catalytic iron salts in synovial fluid from rheumatoid patients. *Clinical Science*. 66, 691-695.

Sandabe, U.K., Mustapha, A.R., Sambo, E.Y (2004). Effect of pregnancy on some biochemical parameters in Sabel goats in Semi – Áride zones. *Veterinary Research Communications*. 28, 279-285.

Sena, V.L.M., Srivastava, R.M., Oliveira, S.P., Lima, V.L.M. (2001). Microwave assisted synthesis of N-arylphthalamic acid hyperlipidemic activity. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, USA. 11, 2671-2674.

Terpstra, A.H.M., Sanchez-Muniz, F. J., West, C.E., Woodward, C.J.H. (1982). The density profile and cholesterol concentration of suerum lipoproteins in domestic and laboratory animals. *Comparative Biochemistry and physiology*. 714B (4), 669-763.

Zink, M. C., and L. K. Johnson. (1994). Pathobiology of lentivirus infections of sheep and goats. *Virus Research*. 32, 139–154.

TABLE

Table 1: Triglyceride, total cholesterol, cholesteryl ester and lipoproteins-cholesterol levels in plasma of goats infected by CAEV.

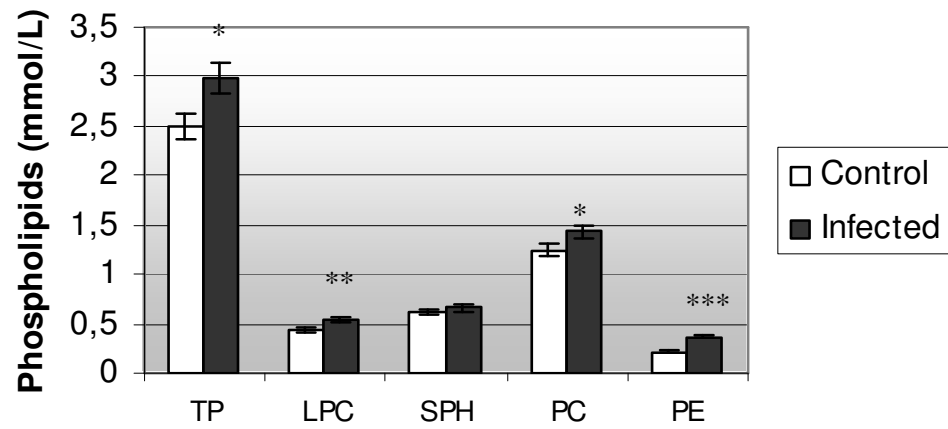
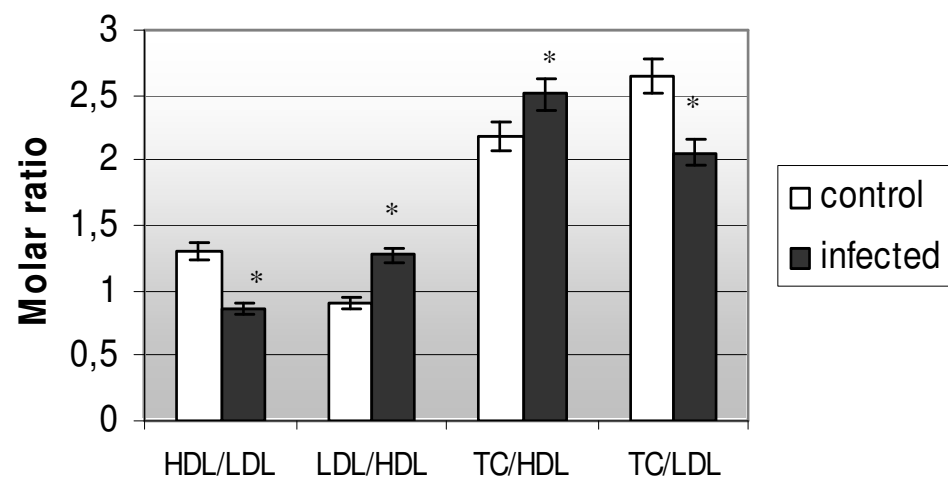
Lipid class	<u>Control group</u>	<u>Infected group</u>
	Content (mmol/l)	Content (mmol/l)
Total cholesterol	2.50 ± 0.36	$3.11 \pm 0.13^*$
Triglyceride	0.68 ± 0.08	0.64 ± 0.08
HDL cholesterol	1.18 ± 0.10	1.24 ± 0.04
LDL cholesterol	1.06 ± 0.38	$1.57 \pm 0.52^*$
VLDL cholesterol	0.31 ± 0.04	0.29 ± 0.04
Cholesteryl ester	1.93 ± 0.29	$2.20 \pm 0.34^{**}$

Data are the mean $\pm$ S.D. from 15 animals in each group. Values significantly different from control group are shown: * $P < 0.005$. ** $P < 0.05$.

LEGENDS FIGURES

Figure 1. Phospholipid levels from plasma of dry female goats infected by CAEV. Total phospholipids (TP), lysophosphatidylcholine (LPC), sphingomyeline (SPH), phosphatidylcholine (PC) and phosphatidyletanolamine (PE) were determined by phosphorus analysis from plasma lipid extracts. Values significantly different from control animals are shown: * $P < 0.05$, ** $p=0.002$, *** $P < 0.0001$.

Figure 2. Comparison of the molar ratio of lipoprotein cholesterol to total cholesterol in plasma from goats infected by CAEV. HDL/LDL, LDL/HDL, total cholesterol/HDL, total cholesterol/LDL. Values significantly different from the control is shown: * $P < 0.05$.

FIGURES**FIGURE 1****FIGURE 2**

IV. CONCLUSÃO

A infecção pelo caprine arthritis encephalitis virus causa anormalidades nas concentrações plasmáticas dos fosfolípidios totais, bem como das suas subclasses. Hipercolesterolemia e o aumento no conteúdo de colesterol das lipoproteínas de baixa densidade também foram fatores observados nos animais infectados pelo lentivírus. Através dos resultados encontrados neste trabalho observamos que a infecção pelo CAEV afeta o metabolismo lipídico animal.

V. REFERÊNCIAS

- BANKS, K.; ADAMS, D.S.; MCGUIRE, T.; CARLSON, J. Experimental infection of sheep by caprine arthritis-encephalitis virus and goats by progressive pneumonia. *Am. J. Vet. Res.* 44, 2307-2311. 1983.
- BLACKLAWS, B.A.; BERRIATUA, E.; TORSTEINSDOTTIR, S.; WATT, N.J.; DE ANDRES, D.; KLEIN, D.; HARKISS, G.D. Transmission of small ruminant lentiviruses. *Veterinary Microbiology*, 101, 199-208. 2004.
- BRODIE, S.J.; MACRON, K.A.; PEARSON, L.D.; ANDERSON, B.C.; DE LA CONCHA-BERMEJILLO, A.; ELLIS, J.A.; DEMARTINI, J.C. Effects of virus load in the pathogenesis of lentivirus induced lymphoid interstitial pneumonia. *J. Infect. Dis.* 166, 531-541. 1992.
- BROWN, M.S. E GOLDESTINE, J.L. Koch's postulates for cholesterol. *Cell.* 71, 187-188. 1992.
- CALLADO, A.K.C.; Castro, R.S.; NASCIMENTO, S.A.; SILVA-RODRIGUES, M.I.M.; PINTO- JÚNIOR, J.H.; TEIXEIRA, M.F.S. Preliminary characterization of the infection of synovial membrane cells by brazilian samples of small ruminants lentiviruses. *Ciência Vet. Trop.* 2(3), 152-159. 1999.
- CASTRO, R.S.; GREENLAND, T.; LEITE, R.C.; GOUVEIA, A.M.J.; MORNEX, J-F.; CORDIER, G. Conserved sequence motifs involving the *tat* reading frame of Brazilian caprine lentiviruses indicate affiliations to both caprine arthritis encephalitis virus and visna-maedi virus. *J. Gen. Virol.* 80, 1583-1589. 1999a.
- CASTRO, R.S.; LEITE, R.C.; RESENDE, M.; MARTINS, A.; GOUVEIA, A.M.G. Caprine arthritis encephalitis virus isolation and identification using fluorescent antibody and polymerase chain reaction. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.* 51(3), 235-240. 1999b.
- CHEEVERS, W.; MCGUIRE, T.; NORTON, L.K.; CORDERY-COTTER, R.; KNOWLES, D. Failure of neutralizing to regulate CAE lentivirus expression *in vivo*. *Virol.* 196, 835-839. 1993.
- CLEMENTS, J.E.; ZINK, M.C. Molecular biology and pathogenesis of animal lentivirus infections. *Clin. Microbiol. Rev.* 9 (1), 100-117. 1996.
- CONCHA-BERMEJILLO A. DE LA. Maedi-visna and ovine progressive pneumonia. *Vet. Clin. North Am.: Food Anim. Pract.* 13, 12-33. 1997.
- CONSTANS, J.; PELLEGRIN, J. L.; PEUCHANT, E.; DUMON, M.F.; PELLEGRIN, I.; SERGEANT, C.; SIMONOFF, M.; BROSSARD, G.; BARBEAU, P.; FLEURY H.; CLERC, M.; LENG, B.; CONRI, C. plasma lipids in HIV-infected patients: a prospective study in 95 patients. *Eur. J. Clin. Investing.* 24, 416-420. 1994.
- CORK, L.C.; HADLOW, W.J.; CRAWFORD, T.B.; GORHAM, J.R.; PIPER, R.C. Infectious leukoencephalomyelitis of young goats. *J. Infec. Dis.* 129, 134-141. 1974.
- CRAWFORD, T.B.; ADAMS, D.S.; CHEEVERS, W.P.; CORK, L.C. Chronic arthritis in goats caused by a retrovirus. *Science* 207, 997-999. 1980.
- DAHLBERG JE, GASKIN JM, PEERK K. Morphological and immunological comparison of caprine arthritis-encephalitis and ovine progressive pneumonia viruses. *J. Virol.* 39, 914-919. 1981.

FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS (FAO): www.fao.org. Acesso: 01.2005.

GAINER, J.; PENNEY, B.; PEARSON, J.; LONG – BRADLEY, P. Wide variation in serum alkaline phosphatase (AP) in goats: comparison with leukocyte counts and with milk CAEV antibody. *J. Leuk. Biol.* 46 (4), 337-338. 1989.

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 virus gene expression increase during maturation of monocytes to macrophages. *J. Virol.* 58, 67-74. 1986.

GILLET, M.P.T.; LIMA-FILHO, A.B.; LIMA-FILHO, J.L.; LIMA, V.L.M. Relationship between plasma lipid and lipoprotein levels and lecithin: cholesterol acyltransferase activity in non-laying domestic hens, *Gallus domesticus*. *Arq. Biol. Tecnol.* 27 (3), 329-339. 1984.

GOLDSTEIN, J. L.; BROWN, M. S. The low density lipoprotein pathway and its relation to atherosclerosis. *Ann. Rev. Biochem.* 46, 987 – 930. 1977.

GORREL, M.D.; BRANDON, M.R.; SHEFFER, D. ADAMS, R.J.; NARAYAN, O. Ovine lentivirus is macrophage-tropic and does not replicate productively in T lymphocytes. *J. Virol.* 66, 2679-2688. 1992.

GREENWOOD, P.L. Effects of caprine arthritis-encephalitis virus on productivity and health of dairy goats in New South Wales, Australia. *Prev. Vet. Med.* 22, 71-87. 1995.

HAASE, A.T. Pathogenesis of lentivirus infections. *Nature.* 322, 130-136. 1986.

HADIGAN, C. MILLER, K.; CORCORAN, C.; ANDERSON, E.; BASGOZ, N.; GRINSPOON, S. Fasting hyperinsulinemia and changes in regional body composition in human immunodeficiency virus – infected women. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 84, 6, 1932-1937. 1999.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA (IBGE). Efetivos dos rebanhos – cabeças. 2003. www.sidra.ibge.gov.br acesso: 02/2005.

JONAS, A. Lecithin cholesterol acyltransferase. *Biochim. Biophys. Acta.* 1529, 245-256. 2000.

KENNEDY-STOSKOPF, S.; NARAYAN, O.; STRANDBERG, J.D. The mammary gland as a target organ for infection with caprine arthritis-encephalitis virus. *J. Comp. Pathol.* 95, 609-617. 1985.

LABTEST DIAGNÓSTICA. Instruções de trabalho, resumo de bancada. Minas Gerais, Brasil. 2003.

LEGASTELOIS, I.; LEROUX, C.; LEVREY, H. & MORNEX, J. F. Bases moléculaires des maladies liées aux lentivirus. *Cahiers Agricultures* 5, 89-98. 1996.

LIMA, V. L. M.; GILLET, M. P. T.; SILVA, M. N.; MAIA, M. M. D.; FILHO, M. C. Changes in the lipid composition of erythrocytes during prolonged fasting in lizards

(*tropidurus torquatos*) and rat (*rattus norvegicus*) *Comp. Biochem. Physiol.* 83B (3), 691-695. 1986.

LIMA, V. L. M.; SENA, V. L. M.; STWART, B.; OWEN, J. S.; DOLPHIN, P. J. An evaluation of the marmoset *Callithrix jacchus* as an experimental model for the dyslipoproteinemia of human *Schistosomiasis mansoni*. *Biochim Bioph. Acta*, v.1393, p.235-243, 1998.

LIMA, V.L.M.; COELHO, L.C.B.B.; KENNEDY, J.F.; OWEN, J.S.; DOLPHIN, P.J. Lecithin-cholesterol acyltransferase (LCAT) as a plasma glycoprotein: an overview. *Carbohydr. Pol.* 55, 179 – 191. 2004.

LOUIE, K.A.; DADGARI, J.M.; DEBOER, B.M.; WEISBUCH, H.; SNOW, P.M.; CHEEVERS, W.P.; DOUVAS, A.; MCMILLAN, M. Caprine arthritis - encephalitis virus infected goats can generate human immunodeficiency virus – gp 120 cross – reactive antibodies. *Virology* 315, 217-223, 2003.

MALDONADO, E.N.; CASANAVE, E.B.; AVELDAÑO, M.I. Major plasma lipids and fatty acids in four HDL mammals. *Comp. Biochem. Physiol.* 132, 297 – 303. 2002.

MASLAK DM, SCHEMERR MJ. Antigenic relatedness between ovine progressive pneumonia virus (OPPV) and VIH-1. *Comp. Immunol. Microbiol. Infect.* 16,103–109. 1993;

McLACHLAN, R.I.; O'DONNELL, L.; MEACHEM, S.J.; STANTON, P.G.; KRETZER, D.M.; PRATIS, K.; ROBERTSON, D.M. Identification of specific sites of hormonal regulation in spermatogenesis in rats, monkeys and man. *Rec. Prog. Horm. Res.* 57, 149 –179. 2002.

MARCHESIN, D.M.; MOOJEN, V.; RAVAZZOLO, A.P. Caracterização molecular parcial do gene *gag* de amostras do vírus da artrite-encefalite caprina (CAEV) isoladas de animais naturalmente infectados no Rio Grande do Sul, Brasil. *Pesq. Vet. Bras.* 18, 119-126. 1998.

MEYER, L.; RABAUD, C.; ZIEGLER, O.; MAY, T.; DROUIN, P. Protease inhibitors, diabetes mellitus and blood lipids. *Diab. Metab.* 24(6), 547-549. 1998.

MILLER, R.J.; CAIRNS, J.S.; BRIDGES, S.; SARVER, N. Human immunodeficiency virus and AIDS: insights from animal lentiviruses. *J. Virol.* 74(16), 7187–7195. 2000.

MOOJEN, V.; SOARES, H.C.; RAVAZZOLO, A.P.; PIZZOL, M.; GOMES, M. Evidência de infecção pelo lentivirus (maedi/visna – Artrite-encefalite Caprina) em caprinos no Rio Grande do Sul, Brasil. *Arq. Fac. Med. Vet. UFRGS* 1, 77- 78. 1986.

NAKAGAWA, M.; MOTOI, Y.; IIZUKA, M.; AZUMA, R. Histopathology of enzootic chronic polyarthritis of goats in Japan. *Nat. Inst. Animal Health Quarterly* 11, 191-200. 1971.

NARAYAN, O.; JOAG, S.V.; CHEBLOUNE, Y.; ZINK, M.C.; CLEMENTS, J.E. Visna-maedi: the prototype lentiviral disease. *Viral Path.*, p. 657-668. Edited by N. NATHANSON. Lippincott-Raven, Philadelphia. 1997

NARAYAN, O. Immunopathology of lentiviral infections on ungulate animals. *Curr. Opin. Immunol.* 2, 399-402. 1989.

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

- NORD, K. & ADONONYT, T. Effects of infection by caprine arthritis encephalitis virus on milk production of goats. *J. Dairy Sci.* 80 (10), 2391-2397. 1997.
- OLIVER, R.; CATHCART, A.; MCNIVEN, R.; POOLE, W. & ROBATI, G. Infection of lambs with CAEV by feeding milk from infected goats. *Vet. Rec.* 19, 83. 1985.
- PREZIUSO, S.; SANNA, E.; SANNA, M.P.; LODDO, C.; CERRI, D.; TACCINI, E.; MARIOTTI, F.; BRAÇA, G.; ROSSI, G.; RENZONI, G. Association of maedi visna vírus whit Burcella ovis infection in rams. *Eur. J. Histochem.* 47, 151-158. 2003.
- PYPER JM, CLEMENTS JE, MOLINEAUX SM, NARAYAN O. Genetic variation among lentiviruses: homology between visna virus and caprine arthritisencephalitis virus is confined to the 5'gag pol region and a small portion of the env gene. *J. Virol.* 51, 713-721. 1986.
- RAMOS, T.M.B.; VASCONCELOS, A.S.; CARVALHO, V.C.O.; LIMA, V.L.M. Alterações nos níveis de colesterol, triglicérido e fosfolípido total em plasma de *Callithrix jacchus* (sagüi) reinfectado por *Schistosoma mansoni*. *Rev. Socied. Bras. Med. Trop.* 37, 37-40. 2004.
- RAJYA, B.S. & SINGH, C. M. The pathology of pneumonia and associated respiratory disease of sheep and goats. I. Occurrence of Jaagsiekte and Maedi in sheep and goats in India. *Am. J. Vet. Res.* 25:61-67. 1964.
- RAVAZZOLO, A.P.; RUTKOSKA J.K., WERENICZ R., REISCHAK D., WENDELSTEIN A.C., MOOJEN, Detecção da infecção pelo vírus da artrite-encefalite caprina: imunodifusão em ágar e reação em cadeia da polimerase com "primers" degenerados *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.* 53(6), 635-640. 2001.
- ROLLAND, M.; CHAUVINEAU, C.; STEPHEN, V.; MAMOUN, R.Z.; PERRIM, G. Establishment and characterization of a goat synovial membrane cell line susceptible to small ruminant lentivirus infection. *J. Virol. Met.* 118, 123-130. 2004.
- RUBY P, GOGOLEWSKI D, SCOTT A, TRAVIS C, MCGUIRE TC, KEITH LB, CHEEVERS WP. Antigenic cross-reactivity between caprine arthritisencephalitis, visna and progressive pneumonia viruses involves all virion-associated proteins and glycoproteins. *J. Gen. Virol.* 66, 1233-1240. 1985.
- RYAN, D. P.; GREENWOOD, P. L.; NICHOLLS, P. J. Effect of caprine arthritis – encephalitis virus infection on milk cell count and N-acetyl- β -glucosaminidase activity in dairy goats. *J. Dairy Res.* 60(3), 299-306, 1993.
- RYAN, S.; TILEY, L.; McCONNELL, I.; BLACKLAWS, B. Infection of dendritic cells by the maedi-visna lentivirus. *J. Virol.* 74, 10096-10103. 2000.
- SANDABE, U.K.; MUSTAPHA, A.R.; SAMBO, E.Y. Effect of pregnancy on some biochemical parameters in Sabel goats in Semi – Áride zones. *Veter. Res. Communic.* 28, 279-285. 2004.
- SOTOMAIOR, C. & MILCZEWSKI, V. Relato de um rebanho ovino infectado pelo vírus maedi-visna no Estado do Paraná. In: XXV Congr. Bras. Med. Vet. p.179.1997. (Resumo)
- STÜNZI, H.; BÜCH, H.F.; LE ROY, H.L. & LEEMANN, W. Endemische arthritis chronica bei Ziege. *Schweizer Archiv Fürur T-ierärkunden* 106:778-788. 1964.

TRAVASSOS, C.; BENOIT, C.; VALAS, S.; DA SILVA, A.; PERRIN, G. Detection of caprine arthritis-encephalitis virus in sperm experimentally infected bucks. *Vet. Res.* 29, 579-584. 1998.

WEINHOLD, E.; MÜLLER, A. & LEUCHTE, S. Visna-virus-ähnliche Partikel in der Kultur von Plexus chorioideus-Zellen einer Ziege mit visna-Symptomen. *Zbl. Vet. Med. B.* 21, 32-36. 1974.

YANOVSKI, J. A.; MILLER, K. D.; KINO, T.; FRIEDMAN, T. C.; CHROUSOS, G. P.; TSIGOS, C.; FALLOON, J. Endocrine and metabolic evaluation of human immunodeficiency virus-infected patients with evidence of protease inhibitor-associated lipodystrophy. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 84(6), 1925-1931. 1999.

VI. ANEXOS



INFLUENCIA DA INFECÇÃO POR LENTIVIRUS DE PEQUENOS RUMINANTES NOS NÍVEIS LIPÍDICOS PLASMÁTICOS EM REBANHOS CAPRINOS DE PERNAMBUCO / BRASIL



Ana Karina C. Callado ¹; *Amanda S. Vasconcelos ¹; Roberto S. de Castro ² e Vera L. M. Lima ¹.

¹Departamento de Bioquímica - CCB - UFPE. ²Departamento de Medicina Veterinária - UFRPE - Av. Prof. Moraes Rego, s/n - Cidade Universitária - Recife / PE. Fone: (81)3271.8540. CEP 50670-420. E-mail: vlml@ufpe.br

Influence of small ruminant lentivirus infection on lipids levels serum in caprine flock Pernambuco/Brazil

The present study aimed to evaluate the cholesterol, phospholipids and triglycerides levels in caprine flock from Pernambuco/Brazil. Serum from animals were analyzed by immunological method (ELISA) for the presence of lentivirus antibodies. The plasma high-density lipoprotein (HDL) was isolated by selective precipitation of low-density lipoprotein (LDL) and very low-density lipoprotein (VLDL) with phosphotungstic acid (1.4 mmol/L) and MgCl (53 mmol/L). Plasma total cholesterol, cholesterol HDL (HDL-C) and triglyceride was analyzed by enzymatic assay, while, VLDL (VLDL-C) was measured by Friedwald Equation. The total phospholipids were measured by chemical method (Bartlett, 1959). Total cholesterol, total phospholipids and LDL-C levels from the infected animals were significantly higher. However, the concentration of triglycerides, HDL-C and VLDL-C were similar to those of the control group. The results suggest that the infection by lentivirus affects the lipid metabolism mainly of LDL.

Introdução

Caprine arthritis-encephalitis virus (CAEV) e maedi-visna são lentivírus de pequenos ruminantes que infectam caprinos e ovinos, respectivamente ^[1]. Esses vírus pertencem a família Retroviridae e particularmente o CAEV possui similaridades estruturais e biológicas com o vírus da imunodeficiência humana (HIV) ^[2]. Enquanto o HIV infecta e prejudica o sistema imune humano, apresentando consequências devastadoras em seus hospedeiros, o CAEV causa doença degenerativa crônica em caprinos de todas as raças e idades ^[3]. A patologia pode se manifestar na forma artrítica, respiratória mamária e nervosa, ou mesmo atingir vários órgãos, devido à replicação viral em células da linhagem fagocítico monocitária.

A transmissão entre os animais dá-se principalmente pela ingestão do leite contaminado ^[4]. Porém, estudos feitos por Mselli-Lakhal *et al.* ^[5] têm demonstrado que são necessários receptores funcionais para que o CAEV infecte células humanas.

Para melhor conhecimento da fisiopatologia das lentiviroses tem sido proposto o estudo

sobre o metabolismo lipídico. O perfil lipídico tem sido usado para prever problemas periparto, diagnóstico de doenças metabólicas e o estado nutricional dos animais ^[6]. Além de que, alguns estudos têm proposto o uso de hepatócitos de caprinos em xenotransplantes, visto que possuem uma grande similaridade com as células hepáticas humana ^[7].

Neste trabalho foi avaliado o efeito da infecção por lentivírus de pequenos ruminantes sobre os níveis plasmáticos do colesterol e fosfolípidos totais, bem como dos triglicerídios e lipoproteínas em caprinos do estado de Pernambuco - Brasil.

Experimental

O soro de 1344 animais distribuídos em 26 rebanhos do estado de Pernambuco foi analisado por ensaio imunológico (ELISA) para detectar a presença de anticorpos contra o lentivírus.

Foram colhidas amostras de sangue de animais infectados e não infectados, por punção venosa após jejum de 12 horas. Essas amostras foram anticoaguladas com EDTA

para a análise dos lipídios. O plasma foi isolado por centrifugação a 2.500 x g, por 15 min.

As lipoproteínas de alta densidade do plasma (HDL) foram isoladas das lipoproteínas de baixa (LDL) e muito baixa densidade (VLDL) por precipitação seletiva com ácido fosfotungístico (1,4 mmol/L) e MgCl (53 mmol/L). Após a precipitação, as lipoproteínas LDL e VLDL foram removidas por centrifugação a 2500 x g por 10 min. O colesterol da HDL-C foi determinado no sobrenadante como descrito em trabalho anterior [8].

O colesterol total e os triglicerídeos foram mensurados pelo método enzimático colorimétrico, enquanto que a concentração dos fosfolipídios totais foi determinada pelo método químico de Bartlett [9]. Os níveis de colesterol da LDL e VLDL foi determinado pela equação de Friedwald [10].

Resultados e Discussão

A análise pelo método do imunoensaio mostrou que 23% (N = 309) dos animais estudados apresentaram-se infectados pelo lentivírus e essa contaminação estava distribuída em 77% dos rebanhos (N = 20). Os níveis de colesterol total e o colesterol da LDL nos animais infectados foram significativamente ($p < 0.005$) aumentados, sendo este aumento em torno de 21.6% e 33.2%, respectivamente. O mesmo foi observado com relação à concentração de fosfolipídios e o aumento observado foi de 20.1%, quando comparados os níveis dos animais infectados com o grupo controle. Também foi observada uma redução nos níveis de triglicerídeos e colesterol da VLDL, porém a diferença não teve significância ($p = 0.22$). Já o colesterol da HDL apresentou discreto aumento que também mostrou ser similar ($p = 0.09$) ao grupo controle (tabela 1).

As lentiviroses apresentam alguns quadros dramáticos em seus hospedeiros específicos [11].

Em caprinos saudáveis e em algumas outras espécies animais, porém não em humanos, uma porção substancial do colesterol plasmático está localizada na fração lipoprotéica da HDL [12]. Por outro lado, neste estudo, o colesterol plasmático apresentou-se aumentado, mas não significativamente, na fração HDL, mostrando, todavia, um aumento

substancial em animais infectados como o lentivírus, na fração LDL das lipoproteínas.

A infecção pelo CAEV causa muitas lesões em vários órgãos e tecidos. Sabe-se que os fosfolipídios são elementos fundamentais na composição das membranas celulares.

Essa ação invasiva do vírus pode ser uma das explicações para que os níveis de fosfolipídios totais plasmáticos estivessem aumentados em animais infectados ($p = 0.03$) quando comparados aos níveis dos animais do grupo controle.

Esse distúrbio no metabolismo do colesterol pode, ainda, estar relacionado com a ação de uma enzima plasmática, a lecitina colesterol aciltransferase (LCAT), que converte o colesterol livre em ésteres de colesterol na HDL, promovendo, assim, a retirada do excesso de colesterol dos tecidos para dentro desta lipoproteína [13,14].

Apesar dos resultados encontrados neste estudo, outros trabalhos precisam ser feitos, visto que, o mecanismo do metabolismo do colesterol nesta patologia permanece desconhecido.

Tabela 1: concentração plasmática dos lipídios em caprinos infectados com o CAEV e do grupo controle

Lipídios		
Colesterol Total	3.92 ± 0.56	$4.75 \pm 0.81^*$
Triglicerídeos	0.68 ± 0.08	0.64 ± 0.08
Fosfolipídios Totais	2.49 ± 0.64	$2.99 \pm 0.56^*$
HDL	1.18 ± 0.04	1.23 ± 0.12
LDL	2.43 ± 0.57	$3.23 \pm 0.81^*$
VLDL	0.31 ± 0.03	0.29 ± 0.04

Conclusões

Os resultados sugerem que a infecção dos caprinos pelo lentivírus – Caprine Arthritis encephalitis vírus - afeta o metabolismo lipídico e das lipoproteínas, porém a relação entre a concentração plasmática dos lipídios e a saúde / doença nesses animais é ainda desconhecida.

Agradecimentos

Agradecemos ao CNPq pelo suporte financeiro

Referências Bibliográficas

- [1] Narayan, O & Clements, J. E. Biology and pathogenesis of lentiviruses. **J. Gen. Virol.**, v.70, p. 1617-1639, 1989.
- [2] Miller, R. J.; Cirns, J. S.; Bridges, S.; Sarver, N. **J. Virol.**, v.74, n. 16, p. 7187-7195, 2000.
- [3] Narayan, O.; Joag, S. V.; Chebloune, Y.; Zink, M. C.; Clements, J. E. **Viral Path.**, 1997, p. 657-668. Edited by N. Nathanson. Lippincott-Raven, Philadelphia.
- [4] Straub, O. C. **Comp. Immunol. Microbiol. Infect. Dis.**, v.27 (1), p. 1-5.
- [5] Mselli-Lakhal, L.; Favier, C.; Leung, K. **J. Virol.**; 74: 8343-8. 2000
- [6] Lima, V. L. M.; Gillett, M. P. T.; Silva, M. N.; Maia, M. M. D.; Filho, M. C. **Comp. Biochem. Physiol.** v. 83B, n°3, p.691-695, 1986.
- [7] Habibullah CM. In: Mito M, Sawa M, eds. **Hepatocyte Transplantation.** Japan: Karger Landes Systems. p. 312-24, 1997
- [8] Lima, V. L. M.; Sena, V. L. M.; Stewart, B.; Owen, J. S.; Dolphin, P. J. **Biochimica and Biophysica Acta**, v.1393, p.235-243. 1998.
- [9] Bartlett, G. R. **J. Biol. Chem.**, v.234, p.466-468, 1959.
- [10] Bergmeyer, H. V. **Methods of Enzymatic Analysis.** 2nd Ed, vol. 4, pp. 1890-1893. Verlag Chemie. 1974.
- [11] Clements, J. E.; Zink, M. C. **Clin. Microbiol. Rev.** 9 (1), p. 100-117, 1996.
- [12] Terpstra, A. H. M.. **Anal. Biochem.** 150, 221-227, 1985.
- [13] Glomset, J. A. in: Nelson, G. J. (Ed). Plasma lipids and lipoproteins, **Wiley Interscience**, New York, p. 745-787, 1972
- [14] Fielding, C. J., Fielding, P. E. **J.Lipid Res.** 36, p. 211-228, 1995.

