

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MICROBIOLOGIA
TESE DE DOUTORADO

**Caracterização molecular e análise filogenética de
regiões parciais do genoma do *Equine infectious
anemia virus* circulante em equídeos brasileiros**

ANDREIA ELISA CURSINO

Belo Horizonte, 08 de março de 2019

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MICROBIOLOGIA
TESE DE DOUTORADO

**Caracterização molecular e análise filogenética de
regiões parciais do genoma do *Equine infectious
anemia virus* circulante em equídeos brasileiros**

ANDREIA ELISA CURSINO

**Tese de Doutorado apresentada ao Programa
de Pós-Graduação em Microbiologia do
Instituto de Ciências Biológicas da
Universidade Federal de Minas Gerais**

Orientadora: Profa. Dra. Erna Geessien Kroon

Belo Horizonte, 08 de março de 2019

043

Cursino, Andreia Elisa.

Caracterização molecular e análise filogenética de regiões parciais do genoma do Equine infectious anemia virus circulante em equídeos brasileiros [manuscrito] / Andreia Elisa Cursino. - 2019.

316 f. : il. ; 29,5 cm.

Orientadora: Prof.^a. Dr.^a Erna Gessien Kroon.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Minas Gerais, Instituto de Ciências Biológicas. Programa de Pós-graduação em Microbiologia.

1. Microbiologia. 2. Anemia Infeciosa Equina. 3. Reação em Cadeia da Polimerase. 4. Filogenia. I. Kroon, Erna Gessien. II. Universidade Federal de Minas Gerais. Instituto de Ciências Biológicas. III. Título.

CDU: 579



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MICROBIOLOGIA

ATA DA DEFESA DE TESE DE ANDREIA ELISA CURSINO
Nº REGISTRO: 2015705729

Às 14 horas do dia 08 de março de 2019, reuniu-se, no Instituto de Ciências Biológicas da UFMG, a Comissão Examinadora composta pelos Drs. Paulo César Peregrino Ferreira (Laboratório de vírus/Departamento de Pós-Graduação em Microbiologia/ICB/UFMG), Maria Isabel Maldonado Coelho Guedes (Escola de Veterinária/UFMG), Pedro Augusto Alves (Centro de Pesquisas René Rachou/Fundação Oswaldo Cruz/Belo Horizonte/MG), Daniel Moura de Aguiar (Faculdade de Medicina Veterinária/Universidade Federal de Mato Grosso) e a Profa. Erna Geessien Kroon - Orientador, para julgar o trabalho final, da aluna **Andreia Elisa Coursino**, requisito final para a obtenção do Grau de **DOCTOR EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS: MICROBIOLOGIA**. Abrindo a sessão, o Presidente da Comissão, Prof. Flávio Guimarães da Fonseca - Coordenador do Programa, após dar a conhecer aos presentes o teor das Normas Regulamentares do Trabalho Final, passou a palavra ao candidato, para a apresentação de seu trabalho. Seguiu-se a arguição pelos Examinadores, com a respectiva defesa do candidato. Logo após, a Comissão se reuniu, sem a presença do candidato e do público, para julgamento e expedição de resultado final. O candidato foi considerado **APROVADO**. O resultado final foi comunicado publicamente ao candidato pelo Presidente da Comissão. Nada mais havendo a tratar, o Presidente encerrou a reunião e lavrou a presente ata, que será assinada por todos os membros participantes da Comissão Examinadora. Belo Horizonte, 08 de março de 2019.

Dr. Paulo César Peregrino Ferreira

Profa. Dra. Maria Isabel Maldonado Coelho Guedes

Dr. Pedro Augusto Alves

Prof. Dr. Daniel Moura de Aguiar

Profa. Dra. Erna Geessien Kroon (Orientadora)

Prof. Flávio Guimarães da Fonseca
Coordenador

AGRADECIMENTOS

Agradeço a todas as pessoas que de alguma forma contribuíram para este trabalho.

Agradeço a Deus pela vida, pela força para enfrentar todos os desafios e dificuldades durante esta etapa da minha vida.

Agradeço a minha família que eu tanto amo. Aos meus pais Neide e Eduardo pelo amor e dedicação em cuidar da nossa família, pelo exemplo de trabalho e perseverança na vida, quem eu sou hoje é graças ao exemplo e amor de vocês. As minhas irmãs Priscilla e Fernanda pela amizade e carinho, obrigada por fazerem parte da minha vida e serem tão especiais pra mim. Aos meus sobrinhos Carolina e Gustavo, por trazerem tanto amor e alegria pra nossa família. Ao Edson, pelo amor, companheirismo, incentivo, por me apoiar sempre, pelo entusiasmo com cada conquista minha durante a execução deste trabalho, por tentar entender o que eu faço dando sempre opiniões, e pela contribuição para a execução das figuras e formatação deste trabalho. Ao Bóris por ser um cãozinho tão amoroso e companheiro e trazer tanta alegria para nossa vida.

Agradeço a minha amiga Tamara, que eu conheci no laboratório de vírus e desde então nos tornamos grandes amigas, obrigada pela amizade, por compartilharmos tantos momentos de alegria juntas, obrigada por me ouvir durante horas, por me apoiar nos momentos difíceis e pelas palavras de incentivo e apoio, fundamentais durante este período. Agradeço a Grazi, pela amizade e carinho, pelo exemplo de dedicação e amor a pesquisa. Obrigada pelas inúmeras vezes em que você me ouviu e me aconselhou, e pela ajuda constante para este trabalho.

Agradeço a minha orientadora Dra. Erna Geessien Kroon, pela oportunidade, pelo exemplo de dedicação a pesquisa e ao Laboratório de vírus, pelos ensinamentos. Obrigada pela paciência em me ouvir e entender minhas preocupações, e me fazer enxergar que sempre podemos ir além.

Agradeço a todos os colegas e amigos do laboratório de vírus durante o tempo em que estive no Laboratório desde 2010, obrigada pela convivência e por tudo que eu aprendi durante esse tempo, seria difícil citar cada um nominalmente. Agradeço a todos que de alguma forma contribuíram para este trabalho. Ao Maurício pela paciência e pelas valiosas discussões, por ter contribuído grandemente para esse trabalho, analisando os resultados, dando sugestões, e por toda a ajuda durante a escrita da tese. A Izabela por todas as contribuições, pelas discussões e ajuda com os experimentos, obrigada por tudo. Ao Rodrigo pela ajuda com experimentos e por todas as valiosas discussões. A Ana Paula Moreira pela ajuda constante durante este trabalho e pela paciência em me ouvir.

Agradeço aos professores do Laboratório de vírus Dr. Cláudio Antônio Bonjardim, Dr. Paulo César Peregrino Ferreira, Dra. Giliane de Souza Trindade, Dr. Jônatas Santos Abrahão e Dra. Betânia Paiva Drumond por todo o conhecimento e dedicação ao Laboratório de vírus.

Agradeço a Dra. Márcia Furlan Nogueira Tavares de Lima ao Dr. Daniel Moura de Aguiar, e ao Dr. Bruno Marques Teixeira e a Viviane Maria Dias Costa por cederem as amostras para a execução deste trabalho.

Agradeço ao relator deste trabalho Dr. Rodrigo Araújo Lima Rodrigues. Agradeço a banca por ter aceitado o convite e se dispor a contribuir para este trabalho, ao Dr. Paulo César Peregrino Ferreira, ao Dr. Pedro Augusto Alves, a Dra. Maria Isabel Maldonado Coelho Guedes e ao Dr. Daniel Moura de Aguiar.

A CAPES, CNPq e FAPEMIG pelo auxílio financeiro para a execução deste trabalho.

RESUMO

A Anemia infecciosa equina (AIE) é uma doença que acomete todos os membros da família *Equidea*, causada pelo retrovírus *Equine infectious anemia virus* (EIAV). A AIE é uma doença de ocorrência mundial, sendo uma das 11 doenças de equídeos de notificação obrigatória pela Organização Mundial de Saúde Animal (OIE). A AIE encontra-se amplamente disseminada no território brasileiro, apresentando uma elevada soroprevalência no Pantanal. O diagnóstico da AIE é feito principalmente empregando o teste de imunodifusão em gel de agar (IDGA). Embora a AIE tenha sido descrita há mais de 150 anos, existem poucas sequências de genoma completo do EIAV disponíveis no GenBank, o que tem impacto nos estudos de detecção e caracterização molecular do vírus. Assim, o objetivo deste estudo foi detectar, caracterizar molecularmente e analisar filogeneticamente o EIAV circulante em amostras de campo de equídeos brasileiros. Para isso foram desenhados iniciadores e desenvolvidas Reações em Cadeia da Polimerase (PCRs) para a amplificação de diferentes regiões do genoma proviral do EIAV em amostras clínicas de equídeos do Pantanal brasileiro, e do estado do Ceará. O DNA amplificado nestas reações foi sequenciado e as sequências nucleotídicas foram empregadas para estudos de alinhamento do genoma e análise filogenética. Foram obtidas sequências nucleotídicas para duas regiões parciais do genoma do EIAV, sendo 23 para a região 5' LTR ao exon 1 do gene *tat*, e 61 para o exon 1 do gene *tat* ao gene *gag*. Também foi feita a caracterização molecular de regiões parciais do genoma de uma amostra do Pantanal, sendo uma sequência nucleotídica completa da ORF *tat*, e sequências parciais da região 5' LTR, dos genes *gag*, *pol*, e *env*, e da ORF S2. A análise filogenética das sequências nucleotídicas para as diferentes regiões do genoma analisadas apresentou diferentes resultados. Na maioria das análises das sequências parciais as amostras de equídeos brasileiros sempre agrupam separadamente das demais sequências mundiais de EIAV. Na análise das sequências das amostras brasileiras e mundiais foram observadas várias substituições nucleotídicas e mutações de aminoácidos. Para avaliar o status sorológico dos equídeos foram empregados os testes IDGA, ELISA gp90 e ELISA p26. Portanto, os dados obtidos neste trabalho contribuem com novas informações sobre a diversidade genética do genoma do EIAV, e destaca a importância da caracterização do EIAV para o desenvolvimento de métodos moleculares para o diagnóstico da AIE em complementação aos testes sorológicos atualmente utilizados. Além disso, os resultados sorológicos demonstram a maior sensibilidade dos testes ELISAs empregados neste estudo em comparação ao IDGA utilizado para o diagnóstico da AIE.

Palavras-chave: Anemia infecciosa equina, Equine infectious anemia vírus, PCR, caracterização molecular, análise filogenética.

ABSTRACT

The Equine infectious anemia (EIA) is a disease that affects all members of the *Equidea* family, caused by the retrovirus *Equine infectious anemia virus* (EIAV). EIA presents a worldwide distribution, being one of the eleven diseases of compulsory notification by the World Organisation for Animal Health (OIE). The EIA is widely disseminated in the Brazilian territory, presenting a high seroprevalence in the Pantanal. The diagnosis of EIA is mainly made using agar gel immunodiffusion (AGID). Although the EIA has been described for more than 150 years, there are few complete EIAV genome sequences available in GenBank which has an impact on the molecular characterization and detection studies of the virus. Considering the shortage of EIAV sequences, the studies of detection and molecular characterization of EIAV are important. Therefore, the objective of this study is to detect, molecularly characterize and analyze phylogenetically the circulating EIAV in equidae from Brazil. For this, primers were designed and Polymerase Chain Reactions (PCRs) were developed for the amplification of different regions of the EIAV proviral genome in clinical samples of equidae from the Brazilian Pantanal of the states of Mato Grosso and Mato Grosso do Sul, and equidae from the state of Ceará. The amplified DNA in these reactions was sequenced and the nucleotide sequences were employed for genome alignment studies and phylogenetic analysis. We obtained nucleotide sequences for two partial regions of the EIAV genome, being 23 for the 5'LTR region to the exon 1 of *tat*, and 61 for the exon 1 of the *tat* to the *gag* gene. Also, the molecular characterization of partial regions of the genome from a Pantanal sample, which were a complete nucleotide sequence of ORF *tat*, and partial sequences of *gag*, *pol* and *env* genes, and of ORF S2. The phylogenetic analysis of nucleotide sequences for different regions of the genome analyzed shows that different results. In most partial sequence analyzes of the Brazilian equines samples always group separately from the other EIAV world sequences. In the analysis of the sequences of the Brazilian and world samples several nucleotide substitutions and mutations of amino acids were observed. To evaluate the serological status of the equine samples were employed the tests IDGA, ELISA gp90 and ELISA p26. Therefore, the data obtained in this work contribute with new information on the genetic diversity of the EIAV genome, and highlights the importance of characterizing the EIAV for the development of molecular methods for the diagnosis of EIA in addition to the serological tests currently used. In addition, the serological results demonstrate the greater sensitivity of the ELISAs used in this study compared to the IDGA utilized for the diagnosis of EIA.

Key words: Equine infectious anemia, Equine infectious anemia virus, PCR, molecular characterization, phylogenetic analysis.

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1: Mapa da distribuição mundial da AIE no período de janeiro a junho de 2018	27
FIGURA 2: Representação da estrutura da partícula e do genoma do <i>Equine infectious anemia virus</i> (EIAV).....	31
FIGURA 3: Caracterização da região LTR do EIAV	33
FIGURA 4: Caracterização da proteína <i>tat</i> do EIAV.....	34
FIGURA 5: Representação do ciclo de multiplicação do <i>Equine infectious anemia virus</i>	37
FIGURA 6: Representação do processo de transcrição do RNA viral dos retrovírus.....	40
FIGURA 7: Estrutura da região LTR do RNA e DNA viral nos diferentes estágios do ciclo de multiplicação viral	41
FIGURA 8: Árvore filogenética de sequências de genoma completo do EIAV norte-americanas, asiáticas e europeias.	44
FIGURA 9: Árvore filogenética de 12 sequências nucleotídicas de 910 pb do EIAV de amostras de cavalos Misaki do Japão	48
FIGURA 10: Árvore filogenética da sequência do Japão Miyazaki para a região LTR (a), o genes <i>gag</i> (b), <i>pol</i> (c) e <i>env</i> (d)	49
FIGURA 11: Árvore filogenética de 11 sequências nucleotídicas do gene <i>gag</i> do EIAV de 10 amostras do Canadá e uma da Argentina	54
FIGURA 12: Árvore filogenética de 34 sequências nucleotídicas do gene <i>gag</i> do EIAV de amostras da Itália e Romênia	55
FIGURA 13: Árvore filogenética de quatro sequências nucleotídicas do gene <i>gag</i> do EIAV de amostras da Carolina do Norte-EUA e duas sequências do Brasil	57

FIGURA 14: Árvore filogenética de três sequências nucleotídicas do gene <i>gag</i> do EIAV de amostras da Bélgica.....	58
FIGURA 15: Árvore filogenética de 22 sequências nucleotídicas da região 5' LTR ao gene <i>gag</i> do EIAV de amostras da Eslovênia.....	59
FIGURA 16: Árvore filogenética de 28 sequências nucleotídicas do gene <i>gag</i> do EIAV de amostras da Eslovênia.....	61
FIGURA 17: Árvore filogenética de 15 sequências nucleotídicas do gene <i>gag</i> do EIAV de amostras da Bahia-Brasil.....	62
FIGURA 18: Árvore filogenética de 14 sequências nucleotídicas do gene <i>gag</i> do EIAV de amostras da França.....	64
FIGURA 19: Árvore filogenética de duas sequências nucleotídicas para a região 5' LTR ao exon 1 do gene <i>tat</i> do EIAV de amostras da Mongólia.....	65
FIGURA 20: Insetos hematófagos.....	71
FIGURA 21: Estágios da Anemia Infecciosa Equina.....	76
FIGURA 22: Cinética da resposta imune adaptativa em equídeos infectados com EIAV.....	78
FIGURA 23: Leitura do teste IDGA.....	81
FIGURA 24: Localização das 11 sub-regiões do Pantanal nos estados de Mato Grosso e Mato Grosso do Sul, região Centro-Oeste do Brasil.....	94
FIGURA 25: Localização dos municípios do estado do Ceará, região Nordeste do Brasil.....	99
FIGURA 26: Representação dos iniciadores empregados para amplificação do DNA proviral do EIAV e indicação no genoma do EIAV.....	117
FIGURA 27: Identificação da sequência dos iniciadores para as regiões LTR, <i>tat</i> e <i>gag</i> no alinhamento das sequências nucleotídicas do EIAV.....	118

FIGURA 28: Gradiente de temperatura da snPCR LTR–tat para amplificação de DNA proviral do EIAV na região 5' LTR ao exon 1 do gene <i>tat</i> (iniciadores EIAVltr-4F, EIAVltr-1R e EIAVltr-2R)	121
FIGURA 29: Teste de amostras e sensibilidade da snPCR LTR–tat para amplificação de DNA proviral do EIAV na região 5' LTR ao exon 1 do gene <i>tat</i> (iniciadores EIAVltr-4F e EIAVltr-2R)	122
FIGURA 30: Gradiente de temperatura da PCR para amplificação de DNA proviral do EIAV na região 5' LTR ao exon 1 do gene <i>tat</i> (iniciadores EIAV-LTR-28-F e EIAV-tat-405-1R)	123
FIGURA 31: Gradiente de temperatura empregado na PCR para amplificação de DNA proviral do EIAV na região 5' LTR ao gene <i>gag</i> (iniciadores EIAV-LTR-28-F e EIAV-gag-672-R)	124
FIGURA 32: Gradiente de temperatura e sensibilidade de PCR para amplificação de DNA proviral do EIAV na região do exon 1 do gene <i>tat</i> ao gene <i>gag</i> (iniciadores EIAV-tat-380-F e EIAV-gag-672-R)	126
FIGURA 33: Gradiente de temperatura em PCR para amplificação de DNA proviral do EIAV na região do gene <i>pol</i> (iniciadores EIAV-pol-4325-F e EIAV-pol-4817-R)	128
FIGURA 34: Gradiente de temperatura em PCR para amplificação de DNA proviral do EIAV na região do gene <i>pol</i> (iniciadores EIAV-pol-4325-F e EIAV-pol-4841-R)	129
FIGURA 35: Gradiente de temperatura em PCR para amplificação de DNA proviral do EIAV na região do gene <i>pol</i> a orf S2 (iniciadores EIAV-pol-4841-F e EIAV-S2-5275-R)	130
FIGURA 36: Gradiente de temperatura em PCR para amplificação de DNA proviral do EIAV na região do gene <i>env</i> (iniciadores EIAV-ENV-6674-F e EIAV-S2-7145-R)	132

FIGURA 37: Alinhamento das sequências nucleotídicas do EIAV de amostras clínicas de equídeos do Pantanal brasileiro para a região 5' LTR ao exon 1 do gene <i>tat</i>.....	139
FIGURA 38: Alinhamento das sequências nucleotídicas do EIAV de equídeos do Pantanal brasileiro para a região 5' LTR ao exon 1 do gene <i>tat</i>.....	142
FIGURA 39: Alinhamento das sequências de aminoácidos do EIAV de equídeos do Pantanal brasileiro para o exon 1 do gene <i>tat</i>.....	147
FIGURA 40: Análise filogenética de 23 sequências nucleotídicas do EIAV do Pantanal brasileiro para a região 5' LTR ao exon 1 do gene <i>tat</i>.....	148
FIGURA 41: Alinhamento das sequências nucleotídicas do EIAV de amostras de equídeos do Pantanal brasileiro para o exon 1 do gene <i>tat</i> ao gene <i>gag</i>...	151
FIGURA 42: Alinhamento das sequências de aminoácidos do EIAV obtidas de amplificação de DNA de amostras de equídeos do Pantanal brasileiro para o exon 1 do gene <i>tat</i>.....	159
FIGURA 43: Alinhamento das sequências nucleotídicas do EIAV de amostras de equídeos do Pantanal brasileiro para o gene <i>gag</i>.....	161
FIGURA 44: Alinhamento das sequências de aminoácidos do EIAV de amostras de equídeos do Pantanal brasileiro para o gene <i>gag</i>.....	177
FIGURA 45: Análise filogenética de 49 sequências nucleotídicas do EIAV de amostras de equídeos do Pantanal brasileiro para o exon 1 do gene <i>tat</i> ao gene <i>gag</i>.....	180
FIGURA 46: Análise filogenética de 49 sequências nucleotídicas do EIAV de amostras de equídeos do Pantanal brasileiro para o gene <i>gag</i>.....	182
FIGURA 47: Alinhamento da sequência nucleotídica do EIAV POCONE-BR do Pantanal brasileiro para a região 5' LTR ao gene <i>gag</i> (posição nucleotídica 44 a 671)	186

FIGURA 48: Alinhamento da sequência nucleotídica do EIAV POCONE-BR do Pantanal brasileiro para a região 5' LTR ao gene <i>gag</i> (posição nucleotídica 44 a 671)	188
FIGURA 49: Alinhamento da sequência de aminoácidos do EIAV POCONE-BR do Pantanal brasileiro para o exon 1 do gene <i>tat</i> (posição nucleotídica 349 a 444)	192
FIGURA 50: Análise filogenética de uma sequência nucleotídica do EIAV do Pantanal brasileiro para a região 5' LTR ao gene <i>gag</i>	193
FIGURA 51: Alinhamento da sequência nucleotídica do EIAV POCONE-BR do Pantanal brasileiro para o gene <i>pol</i> (posição nucleotídica 4.345 a 4.840)	195
FIGURA 52: Alinhamento da sequência de aminoácidos do EIAV POCONE-BR do Pantanal brasileiro para o gene <i>pol</i> (posição nucleotídica 4.346 a 4.840)	197
FIGURA 53: Análise filogenética de uma sequência nucleotídica do EIAV do Pantanal brasileiro para uma região parcial do gene <i>pol</i>	200
FIGURA 54: Alinhamento da sequência nucleotídica do EIAV POCONE-BR do Pantanal brasileiro para o gene <i>pol</i> a ORF S2 (posição nucleotídica 4.862 a 5.274)	202
FIGURA 55: Alinhamento da sequência de aminoácidos do EIAV POCONE-BR do Pantanal brasileiro para o gene <i>pol</i> (posição nucleotídica 4.862 a 5.098)	203
FIGURA 56: Alinhamento da sequência de aminoácidos do EIAV POCONE-BR do Pantanal brasileiro para o exon 2 do gene <i>tat</i> (posição nucleotídica 5.099 a 5.248)	205
FIGURA 57: Análise filogenética de uma sequência nucleotídica do EIAV POCONE-BR do Pantanal brasileiro para uma região parcial do gene <i>pol</i> a ORF S2	208
FIGURA 58: Alinhamento da sequência nucleotídica do EIAV POCONE-BR do Pantanal brasileiro para o gene <i>env</i> (posição nucleotídica 6.697 a 7.143)	210

FIGURA 59: Alinhamento da sequência de aminoácidos do EIAV POCONE-BR do Pantanal brasileiro para o gene <i>env</i>.....	212
FIGURA 60: Análise filogenética de uma sequência nucleotídica do EIAV do Pantanal brasileiro para uma região parcial do gene <i>env</i>	217
FIGURA 61: Análise filogenética de 15 sequências nucleotídicas concatenadas do EIAV do Pantanal brasileiro para a região 5' LTR, exon 1 do gene <i>tat</i> e gene <i>gag</i>.....	219
FIGURA 62: Análise filogenética de uma sequência nucleotídica concatenada do EIAV do Pantanal brasileiro para a região 5' LTR, exon 1 do gene <i>tat</i> e gene <i>gag</i>, gene <i>pol</i>, ORF S2, exon 2 do gene <i>tat</i> e gene <i>env</i>	220
FIGURA 63: Diagrama do número de amostras clínicas de equídeos do Pantanal brasileiro positivas nos testes sorológicos - IDGA, ELISA gp90 e ELISA p26, e na PCR <i>tat-gag</i>	226
FIGURA 64: Diagrama mostrando o número de amostras clínicas de equídeos do Pantanal brasileiro positivas nos testes sorológicos - IDGA, ELISA gp90 e ELISA p26, e na snPCR LTR-<i>tat</i>	226
FIGURA 65: Alinhamento das sequências nucleotídicas do EIAV de equídeos do Ceará para o exon 1 do gene <i>tat</i> ao gene <i>gag</i>.....	230
FIGURA 66: Alinhamento das sequências de aminoácidos do EIAV de equídeos do Ceará para o exon 1 do gene <i>tat</i>.....	240
FIGURA 67: Alinhamento das sequências de aminoácidos do EIAV de equídeos do Ceará para o gene <i>gag</i>.....	251
FIGURA 68: Análise filogenética de 12 sequências nucleotídicas do EIAV de equídeos do Ceará com sequências mundiais do EIAV para o exon 1 do gene <i>tat</i> ao gene <i>gag</i>.....	254
FIGURA 69: Análise filogenética de 12 sequências nucleotídicas do EIAV de equídeos do Ceará, com 49 sequências do Pantanal brasileiro e sequências mundiais do EIAV para o exon 1 do gene <i>tat</i> ao gene <i>gag</i>.....	256

FIGURA 70: Alinhamento da sequência nucleotídica do EIAV CEARA-C-14 do Ceará para a região 5' LTR ao exon 1 do gene <i>tat</i> (posição nucleotídica 44 a 409)	260
FIGURA 71: Alinhamento da sequência de aminoácidos de EIAV do equídeo CEARA-C-14 para o exon 1 do gene <i>tat</i>.....	261
FIGURA 72: Análise filogenética da sequência nucleotídica de EIAV do equídeo CEARA-C-14 empregando a sequência nucleotídica da região 5' LTR ao exon 1 do gene <i>tat</i>.....	262
FIGURA 73: Diagrama representativo das amostras positivas nos testes sorológicos - IDGA, ELISA gp90 e ELISA p26, e na PCR <i>tat-gag</i> de 30 cavalos (<i>Equus caballus</i>) do Ceará	264
FIGURA 74: Diagrama representativo das amostras positivas nos testes sorológicos - IDGA, ELISA gp90 e ELISA p26, e na PCR <i>tat-gag</i> de 160 jumentos (<i>Equus asinus</i>) do Ceará	269

LISTA DE TABELAS

TABELA 1: Identificação das 133 amostras de cavalos (<i>Equus caballus</i>) do Pantanal brasileiro – data e local de coleta	95
TABELA 2: Identificação das 30 amostras de PBMC e soro de cavalos (<i>Equus caballus</i>) do Ceará/Brasil – local e data de coleta.....	99
TABELA 3: Identificação das 160 amostras de PBMC e soro de jumentos (<i>Equus asinus</i>) do Ceará/Brasil – local e data de coleta.....	100
TABELA 4: Identificação das três amostras de PBMC e soro de mula (<i>Equus asinus x Equus caballus</i>) do Ceará/Brasil – local e data de coleta	104
TABELA 5: Identificação das 14 amostras de órgãos de um cavalo (<i>Equus caballus</i>) e três jumentos (<i>Equus asinus</i>) do Ceará/Brasil – local e data de coleta.....	104
TABELA 6: Sequência e Tm dos iniciadores para amplificação do EIAV	110
TABELA 7: Iniciadores para amplificação do DNA proviral do EIAV	116
TABELA 8: Resultado da PCR tat-gag e snPCR LTR-tat para amplificação do DNA proviral do EIAV em amostras de equídeos do Pantanal brasileiro.....	133
TABELA 9: Similaridade nucleotídica de 30 sequências nucleotídicas do EIAV para a região 5' LTR ao exon 1 do gene <i>tat</i>	140
TABELA 10: Similaridade nucleotídica entre 42 sequências nucleotídicas do EIAV para a região 5' LTR ao exon 1 do gene <i>tat</i>	145
TABELA 11: Similaridade nucleotídica de 55 sequências nucleotídicas do EIAV para o exon 1 do gene <i>tat</i> ao gene <i>gag</i> de amostras amplificadas de equídeos do Pantanal brasileiro	156
TABELA 12: Similaridade nucleotídica de 149 sequências nucleotídicas do EIAV para o gene <i>gag</i>	170

TABELA 13: Locais de troca de aminoácidos entre seis sequências mundiais do EIAV e a sequência POCONE-BR do Pantanal brasileiro para o exon 1 do gene <i>tat</i>.....	192
TABELA 14: Locais de troca de aminoácidos entre seis sequências mundiais do EIAV e a sequência POCONE-BR do Pantanal brasileiro para o gene <i>pol</i> .	197
TABELA 15: Locais de troca de aminoácidos entre seis sequências mundiais do EIAV e a sequência POCONE-BR do Pantanal brasileiro para o gene <i>pol</i>..	203
TABELA 16: Locais de troca de aminoácidos entre seis sequências mundiais do EIAV e a sequência POCONE-BR do Pantanal brasileiro para o exon 2 do gene <i>tat</i>.....	205
TABELA 17: Locais de troca de aminoácidos entre seis sequências mundiais do EIAV e a sequência POCONE-BR do Pantanal brasileiro para o gene <i>env</i>.	209
TABELA 18: Resultado dos testes moleculares e sorológicos para EIAV: PCR <i>tat-gag</i>, snPCR LTR-<i>tat</i>, IDGA, ELISA gp90 e ELISA p26 para as amostras clínicas de cavalos (<i>Equus caballus</i>) do Pantanal brasileiro	221
Tabela 19: Similaridade nucleotídica de 68 sequências nucleotídicas do EIAV para o exon 1 do gene <i>tat</i> ao gene <i>gag</i>: 12 sequências de equídeos do Ceará, e 49 do Pantanal brasileiro com sete sequências mundiais	235
Tabela 20: Similaridade nucleotídica de 127 sequências nucleotídicas do EIAV para o gene <i>gag</i>.....	243
TABELA 21: Locais de troca aminoácidos entre as 12 sequências de equídeos do Ceará para o gene <i>gag</i>.....	250
TABELA 22: Resultado da PCR e dos testes sorológicos para AIE de 30 amostras de cavalos (<i>Equus caballus</i>) do Ceará	263
TABELA 23: Resultado da PCR e dos testes sorológicos para AIE para as 160 amostras de jumentos (<i>Equus asinus</i>) do Ceará	265
TABELA 24: Resultado da PCR e dos testes sorológicos para AIE para as três amostras de mula (<i>Equus asinus</i> x <i>Equus caballus</i>) do Ceará.....	270

TABELA 25: Resultado da PCR e dos testes sorológicos para AIE para as 14 amostras de órgão de equídeos do Ceará	270
--	------------

LISTA DE ABREVIATURAS

aa – aminoácido
ATCC – American Type Tissue Collection
BIV – *Bovine immunodeficiency virus*
CA – capsídeo
CAEV – *Caprine arthritis encephalitis virus*
CTL – linfócitos T Citotóxicos
DNA – ácido desoxirribonucleico
DU – dUTPase
EDTA– ácido etilendiamino tetra-acético
AIE – anemia infecciosa equina
EIAV – *Equine infectious anemia virus*
ELISA – enzyme-linked immunosorbent assay
ELR-1 – receptor lentivírus equino-1
env – envelope
FIV – *Feline immunodeficiency virus*
gag – antígeno grupo específico
HIV-1 – *Human immunodeficiency virus 1*
HIV-2 – *Human immunodeficiency virus 2*
IDGA – imunodifusão em gel de agar
IN – integrase
Kb – Kilobases
LTR – repetição terminal longa
MA – matriz
MAPA – Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento
MHC – complexo principal de histocompatibilidade
min – minuto
MVV – *Visna/maedi virus*
NC – nucleocapsídeo
ng – nanogramas
nPCR – nested PCR
OIE – World Organisation for Animal Health
ORF – janela aberta de leitura

pb – pares de bases
PBMC – células mononucleares do sangue periférico
PBS – sítio de ligação ao iniciador
PCR – reação em cadeia da polimerase
PLV – *Puma lentivirus*
pol – polimerase
ppt – trato polipurina
PR – protease
R – sequência redundante
rev – regulador de expressão de proteínas virais
RNA – ácido ribonucleico
RNase H – ribonuclease H
RNAt – RNA de transferência
RT – transcriptase reversa
RT-PCR – transcrição reversa seguida de PCR
-sssDNA – fita negativa de forte parada
+sssDNA – fita positiva de forte parada
SIV – *Simian immunodeficiency virus*
seg – segundo
snPCR – semi-nested PCR
SU – glicoproteína de superfície
tat – transativador de transcrição
TM – glicoproteína transmembrana
TNFR – receptor de fator de necrose tumoral
U5 e U3 – sequências únicas
USDA – United States Department of Agriculture
VLPs – partículas semelhantes a vírus
 μ L – microlitro

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	26
1.1. Histórico.....	26
1.2. Família Retroviridae	28
1.2.1. Estrutura da partícula e genoma dos retrovírus.....	29
1.3. <i>Equine infectious anemia virus</i>	30
1.3.1. Estrutura da partícula e genoma.....	20
1.3.2. Região LTR e ORFs <i>tat</i> , <i>S2</i> e <i>rev</i>	32
1.3.3. Ciclo de multiplicação.....	36
1.3.4. Caracterização molecular e filogenia do EIAV	43
1.4. Anemia Infecciosa Equina	66
1.4.1. Epidemiologia	67
1.4.2. Transmissão	70
1.4.3. Patogênese	75
1.4.4. Resposta Imune.....	77
1.4.5. Diagnóstico	80
1.4.5.1. Diagnóstico sorológico.....	80
1.4.5.2. Diagnóstico molecular	84
1.4.6. Detecção do EIAV por PCR	86
1.4.7. Tratamento, Prevenção e Controle	87
2. JUSTIFICATIVA E RELEVÂNCIA	91
3. OBJETIVOS	92
3.1. Objetivo geral	92

3.2. Objetivos específicos.....	92
4. METODOLOGIA	93
4.1. Estratégia de trabalho.....	93
4.2. Amostras.....	93
4.3. Obtenção de soro e PBMC	105
4.4. Testes sorológicos.....	106
4.5. Extração de ácido nucleico	106
4.5.1. Extração de DNA proviral a partir de PBMC	106
4.5.2. Extração de DNA proviral a partir de órgão	107
4.6. Reações em cadeia da polimerase (PCRs) para amplificação de diferentes regiões do genoma do EIAV.....	108
4.6.1. Seleção dos iniciadores.....	109
4.7. Eletroforese em gel de poliacrilamida	111
4.8. Caracterização molecular	112
4.8.1. Purificação do produto de PCR	112
4.8.2. Sequenciamento de Sanger	113
4.8.3. Análise do sequenciamento	114
4.9. Análise filogenética.....	114
5. RESULTADOS.....	115
5.1. Amplificação de DNA proviral do EIAV: estabelecimento de condições de PCR.....	115
5.1.1. Amplificação de DNA proviral do EIAV por PCR empregando iniciadores de EIAV na região 5' LTR ao exon 1 do gene <i>tat</i> – snPCR LTR- <i>tat</i> – iniciadores EIAV-LTR-211-F4, EIAV- <i>tat</i> -405-R1 e EIAV- <i>tat</i> -380-R2.....	119

5.1.2. Amplificação de DNA proviral do EIAV empregando iniciadores de EIAV na região 5' LTR ao exon 1 do gene <i>tat</i> – iniciadores EIAV-LTR-28-F e EIAV-tat-405-1R	122
5.1.3. Amplificação de DNA proviral do EIAV empregando iniciadores de EIAV na região 5'LTR ao gene <i>gag</i> – PCR LTR-gag – iniciadores EIAV-LTR-28-F e EIAV-gag-672-R.....	123
5.1.4. Amplificação de DNA proviral do EIAV empregando iniciadores de EIAV na região do exon 1 do gene <i>tat</i> ao gene <i>gag</i> – PCR tat-gag – iniciadores EIAV-tat-380-F e EIAV-gag-672-R.....	124
5.1.5. Amplificação de DNA proviral do EIAV empregando iniciadores de EIAV na região do gene <i>pol</i> – iniciadores EIAV-pol-4325-F, EIAV-pol-4817 e EIAV-pol-4841-R.....	127
5.1.6. Amplificação de DNA proviral do EIAV empregando iniciadores de EIAV na região do gene <i>pol</i> a ORF S2 – iniciadores EIAV-pol-4841-F e EIAV-S2-5275-R.....	129
5.1.7. Amplificação de DNA proviral do EIAV empregando iniciadores de EIAV na região do gene <i>env</i> – iniciadores EIAV-ENV-6674-F e EIAV-ENV-7145-R....	131
5.2. Análise molecular e sorológica para identificação de casos de anemia infecciosa equina (AIE) em equídeos do Pantanal brasileiro.....	132
5.2.1. Amplificação do DNA proviral do EIAV em amostras clínicas	132
5.2.1.1. Amostra POCONE-BR	132
5.2.1.2. Amostras clínicas de equídeos do Pantanal brasileiro.....	133
5.2.2. Sequenciamento e análise filogenética de DNA amplificado de amostras de equídeos do Pantanal brasileiro	137
5.2.2.1. Análise molecular empregando as sequências nucleotídicas da região 5'LTR (nt 211) ao exon 1 do gene <i>tat</i> (nt 380) amplificadas de amostras de equídeos do pantanal brasileiro	137

5.2.2.2. Análise molecular empregando as sequências nucleotídicas da região do exon 1 do gene <i>tat</i> (nt 380) ao gene <i>gag</i> (nt 672) amplificadas de amostras de equídeos do Pantanal brasileiro	149
5.2.3. Sequenciamento e análise filogenética de DNA amplificado a partir de uma amostra de um cavalo do Pantanal brasileiro – POCONE-BR	183
5.2.3.1. Análise molecular empregando a sequência nucleotídica da região 5' LTR (nt 28) ao gene <i>gag</i> (nt 672) amplificada a partir da amostra POCONE-BR.....	183
5.2.3.2. Análise molecular empregando a sequência nucleotídica do gene <i>pol</i> (nt 4.325 – 4.841) amplificada a partir da amostra POCONE-BR.....	194
5.2.3.3. Análise molecular empregando a sequência nucleotídica do gene <i>pol</i> (nt 4.862) a ORF S2 (nt 5.274) amplificada a partir da amostra POCONE-BR ..	200
5.2.3.4. Análise molecular empregando a sequência nucleotídica do gene <i>env</i> (nt 6.698 – 7.143) amplificada a partir da amostra POCONE-BR.....	209
5.2.4. Análise filogenética de 15 sequências amplificadas na snPCR LTR- <i>tat</i> e PCR <i>tat-gag</i> e da sequência POCONE-BR para regiões parciais do genoma do EIAV	218
5.2.5. Status sorológico dos equídeos do Pantanal brasileiro.....	221
5.3. Análise molecular e sorológica para identificação de casos de anemia infecciosa equina (AIE) em equídeos do Ceará.....	227
5.3.1. Amplificação de DNA proviral do EIAV em amostras clínicas	227
5.3.2. Sequenciamento e análise filogenética de DNA amplificado de amostras de equídeos do Ceará	227
5.3.2.1. Análise molecular empregando as sequências nucleotídicas do exon 1 do gene <i>tat</i> (nt 380) ao gene <i>gag</i> (nt 672).....	227
5.3.2.2. Análise molecular empregando a sequência nucleotídica da região 5' LTR (nt 28) ao exon 1 do gene <i>tat</i> (nt 405)	257

5.3.3. Status sorológico dos equídeos do Ceará.....	263
6. DISCUSSÃO	272
6.1. O impacto da sn-PCR LTR-tat	272
6.2. PCR tat-gag e a aplicabilidade da reação.....	273
6.3. Caracterização molecular e filogenia do EIAV das amostras de equídeos brasileiros	280
6.4. Testes sorológicos para identificação de animais positivos para AIE.....	285
6.5. Comparação da eficiência de detecção de EIAV por métodos moleculares em comparação aos testes sorológicos	289
7. CONCLUSÃO	292
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	294
9. PRODUÇÃO CIENTÍFICA	314
9.1. Participação em eventos	314
9.2. Apresentação de trabalhos em eventos científicos	315

1. INTRODUÇÃO

1.1. Histórico

O *Equine infectious anemia virus* (EIAV) é o agente etiológico da anemia infecciosa equina (AIE) que apresenta distribuição mundial (Figura 1) (DONG *et al.*, 2014). A AIE é uma das 11 doenças de equídeos de notificação obrigatória pela Organização Mundial de Saúde Animal (OIE, 2019-A). O primeiro relato dos sinais clínicos associados à AIE ocorreu na França em 1843 (LIGNEE). Depois, em 1904 VALLEE e CARRE fizeram uma descrição mais completa dos diferentes estágios da doença. Os autores fizeram a reprodução experimental da AIE através da transferência de pequenas quantidades de sangue de um cavalo (*Equus caballus*) para um jumento (*Equus asinus*), e observaram que o vírus persiste no hospedeiro após a resolução dos sinais clínicos da doença. Assim, a AIE foi a primeira doença animal causada por retrovírus confirmada ser de etiologia viral, antecedendo por vários anos o descobrimento dos principais agentes filtráveis - *Avian leukosis virus* (ALV) da leucemia aviária (ELERMAN & BANG, 1908) e *Rous sarcoma virus* do sarcoma aviário (ROUS 1910, 1911) (COOK *et al.*, 2013). Como o EIAV apresenta um RNA fita simples genômico e a enzima transcriptase reversa associada à partícula viral, ele foi incluído na família *Retroviridae* (CHARMAN *et al.*, 1976).

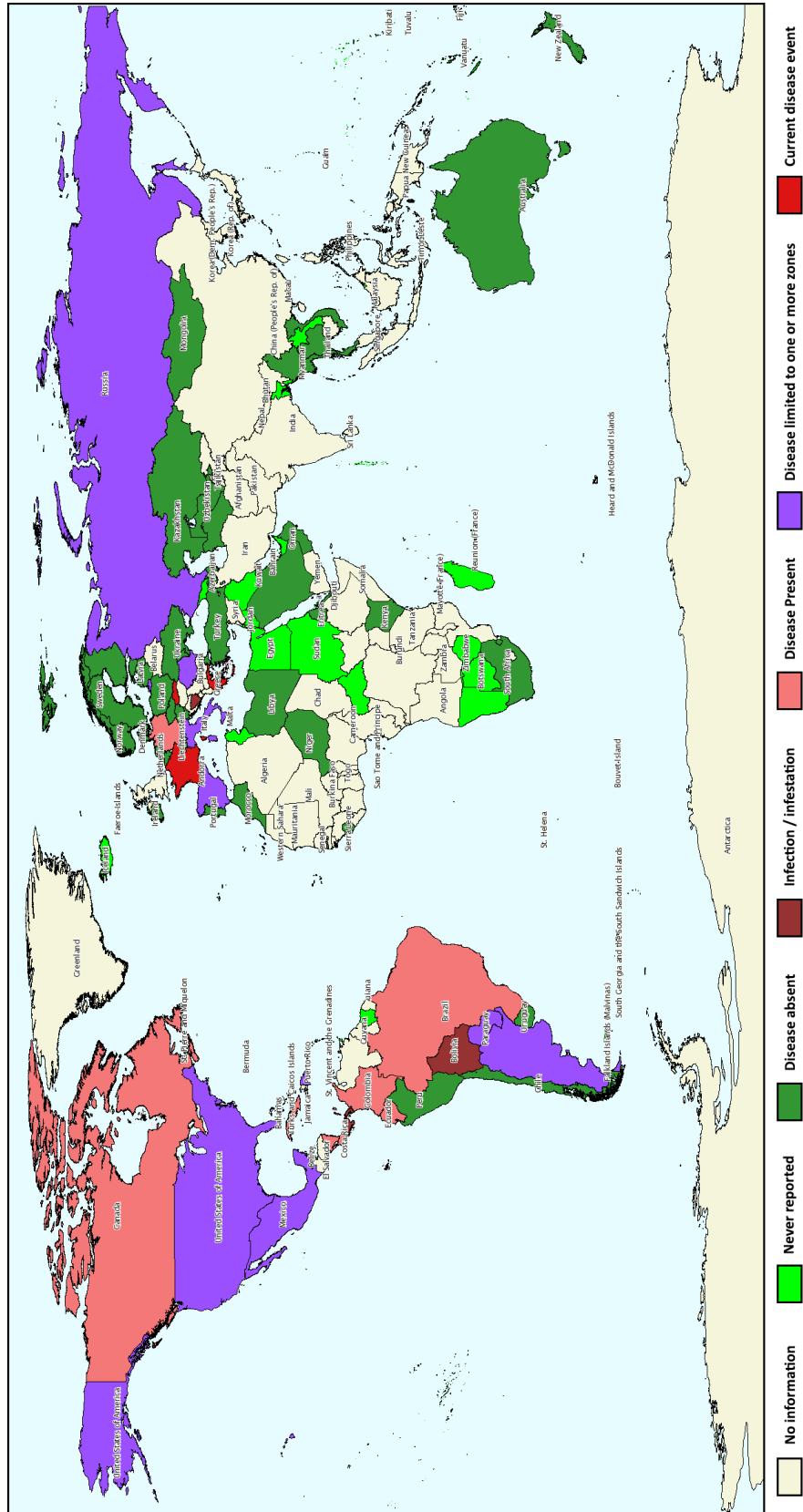


FIGURA 1: Mapa da distribuição mundial da AIE no período de janeiro a junho de 2018 – (OIE, 2018-B).

1.2. Família *Retroviridae*

A família *Retroviridae* é formada por um grande e diverso grupo de vírus encontrados em todos os vertebrados. Os retrovírus apresentam um ciclo de multiplicação único e diferente de outros vírus, uma vez que o seu RNA genômico é convertido em DNA no processo de transcrição reversa, e esse DNA viral é integrado no genoma do hospedeiro, formando um provírus. Essas características do ciclo de multiplicação dos retrovírus explicam muitas das diversas atividades biológicas desses vírus. Como exemplo podemos citar a forma integrada de DNA proviral que confere aos retrovírus a capacidade para manter uma infecção persistente, apesar da resposta imune do hospedeiro. Desta forma, os retrovírus podem permanecer em um estado de latência podendo ser transmitido durante esse período (GOFF, 2013).

Os retrovírus foram originalmente classificados baseado na morfologia do cerne viral. Essa classificação mais antiga tem sido usada em parte para definir os diversos gêneros dentro da família *Retroviridae*, mas o número de gêneros se expandiu baseado em novos critérios (GOFF, 2013). De acordo com a nova classificação definida pelo Comitê Internacional de Taxonomia Viral (ICTV, 2018), os retrovírus pertencem à ordem *Ortervirales*, família *Retroviridae*, a qual apresenta as subfamílias *Orthoretrovirinae* e *Spumaretrovirinae*. A subfamília *Orthoretrovirinae* agrupa os gêneros *Alpharetrovirus*, *Betaretrovirus*, *Deltaretrovirus*, *Epsilonretrovirus*, *Gammaretrovirus* e *Lentivirus*. A subfamília *Spumaretrovirinae* agrupa os gêneros *Bovispumavirus*, *Equispumavirus*, *Felispumavirus*, *Prosimiispumavirus* e *Simiispumavirus*. O EIAV pertence ao gênero *Lentivirus*, que agrupa ainda as espécies *Bovine immunodeficiency virus* (BIV), *Caprine arthritis encephalitis virus* (CAEV), *Feline immunodeficiency virus* (FIV), *Human immunodeficiency virus 1 e 2* (HIV-1 e HIV-2), *Jembrana disease virus*, *Puma lentivirus* (PLV), *Simian immunodeficiency virus* (SIV), e *Visna-maedi virus* (MVV).

1.2.1. Estrutura da partícula e genoma dos retrovírus

As partículas dos retrovírus são esféricas e seu diâmetro varia entre 80 e 110 nm. Internamente na partícula viral está localizado o genoma de RNA, associado a proteínas formando o nucleocapsídeo (NC). O cerne viral é envolto pelo capsídeo (CA), e externamente ao capsídeo existe uma camada de proteína matriz (MA) recoberta por um envelope, formado por uma bicamada lipídica. Associado ao envelope está a glicoproteína transmembrana (TM) ligada à glicoproteína de superfície (SU) que se projeta através do envelope (CARTER & SAUNDERS, 2007).

O genoma dos retrovírus é formado por duas cópias de RNA fita simples (ssRNA) idênticas, de polaridade positiva e cada fita de RNA tem tamanho que pode variar de 7 a 13 Kb. As duas moléculas estão presentes como um dímero, formadas pelo pareamento de bases entre sequências complementares, sendo descrito como diplóide. O genoma contém minimamente três genes: *gag* (antígeno grupo específico), *pol* (polimerase) e *env* (envelope), que codificam as proteínas estruturais e as enzimas necessárias para o ciclo de multiplicação viral (GOFF, 2013).

O gene *gag* codifica as proteínas internas: matriz (MA), capsídeo (CA) e nucleocapsídeo (NC); o gene *pol* codifica as enzimas: protease (PR), transcriptase reversa (RT), ribonuclease H (RNase H), integrase (IN); e o gene *env* codifica as proteínas do envelope: glicoproteína transmembrana (TM) e glicoproteína de superfície (SU). Esses genes são flanqueados por repetições terminais longas (LTRs), formados por duas sequências pequenas redundantes (R), ambas localizadas terminalmente no genoma. Essas sequências são adjacentes a sequências únicas U5 e U3, encontrados nas regiões 5' e 3' terminal, respectivamente (CARTER & SAUNDERS, 2007; GOFF, 2013).

Além dos genes estruturais presentes no genoma de todos os retrovírus, os lentivírus apresentam uma organização genômica mais complexa, apresentando genes adicionais regulatórios. O HIV-1 tem seis genes regulatórios – *vif*, *vpu*, *vpr*, *tat*, *rev* e *nef*, enquanto que o HIV-2 apresenta o gene *vpx*, não encontrado no HIV-

1, mas não tem o gene *vpu*. O HTLV apresenta os genes regulatórios *tax* e *rex* (GOFF, 2013). Esses genes regulatórios compartilham pouca similaridade de nucleotídeo ou aminoácido entre os lentivirus, mas suas funções são conservadas (CLEMENTS *et al.*, 1996).

1.3. Equine infectious anemia virus

1.3.1. Estrutura da partícula e genoma

As partículas do EIAV apresentam um formato esférico, e um diâmetro de 115 nm (TAJIMA *et al.*, 1969; WEILAND *et al.*, 1977). O RNA genômico, localizado dentro da partícula viral, está associado a proteínas formando o nucleocapsídeo (NC), composto pela ribonucleoproteína p11, além das enzimas integrase (IN), transcriptase reversa (TR), protease (PR) e dUTPase (DU). O genoma e as enzimas estão envoltos pelo capsídeo, composto pela proteína p26. Externamente ao capsídeo está localizada a matriz, composta pela fosfoproteína p15, recoberta pelo envelope, do qual se projetam as glicoproteínas transmembrana gp45 e glicoproteína de superfície gp90 (Figura 2-a) (PAREKH *et al.*, 1980; MONTELARO *et al.*, 1982; ISSEL *et al.*, 2014).

O genoma do EIAV é formado por duas cópias de RNA fita simples, de polaridade positiva de 8.2 kb. O RNA genômico contém três genes, *gag*, *pol* e *env* que codificam as proteínas estruturais e as enzimas virais (CHEEVERS *et al.*, 1977; ISSEL *et al.*, 2014). O gene *gag* apresenta três janelas abertas de leitura (ORFs) que codificam as proteínas estruturais não-glicosiladas, p15 da matriz, p26 do capsídeo, p11 do nucleocapsídeo, e p9. O gene *pol* contém três ORFs que codificam as enzimas protease, transcriptase reversa, ribonuclease H, endonuclease e integrase. Além das enzimas comuns aos retrovírus, o gene *pol* dos lentivírus não-primatas inclui ainda um domínio para a dUTPase. O gene *env* codifica as glicoproteínas de superfície gp90 e transmembrana gp45, inseridas no envelope viral. O genoma do EIAV é flanqueado por repetições terminais longas (LTRs), que são formadas por duas sequências pequenas redundantes (R), ambas localizadas

terminalmente no genoma. Essas sequências são adjacentes às sequências únicas, U5 localizada na região 5' terminal, e U3, localizada na região 3' terminal do genoma (Figura 2-b) (MONTELARO *et al.*, 1993; CLEMENTS *et al.*, 1996; LEROUX *et al.*, 2004).

O EIAV contém três genes acessórios, que se apresentam como ORFs no genoma, denominadas S1, S2 e S3. A ORF S1 corresponde a *tat* (transativador da transcrição), que apresenta dois exons, um localizado entre a região 5' LTR e o início do gene *gag*, e o outro localizado na região intergênica *pol-env*. S2, exclusiva do EIAV, está localizada na região entre os genes *pol* e *env*, logo após a *tat*, e sobreposto ao gene *env*. S3 corresponde a *rev* (regulador da expressão de proteínas virais), que está sobreposto ao gene *env* (Figura 2-b) (RUSHLOW *et al.*, 1986, STEPHENS *et al.*, 1986; DERSE *et al.*, 1987; SHERMAN *et al.*, 1988, LI *et al.*, 2000).

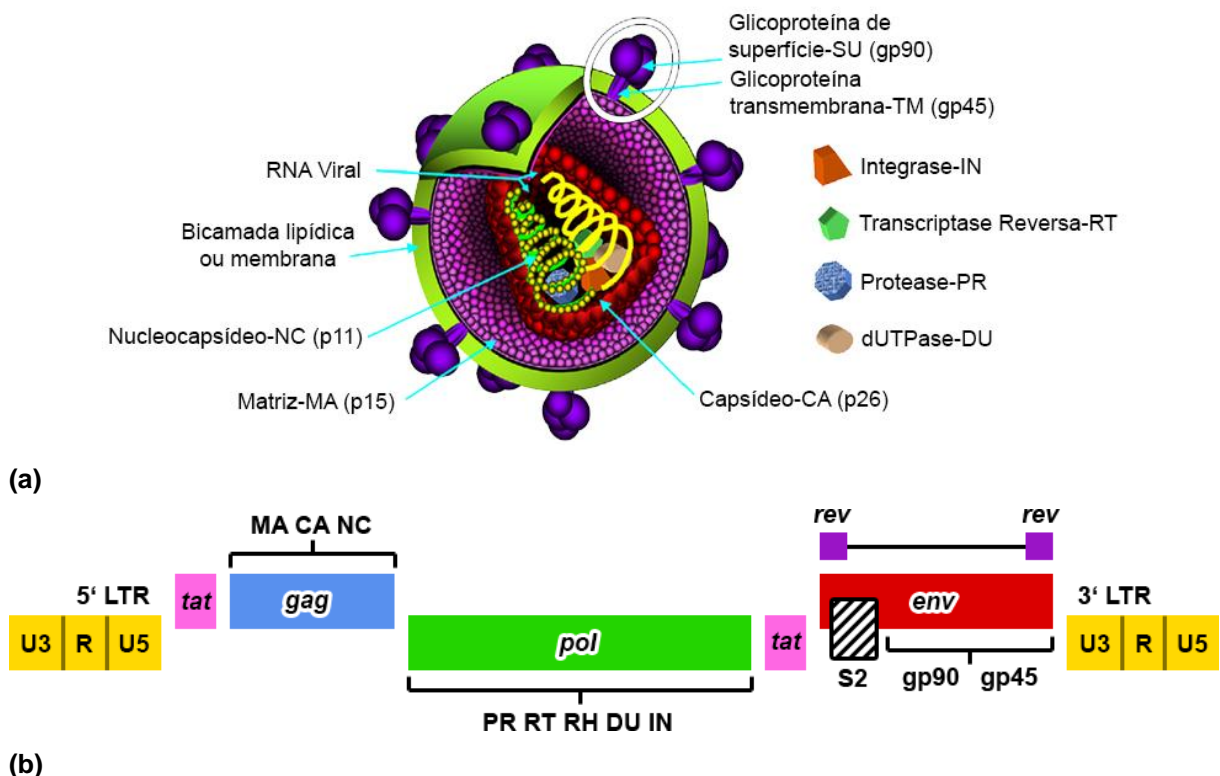


FIGURA 2: Representação da estrutura da partícula e do genoma do *Equine infectious anemia virus* (EIAV) – (a) Estrutura da partícula do EIAV (ISSEL *et al.*, 2014, modificado). (b) Organização do genoma de DNA proviral do EIAV – LTR: Repetições terminais longas; U5: sequência única 5'; U3: sequência única 3'; R: Sequência repetida; *tat*: transativador de transcrição; *gag*: antígeno grupo

específico; MA: matriz; CA: capsídeo; NC: nucleocapsídeo; *pol*: polimerase; PR: protease; RT: transcriptase reversa; RH: ribonuclease H; DU: dUTPase; IN: integrase; *rev*: regulador da expressão de proteínas virais; *env*: envelope; gp90: glicoproteína de superfície; gp45: glicoproteína transmembrana; S2: proteína acessória (CRAIGO & MONTELARO, 2010, modificado).

1.3.2. Região LTR e ORFs *tat*, *S2* e *rev*

A repetição terminal longa (LTR) dos retrovírus, definida pelas regiões U3, R e U5, possui múltiplos elementos cis-acting que são responsáveis por mediar a regulação transcricional da função promotora da LTR. O sítio de iniciação está localizado na junção das regiões U3 e R. Assim, os elementos 'upstream' estão localizados dentro da região U3 e os elementos 'downstream' estão posicionados dentro das regiões R e U5 (TANG *et al.*, 1999).

A região LTR do EIAV apresenta diferentes tamanhos entre as diferentes sequências nucleotídicas de genoma completo: Wyoming (321 pb), Liaoning (316 pb), EIAV_{IRE} (311 pb) e Miyazaki (306 pb). A figura 3 mostra o alinhamento da região 5' LTR de cinco sequências do EIAV, os quatro isolados – Wyoming, Liaoning, EIAV_{IRE} e Miyazaki, e uma amostra gerada em laboratório a partir da amostra Wyoming - pSPEIAV19. Na figura 3 as regiões U3, R e U5 estão identificadas por setas, e a sequências dos domínios funcionais estão identificadas por retângulos (DONG *et al.*, 2014).

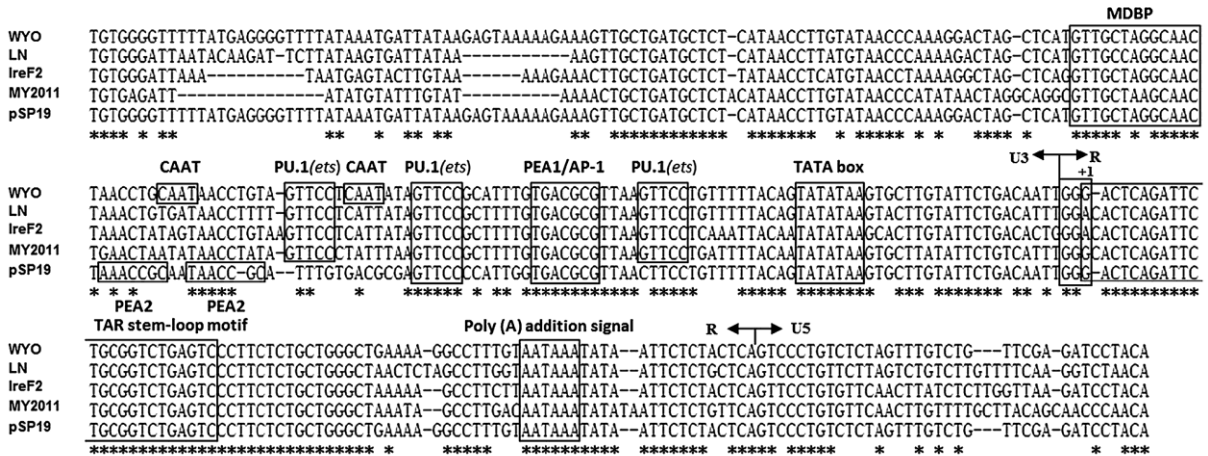


FIGURA 3: Caracterização da região LTR do EIAV – Os elementos estruturais e funcionais da região LTR estão identificados no alinhamento das sequências WYO - Wyoming (AF033820), LN - Liaoning (AF327877), IreF2 - Ireland-F2 (JX480631), MY2011 - Miyazaki (JX003263.1) e pSP19, pSPEIAV19 (U01866), disponíveis no GenBank. Os domínios estruturais U3, R e U5 estão indicados por setas. Os elementos consenso de controle transcricional estão identificados por caixas pretas, o sítio de iniciação da transcrição (GGG/A) está destacado por uma caixa preta e indicado por +1. Traços (-) indicam deleções e asteriscos (*) resíduos conservados. As sequências foram alinhadas usando ClustalX (versão 2.1) (DONG *et al.*, 2014).

Embora exista menos de 80% de identidade nucleotídica entre as LTRs dos quatro isolados de campo caracterizados até o momento, a maior parte da variação ocorre dentro da região U3, que é um domínio ‘enhancer’ e contém elementos de controle transcricional. Ao contrário da maior parte da região U3, os ‘enhancer *ets*’ ou sítios PU.1 parecem ser relativamente conservados nas quatro sequências do EIAV, sugerindo que esses sítios são extremamente importantes para a multiplicação do EIAV *in vivo*. Esses ‘motifs’ incluem três sítios de ligação PU.1; e o sítio “methylated DNA-binding protein” (MDBP) também denominado de EF-C ou EP, um sítio PEA-1/AP-1. Na sequência pSPEIAV19, dois dos sítios PU.1 estão ausentes, enquanto que existe a adição de um ‘motif’ de ligação adicional para esta sequência, denominado PEA2. Na sequência Wyoming estão identificados dois boxes CAAT, os quais não estão presentes nas outras sequências. Na região R encontra-se também o elemento de resposta a trans ativação (TAR), o qual forma uma estrutura *stem-loop* necessária para a interação com a proteína *tat*, um sítio de iniciação da síntese de RNA que consiste de dois resíduos G consecutivos antes de um A ou G +1 nucleotídeo que define a borda U3-R, e um sinal de adição de poly A (AATAAA), e

um TATA-box consenso (TATATAA) (CARVALHO & DERSE, 1991; CARVALHO & DERSE, 1993; DONG *et al.*, 2014).

O PU.1 é um membro das 26 famílias de fatores de transcrição Ets, e esses ‘motifs’ são necessários para a transcrição viral em macrófagos, uma vez que eles se ligam a fatores de transcrição (MAURY *et al.*, 1994). Porém, apesar da importante evidência do sítio 3’ PU.1 para a transativação do gene *tat* na expressão da LTR em macrófagos, estudos de infectividade indicam que a presença dos três sítios PU.1 não é suficiente para a multiplicação viral, uma vez que outros ‘motifs enhancer’ adicionais parecem ser necessários. Uma possível explicação para a necessidade de outros elementos transcricionais poderia ser a natureza de especificidade celular do sítio PU.1, uma vez que dentre as células que são permissivas para a multiplicação do EIAV, somente os macrófagos contêm o sítio PU.1 (HINES *et al.*, 2004).

A *tat* ou proteína trans ativadora regula a transcrição do DNA proviral do EIAV. A *tat* consiste de quatro domínios *amino terminus*, *core region*, *basic region* e *carboxy terminus*. O domínio de reconhecimento a TAR (elemento de resposta a *tat*), presente nas regiões *basic* e *carboxy terminus* do gene *tat*, forma um complexo de interação *tat*-TAR, necessário para a transativação (CARROLL *et al.*, 1991). A *tat* parece ser relativamente conservada no genoma do EIAV, com mais de 80% de identidade de sequência de aminoácido entre os quatro isolados Wyoming, Liaoning, Miyazaki e EIAV_{IRE}, principalmente nos domínios da região *amino terminus* e do *core* (Figura 4) (DONG *et al.*, 2014).

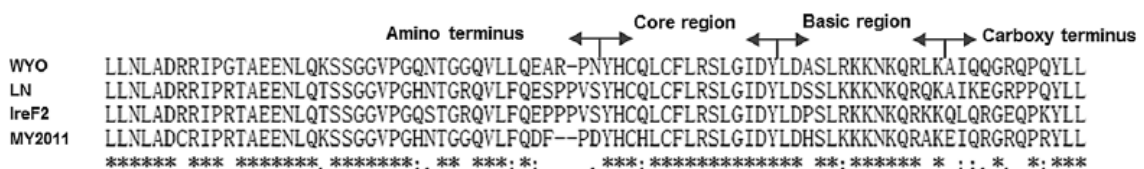


FIGURA 4: Caracterização da proteína *tat* do EIAV – As regiões que compreendem os domínios do gene *tat* estão identificados por setas no alinhamento das sequências WYO - Wyoming (AF033820), LN - Liaoning (AF327877), IreF2 - Ireland-F2 (JX480631), e MY2011 - Miyazaki (JX003263.1), disponíveis no GenBank (DONG *et al.*, 2014).

Ao contrário de *tat*, as duas outras ORFs do EIAV apresentam um alto grau de divergência, como por exemplo nas sequências Miyazaki e Wyoming que possuem apenas 43,9% e 55,2% de identidade de sequência de aminoácido para S2 e rev, respectivamente (DONG *et al.*, 2014). A ORF S2 possui três potenciais *motifs* funcionais: GLFG (putative nucleoporin motif), PXXP (putative SH3 domain binding motif), e RRKQETKK (putative nuclear localization sequence) (LI *et al.*, 1998).

Embora estudos demonstrem a importância da ORF S2 *in vivo*, o papel funcional desse gene permanece desconhecido. Em um estudo foram avaliadas as propriedades do gene S2 na multiplicação viral *in vivo* com pôneis infectados experimentalmente com uma amostra de EIAV pouco virulenta, mostrando que a deleção do gene S2 no genoma do EIAV reduz o nível de multiplicação viral. Contudo, anteriormente em um estudo *in vitro* foi observado que não houve nenhuma diferença nas propriedades de multiplicação dessa mesma amostra parental e os vírus mutantes S2 em culturas de macrófagos de equinos. Assim, esses experimentos sugerem que enquanto S2 não é essencial para a multiplicação viral, este gene influencia as propriedades de multiplicação viral *in vivo* provavelmente como alguma função acessória na multiplicação do EIAV (LI *et al.*, 1998, 2000).

Os retrovírus utilizam diversos mecanismos para expressar diferencialmente numerosas proteínas de genomas relativamente pequenos que possuem um único sítio de iniciação transcricional. Esses mecanismos incluem o uso de poliproteínas precursoras, *frameshifting* ribossomal, códon de iniciação alternativos, mRNAs bicistronicos, e *splicing* alternativo. O *splicing* alternativo permite a produção de múltiplos mRNAs virais a partir de um único RNA precursor. O EIAV expressa cinco principais mRNAs: (I) o *full-length*, mRNA que codifica gag/pol; (II) o *singly spliced* mRNA que codifica *tat*, *env*, e a ORF S2; (III) o quarto exon mRNA que codifica *tat* e *rev*; (IV) o terceiro exon mRNA que codifica *tat*; e (V) o segundo exon mRNA que contém as sequências do exon 1 da *tat* junto ao quarto exon da sequência do envelope. Os lentivírus codificam proteínas regulatórias e elementos cis-acting que modulam o processamento e acumulação de mRNAs contendo intron, em que a

proteína *rev* se liga a motivos estruturais específicos REEs (elementos de resposta a *rev*) no mRNA. O EIAV contém múltiplos REEs, e o gene *rev* codifica um polipeptídeo codificado por um quarto exon de mRNA bicistronico (CARROLL & DERSE, 1993; MARTARANO *et al.*, 1994; BELSHAN *et al.*, 2000).

1.3.3. Ciclo de multiplicação

A primeira etapa no ciclo de multiplicação viral é a adsorção, em que ocorre a interação entre o vírus e a célula alvo e essa interação ocorre entre as glicoproteínas de superfície virais e receptores específicos de superfície celular (Figura 5). A interação dos lentivírus com os receptores causa uma mudança conformacional na glicoproteína transmembrana do envelope. A gp45 do EIAV apresenta dois domínios hidrofóbicos, um amino terminal, que é responsável por induzir a fusão entre célula e vírus, e é funcional somente após a clivagem da glicoproteína precursora; e o outro domínio que alcança a membrana celular e ancora as glicoproteínas na membrana viral. A glicoproteína de superfície gp90 é altamente glicosilada, e forma estruturas tipo “grampos” que podem ser observadas na superfície da partícula viral. Os “grampos” da gp90 contêm os epitopos que interagem com os receptores celulares e com os determinantes para a neutralização viral (CLEMENTS *et al.*, 1996).

Quando os retrovírus encontram a célula hospedeira que apresenta os receptores específicos, os vírus podem adsorver aos receptores de mais de uma célula e causar fusão das células sem, no entanto, ocorrer multiplicação viral. Geralmente os retrovírus adsorvem aos receptores em uma célula e então penetram através de endocitose mediada por receptor ou através de fusão do envelope viral com a membrana da célula hospedeira (CLEMENTS *et al.*, 1996).

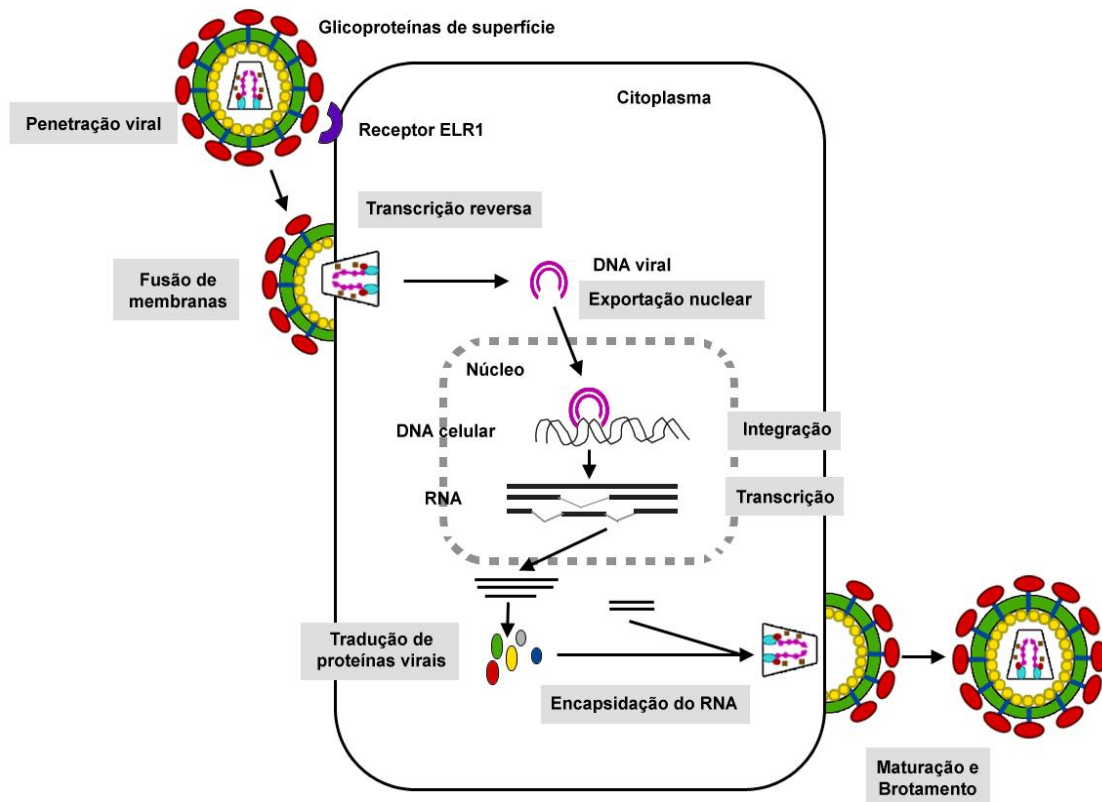


FIGURA 5: Representação do ciclo de multiplicação do *Equine infectious anemia virus*
(LEROUX *et al.*, 2004, modificado)

A adsorção do EIAV na célula hospedeira é mediada pelo receptor funcional para o EIAV, denominado ELR-1 (receptor lentivírus equino-1), membro da família de proteínas de receptores de fator de necrose tumoral (TNFR), o qual é expresso em várias células de equinos, como os macrófagos e monócitos, os quais são células permissivas para a multiplicação do EIAV. O ELR-1 interage com a glicoproteína de superfície gp90 do EIAV, que ativa a fusão de membranas (ZHANG *et al.*, 2005, 2008).

A ligação do EIAV ao receptor ELR-1 desencadeia uma via endocítica dependente de pH, produzindo a acidificação de vesículas endossomais celulares. O valor de pH nesses compartimentos ácidos parece ser ótimo entre 4,5 e 5,0, e essa acidificação causa mudanças conformacionais na estrutura da proteína do envelope, o que promove a fusão das bicamadas lipídicas do envelope viral com as vesículas celulares. Essa endocitose dependente de pH é necessária para a penetração do

EIAV em fibroblastos equinos permissivos ao vírus *in vitro* e em macrófagos *in vivo*, célula alvo de infecção do EIAV (BRINDLEY *et al.*, 2005; JIN *et al.*, 2005).

Após a adsorção da partícula viral ao receptor celular e a subsequente fusão das membranas virais e celulares, a partícula viral é parcialmente desnudada e o ácido nucleico viral é liberado no citoplasma da célula hospedeira. Dentro da célula, o genoma de RNA é convertido em DNA pela transcriptase reversa (RT) viral, essa é uma característica marcante e específica dos retrovírus. Após esse processo, a molécula de DNA viral é integrada no cromossomo do hospedeiro, onde permanece como um provírus e essa reação é catalizada pela enzima integrase. Essa integração genômica é semi-aleatória, mas ocorre preferencialmente em sítios transcricionalmente ativos. Os processos de transcrição reversa e integração promovem a modificação das sequências LTRs nas extremidades do genoma, ao promover a duplicação das sequências U5 e U3, de tal modo que os provírus passam a apresentar a sequência U3-R-U5 em ambas as regiões terminais do genoma (CLEMENTS *et al.*, 1996; TANG *et al.*, 1999; GOFF, 2013).

O processo de transcrição reversa durante o ciclo de multiplicação dos retrovírus contribui para a mutação desses vírus, refletindo a elevada variação genética do EIAV. As taxas de mutação dos retrovírus são provavelmente o resultado da acurácia de três eventos de polimerização durante o ciclo de multiplicação: (1) transcrição reversa do RNA viral em DNA viral dupla fita pela RT; (2) replicação do DNA viral (após ser integrado no cromossomo do hospedeiro) pela DNA polimerase celular; e (3) síntese do DNA em RNA de polaridade positiva pela RNA polimerase II. Essa variação genética significativa do EIAV se deve a ausência de atividade revisora da transcriptase reversa viral, contribuindo para as taxas de mutação observadas nos retrovírus. Como consequência da natureza altamente propensa a erros da RT codificada pelos vírus, cada nova etapa de transcrição reversa pode resultar na introdução de pelo menos uma mutação no genoma viral, permitindo a rápida geração de variantes virais, as quais são denominadas quasispecies (BAKHANASHVILI & HIZI, 1993; COOK *et al.*, 2013).

Durante a transcrição reversa, a síntese da fita negativa de DNA é iniciada na região 3' terminal de um RNAt (RNA de transferência) parcialmente desenrolado que se pareia em uma região complementar na fita positiva do RNA genômico viral usado como molde. Essa região é denominada PBS (sítio de ligação ao iniciador), que funciona como um iniciador da transcrição (Figura 6.1). A síntese da fita negativa de DNA continua até alcançar a região 5' terminal do RNA viral para gerar as sequências U5 e U3, produzindo um DNA intermediário de comprimento descontínuo, denominado -sssDNA (fita negativa de forte parada) (Figura 6.2). Em seguida ocorre a translocação do -sssDNA da região 5' para a 3' do genoma. Esta translocação requer a degradação da sequência de RNA 5', catalizada pela atividade da RNase H (ribonuclease H) (Figura 6.3). Expondo, dessa forma, a fita simples de DNA e facilitando o seu pareamento na sequência R (repetida) da região 3' terminal do genoma, recriando, assim, um iniciador disponível, ou seja, uma estrutura molde para a síntese de DNA. A transcriptase reversa (RT) pode agora continuar a alongar o -sssDNA (Figura 6.4). Como o genoma passa a apresentar um forma híbrida de RNA:DNA, o RNA torna-se suscetível a ação da RNase H e é degradado. Em seguida inicia-se a síntese da fita positiva de DNA em uma sequência particularmente, rica em purina, próxima à região 3' terminal, denominada trato polipurina (ppt), a qual é relativamente resistente à atividade da RNase H (figura 6.5). O oligonucleotídeo permanece hibridizado na fita negativa de DNA, servindo como um iniciador para a síntese da fita positiva de DNA a partir da fita molde negativa de DNA. A síntese procede a partir da região 3' terminal até a 5' terminal da fita negativa, primeiro copiando as sequências U3, R e U5, e em seguida estendendo para copiar a porção do iniciador RNAt ainda presente na região 5' terminal (Figura 6.6 e 6.7). Nesse ponto a elongação da fita para em uma base alterada no RNAt, resultando no intermediário +sssDNA (fita positiva de forte parada). Então a RNase H remove o RNAt na região 5' final na fita negativa de DNA, expondo as sequências do +sssDNA que são complementares às sequências em/ou próximas à região 3' final da fita positiva de DNA, permitindo o pareamento da fita +sssDNA com a fita negativa de DNA. Ao final ocorre a elongação de ambas as fitas e a síntese é realizada, com as fitas positiva e negativa de DNA cada uma servindo

como molde para a outra fita (Figura 6.8) (TELESNITSKY & GOFF, 1997; GOFF, 2013).

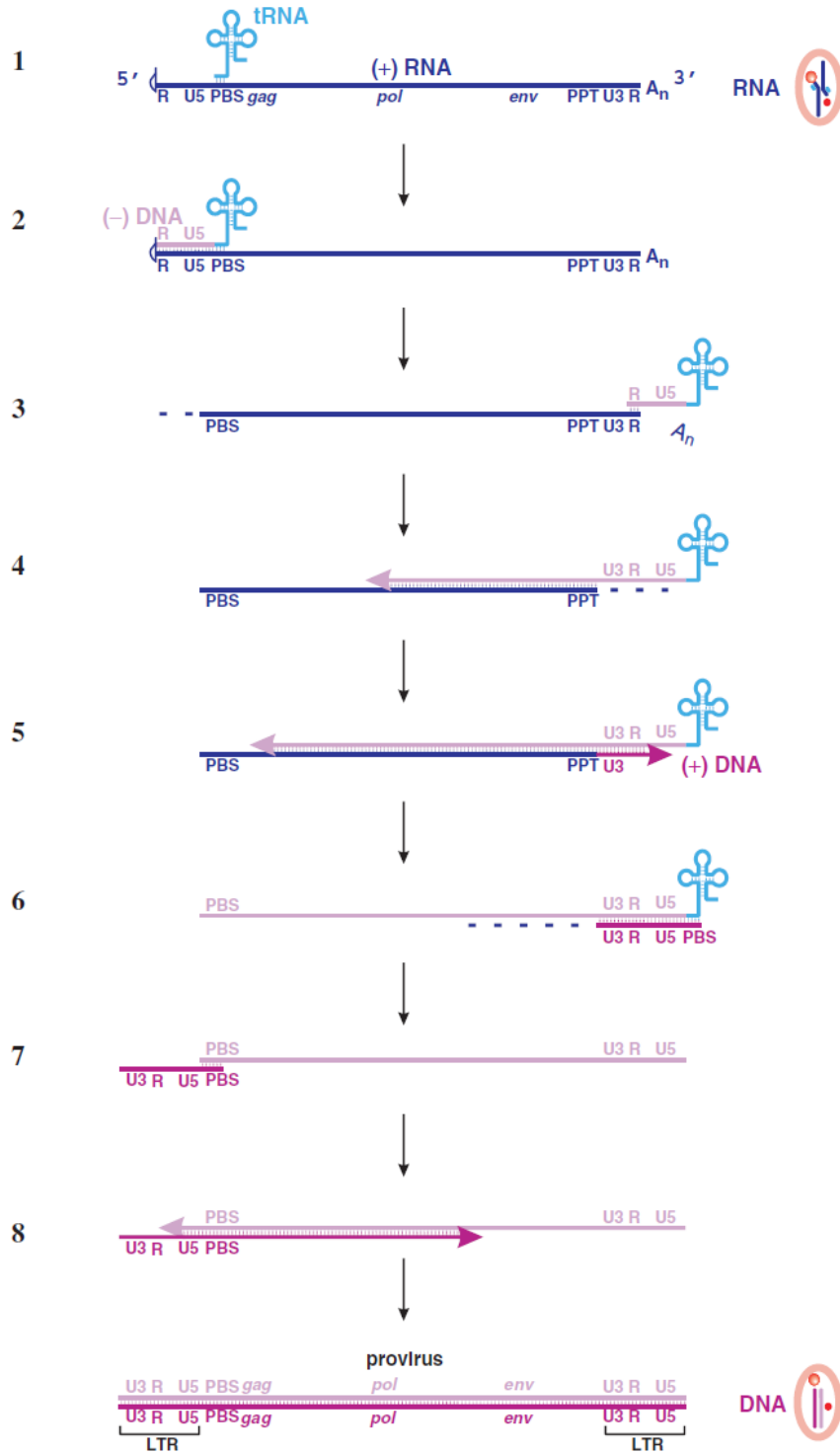


FIGURA 6: Representação do processo de transcrição do RNA viral dos retrovírus (CARTER & SAUNDERS, 2007)

O DNA fita dupla produzido pelo processo de transcrição reversa a partir do RNA genômico viral é integrado no genoma do hospedeiro, formando o provírus que apresenta sequências idênticas nas regiões LTRs nas extremidades do genoma, essa reação é catalizada pela integrase viral. Após a integração do DNA viral no genoma do hospedeiro, ocorre a transcrição que se inicia na extremidade U3-R da região LTR, a qual contém um promotor reconhecido pela RNA polimerase II do hospedeiro. Então a transcrição continua na região 3' LTR posterior do genoma, e termina na extremidade R-U5. Ao final o RNA é clivado, adquire um cap adicional na região 5' LTR, e é poliadenilado na extremidade R-U5 da região 3' LTR, restabelecendo o genoma de RNA viral completo, que se torna disponível para a incorporação na partícula viral (Figura 7) (GOFF, 2013).

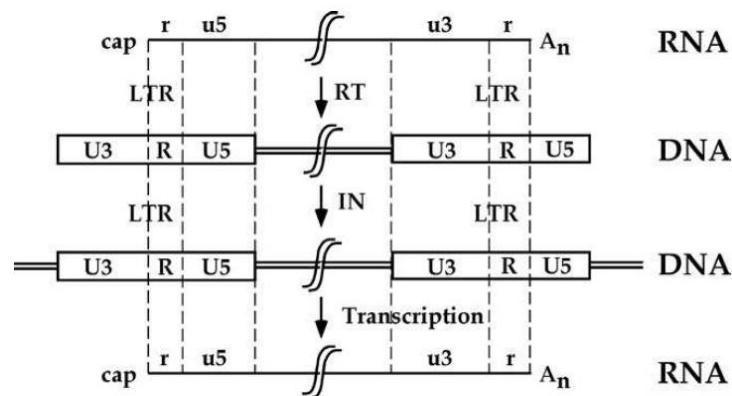


FIGURA 7: Estrutura da região LTR do RNA e DNA viral nos diferentes estágios do ciclo de multiplicação viral – No genoma de RNA as regiões da LTR estão identificadas por letras minúsculas, e no DNA por letras maiúsculas (GOFF *et al.*, 2013).

No processo de tradução, os genes *gag*, *pol* e *env* são expressos por mecanismos complexos pela formação de proteínas precursoras, que são processadas durante e após a montagem para formar a partícula viral madura (GOFF, 2013). A Pr55^{gag} é a poliproteína precursora do gene *gag* do EIAV, que é clivada por proteases em vários eventos de processamento intermediários, gerando as quatro proteínas estruturais internas características do EIAV (p15, p26, p11 e p9), necessárias para a montagem da partícula viral e posterior encapsidação do genoma viral, e brotamento da célula hospedeira (MONTELARO *et al.*, 1993; HUSSAIN *et al.*, 1988; LEROUX *et al.*, 2004). Outra poliproteína do EIAV é a Pr180^{gag/pol}, precursora da proteína Gag-Pol

que produz as enzimas codificadas pelo gene *pol*, incluindo a transcriptase reversa, RNase H, protease, integrase, e a dUTPase, que é essencial para a multiplicação e expressão do EIAV em macrófagos (THREADGILL *et al.*, 1993; LICHTENSTEIN *et al.*, 1995; LEROUX *et al.*, 2004). Enquanto as glicoproteínas do envelope e as enzimas codificadas pelo gene *pol* são necessárias para a produção de partículas virais infecciosas, geralmente a expressão sozinha das proteínas Gag é suficiente para a montagem e liberação de partículas virais não infecciosas, denominadas VLPs (partículas semelhantes a vírus) (DEMIROV & FREED, 2004).

Após o processamento proteolítico da proteína Gag, é induzida uma transformação na estrutura do vírus durante o processo de maturação, em que a proteína matriz (MA) permanece associada com a face interna da membrana viral, enquanto que a proteína do capsídeo (CA) condensa para formar um envoltório ao redor do complexo formado pela associação entre o RNA viral e nucleocapsídeo (RNA/NC) (FREED, 1998). A clivagem da poliproteína Env por uma protease do hospedeiro produz as proteínas de superfície (SU) e transmembrana (TM) que são posteriormente glicosiladas e transportadas para a membrana plasmática (CARTER & SAUNDERS 2007). Ao final do ciclo de multiplicação ocorre a montagem da partícula viral na face interna da membrana plasmática, que se inicia quando as proteínas Gag e Gag-Pol se ancoram na membrana. Esta associação é estabilizada por interações eletrostáticas entre as cargas positivas dos domínios da proteína matriz (MA) e as cargas negativas dos grupos fosfato da membrana plasmática da célula hospedeira. A partícula viral imatura então adquire seu envelope por brotamento da membrana da superfície da célula hospedeira, criando uma abertura sobre a membrana, que induz uma curvatura, promovendo o brotamento da partícula viral nascente para fora, então o vírus é liberado e a membrana da célula hospedeira é reconstituída (CARTER & SAUNDERS, 2007).

1.3.4. Caracterização molecular e filogenia do EIAV

A AIE foi descrita inicialmente em 1843 (LIGNEE, 1843). Seu primeiro relato foi no Japão em 1883, e várias amostras japonesas do EIAV foram isoladas nos anos de 1940 e 1960, incluindo EIAV_{Goshun} (número de acesso no GenBank AB675093.1), EIAV_{Tokyo} (AB675094.1) – as duas sequências de 739 e 740 pb, respectivamente para o gene *gag*, e EIAV_{Tsukiboshi} (DONG *et al.*, 2014). Embora a AIE tenha sido descrita a mais de 150 anos atrás, durante muito tempo as únicas sequências de genoma completo disponíveis tinham sido obtidas somente a partir de duas amostras de campo, Wyoming (número de acesso no GenBank - primeiro depósito no ano de 1998 - AF033820.1, número atual NC_001450.1 – modificação em agosto de 2018), isolada nos Estados Unidos (PETROPOULOS, 1997), e Liaoning, isolada na China (AF327877.1) (TU *et al.*, 2007). Todas as outras sequências de genoma completo do EIAV foram geradas em laboratório, a partir dessas duas amostras. Algumas das amostras derivadas da Wyoming são V26 (AB008197.1), V70 (AB008196.1), WSU5 (AF247394.1), e EIAVUK (AF016316.1) (COOK *et al.*, 1998; DONG *et al.*, 2014; MCGUIRE *et al.*, 2000; ZHENG *et al.*, 2000). Diversas amostras foram geradas a partir da Liaoning, incluindo uma amostra vacinal – Vaccine (AF327878), e outras como, por exemplo, DV35-20 (HM141911.1), FDDV-10 (GU385360.1), DLV18-8 (HM141923.1) e DV117 (HM141912.1) (WANG *et al.*, 2011).

As sequências de genoma completo V70 e V26 (ZHENG *et al.*, 2000), inicialmente descritas como sendo de origem japonesa baseado em relatos publicados, tem sido incluídas como vírus de origem japonesa ou asiática em diversos estudos epidemiológicos e filogenéticos publicados (CAPOMACCIO *et al.*, 2012). Contudo, atualmente, por meio de estudos de análise nucleotídicas e filogenéticas, foi demonstrado que V70 e V26 foram originados de uma mesma amostra, variantes de passagens seriadas da amostra norte americana Wyoming, apesar da extensiva separação geográfica, como demonstrado pela árvore filogenética da figura 8. Assim, as amostras V70 e V26 não são de origem japonesa, sendo derivadas de vírus que foram importados em alguma época durante os anos de 1960 de um

laboratório da American Type Tissue Collection (ATCC), nos Estados Unidos, para estudos de inoculação experimental em cavalos. Esta conclusão foi derivada a partir de declarações publicadas em jornais científicos japoneses que declararam que V70 e V26 são variantes de passagens seriadas da amostra norte americana Wyoming (DONG *et al.*, 2014).

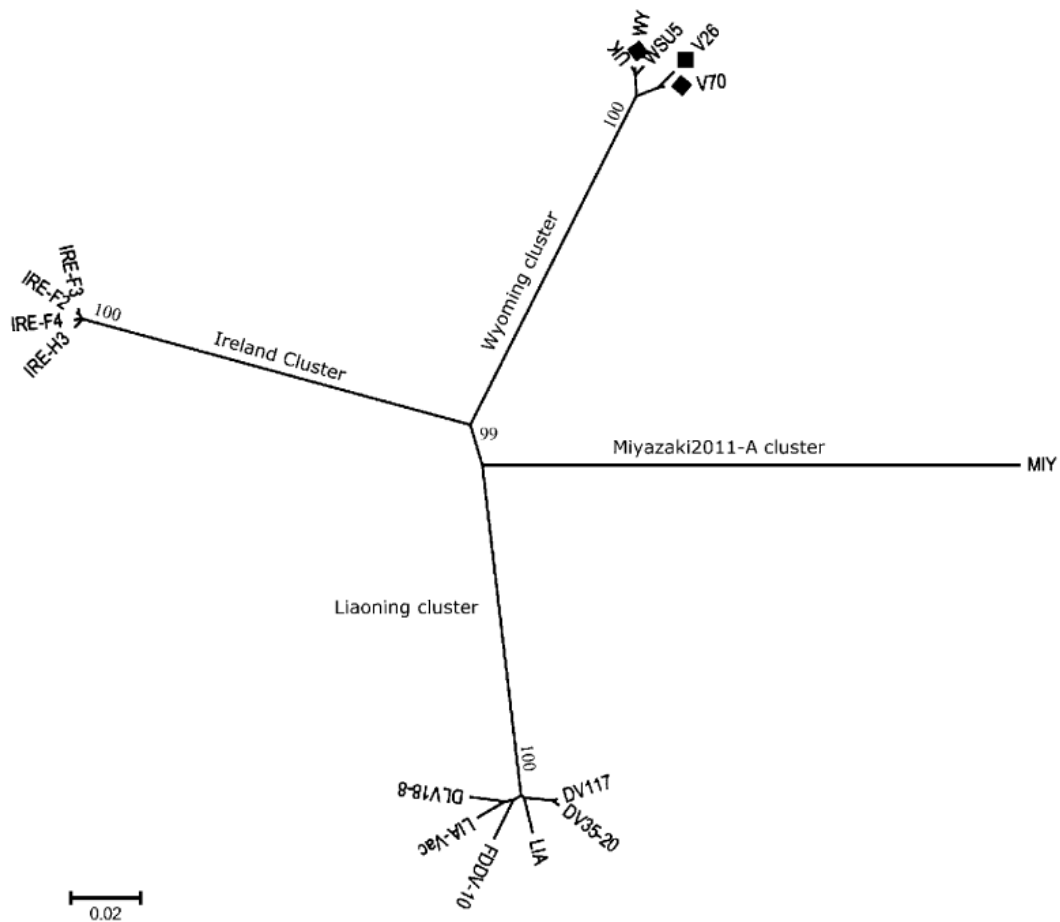


FIGURA 8: Árvore filogenética de sequências de genoma completo do EIAV norte-americanas, asiáticas e europeias - Análise filogenética do genoma proviral completo de sequências do EIAV. A árvore filogenética foi construída usando o programa MEGA versão 6.0 (Tamura *et al.*, 2013), empregando o método Neighbor-joining em conjunção com o algoritmo Maximum Composite Likelihood para computar a distância evolutiva. Valores de bootstrap foram determinados baseado em 1000 replicatas. As sequências comparadas incluem: WY, Wyoming (AF033820); UK, EIAVuk (AF016316); V26 (AB008197); V70 (AB008196); WSU5 (AF247394); LIA, Liaoning (AF327877); LIA-Vac, Vaccine (AF327878); DLV18-8 (HM141923); DV35-20 (HM141911); DV117 (HM141912); FDDV-10 (GU385360.1); IRE-F2, Ireland-F2 (JX480631); IRE-F3, Ireland-F3 (JX480632); IRE-F4, Ireland-F4 (JX480633); IRE-H3, Ireland-H3 (JX480634), disponíveis no GenBank (DONG *et al.*, 2014).

Em 2013, foi sequenciado o genoma completo do EIAV de cinco amostras de cavalos infectados naturalmente da Ásia e Europa. Uma amostra do Japão - Miyazaki (JX003263.1) (DONG *et al.*, 2013), e quatro amostras da Irlanda - H3 (JX480634.1), F4 (JX480633.1), F3 (JX480632.1) e F2 (JX480631.1) (QUINLIVAN *et al.*, 2013). Recentemente em 2017, foi sequenciado aproximadamente 95% do genoma do EIAV de amostras de dois equídeos naturalmente infectados em um surto de AIE na Itália ocorrido em 2006 – SA (KM247555.2) e DE (KM247554.1) (CAPPELLI *et al.*, 2017). Até o momento não existe nenhuma sequência brasileira de genoma completo do EIAV disponível no GenBank.

A sequência Miyazaki (JX003263.1) do Japão foi obtida a partir de DNA proviral, amplificado de amostras de PBMCs de cavalos infectados naturalmente. Em 2011 foram coletadas amostras de 12 equídeos, um cavalo selvagem nativo do Japão, denominado Misaki (embora tecnicamente seja um pônei, baseado em seu tamanho e sua conformação), que habita a área Toi-Cape, Miyazaki, no Sul do Japão. Os 12 cavalos foram positivos para AIE nos testes sorológicos IDGA e imunoblot, e confirmados por “nested” PCR (DONG *et al.*, 2012), e posteriormente foi feito o sequenciamento do genoma proviral completo de uma amostra (DONG *et al.*, 2013).

A sequência Miyazaki apresenta 8.208 pb. A região LTR apresenta 306 pb, sendo menor quando comparada às sequências Wyoming (323 pb) e Liaoning (316 pb). Formada por uma região única 3' (U3) de 186 pb, uma região repetida (R) de 80 pb, junto com uma região menor única 5' (U5) de 40 pb. A ORF do gene *gag* possui 1.452 pb, codificando uma poliproteína precursora-GAG de 484 aa. O gene *pol* possui 3.408 pb, se localiza na posição nucleotídica 1.691-5.098. O gene *env* possui 2.601 pb ocupa a posição nucleotídica 5.285-7.885, que codifica uma glicoproteína de superfície (SU) – gp90 de 1356 pb (425 aa), a glicoproteína transmembrana (TM) – gp45 de 1245 pb (415 aa). A ORF do gene *tat* de 246 pb, consiste de dois exons, um de 96 pb, localizado entre a região 5' LTR e o início do gene *gag*, na posição 349-444 nt, outro exon de 150 pb, localizado imediatamente após o gene *pol*, na posição 5.099-5.248 nt. A ORF S2 de 234 pb, localizada na posição 5.259-5.492 nt, sendo que 26 nt formam uma ORF alternativa na região 5' terminal do gene *env*.

Duas ORFs de *rev*, localizadas dentro do gene *env*, ocupam as posições 5.426-5.525 e 7.232-7.635 nt (DONG *et al.*, 2013).

O alinhamento de nucleotídeos da sequência Miyazaki com as sequências Wyoming, e as derivadas desta – V26, V70, WSU5 e EIAVUK, e Liaoning, e as derivadas desta – DV35-20, DLV18-8, DV117 e FDDV-10 demonstrou que as amostras virais derivadas dos isolados Wyoming e Liaoning, apesar de apresentarem extensiva passagem *in vitro* e *in vivo*, mantiveram significativa identidade com os isolados de origem, com identidades nucleotídicas de 97,5-98,9% com Wyoming e 97,1%-97,9% com Liaoning. No entanto, a sequência Miyazaki compartilhou somente 77,2% de identidade nucleotídica com Wyoming, e 78,7% com Liaoning, o que é similar à identidade nucleotídica de 80,2% entre Wyoming e Liaoning, sugerindo que esses três vírus surgiram independentemente após divergirem de um ancestral comum. Quando se analisa os genes separadamente, a sequência Miyazaki comparada às sequências Wyoming e Liaoning compartilhou identidade nucleotídica de 71,6-80,4% com a região LTR, 77,7-81,8% com *gag*, 80,9-81,3% com *pol* e 71,0-73,3% com *env* (DONG *et al.*, 2013).

A análise de similaridade nucleotídica da sequência Miyazaki com as sequências Wyoming e Liaoning e as derivadas desta, descritas acima, mostrou evidência de variação significativa em relação a todos as sequências utilizadas na análise. Esta análise demonstrou também que as sequências norte-americana Wyoming e asiática Liaoning não são proximamente relacionadas. Além disso, é altamente improvável que Miyazaki, Wyoming ou Liaoning tenham sido derivadas a partir de eventos de recombinação entre si, sendo assim, elas provavelmente constituem linhagens separadas (DONG *et al.*, 2013).

Além da sequência de genoma completo Miyazaki, foram obtidas 11 outras sequências parciais de cavalos Misaki positivos para AIE [Misaki (MY)-5, -25, -29, 35, -47, -53, -56, -65, -67, -69 e -75] de 910 pb que compreende a região 5' LTR (90 pb), a região não codificadora (47 pb), o exon 1 do gene *tat* (96 pb), e os primeiros 677 pb do gene *gag*. As sequências apresentaram identidade nucleotídica de 95,1-

98,2% entre si. No entanto esses 11 isolados apresentaram somente 80,7-81,9% e 81,2-82,5% de identidade nucleotídica com as sequências Wyoming e Liaoning (incluindo as amostras derivadas a partir destas), respectivamente (DONG *et al.*, 2013).

A análise filogenética baseada neste fragmento de 910 pb demonstrou que todas as sequências obtidas a partir dos cavalos Misaki formam um clado separado comparado as sequências Wyoming e Liaoning (Figura 9). Este fato fornece forte evidência que todos os cavalos Misaki foram infectados com amostras proximamente relacionadas, que provavelmente compartilham um ancestral comum, uma observação completamente consistente com o fato de que esses cavalos não tiveram contato recente com outros equídeos. A análise filogenética da região LTR e dos principais genes estruturais do EIAV – *gag*, *pol* e *env* demonstrou que Miyazaki compreende um grupo monofilético separado (Figura 10). Assim, os resultados obtidos nesse estudo implicam que pelo menos dois subtipos ou clados do EIAV são ou foram em algum momento amostras circulantes na Ásia (DONG *et al.*, 2013).

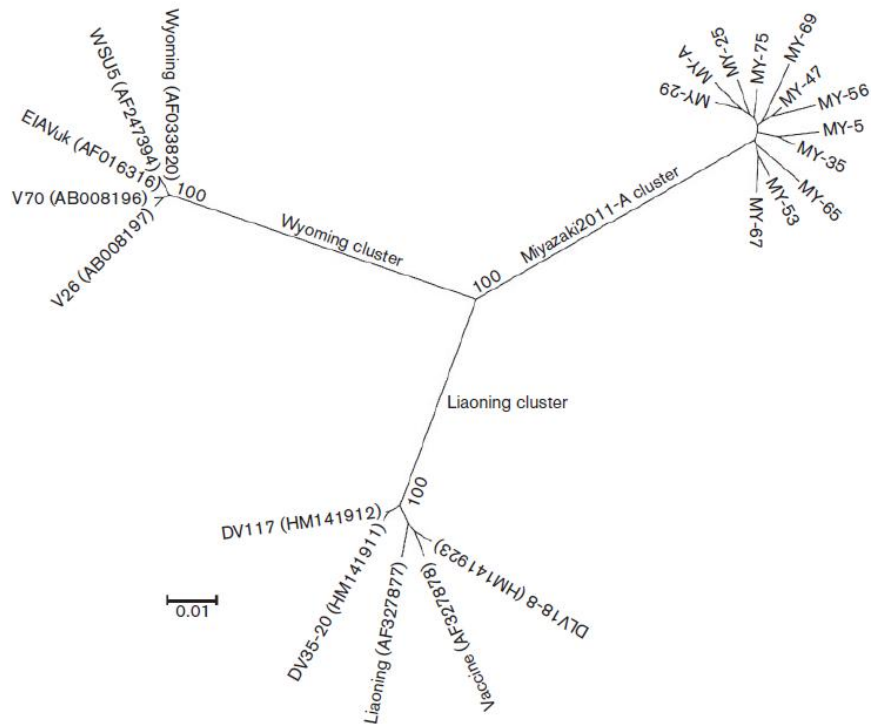
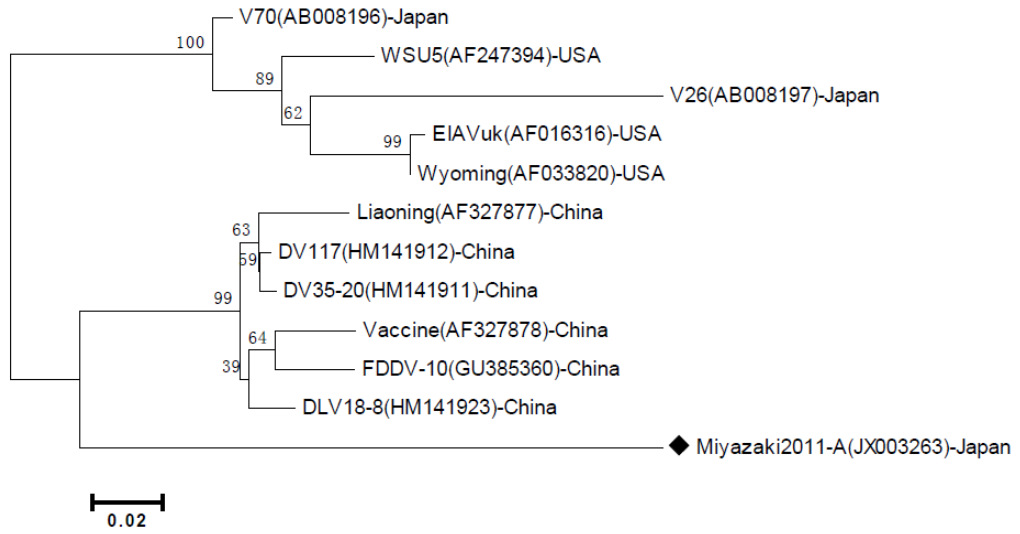
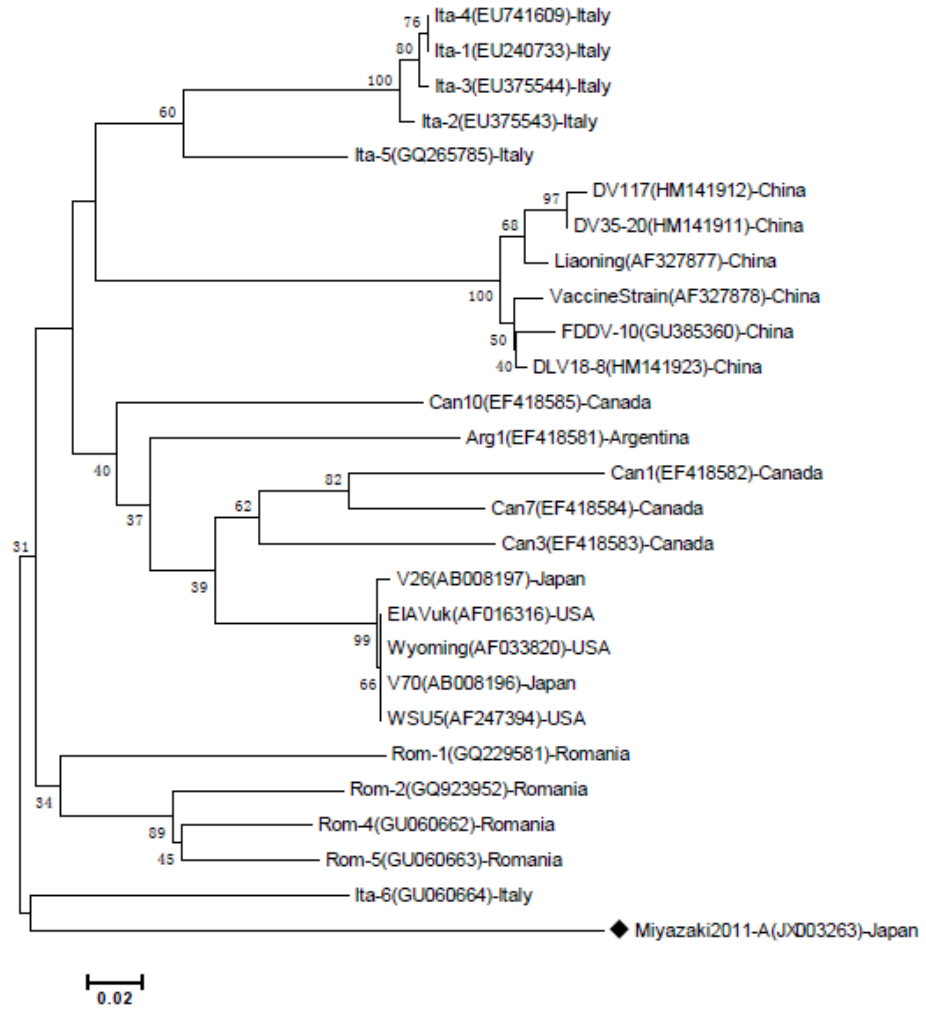


FIGURA 9: Árvore filogenética de 12 sequências nucleotídicas de 910 pb do EIAV de amostras de cavalos Misaki do Japão – A análise filogenética foi baseada na sequência nucleotídica de 910 pb para a região 5' LTR, exon 1 do gene *tat* a uma região parcial do gene *gag*. A árvore filogenética foi construída no programa Mega versão 5.05 (TAMURA *et al.*, 2011), empregando o método neighbour-joining em conjunto com o algoritmo maximum-composite likelihood para computar as distâncias evolutivas. Valores de bootstrap foram baseados em 1000 replicatas. As sequências de EIAV dos cavalos Misaki são denominadas MY-A (Miyazaki2011-A), -5, -25, -29, -35, -47, -53, -56, -65, -67, -69 e -75. A análise foi feita em comparação com as sequências: Wyoming, EIAVUK, V26, V70, WSU5, Liaoning, Vaccine, DLV18-8, DV35-20 e DV1117 (DONG *et al.*, 2013).

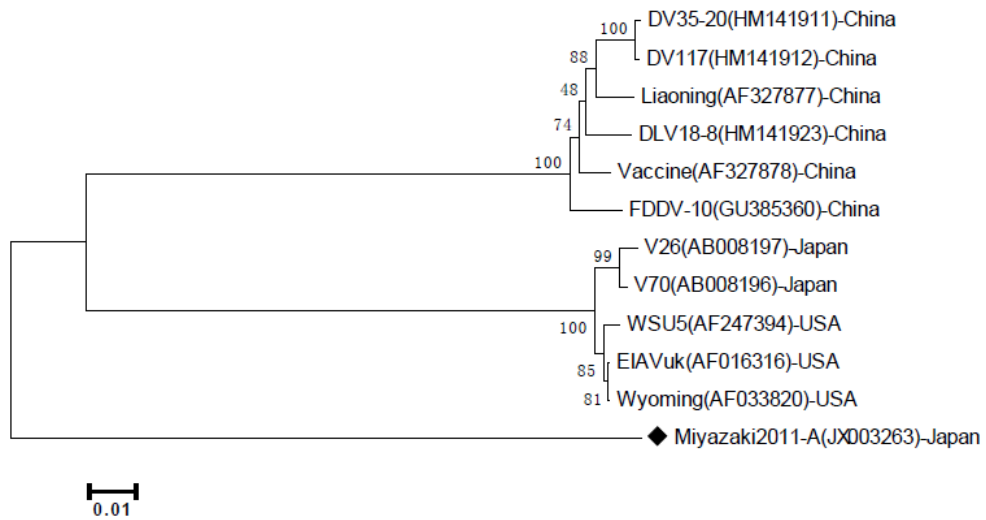
(a)



(b)



(c)



(d)

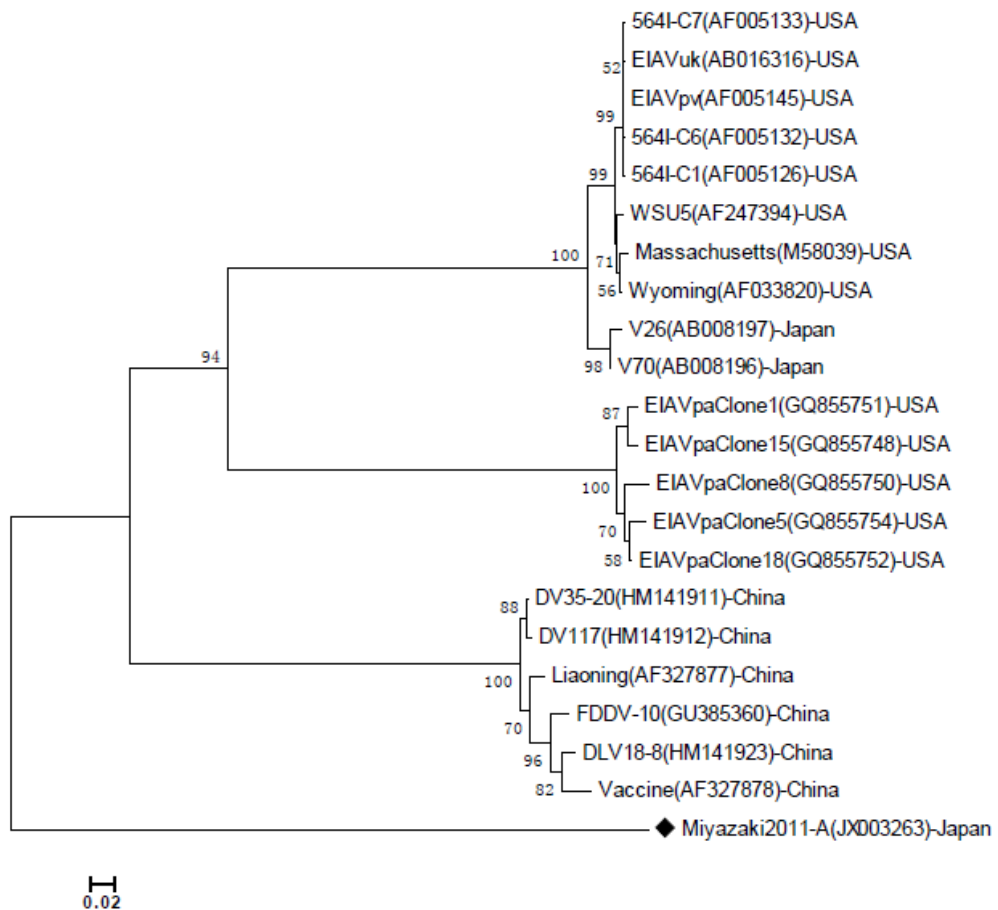


FIGURA 10: Árvore filogenética da sequência do Japão Miyazaki para a região LTR (a), o genes *gag* (b), *pol* (c) e *env* (d) – A análise foi feita em comparação com as sequências Wyoming e Liaoning e as derivadas destas duas, junto com sequências de isolados norte-americanos e europeus

para os genes *gag*, *pol* e *env*. As sequências foram alinhadas usando o CLUSTAL W no programa Mega versão 5.05 (TAMURA *et al.*, 2011). A árvore filogenética foi construída no programa Mega versão 5.05 (TAMURA *et al.*, 2011), empregando o método neighbour-joining em conjunto com o algoritmo maximum-composite likelihood para computar as distâncias evolutivas. Valores de bootstrap foram baseados em 1000 replicatas. A informação de cada sequência, como número de acesso no GenBank e país de origem estão incluídas na figura (DONG *et al.*, 2013).

As quatro sequências da Irlanda foram obtidas a partir de DNA proviral de amostras de tecido de quatro equídeos infectados naturalmente, durante um surto de AIE na Irlanda em 2006, sendo três potros (F2, F3 e F4) e uma égua [cavalo 3 (H3)]. Essas sequências variaram em tamanho, sendo H3 (8266), F2 (8254), F3 (8275) e F4 (8272 pb), as quais apresentaram 99% de identidade nucleotídica entre si. A sequência consenso dessas quatro sequências, denominada EIAV_{IRE}, foi comparada a duas sequências de genoma completo, sendo maiores que as sequências Wyoming (8228 bp) e Liaoning (8235 bp), apresentando identidade nucleotídica menor que 80% com estas duas sequências. A sequência consenso da região LTR para o EIAV_{IRE} obtida a partir dos isolados H3, F2, F3 e F4 foi de 313 pb foi menor do que a das sequências Wyoming (323 pb) e Liaoning (316 pb). A sequência consenso LTR do EIAV_{IRE} compartilhou apenas 77,3–77,6% e 78,1–78,4% de identidade nucleotídica com as sequências Wyoming e Liaoning, respectivamente (QUINLIVAN *et al.*, 2013).

Análises das sequências mostraram que nenhuma das quatro sequências (H3, F4, F3 e F2) apresentaram regiões extensivas de identidade genética com as sequências Wyoming e Liaoning, assim como entre as sequências Wyoming e Liaoning. Além disso, parece improvável que Wyoming foi derivada a partir de eventos de recombinação com Liaoning ou vice versa; e é igualmente improvável que recombinação envolvendo Wyoming e Liaoning esteja recentemente envolvido na geração de EIAV_{IRE}. A análise filogenética mostrou que as sequências compreendem três grupos monofiléticos separados, separadas por distâncias evolutivas similares – Wyoming e as sequências derivadas desta, Liaoning e as sequências derivadas desta e as quatro sequências da Irlanda (H3, F4, F3 e F2).

Sugerindo que Wyoming, Liaoning e EIAV_{IRE} evoluíram independentemente umas das outras, divergindo de um ancestral comum (QUINLIVAN *et al.*, 2013).

As sequências SA e DE da Itália possuem 7.841 pb, compreendendo os genes *gag*, *pol*, *env* e as ORFs *tat*, *S2* e *rev*. Diferente das demais sequências do EIAV que foram obtidas por sequenciamento de Sanger, as sequências SA e DE foram obtidas por tecnologia de 'next-generation sequencing' (NGS) através de uma etapa de 'long-range PCR'. Com este sequenciamento de alta cobertura, análises de bioinformática podem ser utilizadas para descobrir mutações de baixa frequência, não reveladas pelo sequenciamento de Sanger, e distingui-las de erros técnicos. No entanto, a técnica de NGS apresenta desvantagens, como demonstrado pela observação que amplicons de 7.8 Kb foram produzidos para somente 20% das amostras testadas no estudo, uma vez que a etapa de 'long-range PCR' é relativamente insensível e susceptível a potenciais 'mismatches' entre os iniciadores e as sequências alvo (CAPPELLI *et al.*, 2017).

As sequências SA e DE foram obtidas a partir de amostras de tecido de dois potros, a partir de um surto da AIE que ocorreu na Itália em 2006. Esse surto que ocorreu em 2006 simultaneamente na Itália e Irlanda tem sido atribuído à transmissão iatrogênica, através da infusão de produtos de plasma de cavalo contaminado em potros recém-nascidos da raça Puro-Sangue (CAPPELLI *et al.*, 2017). Ao contrário da maior parte dos casos de AIE identificados na Europa que envolvem portadores inaparentes e ausência de sinais clínicos, esses surtos na Itália e Irlanda foram caracterizados por doença grave, e algumas vezes fatal tanto em cavalos adultos quanto potros (CAPPELLI *et al.*, 2011; CULLINANE *et al.*, 2007).

Análises demonstraram que as sequências SA e DE apresentaram 99,3% de identidade nucleotídica entre si. Quando comparadas à sequência F2, isolada na Irlanda durante o surto da AIE em 2006, apresentaram identidade de 99,2% e 99,1% com SA e DE, respectivamente. O que demonstra que os cavalos infectados com as amostras SA, DE e F2, foram infectados com vírus semelhantes, provavelmente derivados da mesma fonte, apesar das suas localizações geográficas distintas. A

observação de que SA teve uma identidade nucleotídica levemente mais alta (99,2%) com F2 do que DE (99,1%) provavelmente pode ser explicada pelo fato do potro DE ter sobrevivido quase três vezes mais tempo após a infecção, dando mais tempo para as substituições nucleotídicas se acumularem (CAPPELLI *et al.*, 2017).

Diversos estudos têm feito a caracterização molecular e análise filogenética de regiões parciais do genoma do EIAV, amplificadas a partir de amostras de equídeos infectados naturalmente de diferentes regiões geográficas mundiais, como Canadá, Itália, Romênia, Bélgica, Eslovenia, Bahia-Brasil e França. A maior parte de sequências parciais do genoma do EIAV disponíveis são para o gene *gag* e algumas para a região 5' LTR, como exemplificado a seguir (NAGARAJAN & SIMARD, 2007; CAPPELLI *et al.*, 2011; CAPOMACCIO *et al.*, 2012; KUHAR *et al.*, 2013; CAIJ *et al.*, 2014,; KUHAR & MALOVRH, 2016, TIGRE *et al.*, 2017, GAUDAIRE *et al.*, 2017; SHARAV *et al.*, 2017).

Estudos foram feitos com 54 amostras do Canadá, positivas no teste IDGA, coletadas entre os anos de 2001 e 2005, e incluindo também amostras de quatro casos clínicos de AIE que correram em 1999, 2001, 2003 e 2005. Foi feita a caracterização molecular e análise filogenética de um fragmento de 414 nucleotídeos de 20 amostras para uma sequência parcial do gene *gag*, incluindo 10 sequências do Canadá (designadas como Can1-Can10) e uma amostra de um cavalo da Argentina (designada como Arg1). As amostras Can1 (1999), Can3 (2002), Can7 (2004) e Can10 (2005) são variantes clínicas, que foram identificadas inicialmente em um único cavalo que estava apresentando sintomas agudos graves relacionados à infecção pelo EIAV. Estes animais são de diferentes rebanhos em diferentes intervalos de tempo, como identificado pelo ano entre parênteses para cada amostra. As variantes subclínicas são Can2 (2001), Can4 (2002), Can5 (2003), Can6 (2003), Can8 (2005) e Can9 (2005). A análise filogenética mostrou que as sequências Can1-Can10, Arg1 e outras sequências do EIAV revelaram um agrupamento em certo grau baseado na localização geográfica (Figura 11). As sequências do Canadá agruparam próximas, enquanto que a sequência da

Argentina ficou separada e próxima em relação às sequências do Canadá (NAGARAJAN & SIMARD, 2007).

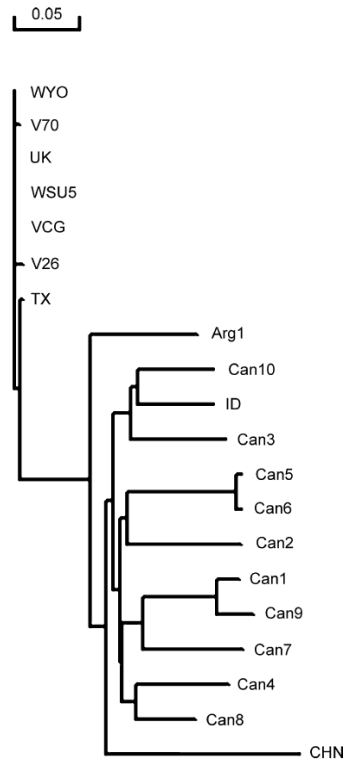


FIGURA 11: Árvore filogenética de 11 sequências nucleotídicas do gene *gag* do EIAV de 10 amostras do Canadá e uma da Argentina – Árvore filogenética demonstrando as relações entre sequências do EIAV baseada em 414 nucleotídeos do gene *gag*. As sequências foram analisadas pelo método ‘observed divergency distance’ do programa DNAMAN (Lynnon Biosoft). As distâncias verticais são arbitrárias e os comprimentos dos ramos horizontais são proporcionais à distância genética. As sequências do Canadá (Can1-Can10) e da Argentina (Arg1) foram comparadas com outras sequências do EIAV - (WYO, AF033820; Japanese V70, AB008196; UK, AF016316; WSU5, AY742244; VCG, M16575; Japanese V26, AB008197; TX, AF170894; ID, AF172098; CHN, AF327877) (NAGARAJAN & SIMARD, 2007).

Em 2006, em um surto de AIE que ocorreu na Itália foram coletadas amostras de cavalos durante um período de quatro anos de 2006 a 2009. No total foram coletadas 400 amostras de cavalos mantidos em 24 fazendas diferentes predominantemente nas regiões norte e central da Itália e quatro fazendas na região da Transilvânia na Romênia. Foi feita a caracterização molecular de 33 amostras, e desse total foram obtidas 10 sequências completas e parciais para o gene *gag*,

sendo seis sequências da Itália (Ita-1, Ita-2, Ita-3, Ita-4, Ita-5 e Ita-6) e quatro sequências da Romênia (Rom-1, Rom-2, Rom-4 e Rom-5). Foram obtidas também 23 sequências parciais de 313 pb para o gene *gag*, sendo 23 de amostras da Itália e uma amostra da Romênia. A análise filogenética das 33 sequências sugere que existem subtipos do gene *gag* circulando na Itália, dois dos quais também estão presentes na Romênia (Figura 12). Além disso, o principal subtipo parece estar geograficamente restrito (CAPPELLI *et al.*, 2011).

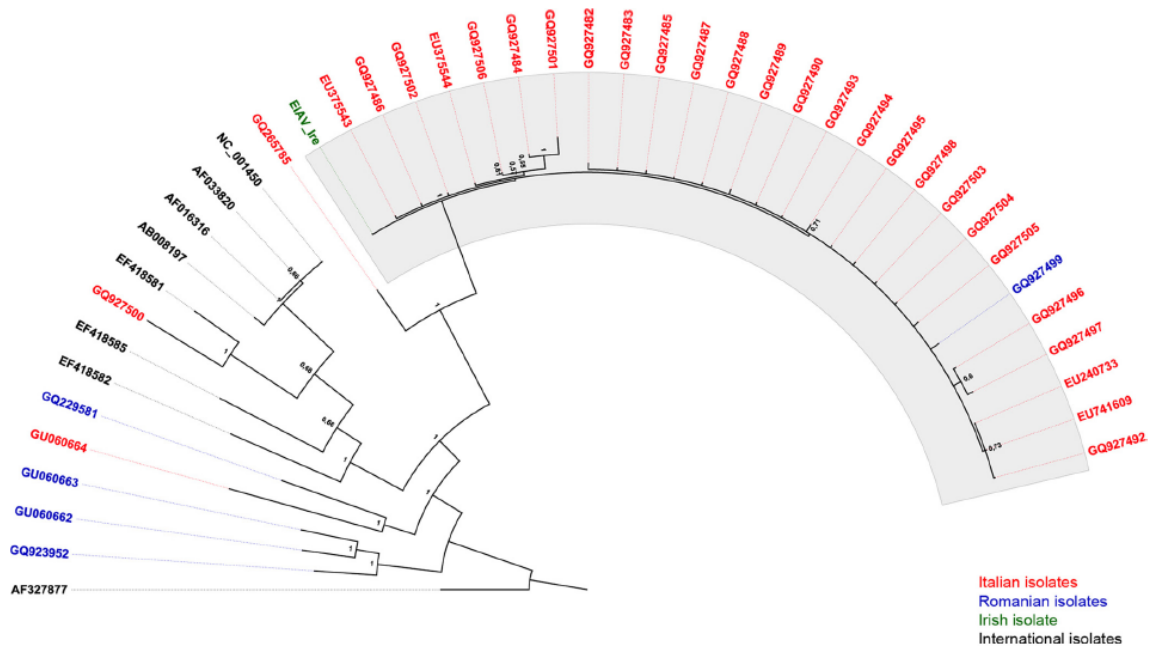


FIGURA 12: Árvore filogenética de 34 sequências nucleotídicas do gene *gag* do EIAV de amostras da Itália e Romênia – Árvore filogenética demonstrando as relações entre sequências do EIAV da Europa, América e Ásia. A árvore foi visualizada no programa FigTree 1.2.3. As regiões destacadas são os principais subtipos do gene *gag* na Itália. Sequências utilizadas na análise: NC_001450, reference genome; AF033820, Wyoming; AF016316, United Kingdom; AF327877, Liaoning; AB008197, Japan; EF418582, Canada-1; EF418585, Canada-10; and EF418581, Argentina 1; EIAV_{IRE} (CAPPELLI *et al.*, 2011).

Em um estudo de 2012 foi feita a detecção, caracterização molecular e análise filogenética do gene *gag* a partir de amostras de cavalos selvagens que habitam um sistema de ilhas localizado na Carolina do Norte nos Estados Unidos, denominada Shackleford Banks. No ano de 1996, 184 animais vivendo nesta área foram capturados e testados para AIE, e 76 foram soropositivos e foram eutanasiados

(CAPOMACCIO *et al*, 2012). No entanto, devido ao grande patrimônio cultural e genético insubstituível que esses animais representam, em 1988 foi criada uma lei de proteção a esses cavalos – ‘Shackleford Banks Wild Horse Protection Act’. Nos anos seguintes de 1997 e 1998, oito cavalos foram identificados como positivos para AIE e foram transferidos para uma instalação de quarentena e 10 anos depois três desses cavalos começaram a desenvolver sinais clínicos relacionados à AIE. A partir desses cavalos foi feita a detecção do EIAV por PCR, para amplificação do gene *gag* de três cavalos (SB1, SB2, SB3). Nesse mesmo estudo também foi feita a detecção, caracterização molecular e análise filogenética do EIAV a partir de duas amostras de cavalos do Brasil (EIAV_{Brazil95} e EIAV_{Brazil99}), e duas amostras de cavalos infectados experimentalmente com vírus isolado de dois casos de AIE na Flórida (EIAV_{FL}) e na Pensilvânia (EIAV_{PA}) (CAPOMACCIO *et al*, 2012).

A partir da análise filogenética das quatro sequências de Shackleford Banks (SB1-SEP, SB1-OCT, SB2 e SB3) de um fragmento de 1485 nucleotídeos correspondente ao gene *gag* foi observado que existe uma relação muito próxima entre os quatro isolados de Shackleford Banks o que sugere um ancestral comum com a sequência da Pensilvânia (EIAV_{PA}). Também é aparente que esses quatro isolados são membros de um grupo monofilético, o qual compreende quase exclusivamente sequências do continente Americano. A ocorrência de um segundo grupo monofilético formado por isolados da Europa junto com o isolado da China (Liaoning) também pode ser observada (Figura 13). A partir das análises feitas neste estudo é possível concluir que a presença do EIAV nos cavalos nesta ilha na Carolina do Norte pode ter sido resultado de um único evento de introdução do vírus ou de múltiplas introduções e a evolução de uma linhagem predominante (CAPOMACCIO *et al*, 2012).

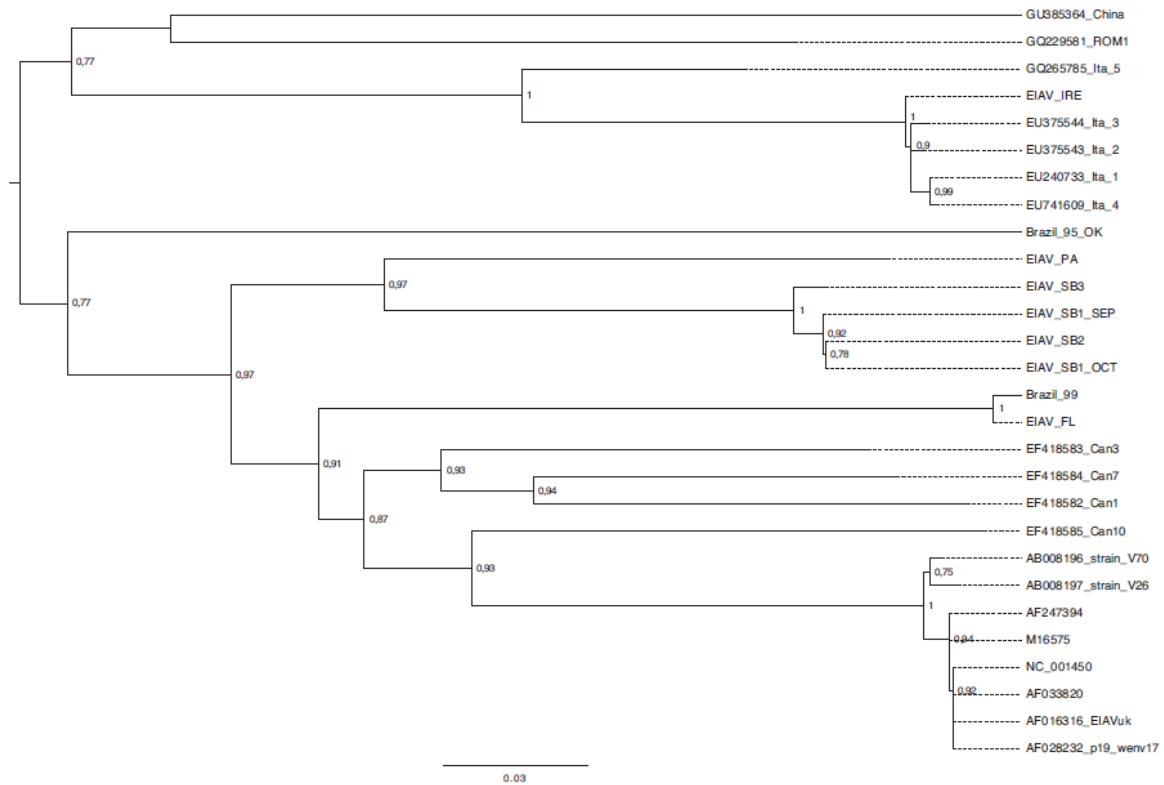


FIGURA 13: Árvore filogenética de quatro seqüências nucleotídicas do gene *gag* do EIAV de amostras da Carolina do Norte-EUA e duas seqüências do Brasil – Análise filogenética de isolados do EIAV de cavalos de Shackleford Banks (SB1, SB2 e SB3) baseada em um fragmento de 1485 nucleotídeos correspondente ao gene *gag*. A análise filogenética foi realizada usando o PhyML 3.0 (Guindon *et al.*, 2010), junto com o modelo GTR + I + G. Para a análise foram utilizadas as seqüências do GenBank, identificadas com o número de acesso junto com a indicação do país de origem e/ou o número de referência do isolado publicado. Seqüência da Ásia – Liaoning; seqüências da Europa – da Itália (Ita-5), da Irlanda (IRE); seqüências da América – do Brasil (95, 99), do Canadá (Can1, Can3, Can7 e Can10), dos Estados Unidos (Flórida – PL e Pensilvânia – PA). Seqüências AF247394, M16575, NC_001450 e AF033820 são variantes de cultivo celular adaptado da seqüência Wyoming (EIAVWY), e AF016316 (EIAVUK) e AF028232 (p19 wenv17) são clones moleculares infecciosos gerados a partir da seqüência Wyoming. Suporte estatístico abaixo de 0.7 não estão demonstrados (CAPOMACCIO *et al.*, 2012).

Na Bélgica foi feita a caracterização molecular e análise filogenética de três amostras obtidas a partir de dois cavalos positivos em testes sorológicos, notificados pelas autoridades britânicas em 2010 depois de uma remessa de 10 cavalos que vieram da Romênia para a Bélgica. As três seqüências nucleotídicas obtidas – Belgium-1, 2 e 3 amplificadas em PCR correspondem a um fragmento de 1.671 pb

do gene *gag*. Dois clones Belgium-2 e Belgium-3 obtidos do mesmo cavalo apresentaram identidade nucleotídica de 98,9% entre si. Comparando as sequências, o clone Belgium-1 apresentou 76,4% e 76,5% de identidade nucleotídica, respectivamente com os clones Belgium-2 e Belgium-3. A figura 14 mostra a análise filogenética dessas três sequências da Bélgica, mostrando que as duas sequências (Belgium-2 e Belgium-3) provenientes do mesmo cavalo agrupam em um ramo separado, em relação à sequência Belgium-1 proveniente de um cavalo diferente (CAIJ *et al.*, 2014).

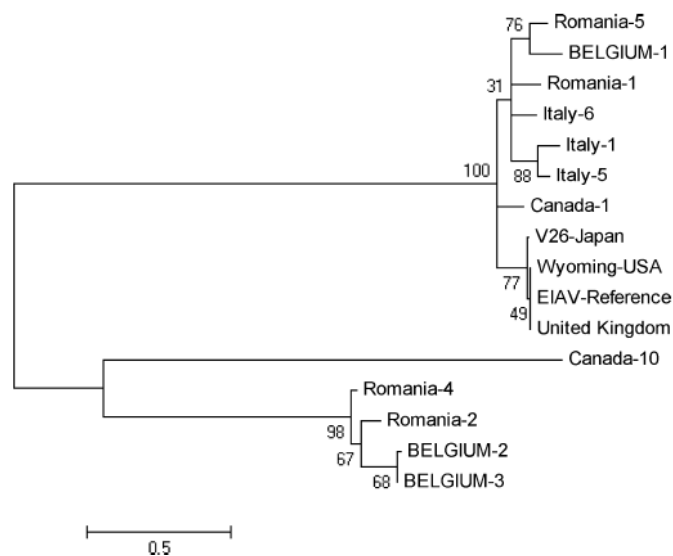


FIGURA 14: Árvore filogenética de três sequências nucleotídicas do gene *gag* do EIAV de amostras da Bélgica – As sequências foram alinhadas com outras sequências de *gag* do GenBank: NC_001450 (EIAV reference), AB008197 (V26-Japan), AF016316 (United Kingdom), AF033820 (Wyoming-USA), EF418582 (Canada-1), EF418585 (Canada-10), EU240733 (Italy-1), GQ229581 (Romania-1), GQ265785 (Italy-5), GQ923952 (Romania-2), GU060662 (Romania-4), GU060663 (Romania-5) e GU060664 (Italy-6). A árvore consenso foi inferida a partir de um valor de bootstrap de 1000 replicatas, e representa a história evolutiva dos táxons analisados (Felsenstein, 1985). Os ramos correspondentes a valores de bootstrap menores que 50% foram colapsados. As porcentagens de replicatas das árvores em que os táxons associados agruparam juntos no teste de bootstrap (1000 replicatas) são mostrados próximo aos ramos. A distribuição Gama discreta foi utilizada para modelar as diferenças nas taxas evolutivas entre os sítios [cinco categorias (+G, parâmetro = 4.2226)]. A árvore foi desenhada em escala, com os comprimentos dos ramos medidos por número de substituições por sítio. A análise foi feita com 16 sequências nucleotídicas. Posições de códon incluídas foram 1st + 2nd + 3rd + non-coding. Todas as posições contendo ‘gaps’ e ‘missing gap’ foram eliminadas. Existe um total de 1265 posições no data set final (CAIJ *et al.*, 2014).

Em 2009, na Eslovênia, a partir de 26 amostras positivas nos testes sorológicos IDGA e ELISA de 13 fazendas diferentes, foi feita a caracterização molecular e análise filogenética de 22 amostras, empregando um fragmento de 222 pb para a região 5' LTR ao gene *gag*. A análise filogenética mostra que as sequências da Eslovênia foram distribuídas entre nove grupos monofiléticos separados com diversidade genética significativa (Figura 15). As sequências da Eslovênia apresentaram identidade nucleotídica variável entre si de 84,7% a 100%. Quando foram comparadas às demais sequências mundiais estas apresentaram valores entre 84,7% a 98,8% (KUHAR *et al.*, 2013).

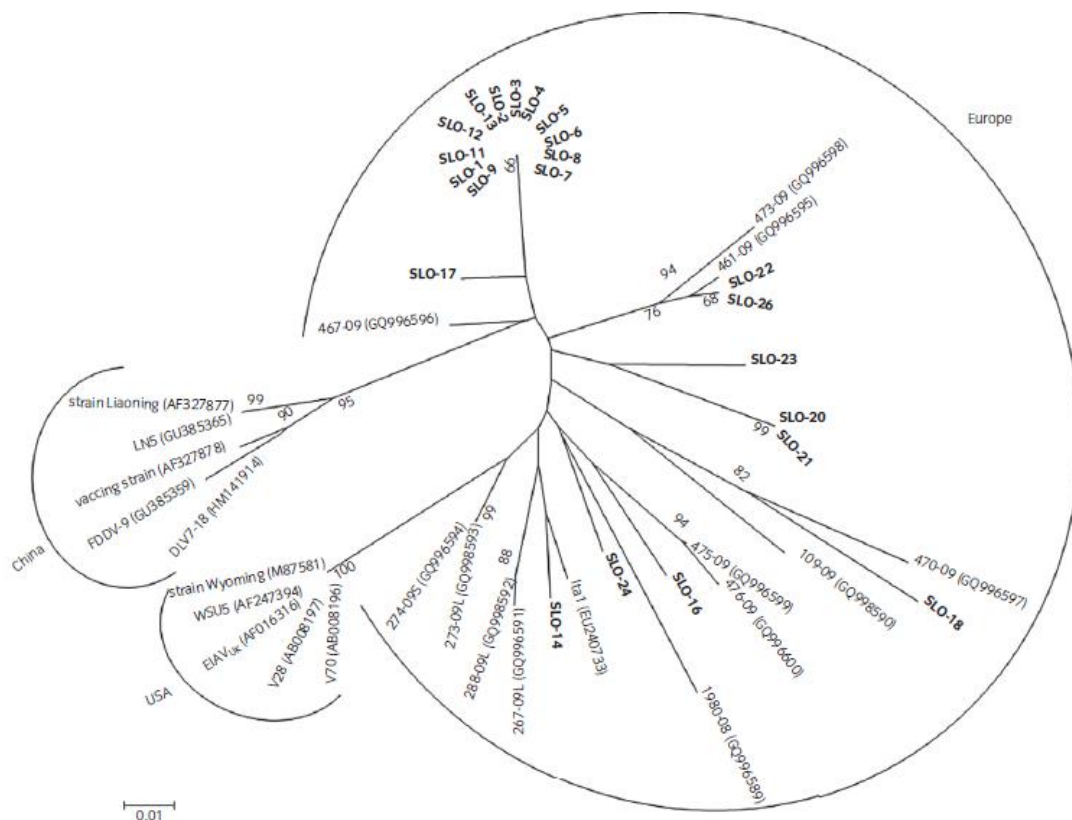


FIGURA 15: Árvore filogenética de 22 sequências nucleotídicas da região 5' LTR ao gene *gag* do EIAV de amostras da Eslovênia – Árvore filogenética não enraizada Neighbor-Joining baseada em 222 nucleotídeos (incluindo 'gaps') da região 5' LTR ao gene *gag*. Sequências da Eslovênia estão destacadas em negrito. Representantes selecionadas do EIAV foram incluídas na análise e estão indicadas pelo nome da sequência e número de acesso do GenBank entre parênteses. Somente os valores de bootstrap acima de 65 estão mostrados (1000 replicatas) (KUHAR *et al.*, 2013).

Outro estudo também da Eslovênia a partir do mesmo grupo de amostras obtidas a partir de 17 fazendas diferentes, foi feita a caracterização molecular e análise filogenética de 28 sequências nucleotídicas de 363 pb correspondente a proteína p15 do gene *gag*. A análise filogenética mostrou que as sequências da Eslovênia foram distribuídas entre quatro grupos monofiléticos separados e nove ramos, com identidade nucleotídica variando entre as sequências de 78,2 a 100% (Figura 16). As sequências da China, América do Norte e Japão formam três clados separados, baseado na sua localização geográfica. O primeiro grupo consiste de sequências da China (identidade nucleotídica entre si de 97,7%), o segundo grupo de sequências dos Estados Unidos e Canadá (identidade nucleotídica entre si de 88,1%), e o terceiro grupo de sequências do Japão (identidade nucleotídica entre si de 83,8%). As sequências da Eslovênia apresentaram divergência nucleotídica significativa em relação a esses grupos de sequências, com valores de identidade nucleotídica de 84,7% a 78,8% em relação aos primeiro e segundo grupos, e valores de 83,8% a 76,7% com o terceiro grupo. As sequências da Europa foram mais heterogêneas, e quando comparadas às sequências da Eslovênia, apresentaram identidade nucleotídica de 93,2% a 76,7% (KUHAR & MALOVRH, 2016).

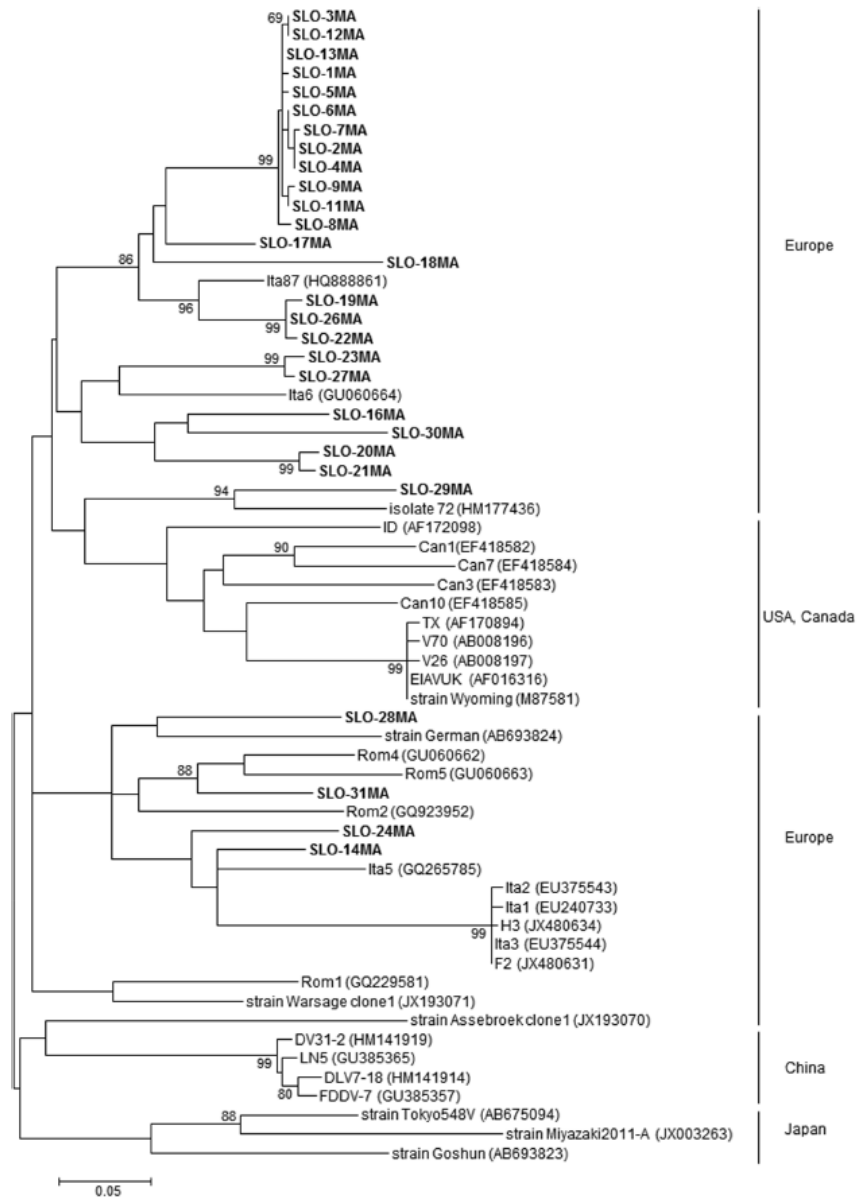


FIGURA 16: Árvore filogenética de 28 sequências nucleotídicas do gene *gag* do EIAV de amostras da Eslovênia – Árvore filogenética não enraizada construída pelo método ‘maximum likelihood’ com o modelo de substituição T92 + G + I baseado no alinhamento de 636 nucleotídeos (incluindo ‘gaps’), que codifica a proteína p15 do gene *gag*. As sequências da Eslovênia estão indicadas em negrito. Representantes selecionadas do EIAV foram incluídas na análise e estão indicadas pelo nome da sequência e número de acesso do GenBank entre parênteses. Somente os valores de bootstrap acima de 65 estão mostrados (1000 replicatas) (KUHAR & MALOVRH, 2016).

Recentemente no Brasil foi feita a caracterização molecular e análise filogenética de 15 amostras a partir de equídeos da Bahia. A análise filogenética a partir de um fragmento de 393 nucleotídeos correspondendo a proteína p26 do gene *gag*, mostra que as sequências da Bahia agrupam junto com as sequências dos Estados Unidos WSU5, EIAV_{UK} e Wyoming (Figura 17). Como pode ser visto na árvore filogenética a sequência KC213778.1 está mais distante em relação às demais amostras da Bahia, esta sequência foi obtida a partir de um potro (negativo no teste IDGA), proveniente de uma égua progenitora infectada (KC213790.1) (TIGRE *et al.* 2017).

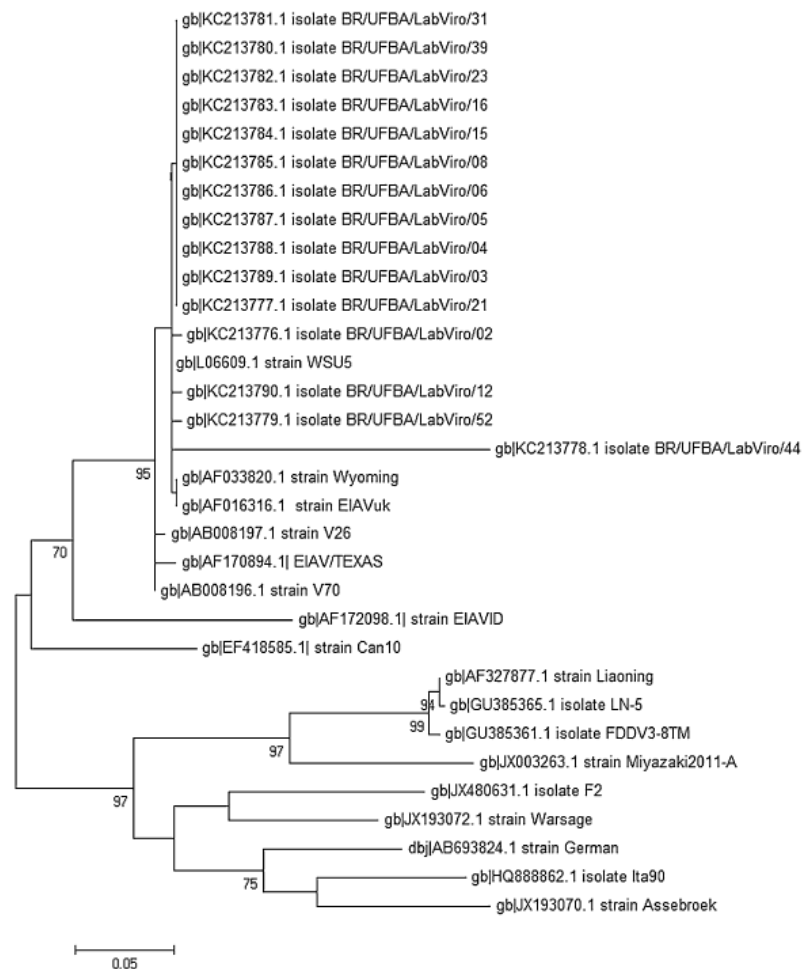


FIGURA 17: Árvore filogenética de 15 sequências nucleotídicas do gene *gag* do EIAV de amostras da Bahia-Brasil – A análise filogenética foi realizada no programa MEGA 6, empregando o método neighbor-joining. A árvore filogenética foi construída pelo método maximum-likelihood com o modelo Hasegawa–Kishino–Yano (HKY + G + I) algoritmo de substituição nucleotídica. Apoio estatístico para as árvores foi avaliado baseado em valor de bootstrap de 1000 replicatas. Incluindo ‘gaps’ e excluindo as sequências dos iniciadores, 15 sequências parciais do gene *gag* de 393

nucleotídeos para as sequências da Bahia (KC213776-KC213790) foram comparada com sequências de EIAV do GenBank - AF033820.1 (Wyoming), AF016316.1 (EIAVUK), L06609.1 (WSU5), AB008196.1 (V70), AB008197.1 (V26), AF170894.1 (EIAV/TEXAS) e AF172098.1 (EIAVID) dos Estados Unidos; JX003263.1 (Myiazaki2011-A) do Japão; AF327877.1 (EIAVLiaoning), GU385365.1 (LN5) e GU385361.1 (FDDV3-8TM) da China; AB693824.1 (German) da Alemanha, HQ888862.1 (Ita-90) da Itália; JX193070.1 (Assebroek) e JX19307 2.1 (Warsage) da Bélgica; EF418585.1 (Can-10) do Canadá e JX480631.1 (EIAVIRE) da Irlanda (TIGRE *et al.*, 2017).

Na França foi feita a caracterização molecular e análise filogenética de 14 amostras obtidas de cavalos a partir de um surto de AIE que ocorreu no ano de 2009 em uma escola de equitação, localizada em Carcès no sudeste da França, com 16 cavalos positivos em IDGA. A análise filogenética de um fragmento de 1400 nucleotídeos do gene *gag* mostrou que as sequências da França apresentaram identidade nucleotídica de 97,9% a 100% entre si. O alinhamento e comparação da sequência de aminoácidos para as proteínas codificadas pelo gene *gag* – p9, p11, p15 e p26, mostraram respectivamente uma similaridade de sequência variando de 94% a 100%, de 97,4% a 100%, de 98% a 100% e de 98,3% a 100%. A análise filogenética mostra que as sequências do Japão, China, América do Norte (Estados Unidos e Canadá) e Europa (três ramos) agrupam separadamente, e as sequências da França agrupam separadamente e não relacionadas a nenhum dos outros grupos. Estes dados sugerem que essas sequências podem representar um novo grupo monofilético junto com as sequências Rom-1 e Warsage (Figura 18) (GAUDAIRE *et al.*, 2017).

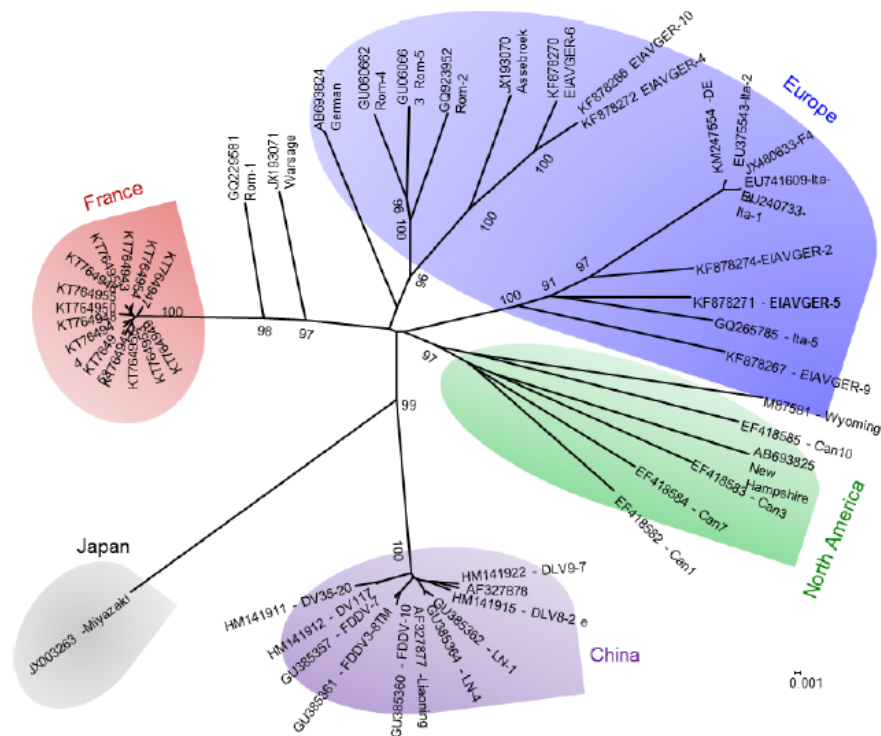


FIGURA 18: Árvore filogenética de 14 sequências nucleotídicas do gene *gag* do EIAV de amostras da França – Análise filogenética de um fragmento de 1400 nucleotídeos do genen *gag*, de 51 sequências nucleotídicas. A porcentagem de árvores em que os táxons agruparam juntos no teste de bootstrap (1000 replicatas) está indicada ao lado dos ramos. Foi utilizado o método de máxima verossimilhança no Mega 5 (TAMURA *et al.*, 2011) (GAUDAIRE *et al.*, 2017).

Em um estudo com amostras de cavalos da Mongólia foi feita a caracterização molecular e análise filogenética de uma região parcial do genoma do EIAV que corresponde a região 5' LTR ao exon 1 do gene *tat*. A partir de um total de 776 amostras coletadas durante o ano de 2016, 11 amostras foram positivas no teste IDGA, e três amostras foram positivas em PCR, amplificadas através de uma nested PCR descrita por Dong *et al.*, (2012). Foram obtidas duas sequências (Mongolia-1 (LC185347) e Mongolia 2 (LC190840), as quais apresentaram 94% de identidade nucleotídica entre si, e comparadas as demais sequências analisadas apresentaram valores variando entre 84% a 90%. A análise filogenética mostrou que as duas sequências da Mongólia foram muito divergentes das sequências Asiáticas – China e Japão, assim como das sequências dos Estados Unidos (Figura 19) (SHARAV *et al.*, 2017).

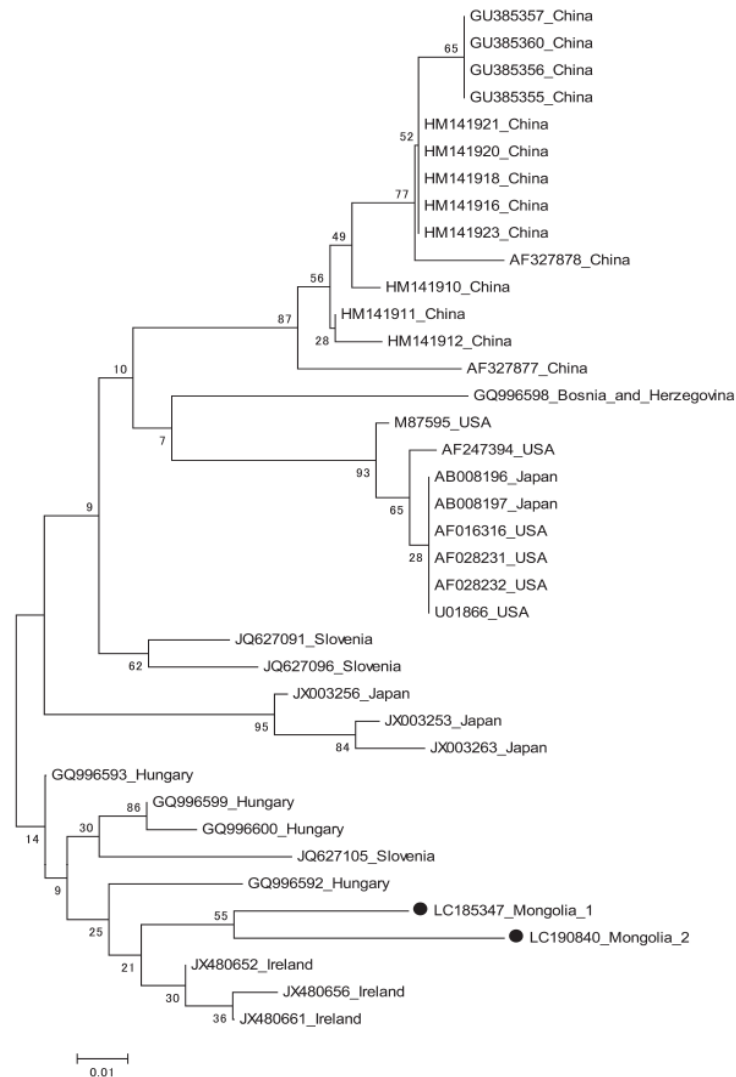


FIGURA 19: Árvore filogenética de duas sequências nucleotídicas para a região 5' LTR ao exon 1 do gene *tat* do EIAV de amostras da Mongólia – Análise filogenética de um fragmento de 197 nucleotídeos. A árvore filogenética foi construída no programa MEGA 7, utilizando o método neighbor-joining (SHARAV *et al.*, 2017).

1.4. Anemia Infeciosa Equina

1.4.1. Epidemiologia

O EIAV infecta todos os membros da família *Equidae* (CFSPH, 2009) e casos clínicos da doença são relatados em cavalos e pôneis (*Equus caballus*) (HARROLD *et al.*, 2000), e também em mulas (*Equus caballus* X *Equus asinus*) (SPYROU *et al.*, 2003). Algumas linhagens virais que produzem sinais clínicos em cavalos e pôneis são capazes de se multiplicar em jumentos (*Equus asinus*), porém, sem causar doença clínica nesses animais (COOK *et al.*, 2001).

A AIE foi constatada no Brasil pela primeira vez em 1968 nos estados do Rio Grande do Sul e Rio de Janeiro. Dados não oficiais demonstram a prevalência da doença em outras regiões indicando sua ampla distribuição no território brasileiro (SILVA *et al.*, 2001). Apesar de estatísticas oficiais apresentarem um quadro da situação epidemiológica da AIE, o índice de prevalência e enfermidade da AIE nos estados brasileiros não são informados com exatidão, uma vez que os dados se referem exclusivamente aos testes diagnósticos realizados para o trânsito interestadual e/ou participação em eventos agropecuários controlados pelos serviços oficiais da defesa sanitária ambiental (ALMEIDA *et al.*, 2006).

Segundo informações de fazendeiros e técnicos, a AIE foi relatada no Pantanal em 1974 (SILVA *et al.*, 2001). O Pantanal é um ecossistema caracterizado como uma imensa planície, alagada em sua maior parte, localizado em um cinturão global de instabilidade climática, com clima quente, uma pronunciada estação seca de maio a setembro, e uma estação chuvosa de outubro a abril. Apresentando 250.000 km² de extensão, no Brasil possui uma área de aproximadamente 140.000 km², localizado no sul do Mato Grosso e no noroeste do Mato Grosso do Sul, abrangendo uma área de 35% e 65%, respectivamente, nesses estados, além de se estender ao norte do Paraguai e leste da Bolívia (JUNK *et al.*, 2006; BAZZO *et al.*, 2012). O Pantanal brasileiro é dividido em 11 subregiões, baseado em aspectos fisiomorfológicos, cobrindo 16 municípios nos estados de Mato Grosso e Mato Grosso do Sul,

denominadas Cáceres, Poconé, Barão de Melgaço, Paraguai, Paiaguás, Nhecolândia, Abobral, Aquidauana, Miranda, Nabileque e Porto Murtinho (SILVA & ABDON, 1998).

Bovinos e equídeos foram introduzidos no Pantanal há aproximadamente 300 anos atrás e foram desenvolvidas raças específicas de equídeos no Pantanal, como a *tucura* e o *cavalo pantaneiro* (JUNK *et al.*, 2006). O cavalo pantaneiro foi introduzido por colonizadores durante a colonização do Pantanal Mato-Grossense e adaptou-se as condições bioclimáticas deste bioma, e formou uma raça localmente adaptada, resultante da seleção natural que ocorreu ao longo de mais de três séculos (SANTOS *et al.*, 2016). Historicamente, equídeos incluindo cavalos, mulas e burros têm sido essenciais à pecuária pantaneira devido à utilização desses animais para o manejo de bovinos (SILVA *et al.*, 2001).

De acordo com o United States Department of Agriculture (USDA), o Brasil apresenta o segundo maior efetivo de bovinos do mundo, representando 22,2% do rebanho mundial, está atrás apenas da Índia. No ano de 2016 o Brasil atingiu a marca recorde de efetivo de bovinos com 218 milhões de cabeças de gado. Dados de 2016 mostram que a região centro-oeste apresentou o maior plantel de bovinos do país, com 34,4% do total brasileiro. Mato Grosso foi o estado que apresentou o maior plantel de bovinos do país, com 13,9% do total nacional, com 30 milhões de cabeças de gado (IBGE, 2016).

A bovinocultura é um dos principais destaques do agronegócio brasileiro no cenário mundial. Em 2016, o Brasil foi o maior produtor de carne bovina, responsável por 15,4% da produção mundial. De acordo com o Ministério da Indústria, Comércio Exterior e Serviços, em 2016 as exportações de carne bovina brasileira *in natura* foram de 1,08 milhão de toneladas com um valor de R\$ 4,35 bilhões (IBGE, 2016). O Brasil apresenta um rebanho efetivo de equinos de 5,58 milhões de cabeças. Destaque para a região Nordeste que além de equinos concentra o maior quantitativo de asininos e muares, representando 23,2% do efetivo nacional, seguida

pelas regiões Sudeste (23,2%), Centro-Oeste (20%), Sul (17,5%) e Norte (16,1%) (IBGE, 2016).

Segundo a OIE (2018-C) no período de janeiro a dezembro do ano de 2018 foram notificados um total de 3.893 surtos da AIE no território brasileiro. Ceará foi o segundo estado brasileiro que apresentou o maior índice da doença nesse período, com um total de 757 surtos. Maranhão foi o estado que apresentou o maior número de surtos nesse período com 806. No Mato Grosso e Mato Grosso do Sul foram notificados um total de 181 e 31 surtos, respectivamente. No ano de 2017 foram notificados um total de 3.448 surtos da AIE, neste ano Maranhão também foi o estado que apresentou o maior índice da doença com 805 surtos, enquanto que nos estados do Ceará, Mato Grosso e Mato Grosso do Sul foram notificados 554, 313 e 88 surtos, respectivamente.

Estudo realizado em 2012 com 886 equídeos provenientes de municípios dos ecossistemas Amazônico, Pantaneiro e Cerrado do estado do Mato Grosso registrou uma prevalência de 5,1% (46 equídeos positivos) da AIE empregando o teste IDGA. Destes, o maior percentual de animais positivos foi no Pantanal, com 36,3%, e não foi detectado nenhum animal positivo no bioma da Amazônia. Porém, segundo os autores esse valor total detectado de 5,1% deve ser analisado com ressalvas, pois não houve sistematização da amostragem, uma vez que foram considerados para o estudo animais em que foi solicitado o teste diagnóstico para AIE, o que sugere uma grande quantidade de animais de grande valor econômico ou animais de propriedades que possuem programas de controle para AIE (MELO *et al.*, 2012).

Estudo de 2013, também realizado no Pantanal brasileiro, com 547 equídeos do município de Poconé, do estado do Mato Grosso mostrou uma sopervalencia de 31,5% da AIE empregando IDGA. Também foi demonstrado que 52% das fazendas amostradas tiveram pelo menos um animal positivo (BORGES *et al.*, 2013).

A prevalência da AIE em outros estados brasileiros também foi demonstrada por outros estudos. Em 2006 foram analisadas amostras de 6.540 equídeos de 1.940

rebanhos, coletadas entre 2003 e 2004, de equídeos de serviço com baixo valor zootécnico, nos 853 municípios do estado de Minas Gerais. Foram feitos os testes sorológicos IDGA e ELISA rgp90. A prevalência encontrada foi de 5,3% e 3,1% para rebanhos e equídeos, respectivamente. O maior percentual de rebanhos e equídeos de serviço positivos foram encontrados nas regiões Norte/Noroeste de Minas e Vale do Mucuri/Jequitinhonha. Estas são regiões em que predominam grandes propriedades, com estradas em condições ruins, principalmente na época de chuva, com criação extensiva de gado de corte, atividade que depende da utilização de equídeos, e muitas vezes esses animais constituem a única opção de transporte. Dessa forma, a AIE se mantém no campo, já que muitas vezes não são tomadas as medidas necessárias de combate à doença, determinadas em lei (ALMEIDA *et al.*, 2006).

Em 2013, a soroprevalência da AIE foi avaliada por IDGA em 5.615 animais submetidos ao controle oficial pelo MAPA durante o ano de 2010, em 209 municípios de três estados do nordeste brasileiro. A soroprevalência encontrada foi de 3,10% no Ceará, 2,86% na Paraíba e 1,29% no Rio Grande do Norte. A variação no percentual de animais positivos entre os municípios pode estar relacionada à grande quantidade de eventos hípicas, como as vaquejadas, comuns no nordeste brasileiro. Estes propiciam a aglomeração de equídeos de diferentes regiões e a exposição a diversos agentes causadores de doenças, como o EIIV. Essa variação também pode estar relacionada ao trânsito interestadual de equinos, uma vez que foi observado um maior percentual de equídeos positivos nas divisas entre os três estados amostrados (SILVA *et al.*, 2013).

Existem poucos dados sobre a incidência da AIE em jumentos. Historicamente, os jumentos tiveram uma importância social, econômica e cultural no nordeste brasileiro, tendo um papel fundamental no desenvolvimento dessa região. Durante muito tempo esses animais foram utilizados como meio de transporte para a população, como animal de carga e prestador de serviço. Porém, atualmente os jumentos estão sendo substituídos por outros meios de transporte, como motos, carros e caminhões; e na lavoura pela agricultura mecanizada. Devido a essa

situação atual, muitos jumentos estão sendo abandonados nas ruas, vivendo livres e alimentando-se nas estradas, muitos acabam causando acidentes de trânsito (BUAINAIN, 2014). Além disso, esses animais podem servir como potencial fonte de transmissão e manutenção do EIAV (OLIVEIRA *et al.*, 2017).

Recentemente OLIVEIRA *et al.*, (2017) realizou um inquérito sorológico da AIE em jumentos semi-selvagens, do município de Mossoró - Rio Grande do Norte - Brasil, região que apresenta uma população de jumentos em expansão, uma vez que muitos desses animais estão sendo abandonados nas ruas. Amostras de 367 jumentos foram testadas pelos testes sorológicos IDGA e dois testes ELISA, o cELISA e o rgp90 ELISA, que detectam anticorpos contra as proteína p26 e gp90, respectivamente. Somente 1,6% (6/367) das amostras foram positivas no IDGA, 3,3% (12/367) no cELISA enquanto que 14,4% (53/367) foram positivas no rgp90 ELISA.

1.4.2. Transmissão

A principal forma de transmissão do EIAV é pelo sangue, por transmissão mecânica através de um vetor artrópode ou por fômites (ISSEL *et al.*, 1988). A transmissão mecânica do EIAV por fômites ocorre através de agulhas e instrumentos cirúrgicos contaminados, como por exemplo, a utilização de uma mesma agulha para a aplicação de medicamentos em diferentes animais, além de outros utensílios como freios e esporas. Sendo assim, o homem torna-se um elemento importante na transmissão da doença devido ao manejo inadequado desses animais, sendo muitas vezes por falta de conhecimento (SILVA *et al.*, 2001). Em um estudo da prevalência e fatores de risco associados à AIE no município de Poconé, no Pantanal, foi observada uma maior prevalência da AIE em equídeos vacinados para doenças, como encefalomielite e raiva equina, vacinas que são comumente utilizadas nesta região, do que em animais não vacinados sugerindo que pode ocorrer transmissão iatrogênica da doença (BORGES *et al.*, 2013).

A transmissão mecânica por um vetor artrópode ocorre através da picada de insetos hematófagos da ordem Diptera. Dentre as espécies responsáveis pela transmissão do EIAV, as principais pertencem à família *Tabanidae*, incluindo os “horse flies” do gênero *Tabanus spp.*, também chamados de mutuca, os quais são relativamente grandes, apresentando um tamanho entre 10-30 mm; e os “deer flies” do gênero *Chrysops spp.*, que são menores, variando de 6-13 mm. Na ausência de tabanídeos, os “stable flies” do gênero *Stomoxys*, da família *Muscidae*, podem se tornar importantes vetores do EIAV, principalmente a espécie *Stomoxys calcitrans* (Figura 20) (ISSEL *et al.*, 1988; FOIL & HOGSETTE 1994; BALDACCHINO *et al.*, 2014).

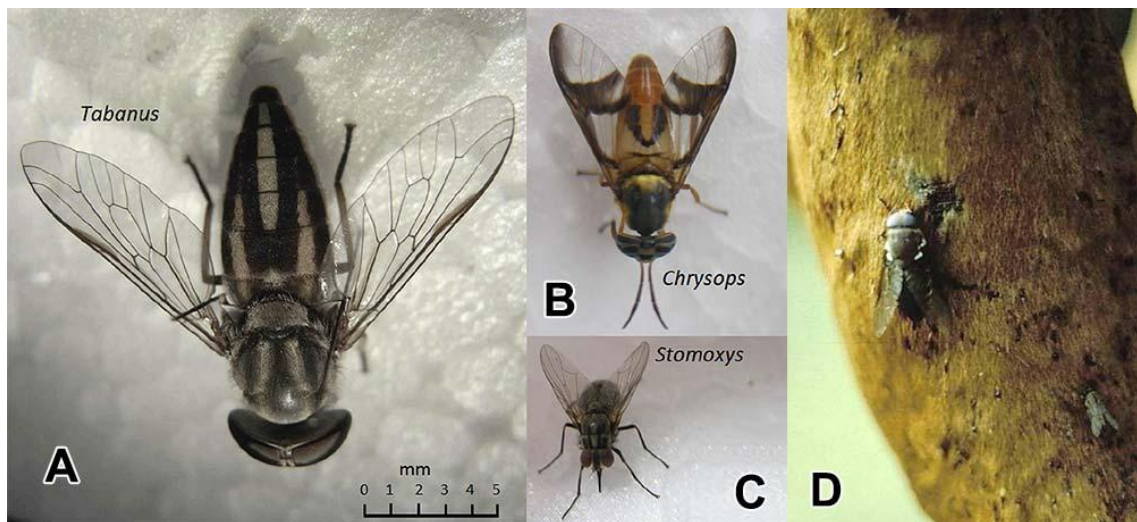


FIGURA 20: Insetos hematófagos - Comparação do tamanho de insetos hematófagos da ordem Diptera, da família *Tabanidae*, dos gêneros: *Tabanus* (a) e *Chrysops* (b); e da família *Muscidae*, do gênero *Stomoxys* (c) (os tamanhos estão na mesma escala da figura). E fêmea de *Tabanus americanus*, uma espécie muito grande, se alimentando na perna de um cavalo, em que lesões e sangue coagulado devido às picadas dos tabanídeos são visíveis na pele (d) (BALDACCHINO *et al.*, 2014).

A transmissão do EIAV a partir de um hospedeiro infectado para um saudável ocorre durante a alimentação dos tabanídeos. Os insetos hematófagos adquirem o EIAV ao se alimentar em um hospedeiro infectado, e quando essa alimentação é interrompida, durante um novo repasto sanguíneo, eles transferem o sangue presente nas suas peças bucais para um novo hospedeiro, e assim transmitem o EIAV. Entretanto, o EIAV não se multiplica nas células dos tabanídeos, dessa forma,

não se mantêm na população de vetores (ISSEL *et al.*, 1988; BALDACCHINO *et al.*, 2014).

Vários fatores são importantes na transmissão da AIE, incluindo fatores relacionados ao hospedeiro, ao vetor, ao vírus, e ambientais. Dentre os fatores relacionados ao hospedeiro, a fase da doença em que o hospedeiro se encontra interfere na transmissão do EIAV, uma vez que, cavalos com sinais clínicos da doença são uma potencial fonte para a transmissão do vírus, pois durante os episódios febris na fase aguda da doença existe uma elevada viremia, o que favorece a transmissão mecânica do EIAV. Ao contrário, cavalos sem nenhuma história clínica conhecida da AIE são fontes de infecção viral de menor importância. Portanto, a transmissão eficiente do EIAV é altamente dependente da carga viral no sangue (ISSEL *et al.*, 1988).

A relação entre vetores e hospedeiros também interfere na transmissão. Um desses fatores seria o comportamento defensivo do hospedeiro induzido pelas picadas dolorosas dos insetos hematófagos, como manobras do rabo, pé e cabeça, que podem contribuir para a interrupção da alimentação, o que permite que o vetor procure um novo hospedeiro, e assim transmita o EIAV. Geralmente, a alimentação de tabanídeos em potros é menor quando comparada à alimentação em adultos, devido justamente a esse comportamento defensivo que é mais eficiente em cavalos mais jovens. Ao contrário, um hospedeiro que está na fase crônica da doença e está gravemente debilitado, poderia ser uma potencial fonte de transmissão do EIAV, porém não é o que acontece, pois o animal permite a extensiva alimentação dos insetos hematófagos, pois ele não gasta energia com movimentos defensivos. Sendo assim, a interrupção da alimentação pode não ocorrer e, conseqüentemente, a transmissão do EIAV também não ocorre. Em contraste, na fase aguda da doença, durante os primeiros episódios febris, o cavalo ainda está ativo, e o comportamento defensivo é alto, então a probabilidade do vetor ir alimentar-se em outros hospedeiros é elevada (ISSEL *et al.*, 1988; FOIL & ISSEL, 1991).

Dentre outros fatores relacionados ao hospedeiro, vetor e vírus, está a quantidade do vírus que é transferida pelo vetor para um novo hospedeiro. Essa quantidade de agente infeccioso transferido é influenciada por vários fatores, como a quantidade total de sangue que está presente nas peças bucais do inseto após uma alimentação interrompida; o título do vírus no hospedeiro inicial, assim como sua estabilidade. Outro fator seria a densidade da população de vetores, assim como sua mobilidade; a proximidade entre animais infectados e suscetíveis. Também o tempo entre as alimentações do vetor podem impactar, uma vez que a transmissão por tabanídeos pode ocorrer eficientemente 30 minutos após o primeiro repasto sanguíneo em um animal infectado (ISSEL *et al.*, 1988; FOIL & ISSEL, 1991; GREGG & POLEJAEVA, 2009).

A relação entre as condições ambientais e a quantidade de vetores também podem influenciar na transmissão do vírus, uma vez que o estresse ambiental do verão quente e úmido coincide com o surgimento de elevadas populações do vetor, o que propicia a transmissão do EIAV, e conseqüentemente, a recrudescência da doença. Esse fato também se reflete na denominação dada à doença, também conhecida como febre do pântano, pois a AIE é mais prevalente em regiões quentes e úmidas, onde os insetos hematófagos são mais abundantes (FOIL & ISSEL, 1991).

Em um estudo realizado no Brasil, sobre a relação entre a sazonalidade e a abundância de tabanídeos capturados em cavalos no Pantanal do Mato Grosso do Sul, foi observado um aumento da população de tabanídeos durante a estação chuvosa, sugerindo que este é um período de risco potencialmente elevado para a transmissão mecânica, por tabanídeos, de patógenos para cavalos nesta região (BARROS *et al.*, 2001). Outro estudo, também realizado no Pantanal, no município de Poconé, estado do Mato Grosso, demonstra que existe uma correlação entre a soropositividade do EIAV e a manutenção de equídeos em áreas alagadas do Pantanal. Assim, a associação entre pântanos ou áreas úmidas e temperaturas quentes fornece condições favoráveis para a proliferação da população de insetos hematófagos, e conseqüentemente uma elevada prevalência do EIAV no Pantanal brasileiro (BORGES *et al.*, 2013).

O EIAV pode também ser transmitido através da placenta ou durante o parto de uma égua progenitora infectada para sua prole. Em um estudo foi avaliada a frequência da transmissão vertical do EIAV e a influência da carga viral no sucesso da transmissão do vírus através do sangue de uma égua infectada para o potro. Tendo sido demonstrado que embora a transmissão do vírus de uma égua agudamente infectada para sua prole seja inevitável, a possibilidade de transmissão de uma égua progenitora portadora do EIAV clinicamente normal para a sua prole é de menos de 11% (GREGG & POLEJAEVA, 2009).

O EIAV pode ser transferido através do leite, como demonstrado por estudos que avaliaram a possibilidade de transmissão da doença através da amamentação, indicando a presença do EIAV no leite de uma égua infectada amamentando um potro, mas não foi observado nenhum sintoma de doença no potro. Contudo, os anticorpos maternos podem ser transferidos de uma égua progenitora infectada para a sua prole através do colostro (GREGG & POLEJAEVA, 2009).

O EIAV pode ser encontrado no sêmen de garanhões infectados, porém, não existe nenhuma confirmação da transmissão venérea da doença. Atualmente com o aprimoramento da inseminação artificial na indústria equina, existe a preocupação da transmissão de agentes infecciosos através do sêmen, entre diferentes países. Entretanto, as regulamentações para a importação e exportação de sêmen variam de acordo com cada país (METCALF, 2001).

Existe ainda outra preocupação para a transmissão da AIE, com a crescente demanda comercial da clonagem ou tecnologia de transferência de células somáticas (SCNT), que nos últimos anos tem surgido na indústria equina. Porém, como qualquer outra mercadoria agrícola, embriões clonados apresentam um risco incerto e variável para a introdução de doenças e animais exóticos nos países importadores. Muitos trabalhos sobre o risco de transmissão de doenças através da produção e transferência de embrião *in vitro* foram publicados para bovinos, suínos, cabras e ovelhas. Contudo, os dados para cavalos são escassos. Em um trabalho de revisão a partir da análise de dados já publicados para o risco de transmissão

de outros lentivírus, através da produção e transferência de embrião *in vitro* via SCNT, foi hipotetizado que o risco de transmissão do EIAV, através da SCNT em cavalos pode ser pequena ou ausente. Entretanto, devido à especificidade de hospedeiro e a interação de patógeno, evidência experimental é necessária para confirmar essa hipótese (GREGG & POLEJAEVA, 2009; ASSEGED *et al.*, 2012).

QUINLIVAN *et al.* (2007), avaliou o possível papel de outros fluidos corporais, ao invés do sangue, na transmissão do EIAV, como “swabs” nasal, bucal, genital e conjuntival, testados através de uma PCR quantitativa. Todos os “swabs” coletados de dois cavalos subclínicamente afetados foram negativos, mas RNA viral foi detectado nos “swabs” nasal e bucal de três cavalos afetados clinicamente (duas éguas e um potro) e de duas éguas, respectivamente, e também em “swab” genital de uma égua, indicando a possibilidade de infecção do EIAV no aparelho reprodutivo, como já demonstrado para outros lentivírus (GREGG & POLEJAEVA, 2009).

1.4.3. Patogênese

A AIE pode ser caracterizada por três estágios definidos: aguda, crônica e assintomática de acordo com infecção experimental de equídeos com EIAV. Exposição inicial a uma amostra virulenta normalmente resulta em uma doença caracterizada por febre, diarreia, letargia, anemia e trombocitopenia, associada a altos níveis de viremia no plasma. Após este episódio clínico inicial, a maioria das infecções tipicamente progride para a AIE crônica, caracterizada por repetidos ciclos de doença em intervalos irregulares, e associada a picos de viremia. Com o tempo, a frequência dos episódios de doença e a gravidade dos sintomas clínicos tipicamente diminuem. O animal infectado se torna clinicamente assintomático para AIE indefinidamente, alcançando o estágio de portador inaparente, permanecendo infectado pelo resto da vida. Esta manifestação é diferente da maioria das infecções lentivirais, como a infecção causada pelo HIV-1 que evolui lentamente, causando doenças degenerativas progressivas, levando à morte do hospedeiro após meses ou anos. Estresse ou imunossupressão do portador inaparente pode induzir um aumento

na multiplicação viral e levar à recrudescência da doença (LEROUX *et al.*, 2004; CRAIGO & MONTELARO, 2013).

Os episódios clínicos da AIE estão associados a múltiplos ciclos concomitantes de febre, trombocitopenia e viremia. Nos episódios febris e trombocitopenia, além do número de cópias de RNA viral durante os diferentes estágios da AIE foram avaliados em um cavalo infectado experimentalmente com uma amostra virulenta do EIAV, mostrando que a elevação da temperatura retal e viremia coincidem com a diminuição na quantidade de plaquetas, como mostrado no diagrama (Figura 21). Outras alterações hematológicas associadas à infecção pelo EIAV são declínio no número de eritrócitos e uma leucopenia branda. Dentre as alterações histopatológicas associadas à infecção estão esplenomegalia e hepatomegalia (CLABOUGH *et al.*, 1991).

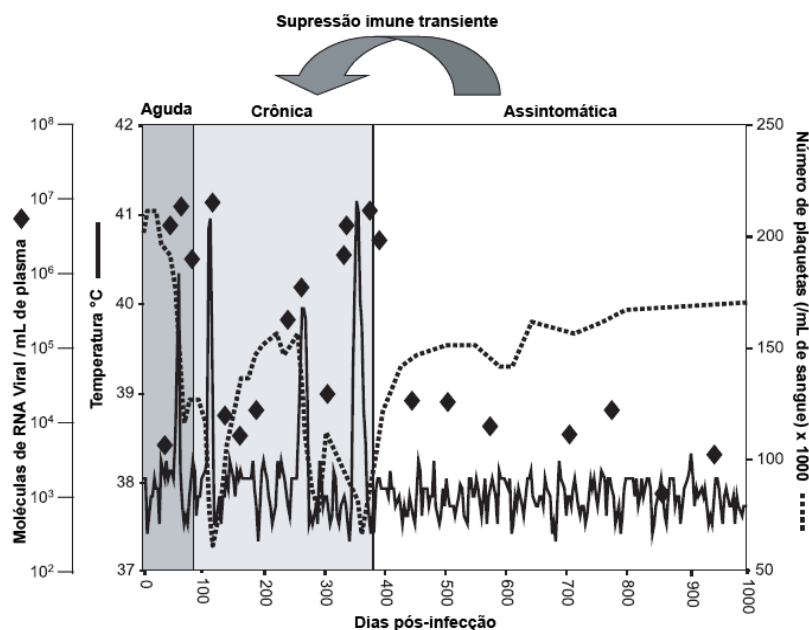


FIGURA 21: Estágios da Anemia Infecciosa Equina - Diagrama dos estágios agudo, crônico e assintomático da EIA associados aos episódios febris (definidos como temperatura retal acima de 39°C), juntamente com trombocitopenia (definida como redução nos níveis de plaquetas abaixo de 100.000/μL de sangue total ●●●●), e viremia (cópias de RNA viral/mL ♦). Animais assintomáticos podem voltar para o estágio crônico da doença após imunossupressão imune induzida experimentalmente ou naturalmente, como indicado pela seta cinza no topo (LEROUX *et al.*, 2004).

O EIAV tem tropismo por macrófagos e durante a infecção aguda pode ser encontrado em altos títulos principalmente em macrófagos do baço, fígado e linfonodos, podendo também ser encontrado em menor número em macrófagos de outros tecidos, como rins, pulmões e glândula adrenal (MCGUIRE *et al.*, 1971, SELTON *et al.*, 1992). O EIAV também pode ser encontrado em células endoteliais vasculares como foi demonstrado pela detecção de RNA viral durante a fase aguda da doença, em cavalos experimentalmente infectados (OAKS *et al.*, 1999).

HARROLD e colaboradores (2000) fizeram uma análise quantitativa por PCR da carga viral em sítios de infecção e multiplicação do EIAV, durante a fase aguda e o estágio de portador inaparente da doença, em animais experimentalmente infectados. Foi observado que a carga viral difere dependendo da fase da doença, uma vez que os níveis de RNA viral quantificados foram de 10^7 a 10^8 cópias de RNA viral por mL de plasma durante a fase aguda da doença, enquanto que durante a fase assintomática foram pouco menos de 100 cópias por mL, demonstrando que a infecção aguda está associada a elevados níveis de viremia.

1.4.4. Resposta Imune

A infecção causada pelo EIAV resulta em uma elevada viremia no plasma dentro de três semanas após infecção. Vários estudos sugerem que a resposta humoral e celular específicas ao EIAV são necessárias para eliminar a viremia inicial. Como descrito anteriormente, a multiplicação viral é eficientemente reduzida em níveis subclínicos durante a passagem do estágio crônico para o estágio assintomático da doença (LEROUX *et al.*, 2004). Assim, a ausência de doença nos equídeos está relacionada com a baixa carga viral associada aos tecidos (HARROLD *et al.*, 2000), e é dependente da remoção da viremia primária no plasma pelo complexo principal de histocompatibilidade (MHC) restrito aos linfócitos T citotóxicos (CTL) (PERRYMAN *et al.*, 1988), e está associada a anticorpos específicos anti-EIAV não-neutralizantes e neutralizantes (O'ROURKE *et al.*, 1988, HAMMOND *et al.*, 1997).

Em um estudo da análise da resposta imune celular e humoral ao EIAV em pôneis infectados experimentalmente, foi observado que o EIAV induz uma resposta imune altamente complexa que está evoluindo constantemente durante o curso da infecção, e requer um período mínimo de 6 a 8 meses para maturar. Durante este período, os anticorpos específicos para o EIAV evoluem gradualmente de uma população caracterizada por baixa avidéz, não-neutralizante, especificidade de epitopo predominantemente linear, para uma população com uma avidéz de moderada a elevados níveis, atividade neutralizante e especificidade de epitopo predominantemente conformacional (Figura 22). Anticorpos neutralizantes não foram detectados até 2 a 3 meses após a infecção. Após este período pós-infecção cada animal resolve o episódio virêmico inicial semanas antes dos anticorpos neutralizantes serem detectados, os quais tiveram seus níveis aumentados em todos os animais até aproximadamente 4 meses após a infecção (HAMMOND *et al.*, 1997).

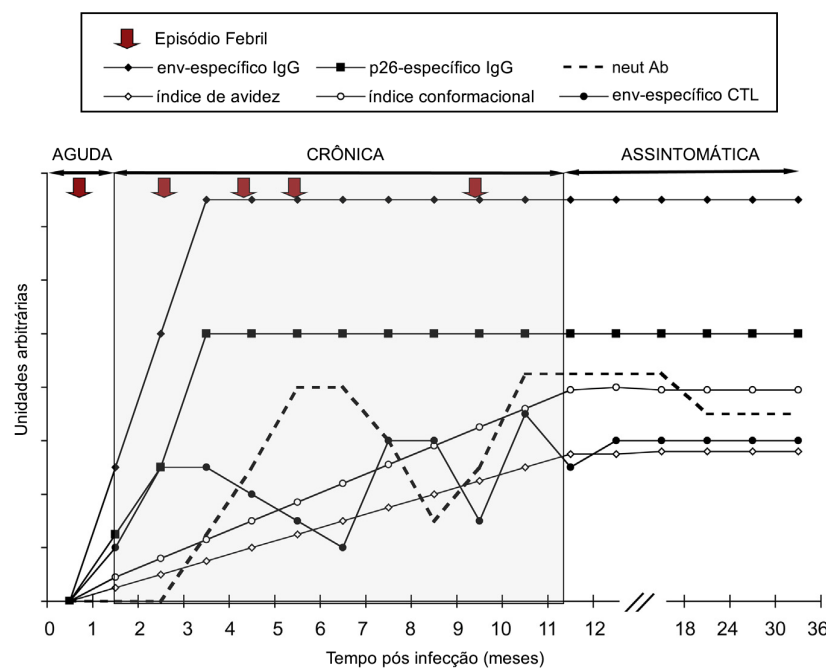


FIGURA 22: Cinética da resposta imune adaptativa em equídeos infectados com EIAV – Representação esquemática da resposta imune humoral, observada em pôneis após infecção experimental com EIAV, mostrando os estágios agudo, crônico e assintomático da doença, mostrando a evolução da resposta de anticorpo específica ao EIAV (IgG específico-env e IgG específico-p26), a resposta celular específica-EIAV (CTL específico-env), anticorpo neutralizante relativo (neut Ab), índice de avidéz da imunoglobulina (avidity index), e índice de mudança conformacional de epitopos (conformational index) (COOK *et al.*, 2013, modificado).

A análise da resposta imune mediada por célula ao EIAV mostrou a atividade aparente de células T efectoras mediada pelo MHC classe I restrito ao CTL CD8⁺ e MHC classe II restrito ao CTL CD4⁺, que emergem dentro de três a quatro semanas pós-infecção, o contrário da demorada cinética de maturação de anticorpos específicos anti-EIAV. Mais especificamente CTL CD8⁺ reconhece e lisa células alvo expressando os antígenos gag e envelope, enquanto que CTL CD4⁺ reconhece e lisa células alvo expressando somente o antígeno envelope. A atividade dos CTLs está correlacionada temporalmente com a resolução da viremia primária. Após a resolução da viremia primária, a atividade dos CTLs específicos ao EIAV difere significativamente, uma vez que alguns animais apresentaram atividade de CTL facilmente detectável, enquanto outros atividade de CTL pouco mensurável. Foram observadas flutuações ou até perdas nos níveis de atividade de células T específicas ao EIAV, medidas *in vitro*, as quais podem resultar de mutações nos epítomos virais dominantes, demonstrando a notável habilidade do EIAV para alterar os sítios antigênicos. Assim, não se pode afirmar que a detecção de CTL nos pôneis esteja correlacionada com a capacidade dos animais para prevenir episódios virêmicos subsequentes, resultantes do aparecimento de novas variantes antigênicas (HAMMOND *et al.*, 1997).

Assim, em contraste à viremia primária, verificou-se que nenhum parâmetro imune único correlaciona com a resolução dos novos episódios virêmicos. Além disso, o controle imune da infecção pelo EIAV durante o estágio de portador inaparente da doença parece depender de uma combinação complexa de mecanismos do sistema imune para suprimir a multiplicação viral, que funciona somente após o sistema imune ter evoluído para um estado completamente maduro (HAMMOND *et al.*, 1997).

Portanto, os episódios virêmicos iniciais da AIE são controlados por linfócitos T citotóxicos antes do aparecimento de anticorpos neutralizantes. Os episódios virêmicos subsequentes ocorrem porque as variantes virais emergentes escapam dos CTLs e se multiplicam, e posteriormente também podem escapar dos anticorpos neutralizantes. O controle relativamente rápido dos episódios virêmicos secundários

pode também ser devido à destruição, mediada por CTL, de células infectadas, com anticorpos neutralizantes aparecendo novamente após a remoção da viremia. O baixo nível de multiplicação viral durante o estágio de portador inaparente pode estimular a resposta de linfócitos de memória e manter o estágio de portador inaparente até cada resposta imune ser suprimida, seja experimentalmente ou induzida por estresse, ou uma variante viral que escapa de ambos CTLs e anticorpos neutralizantes. Assim, os anticorpos neutralizantes são efetivos no controle viral apenas em linhagens virais reconhecidas previamente pelo sistema imune após um episódio clínico inicial, não sendo efetivos contra novas variantes virais (MCGUIRE *et al.*, 2002).

1.4.5. Diagnóstico

1.4.5.1. Diagnóstico sorológico

A AIE foi descrita na França em 1843 (LIGNEE), e a primeira tentativa de diagnóstico foi nos Estados Unidos em 1888 (CORDES & ISSEL, 1996), mas somente quase um século, depois em 1970, foi possível o diagnóstico acurado da AIE através do teste sorológico de imunodifusão em gel de agar (IDGA) (Figura 23). Este teste é uma adaptação do teste de Ouchterlony ou técnica de dupla difusão que foi modificada para o diagnóstico da AIE, sendo conhecido coloquialmente como teste de Coggins (NORCROSS & COGGINS, 1971; NAKAJIMA & USHIMI, 1971). Desde 1970 o IDGA é considerado o teste sorológico padrão ouro para o diagnóstico da AIE. O IDGA detecta anticorpos contra a p26 do capsídeo, a principal proteína do interior da partícula viral, que apresenta determinantes grupos específicos, e permanece relativamente conservada (ISSEL & COOK, 1993; ISSEL *et al.*, 1999).

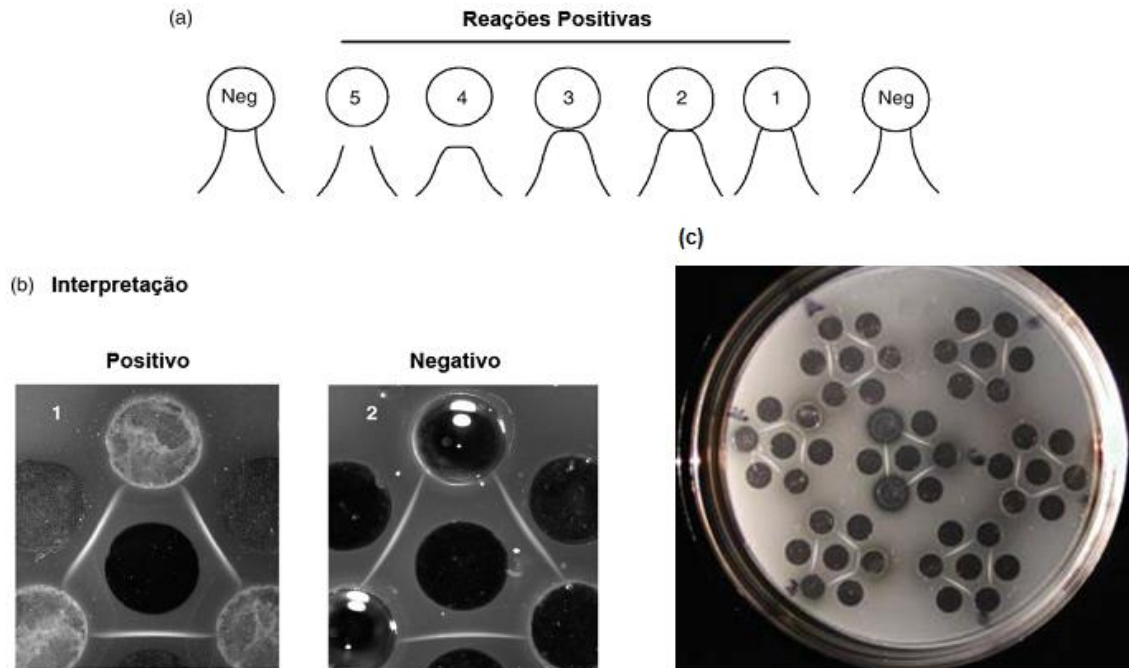


FIGURA 23: Leitura do teste IDGA - (a) Representação gráfica da interpretação numérica padronizada a partir da intensidade da linha de precipitação. (b) Fotografias de reações positiva (1) e negativa (2) obtidas a partir da interpretação das linhas de precipitação no teste IDGA. (c) Imagem de um teste IDGA comercial (VMRD, 2010; ISSEL *et al.*, 2013 modificado).

O teste IDGA apresenta algumas limitações, que podem ser comuns nos testes sorológicos. Por exemplo, amostras de soro coletadas dos cavalos durante os primeiros episódios clínicos induzidos pelo EIAV, quando testadas no IDGA serão negativas, uma vez que o sistema imune do hospedeiro não teve tempo suficiente para elaborar uma resposta imune primária que reagirá contra os antígenos p26. Sendo assim, esses cavalos devem ser amostrados novamente dentro de três a quatro semanas para confirmação, pois essas não são verdadeiras reações 'falsas negativas'. Também podem ocorrer reações 'falsas positivas', quando potros obtêm imunidade passiva através do colostro da sua progenitora infectada, mas o potro pode não estar infectado, resultando em uma interpretação equivocada. Sendo assim, é necessário esperar um período de seis meses ou mais após o nascimento para a diminuição dos anticorpos maternos no potro, para a realização de um novo teste IDGA. Além dessas limitações, existe ainda a incapacidade do teste em detectar amostras com baixos níveis de anticorpos contra a proteína p26. Outra desvantagem do teste IDGA é que o teste requer a preparação de placas de ágar e

não é adequado para ser usado em campo (ISSEL & COOK, 1993; ISSEL *et al.*, 1999; OSTLUND *et al.*, 2013).

Outro teste sorológico que tem sido empregado para o diagnóstico da AIE é o ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay). Desde 1980 tem sido desenvolvida uma série de kits de ELISA. Quatro kits de ELISA são aprovados pelo United States Department of Agriculture (USDA) e estão disponíveis internacionalmente para o diagnóstico da AIE, um ELISA competitivo e três ELISAs não competitivos. O cELISA (ELISA competitivo), primeiro kit a ser comercializado nos Estados Unidos emprega a proteína p26. O segundo kit a ser licenciado nos EUA foi o SA-ELISA (antígeno sintético ELISA), que além da p26 possui ainda a proteína gp45. Existe ainda o ViraCHEK/EIA e o VMRD ELISA que utilizam o antígeno p26. (CORDES & ISSEL, 1996; ISSEL *et al.*, 1999; CULLINANE *et al.*, 2007; ISSEL *et al.*, 2013; OSTLUND *et al.*, 2013).

REIS *et al.*, (2012) desenvolveram um ELISA indireto que utiliza a proteína recombinante gp90 (ELISA rgp90) do envelope viral para detectar anticorpos específicos anti-EIAV em amostras de campo de soro de cavalos, o qual apresentou elevada concordância de 95,4% com o teste IDGA. Após teste com 1160 amostras de cavalos, o ELISA rgp90 apresentou 96,1% de sensibilidade, 96,4% de especificidade e boa reprodutibilidade. Recentemente em 2019, NAVES *et al.*, desenvolveram um ELISA indireto, utilizando um peptídeo sintético baseado na proteína gp45 do envelope (ELISA pgp45), para detecção de anticorpos anti-EIAV em 859 amostras de soro de cavalos, jumentos e mulas. O ELISA pgp45 apresentou 96,1% de concordância, 98,6% de sensibilidade e 95,6% de especificidade quanto comparado ao teste IDGA. Os resultados mostraram que este peptídeo pgp45 pode ser utilizado como um antígeno em testes sorológicos, principalmente para a rápida detecção de um grande número de equídeos, podendo contribuir para o controle da AIE, especialmente em regiões com elevadas populações de jumentos e mulas.

O ELISA apresenta a vantagem de ser inerentemente mais sensível que o teste IDGA, uma vez que o ELISA é capaz de detectar baixos níveis de anticorpos contra

o antígeno p26 em um cavalo infectado, que apresenta um resultado negativo no IDGA. Porém, os testes mais sensíveis podem apresentar reações cruzadas, o que poderia implicar na obtenção de maior percentagem de reações positivas que na verdade são 'falsas positivas'. Uma das vantagens do ELISA é que os testes podem ser automatizados e com isso os resultados podem ser obtidos no mesmo dia em que as amostras são coletadas, enquanto que para obtenção dos resultados do teste IDGA, é necessário um período de pelo menos 24 horas. Outra vantagem é que o teste ELISA é lido por um espectrofotômetro gerando um resultado mais objetivo quando comparado ao IDGA em que a leitura é realizada visualmente pelo operador, o que depende da interpretação humana tornando o teste mais subjetivo. Uma das desvantagens do ELISA se deve à sua limitação para uso em campo, uma vez que o teste emprega reagentes que requerem o manuseio cuidadoso para manter a sua estabilidade. (ISSEL & COOK, 1993; CORDES & ISSEL, 1996; ISSEL *et al.*, 1999; ISSEL *et al.*, 2013; OSTLUND *et al.*, 2013).

A Organização Mundial de Saúde Animal (OIE, 2013-D) recomenda que um resultado positivo obtido no ELISA deverá ser retestado usando o teste IDGA para confirmar o diagnóstico, pois tem sido observado alguns resultados falso-positivos no ELISA. Além do ELISA e do IDGA, pode ser realizado um teste adicional, o imunoblot, para confirmar os resultados. O imunoblot, além da p26, apresenta ainda as proteínas do envelope gp45 e gp90. Apesar das proteínas do envelope serem encontradas em baixas quantidades na partícula viral, elas são potentes antígenos capazes de estimular uma resposta imune e produzir elevados níveis de anticorpos, que podem ser detectados no soro de cavalos. Nos Estados Unidos o imunoblot é utilizado como um teste adicional aos tradicionalmente utilizados, o IDGA e o ELISA, para alcançar um consenso quando são obtidos resultados inconclusivos nos outros testes diagnósticos (ISSEL & COOK, 1993; OSTLUND *et al.*, 2013; BALDACCHINO *et al.*, 2014).

Desde 2011, na Itália tem sido conduzido um programa de vigilância para o diagnóstico da AIE baseado em três etapas, utilizando o ELISA como um teste de triagem inicial, o IDGA como um teste confirmatório, e um imunoblot como um teste

confirmatório alternativo para a casos discordantes no ELISA e IDGA. Recentemente na Itália foi validado um imunoblot empregando os antígenos p26, gp45 e gp90, e os testes foram feitos com amostras de soro de cavalos positivas, e amostras negativas de cavalo, mula e jumento coletadas de diferentes localizações geográficas. Os dados de validação do imunoblot apresentaram sensibilidade satisfatória, especificidade, repetibilidade e reprodutibilidade para todos os antígenos e espécies de equídeos testados (SCICLUNA *et al.*, 2019).

1.4.5.2. Diagnóstico molecular

Embora a AIE seja rotineiramente diagnosticada pelo teste IDGA, os testes sorológicos apresentam algumas limitações, conforme já descrito anteriormente. Assim, em algumas situações é necessário um teste adicional para o diagnóstico da AIE, por exemplo, quando ocorrem resultados conflitantes entre os diferentes testes sorológicos, ou quando os resultados são negativos ou questionáveis no caso de uma suspeita de infecção. Para a confirmação de resultados positivos, para confirmação de infecção antes do desenvolvimento dos anticorpos para AIE, ou ainda para confirmar se um potro proveniente de uma égua infectada está ou não infectado pelo EIAV. Também para garantir que os cavalos que são usados como doadores de sangue, para a produção de antisoro ou para a produção de vacina não estejam infectados pelo EIAV (OSTLUND *et al.* 2013).

Diversas PCRs tem sido desenvolvidas para a detecção de DNA proviral e RNA viral do EIAV a partir de diferentes amostras de equídeos, como plasma, células mononucleares do sangue periférico (PBMCs) e tecidos. Contudo, muitas dessas PCRs foram feitas para a detecção do EIAV a partir de amostras de cavalos experimentalmente infectados, com amostras conhecidas do EIAV (WHETTER *et al.*, 1990; KIM *et al.*, 1992; LICHTENSTEIN *et al.*, 1996; OAKS *et al.*, 1998; HARROLD *et al.*, 2000; COOK *et al.*, 2001, 2002). Porém algumas dessas PCRs descritas falharam em detectar o EIAV em amostras de campo de alguns países, o que indica que os iniciadores construídos para a detecção do EIAV em um país não necessariamente serão adequados para amplificação de amostras de EIAV de

equídeos de outras regiões do mundo. Essa ocorrência sugere a existência de 'mismatches' entre o sítio de ligação do iniciador e a sua sequência alvo (NAGARAJAN & SIMARD, 2001; CAPPELLI *et al.*, 2011; DONG *et al.*, 2012).

Até o momento já foram desenvolvidas diferentes PCRs que permitiram a amplificação de regiões parciais do genoma do EIAV a partir de amostras de cavalos naturalmente infectados de diferentes países, como, Bélgica, Canadá, França, Eslovênia, Irlanda, Itália e Romênia. A maioria dessas PCRs amplificam o DNA da região do gene *gag* do EIAV, através de transcrição reversa seguida de PCR (RT-PCR) para a detecção do RNA viral em amostras de plasma, e "nested" PCR (n-PCR) para a detecção de DNA proviral em amostras de PBMC. Em alguns estudos, também foi possível detectar o RNA viral e DNA proviral em amostras de tecidos, como linfonodos, pulmão, fígado, baço, glândula adrenal, timo e rim, além de swabs nasal, oral, conjuntival e genital (NAGARAJAN & SIMARD, 2001, 2007; CULLINANE *et al.*, 2007; QUINLIVAN *et al.*, 2007; CAPPELLI *et al.*, 2011; CAPOMACCIO *et al.*, 2012; CAIJ *et al.*, 2014; KUHAR & MALOVRH, 2016; GAUDAIRE *et al.*, 2017).

Outros estudos também descrevem o desenvolvimento de PCRs para amplificação da região LTR do genoma do EIAV. DONG *et al.* (2012) desenvolveu uma n-PCR para amplificação da região 5' LTR ao gene *tat*, a qual permitiu a detecção do DNA proviral do EIAV a partir de amostras de PBMCs de cavalos do Japão. KUHAR *et al.* (2013) desenvolveu uma PCR para amplificação de um fragmento de 222 pb para a região 5' LTR ao gene *gag*, a qual permitiu a detecção e caracterização molecular do EIAV em amostras de equídeos da Eslovênia.

Recentemente no Brasil foi feita a caracterização molecular e análise filogenética de 15 amostras a partir de equídeos naturalmente infectados da Bahia. A partir de 62 amostras de PBMCs foi detectado o DNA proviral do EIAV em 53 amostras, através de uma n-PCR utilizando os iniciadores descritos por OAKS *et al.*, (1998) para amplificação de uma região parcial de 427 pb do gene *gag* (TIGRE *et al.* 2017).

O emprego de testes diagnósticos para a AIE de rotina baseados em ensaios moleculares apresenta alguns obstáculos. O principal deles se deve à ocorrência de variação genética significativa do EIAV entre isolados distintos geograficamente ou até mesmo durante o curso de uma infecção, o que impede o pareamento entre os iniciadores e as sequências alvo (DONG *et al.*, 2012; COOK *et al.*, 2013). O estágio da doença que o equídeo está também pode influenciar na detecção do vírus, como a baixa carga viral no plasma e nos tecidos alvos, especialmente quando o animal atinge o estágio de portador inaparente da doença, conforme já foi demonstrado por HARROLD *et al.* (2000).

Em um estudo recente foi desenvolvida uma RT-iiPCR (reverse transcription-insulated isothermal PCR) para auxiliar no diagnóstico do AIE. O desempenho clínico e analítico desta PCR foi avaliado em comparação com uma RT-qPCR (real-time RT-PCR). Os dois ensaios têm como alvo a mesma região do genoma: região 5' LTR ao exon 1 do gene *tat*, porém utilizando iniciadores e sondas diferentes. Os resultados também foram comparados com os obtidos no teste IDGA. A partir de testes de sensibilidade analítica, especificidade e desempenho clínico, os resultados obtidos mostraram que a RT-iiPCR não reagiu com outros vírus comumente encontrados em equinos, teve sensibilidade equivalente e concordância de 95,4% com a RT-qPCR. Além disso a RT-qPCR e RT-iiPCR tiveram sensibilidade de 43,7% e 50%, respectivamente, quando comparadas ao IDGA. A principal limitação encontrada na RT-iiPCR foi a baixa carga viral comumente encontrada nos portadores inaparentes, o que pode limitar a sensibilidade do diagnóstico dos testes baseados em RT-PCR (COOK *et al.*, 2018).

1.4.6. Detecção do EIAV por PCR

Durante o meu mestrado (março de 2013 a fevereiro de 2015) foi feita a detecção de uma região parcial do DNA proviral do EIAV, através de uma “semi-nested” PCR, em amostras de PBMCs, obtidas de equídeos infectados naturalmente do Pantanal brasileiro. A snPCR foi feita empregando iniciadores baseados na região 5' LTR ao exon 1 do gene *tat* do genoma do EIAV. Essa snPCR foi desenvolvida a partir da

modificação da técnica de “nested” PCR desenvolvida por DONG *et al.*, (2012), utilizando dois iniciadores descritos nesse trabalho, em conjunto com um iniciador desenhado no Laboratório de vírus da UFMG. A snPCR mostrou ser eficiente para a detecção do DNA proviral do EIAV em amostras de campo de PBMCs de cavalos do Pantanal brasileiro (Dissertação de mestrado “Detecção e caracterização molecular do *Equine infectious anemia virus* em amostras de cavalos provenientes do Pantanal brasileiro”)

1.4.7. Tratamento, Prevenção e Controle

Não existe nenhum tipo de tratamento específico para o controle da infecção por EIAV. Porém, pode ser utilizada terapia de apoio, que poderá incluir o isolamento do cavalo infectado de outros cavalos, minimização do estresse do equídeo infectado, fornecimento de bons cuidados médicos, uso de drogas anti-inflamatórias não-esteroidais, hidroterapia nas patas para tratar edemas, transfusão de sangue em casos de anemia grave e/ou trombocitopenia. O uso de corticosteroides é contraindicado, porque eles irão provocar o aumento da carga viral e dos sintomas clínicos associados à doença. Ao contrário de outros lentivírus, como o HIV, o EIAV não causa imunodeficiência profunda. Entretanto, elevados níveis de viremia podem induzir uma imunossupressão transiente do animal. Com isso, pode ser indicado o uso de antimicrobianos durante os episódios febris para ajudar a prevenir infecções bacterianas secundárias (SELLON & LONG, 2014).

Embora existam vacinas que ajudem a proteger os cavalos de muitas doenças infecciosas comuns, até o momento não existe nenhuma vacina disponível contra o EIAV. Em 1970 foi desenvolvida uma vacina viva atenuada de EIAV na China. Essa amostra vacinal (EIAV_{DLV120}) foi obtida em passagens seriadas *in vitro* de uma amostra de EIAV patogênica, que foi obtida a partir de passagem *in vivo* de uma amostra do tipo selvagem em jumentos. Essa vacina foi utilizada na China entre os anos de 1975 e 1990 em 75 milhões de cavalos e jumentos para o controle de uma pandemia da AIE, que resultou na morte de 40 milhões de equinos, mas logo depois

o programa de vacinação não teve continuidade (COHEN, 2004; MA *et al.*, 2011; OSTLUND *et al.*, 2013; BALDACCHINO *et al.*, 2014; SELTON & LONG, 2014).

O EIAV apresenta algumas características que tornam difícil o desenvolvimento de uma vacina efetiva contra a AIE. Dentre estas características está a enorme diversidade de amostras de EIAV que circulam mundialmente, sua variação antigênica, a capacidade de resistência a anticorpos neutralizantes, e a capacidade de integrar no genoma do hospedeiro. Geralmente, a proteína *env* do envelope viral é o principal alvo para o desenvolvimento de vacinas, pois ela interage com o sistema imune do hospedeiro em uma extensão muito maior que qualquer outra proteína viral. Contudo, a proteína *env* é uma fonte primária de variação antigênica, o que faz com que essa enorme diversidade tenha um notável impacto no desenvolvimento de uma vacina efetiva para o controle das infecções pelo EIAV. Assim, é possível que pesquisas futuras superem esses obstáculos e levem ao desenvolvimento de uma vacina eficiente contra o EIAV, que contribuirá para os programas de controle da AIE (CRAIGO & MONTELARO, 2013; BALDACCHINO *et al.*, 2014).

Segundo a Organização Mundial de Saúde Animal (OIE, 2019-D) o diagnóstico da AIE pode ser feito através dos testes sorológicos IDGA e ELISA, e quando é obtido um resultado positivo no ELISA, este deve ser confirmado através do IDGA. Para confirmação de resultados discordantes nos dois testes pode ser realizado um teste adicional, o imunoblot. Técnicas de PCR também podem ser usadas em alguns casos, como por exemplo, para confirmação de caso clínico, mas alguns fatores limitam o uso da PCR, conforme descrito anteriormente, como a baixa eficácia das metodologias de PCR atualmente disponíveis para a detecção do EIAV (OIE, 2019-D).

No Brasil de acordo com o Ministério da Agricultura e Abastecimento (MAPA), para o diagnóstico da AIE podem ser utilizados os testes sorológicos IDGA e ELISA, o uso do ELISA foi aprovado recentemente através da Instrução Normativa Nº 52, de 26 de novembro de 2018 (MAPA, 2018).

As normas para a prevenção e controle da AIE no Brasil foram estabelecidas pela Instrução Normativa nº45 de junho de 2004 do MAPA. Em caso de detecção de foco da AIE, deverão ser adotadas as seguintes medidas: interdição da propriedade após identificação do equídeo portador; o proprietário deverá ser notificado da proibição do trânsito dos equídeos da propriedade, assim como da movimentação de objetos passíveis de veiculação do EIAV. Em conjunto, deverá ser realizada investigação epidemiológica de todos os animais IDGA positivos, incluindo histórico de trânsito. Deverá ser feita a marcação dos equídeos portadores da AIE, e o subsequente sacrifício ou isolamento desses animais portadores, até o resultado definitivo do exame de contraprova. Quando a medida indicada for o sacrifício do animal portador, esta será realizada pelo serviço veterinário oficial, no prazo máximo de 30 dias, a contar a partir do resultado do exame diagnóstico. O isolamento, que prevê a manutenção de equídeo em área delimitada, somente será permitido para animais portadores localizados em área de alto risco. Além disso, deverá ser feito teste de todos os equídeos da propriedade. Poderá ser feita a desinterdição da propriedade após realização de dois exames com resultados negativos consecutivos, com intervalo de 30 e 60 dias (MAPA, 2004).

O trânsito interestadual de equídeos é permitido somente quando acompanhado de documento oficial de trânsito e do resultado negativo no teste diagnóstico para AIE. Para ingresso de equídeo no território nacional, será indispensável, sem prejuízo de outras exigências sanitárias, a apresentação de resultado IDGA negativo. Quanto à participação de equídeos em eventos agropecuários, a lei preconiza que será permitida somente com teste negativo para AIE. Está dispensado do teste diagnóstico para AIE o equídeo com idade inferior a seis meses, desde que esteja acompanhado da progenitora e esta apresente resultado negativo no teste. No caso de equídeo com idade inferior a seis meses, proveniente de uma progenitora positiva, este deverá ser isolado por um período mínimo de 60 dias, e após este período, ser submetido a dois testes para o diagnóstico da AIE, e apresentar resultados negativos consecutivos com intervalo de 30 e 60 dias, antes de ser incorporado ao rebanho negativo (MAPA, 2004).

Nos estados do Mato Grosso e Mato Grosso do Sul, ao invés do sacrifício dos animais soropositivos, como estabelecido por lei (MAPA, 2004), é permitido a manutenção dos animais positivos nas propriedades, permitindo sua utilização no manejo diário da fazenda, e concomitantemente estimulando o diagnóstico e a adoção de medidas profiláticas e de controle da AIE nas propriedades. Existe um programa oficial do estado de Mato Grosso do Sul intitulado Programa de Controle e Prevenção da Anemia Infecciosa Equina no Pantanal Sul-Mato-Grossense (CAIEPAN), que tem por objetivos controlar a AIE em propriedades pertencentes aos municípios do Pantanal sul-mato-grossense, visando à redução de sua prevalência a níveis que permitam o sacrifício dos animais infectados, sem comprometer a atividade pecuária no Pantanal e objetivando a erradicação da doença na região (SILVA *et al.*, 2004; NOGUEIRA *et al.*, 2017).

Na maioria das áreas do mundo o controle da AIE tem sido realizado através de testes diagnósticos e separação dos cavalos com resultados positivos daqueles negativos. Porém, até realizar o teste diagnóstico para todos os cavalos, cada animal é um reservatório potencial para o EIAV. Com isso, os proprietários de equinos devem tomar algumas precauções para reduzir o risco da infecção pelo EIAV, como por exemplo, o uso de seringas e agulhas descartáveis; limpeza e esterilização de todos os instrumentos após o uso; limpeza dos estábulos e as instalações próximas; separação de animais infectados dos saudáveis; isolamento de todos os novos animais, incluindo cavalos, mulas e jumentos, levados para as instalações até que testes diagnósticos para AIE sejam realizados; obtenção de certificação do status de AIE negativo para os cavalos utilizados em shows, feiras e outros locais onde muitos animais se reúnem; e implementação de medidas de controle dos insetos vetores, como aplicação periódica de repelentes e inseticidas em equinos e instalações ocupadas por esses animais (USDA, 2008).

2. JUSTIFICATIVA E RELEVÂNCIA

A AIE é uma doença de ocorrência mundial e encontra-se amplamente disseminada no território brasileiro, especialmente na região do Pantanal onde apresenta uma elevada prevalência, como demonstrado por estudos sorológicos. O estado do Ceará também pode ser destacado, pois em 2018 foi o segundo estado que apresentou o maior número de surtos da doença. A pecuária extensiva, principal atividade econômica do Pantanal, utiliza equídeos para o manejo dos rebanhos bovinos, os quais ao longo dos anos apresentaram adaptações às características peculiares dessa região.

A AIE pode comprometer o desempenho dos equídeos e conseqüentemente afetar indiretamente a atividade de pecuária. A legislação brasileira prevê o sacrifício dos animais soropositivos, porém nos estados do Mato Grosso e Mato Grosso do Sul, em que a prevalência da AIE é elevada, é permitida a manutenção dos animais positivos, uma vez que o sacrifício dos equídeos comprometeria significativamente ou mesmo inviabilizaria a pecuária pantaneira. Contudo, se não forem adotadas medidas profiláticas para evitar a transmissão da doença e testes diagnósticos eficazes e de rotina para o controle da doença, esses equídeos infectados podem servir como potenciais fontes de transmissão do EIAV, disseminação e manutenção da doença.

Os dados da prevalência e incidência da doença no Brasil não são informados com exatidão, uma vez que muitos se referem ao teste diagnóstico realizado para o trânsito de equídeos e a participação em eventos agropecuários, e especialmente para animais de alto valor zootécnico. Assim, a taxa de prevalência da AIE no território brasileiro pode ser subestimada devido a esses fatores. Embora a AIE seja rotineiramente diagnosticada pelo IDGA, é essencial ampliar os ensaios de detecção da AIE para que sejam mais sensíveis, uma vez que o IDGA apresenta limitações para a detecção da infecção por diversas razões. Assim, em algumas situações torna-se necessário a realização de um diagnóstico molecular, além dos testes sorológicos convencionais, como por exemplo, para a resolução de resultados

discordantes, ou no caso de suspeita de infecção de amostras negativas em testes sorológicos.

Considerando a ausência de disponibilização de sequências brasileiras do genoma completo do EIAV e a escassez de sequências do EIAV em bancos de dados públicos, tornam-se importantes estudos de detecção e caracterização molecular do EIAV circulante no Pantanal brasileiro, assim como em outras regiões do Brasil, especialmente onde a AIE é endêmica. A detecção do EIAV, através de testes moleculares em equídeos brasileiros poderá contribuir para dados da prevalência da doença, muitas vezes subestimados pelas estatísticas oficiais. A caracterização molecular do vírus a partir de amostras de equídeos do Brasil poderá contribuir para a filogenia do EIAV circulante no território brasileiro. Estes estudos serão importantes para permitir o desenho de iniciadores adequados e eficientes para amplificação do EIAV em amostras clínicas de equídeos no Brasil.

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo geral

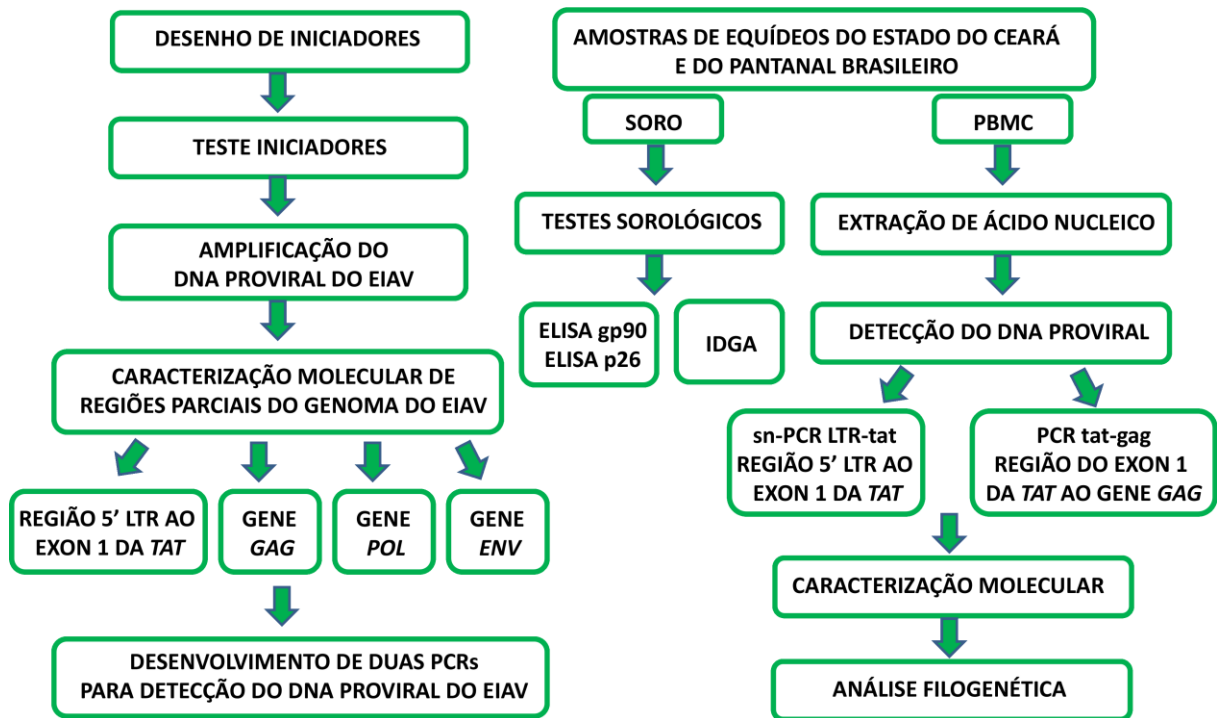
- Detectar, caracterizar molecularmente e analisar filogeneticamente regiões parciais do genoma do *Equine infectious anemia virus* circulante em amostras de equídeos infectados naturalmente do Pantanal brasileiro e do estado do Ceará.

3.2. Objetivos específicos

- Desenvolver PCRs para a amplificação de diferentes regiões parciais do genoma do EIAV;
- Detectar o DNA proviral do EIAV em amostras de equídeos do Pantanal brasileiro e do estado do Ceará;
- Sequenciar as amostras amplificadas em PCR;
- Fazer a análise filogenética das sequências nucleotídicas obtidas;
- Analisar o status sorológico das amostras de equídeos do Pantanal brasileiro e do estado do Ceará.

4. METODOLOGIA

4.1. Estratégia de trabalho



4.2. Amostras

As amostras utilizadas no estudo são de equídeos naturalmente infectados do Pantanal e do Nordeste brasileiro. Para todas as amostras do estudo, foi coletado sangue total de equídeos por venipunctura jugular em tubos com ácido etilenodiamino tetra-acético (EDTA) e sem EDTA, para obtenção de células mononucleares do sangue periférico (PBMCs) e soro, respectivamente. Para os equídeos do Ceará, também foram obtidas amostras de sangue total e órgãos para extração de ácido nucleico.

As amostras do Pantanal foram fornecidas pela pesquisadora Márcia Furlan Nogueira da Embrapa Pantanal, Corumbá/MS/Brasil, e uma amostra (POCONE-BR) foi fornecida pelo professor Daniel Moura de Aguiar do Laboratório de Virologia e Rickettsioses, Faculdade de Medicina Veterinária, Universidade Federal de Mato

Grosso, Cuiabá/MT, Brasil. Do Pantanal foram obtidas 133 amostras de DNA proviral extraídas a partir de PBMCs, e amostras de soro dos mesmos animais, provenientes de equídeos de quatro sub-regiões do Pantanal. Desse total 47 foram coletadas em 2008 de Nabileque, 12 em 2015 de Nhecolândia, e 73 de Paiaguás e uma amostra (POCONE-BR) de PBMC, plasma e soro de um cavalo pertencente a uma fazenda, localizada nos limites dos municípios de Poconé e Nossa Senhora do Livramento, do estado do Mato Grosso (Figura 24, tabela 1).

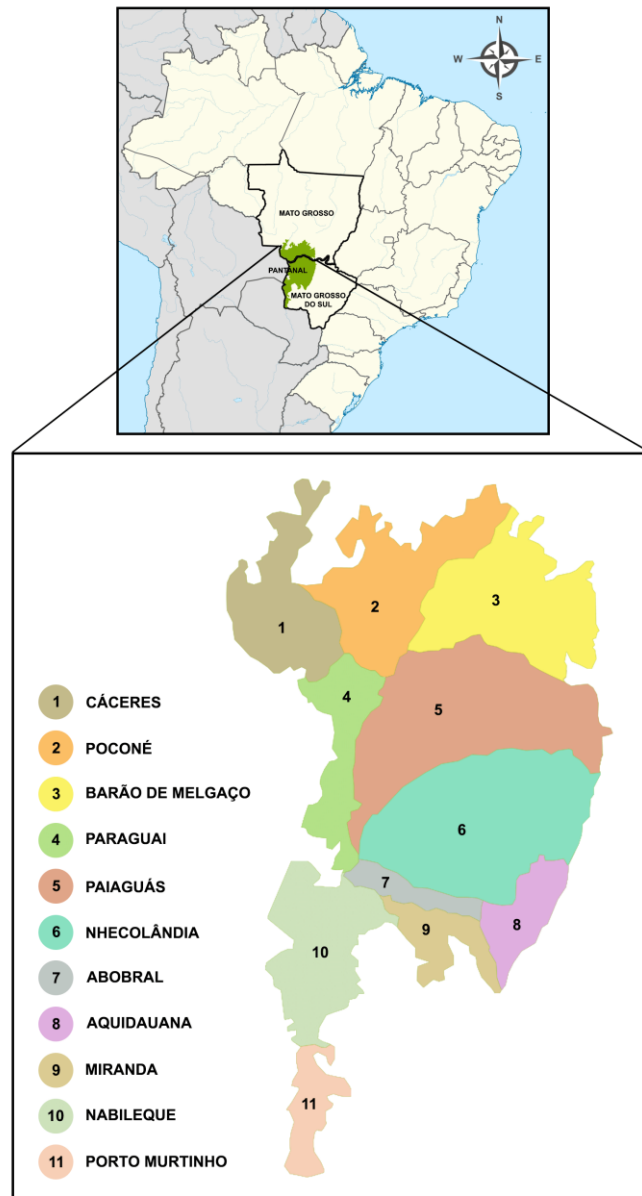


FIGURA 24: Localização das 11 sub-regiões do Pantanal nos estados de Mato Grosso e Mato Grosso do Sul, região Centro-Oeste do Brasil – O mapa exhibe os locais de coleta das amostras de equídeos do Pantanal brasileiro: Nabileque, Nhecolândia, Paiaguás e Poconé.

TABELA 1: Identificação das 133 amostras de cavalos (*Equus caballus*) do Pantanal brasileiro – data e local de coleta

Identificação Amostras	Data de coleta	Local de coleta*
POCONE-BR-01	2015	Limites de Poconé e Nossa Senhora do Livramento
PAN-BR-01	2008	Nabileque
PAN-BR-02	2008	Nabileque
PAN-BR-03	2008	Nabileque
PAN-BR-04	2008	Nabileque
PAN-BR-05	2008	Nabileque
PAN-BR-06	2008	Nabileque
PAN-BR-07	2008	Nabileque
PAN-BR-08	2008	Nabileque
PAN-BR-09	2008	Nabileque
PAN-BR-10	2008	Nabileque
PAN-BR-11	2008	Nabileque
PAN-BR-12	2008	Nabileque
PAN-BR-13	2008	Nabileque
PAN-BR-14	2008	Nabileque
PAN-BR-15	2008	Nabileque
PAN-BR-16	2008	Nabileque
PAN-BR-17	2008	Nabileque
PAN-BR-18	2015	Nhecolândia
PAN-BR-19	2015	Nhecolândia
PAN-BR-20	2015	Nhecolândia
PAN-BR-21	2015	Nhecolândia
PAN-BR-22	2015	Nhecolândia
PAN-BR-23	2008	Nabileque
PAN-BR-24	2008	Nabileque
PAN-BR-25	2008	Nabileque
PAN-BR-26	2008	Nabileque
PAN-BR-27	2008	Nabileque
PAN-BR-28	2008	Nabileque
PAN-BR-29	2008	Nabileque
PAN-BR-30	2008	Nabileque
PAN-BR-31	2008	Nabileque
PAN-BR-32	2008	Nabileque
PAN-BR-33	2008	Nabileque
PAN-BR-34	2008	Nabileque
PAN-BR-35	2008	Nabileque
PAN-BR-36	2008	Nabileque
PAN-BR-37	2008	Nabileque
PAN-BR-38	2008	Nabileque

TABELA 1: Identificação das 133 amostras de cavalos (*Equus caballus*) do Pantanal brasileiro – data e local de coleta

Identificação Amostras	Data de coleta	Local de coleta*
PAN-BR-39	2008	Nabileque
PAN-BR-40	2008	Nabileque
PAN-BR-41	2008	Nabileque
PAN-BR-42	2008	Nabileque
PAN-BR-43	2008	Nabileque
PAN-BR-44	2008	Nabileque
PAN-BR-45	2008	Nabileque
PAN-BR-46	2008	Nabileque
PAN-BR-47	2008	Nabileque
PAN-BR-48	2008	Nabileque
PAN-BR-49	2008	Nabileque
PAN-BR-50	2008	Nabileque
PAN-BR-51	2008	Nabileque
PAN-BR-52	2008	Nabileque
PAN-BR-53	2015	Nhecolândia
PAN-BR-54	2015	Nhecolândia
PAN-BR-55	2015	Nhecolândia
PAN-BR-56	2015	Nhecolândia
PAN-BR-57	2015	Nhecolândia
PAN-BR-58	2015	Nhecolândia
PAN-BR-59	2015	Nhecolândia
PAN-BR-7528	2015	Paiaguás
PAN-BR-7537	2015	Paiaguás
PAN-BR-7538	2015	Paiaguás
PAN-BR-7540	2015	Paiaguás
PAN-BR-7541	2015	Paiaguás
PAN-BR-7542	2015	Paiaguás
PAN-BR-7543	2015	Paiaguás
PAN-BR-7544	2015	Paiaguás
PAN-BR-7548	2015	Paiaguás
PAN-BR-7562	2015	Paiaguás
PAN-BR-7570	2015	Paiaguás
PAN-BR-7572	2015	Paiaguás
PAN-BR-7573	2015	Paiaguás
PAN-BR-7575	2015	Paiaguás
PAN-BR-7584	2015	Paiaguás
PAN-BR-7598	2015	Paiaguás
PAN-BR-7612	2015	Paiaguás
PAN-BR-7617	2015	Paiaguás

TABELA 1: Identificação das 133 amostras de cavalos (*Equus caballus*) do Pantanal brasileiro – data e local de coleta

Identificação Amostras	Data de coleta	Local de coleta*
PAN-BR-7683	2015	Paiaguás
PAN-BR-7693	2015	Paiaguás
PAN-BR-7697	2015	Paiaguás
PAN-BR-7704	2015	Paiaguás
PAN-BR-7716	2015	Paiaguás
PAN-BR-7718	2015	Paiaguás
PAN-BR-7719	2015	Paiaguás
PAN-BR-7721	2015	Paiaguás
PAN-BR-7725	2015	Paiaguás
PAN-BR-7731	2015	Paiaguás
PAN-BR-7734	2015	Paiaguás
PAN-BR-7738	2015	Paiaguás
PAN-BR-7740	2015	Paiaguás
PAN-BR-7960	2015	Paiaguás
PAN-BR-7961	2015	Paiaguás
PAN-BR-7962	2015	Paiaguás
PAN-BR-7963	2015	Paiaguás
PAN-BR-7968	2015	Paiaguás
PAN-BR-7972	2015	Paiaguás
PAN-BR-7984	2015	Paiaguás
PAN-BR-7991	2015	Paiaguás
PAN-BR-7994	2015	Paiaguás
PAN-BR-8001	2015	Paiaguás
PAN-BR-8002	2015	Paiaguás
PAN-BR-8003	2015	Paiaguás
PAN-BR-8005	2015	Paiaguás
PAN-BR-8013	2015	Paiaguás
PAN-BR-8014	2015	Paiaguás
PAN-BR-8016	2015	Paiaguás
PAN-BR-8017	2015	Paiaguás
PAN-BR-8019	2015	Paiaguás
PAN-BR-8028	2015	Paiaguás
PAN-BR-8052	2015	Paiaguás
PAN-BR-8054	2015	Paiaguás
PAN-BR-8063	2015	Paiaguás
PAN-BR-8065	2015	Paiaguás
PAN-BR-8083	2015	Paiaguás
PAN-BR-8084	2015	Paiaguás
PAN-BR-8086	2015	Paiaguás

TABELA 1: Identificação das 133 amostras de cavalos (*Equus caballus*) do Pantanal brasileiro – data e local de coleta

Identificação Amostras	Data de coleta	Local de coleta*
PAN-BR-8087	2015	Paiaguás
PAN-BR-8088	2015	Paiaguás
PAN-BR-8095	2015	Paiaguás
PAN-BR-8098	2015	Paiaguás
PAN-BR-8101	2015	Paiaguás
PAN-BR-8103	2015	Paiaguás
PAN-BR-8110	2015	Paiaguás
PAN-BR-8117	2015	Paiaguás
PAN-BR-8135	2015	Paiaguás
PAN-BR-8142	2015	Paiaguás
PAN-BR-8145	2015	Paiaguás
PAN-BR-8147	2015	Paiaguás
PAN-BR-8151	2015	Paiaguás
PAN-BR-8152	2015	Paiaguás
PAN-BR-8156	2015	Paiaguás
PAN-BR-8159	2015	Paiaguás

*Todos os locais de coleta das amostras são de fazendas de subregiões do Pantanal brasileiro.

As amostras do nordeste brasileiro foram fornecidas pelo professor Bruno Marques Teixeira do Centro Universitário INTA (UNINTA). As amostras de sangue foram coletadas pela aluna Viviane Maria Dias Costa do UNINTA. As amostras de equídeos são provenientes de diferentes localizações do Ceará, de Taparuaba e Jaibaras distritos do município de Sobral, e dos municípios de Groaíras, Massapê, Santa Quitéria e Sobral (Figura 25). Foram obtidas 207 amostras, sendo 193 amostras de PBMC e soro dos mesmos animais, e 14 amostras de órgãos de equídeos eutanasiados. Desse total, 30 amostras são de cavalos (*Equus caballus*) (Tabela 2), 160 de jumentos (*Equus asinus*) (Tabela 3), e três de mula (*Equus caballus* X *Equus asinus*) (Tabela 4). Das 14 amostras de órgãos, seis são de um cavalo (*Equus caballus*) e oito de três jumentos (*Equus asinus*), e destes mesmos animais também foram obtidas amostras de PBMC e soro (Tabela 5).

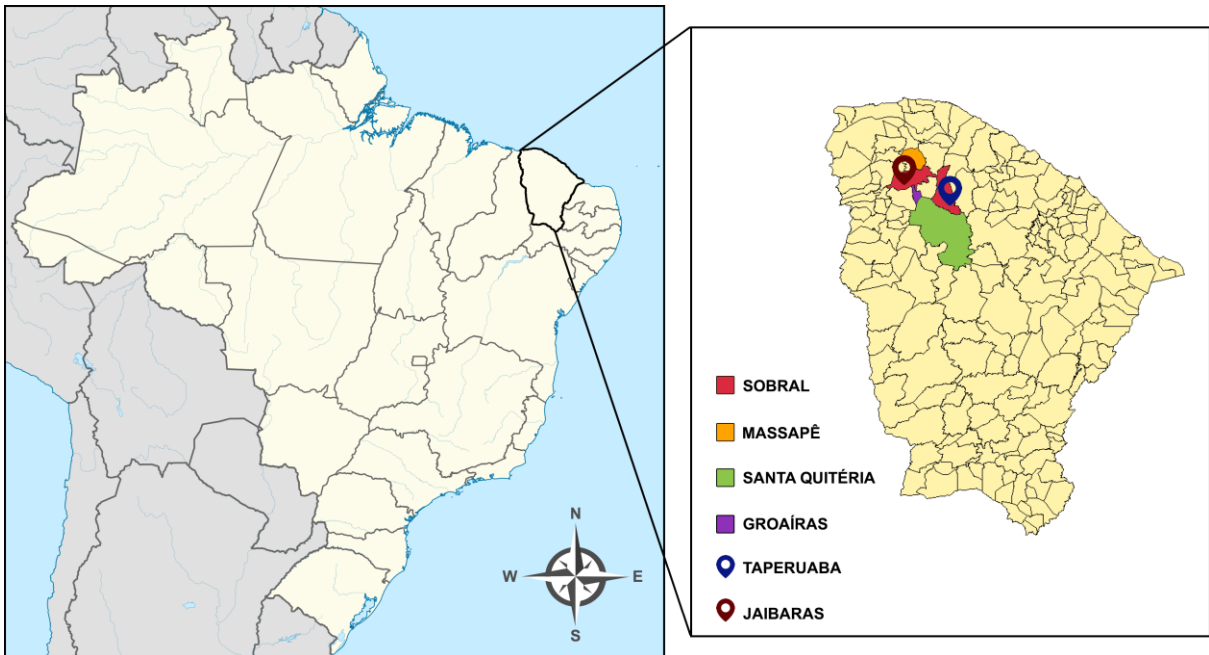


FIGURA 25: Localização dos municípios do estado do Ceará, região Nordeste do Brasil – O mapa exibe os locais de coleta das amostras de equídeos do estado do Ceará: Taperuaba e Jaibaras, distritos do município de Sobral, e os municípios de Sobral, Massapé, Santa Quitéria e Groaíras do estado do Ceará.

TABELA 2: Identificação das 30 amostras de PBMC e soro de cavalos (*Equus caballus*) do Ceará/Brasil – local e data de coleta

Identificação amostras	Local de coleta	Data de coleta
CEARÁ-C-01	Sobral	2016
CEARÁ-C-02	Massapé	2016
CEARÁ-C-03	Jaibaras/Sobral	2016
CEARÁ-C-04	Jaibaras/Sobral	2016
CEARÁ-C-05	Jaibaras/Sobral	2016
CEARÁ-C-06	Jaibaras/Sobral	2016
CEARÁ-C-07	Groaíras	2017
CEARÁ-C-08	Groaíras	2017
CEARÁ-C-09	Groaíras	2017
CEARÁ-C-10	Groaíras	2017
CEARÁ-C-11	Groaíras	2017
CEARÁ-C-12	Groaíras	2017
CEARÁ-C-13	Groaíras	2017
CEARÁ-C-14	Taperuaba/Sobral	2017
CEARÁ-C-15	Sobral	2017
CEARÁ-C-16	Sobral	2017
CEARÁ-C-17	Sobral	2017

TABELA 2: Identificação das 30 amostras de PBMC e soro de cavalos (*Equus caballus*) do Ceará/Brasil – local e data de coleta

Identificação amostras	Local de coleta	Data de coleta
CEARÁ-C-18	Sobral	2017
CEARÁ-C-19	Sobral	2017
CEARÁ-C-20	Sobral	2017
CEARÁ-C-21	Sobral	2017
CEARÁ-C-22	Sobral	2017
CEARÁ-C-23	Sobral	2017
CEARÁ-C-24	Sobral	2017
CEARÁ-C-25	Sobral	2017
CEARÁ-C-26	Sobral	2017
CEARÁ-C-27	Sobral	2017
CEARÁ-C-179-127	Santa Quitéria	2017
CEARÁ-C-268-128	Santa Quitéria	2017
CEARÁ-C-549-126-AZ	Santa Quitéria	2017

TABELA 3: Identificação das 160 amostras de PBMC e soro de jumentos (*Equus asinus*) do Ceará/Brasil – local e data de coleta

Identificação amostras	Local de coleta	Data de coleta
CEARÁ-J-01	Santa Quitéria	2016
CEARÁ-J-04	Santa Quitéria	2016
CEARÁ-J-05	Santa Quitéria	2016
CEARÁ-J-06	Santa Quitéria	2016
CEARÁ-J-07	Santa Quitéria	2016
CEARÁ-J-08	Santa Quitéria	2016
CEARÁ-J-09	Santa Quitéria	2016
CEARÁ-J-10	Santa Quitéria	2016
CEARÁ-J-11	Santa Quitéria	2016
CEARÁ-J-12	Santa Quitéria	2016
CEARÁ-J-13	Santa Quitéria	2016
CEARÁ-J-14	Santa Quitéria	2016
CEARÁ-J-15	Santa Quitéria	2016
CEARÁ-J-16	Santa Quitéria	2016
CEARÁ-J-17	Santa Quitéria	2016
CEARÁ-J-18	Santa Quitéria	2017
CEARÁ-J-138	Santa Quitéria	2017
CEARÁ-J-40	Santa Quitéria	2017
CEARÁ-J-423	Santa Quitéria	2017
CEARÁ-J-295	Santa Quitéria	2017
CEARÁ-J-426	Santa Quitéria	2017
CEARÁ-J-294	Santa Quitéria	2017

TABELA 3: Identificação das 160 amostras de PBMC e soro de jumentos (*Equus asinus*) do Ceará/Brasil – local e data de coleta

Identificação amostras	Local de coleta	Data de coleta
CEARÁ-J-404	Santa Quitéria	2017
CEARÁ-J-570	Santa Quitéria	2017
CEARÁ-J-508	Santa Quitéria	2017
CEARÁ-J-336	Santa Quitéria	2017
CEARÁ-J-144	Santa Quitéria	2017
CEARÁ-J-462	Santa Quitéria	2017
CEARÁ-J369	Santa Quitéria	2017
CEARÁ-J-184	Santa Quitéria	2017
CEARÁ-J-140	Santa Quitéria	2017
CEARÁ-J-318	Santa Quitéria	2017
CEARÁ-J-600	Santa Quitéria	2017
CEARÁ-J-448	Santa Quitéria	2017
CEARÁ-J-292	Santa Quitéria	2017
CEARÁ-J-314	Santa Quitéria	2017
CEARÁ-J-11-38A-AZ	Santa Quitéria	2017
CEARÁ-J-29-AZ	Santa Quitéria	2017
CEARÁ-J-39	Santa Quitéria	2017
CEARÁ-J-48-32-VE	Santa Quitéria	2017
CEARÁ-J-62-AM	Santa Quitéria	2017
CEARÁ-J-80-55-VD	Santa Quitéria	2017
CEARÁ-J-101-AZ	Santa Quitéria	2017
CEARÁ-J-103-VM	Santa Quitéria	2017
CEARÁ-J-105-AZ	Santa Quitéria	2017
CEARÁ-J-107-AM	Santa Quitéria	2017
CEARÁ-J-121-AM	Santa Quitéria	2017
CEARÁ-J-121-F	Santa Quitéria	2017
CEARÁ-J-132-AZ	Santa Quitéria	2017
CEARÁ-J-133-47	Santa Quitéria	2017
CEARÁ-J-137	Santa Quitéria	2017
CEARÁ-J-137-30-AZ	Santa Quitéria	2017
CEARÁ-J-141-VD	Santa Quitéria	2017
CEARÁ-J-144-135-AM	Santa Quitéria	2017
CEARÁ-J-158-AZ	Santa Quitéria	2017
CEARÁ-J-170-VE	Santa Quitéria	2017
CEARÁ-J-175-1-AZ	Santa Quitéria	2017
CEARÁ-J-175-AM	Santa Quitéria	2017
CEARÁ-J-177-AM	Santa Quitéria	2017
CEARÁ-J-181-AM	Santa Quitéria	2017
CEARÁ-J-183-AZ	Santa Quitéria	2017

TABELA 3: Identificação das 160 amostras de PBMC e soro de jumentos (*Equus asinus*) do Ceará/Brasil – local e data de coleta

Identificação amostras	Local de coleta	Data de coleta
CEARÁ-J-184-VD	Santa Quitéria	2017
CEARÁ-J-194-VD	Santa Quitéria	2017
CEARÁ-J-202-AZ	Santa Quitéria	2017
CEARÁ-J-213-AZ	Santa Quitéria	2017
CEARÁ-J-218	Santa Quitéria	2017
CEARÁ-J-226-AZ	Santa Quitéria	2017
CEARÁ-J-229-AM	Santa Quitéria	2017
CEARÁ-J-229-AZ	Santa Quitéria	2017
CEARÁ-J-238	Santa Quitéria	2017
CEARÁ-J-249-41-AZ	Santa Quitéria	2017
CEARÁ-J-261-AZ	Santa Quitéria	2017
CEARÁ-J-267-AZ	Santa Quitéria	2017
CEARÁ-J-272-10-AZ	Santa Quitéria	2017
CEARÁ-J-280-AZ	Santa Quitéria	2017
CEARÁ-J-283-12-AZ	Santa Quitéria	2017
CEARÁ-J-284-112-AZ	Santa Quitéria	2017
CEARÁ-J-284-24-AZ	Santa Quitéria	2017
CEARÁ-J-285-AM	Santa Quitéria	2017
CEARÁ-J-287-AZ	Santa Quitéria	2017
CEARÁ-J-292-39-AZ	Santa Quitéria	2017
CEARÁ-J-292-130-AZ	Santa Quitéria	2017
CEARÁ-J-292-136-AM	Santa Quitéria	2017
CEARÁ-J-294-137-AZ	Santa Quitéria	2017
CEARÁ-J-294-AZ	Santa Quitéria	2017
CEARÁ-J-300-35-AZ	Santa Quitéria	2017
CEARÁ-J-301-AM	Santa Quitéria	2017
CEARÁ-J-319-AM	Santa Quitéria	2017
CEARÁ-J-336-132	Santa Quitéria	2017
CEARÁ-J-337-34-AZ	Santa Quitéria	2017
CEARÁ-J-382-AM	Santa Quitéria	2017
CEARÁ-J-393-AM	Santa Quitéria	2017
CEARÁ-J-398-AM	Santa Quitéria	2017
CEARÁ-J-421-123	Santa Quitéria	2017
CEARÁ-J-424-VD	Santa Quitéria	2017
CEARÁ-J-426-129-AM	Santa Quitéria	2017
CEARÁ-J-429-VD	Santa Quitéria	2017
CEARÁ-J-447-AZ	Santa Quitéria	2017
CEARÁ-J-449-VD	Santa Quitéria	2017
CEARÁ-J-461-VD	Santa Quitéria	2017

TABELA 3: Identificação das 160 amostras de PBMC e soro de jumentos (*Equus asinus*) do Ceará/Brasil – local e data de coleta

Identificação amostras	Local de coleta	Data de coleta
CEARÁ-J-471-VD	Santa Quitéria	2017
CEARÁ-J-471-74	Santa Quitéria	2017
CEARÁ-J-472-VE	Santa Quitéria	2017
CEARÁ-J-476-60	Santa Quitéria	2017
CEARÁ-J-476	Santa Quitéria	2017
CEARÁ-J-477-VE	Santa Quitéria	2017
CEARÁ-J-478	Santa Quitéria	2017
CEARÁ-J-479	Santa Quitéria	2017
CEARÁ-J-484-VD	Santa Quitéria	2017
CEARÁ-J-488-AM	Santa Quitéria	2017
CEARÁ-J-42-VM	Santa Quitéria	2017
CEARÁ-J-492-AM	Santa Quitéria	2017
CEARÁ-J-497-AM	Santa Quitéria	2017
CEARÁ-J-507-97-AZ	Santa Quitéria	2017
CEARÁ-J-507-BR	Santa Quitéria	2017
CEARÁ-J-508-AZ	Santa Quitéria	2017
CEARÁ-J-509-BR	Santa Quitéria	2017
CEARÁ-J-510-14-AZ	Santa Quitéria	2017
CEARÁ-J-511-BR	Santa Quitéria	2017
CEARÁ-J-514-AZ	Santa Quitéria	2017
CEARÁ-J-514-46	Santa Quitéria	2017
CEARÁ-J-514-43	Santa Quitéria	2017
CEARÁ-J-515-AZ	Santa Quitéria	2017
CEARÁ-J-517-BR	Santa Quitéria	2017
CEARÁ-J-518-20-AZ	Santa Quitéria	2017
CEARÁ-J-520-AZ	Santa Quitéria	2017
CEARÁ-J-529-AZ	Santa Quitéria	2017
CEARÁ-J-531-50-AZ	Santa Quitéria	2017
CEARÁ-J-532-AZ	Santa Quitéria	2017
CEARÁ-J-537-16-AZ	Santa Quitéria	2017
CEARÁ-J-537-71-AZ	Santa Quitéria	2017
CEARÁ-J-538-BR	Santa Quitéria	2017
CEARÁ-J-542-AZ	Santa Quitéria	2017
CEARÁ-J-547	Santa Quitéria	2017
CEARÁ-J-549	Santa Quitéria	2017
CEARÁ-J-554-AZ	Santa Quitéria	2017
CEARÁ-J-556-AZ	Santa Quitéria	2017
CEARÁ-J-571-VD	Santa Quitéria	2017
CEARÁ-J-573-22-BR	Santa Quitéria	2017

TABELA 3: Identificação das 160 amostras de PBMC e soro de jumentos (*Equus asinus*) do Ceará/Brasil – local e data de coleta

Identificação amostras	Local de coleta	Data de coleta
CEARÁ-J-574-BR	Santa Quitéria	2017
CEARÁ-J-576-BR	Santa Quitéria	2017
CEARÁ-J-580-BR	Santa Quitéria	2017
CEARÁ-J-581-63-AZ	Santa Quitéria	2017
CEARÁ-J-583-BR	Santa Quitéria	2017
CEARÁ-J-583-AZ	Santa Quitéria	2017
CEARÁ-J-584-AZ	Santa Quitéria	2017
CEARÁ-J-585	Santa Quitéria	2017
CEARÁ-J-585-18-BR	Santa Quitéria	2017
CEARÁ-J-588-AZ	Santa Quitéria	2017
CEARÁ-J-596-VD	Santa Quitéria	2017
CEARÁ-J-600-133-AM	Santa Quitéria	2017
CEARÁ-J-622-AM	Santa Quitéria	2017
CEARÁ-J-624-AM	Santa Quitéria	2017
CEARÁ-J-719-AM	Santa Quitéria	2017
CEARÁ-J-723	Santa Quitéria	2017
CEARÁ-J-738	Santa Quitéria	2017
CEARÁ-J-765-54-AM	Santa Quitéria	2017
CEARÁ-J-768-78-AM	Santa Quitéria	2017
CEARÁ-J-821-49	Santa Quitéria	2017
CEARÁ-J-269-26	Santa Quitéria	2017

TABELA 4: Identificação das três amostras de PBMC e soro de mula (*Equus asinus* x *Equus caballus*) do Ceará/Brasil – local e data de coleta

Identificação amostras	Local de coleta	Data de coleta
CEARA-M-01	Jaibaras/Sobral	2016
CEARA-M-138-5	Santa Quitéria	2017
CEARA-M-298-6	Santa Quitéria	2017

TABELA 5: Identificação das 14 amostras de órgãos de um cavalo (*Equus caballus*) e três jumentos (*Equus asinus*) do Ceará/Brasil – local e data de coleta

Identificação amostra órgão	Referente a amostra de		Data de coleta
	PBMC e soro	Local de coleta	
CEARÁ-C-07-Fígado	CEARÁ-C-07	Groaíras	2017
CEARÁ-C-07-Pulmão	CEARÁ-C-07	Groaíras	2017
CEARÁ-C-07-Útero	CEARÁ-C-07	Groaíras	2017
CEARÁ-C-07-Ovário	CEARÁ-C-07	Groaíras	2017
CEARÁ-C-07-Rim	CEARÁ-C-07	Groaíras	2017

TABELA 5: Identificação das 14 amostras de órgãos de um cavalo (*Equus caballus*) e três jumentos (*Equus asinus*) do Ceará/Brasil – local e data de coleta

Identificação amostra órgão	Referente a amostra de PBMC e soro	Local de coleta	Data de coleta
CEARÁ-C-07-Baço	CEARÁ-C-07	Groaíras	2017
CEARÁ-J-18-Baço	CEARÁ-J-18	Santa Quitéria	2017
CEARÁ-J-18-Fígado	CEARÁ-J-18	Santa Quitéria	2017
CEARÁ-J-18-Pulmão	CEARÁ-J-18	Santa Quitéria	2017
CEARÁ-J-18-Linfonodo	CEARÁ-J-18	Santa Quitéria	2017
CEARÁ-J-08-Pulmão	CEARÁ-J-08	Santa Quitéria	2016
CEARÁ-J-08-Cérebro	CEARÁ-J-08	Santa Quitéria	2016
CEARÁ-J-09-Baço	CEARÁ-J-09	Santa Quitéria	2016
CEARÁ-J-09-Pulmão	CEARÁ-J-09	Santa Quitéria	2016

4.3. Obtenção de soro e PBMC

As amostras coletadas sem anticoagulante foram centrifugadas a 3.000 g por 10 minutos. Após a centrifugação, o sobrenadante correspondente ao soro foi coletado e transferido para um microtubo, e armazenado a -20°C até análise.

Para obtenção de PBMC, as amostras de sangue total coletadas com EDTA primeiro foram centrifugadas a 250 g por 10 minutos. Após a centrifugação foi coletada a fase intermediária, correspondente à papa de leucócitos, a qual foi diluída em igual volume de PBS 1X (Tampão fosfato-salino). A mistura foi depositada, cuidadosamente, em um tubo cônico, contendo volume igual de Ficoll-Paque PLUS (GE Healthcare), e centrifugada a 500 g por 30 minutos. Após a centrifugação, foi coletado o anel de PBMCs, fase intermediária entre o ficoll e o plasma sanguíneo, e transferido para um tubo cônico, contendo volume igual de PBS 1X. A mistura foi centrifugada a 400 g por 10 minutos. Após a centrifugação, o sobrenadante foi descartado e o sedimento de células obtido foi ressuscitado em 3 mL de PBS 1X. Em seguida, a mistura foi centrifugada novamente a 400 g por 10 minutos. Ao final o sedimento obtido foi ressuscitado em 1 mL de PBS 1X. E armazenado a -20°C até extração de ácido nucleico. Para as amostras do Pantanal, não foi feita a separação de PBMCs com ficoll, foi feita a extração de DNA proviral diretamente da papa de leucócitos.

4.4. Testes sorológicos

A partir das amostras de soro foram feitos os testes sorológicos IDGA (Bruch, Brasil), ELISA para a proteína p26 (Viriontech do Brasil, Brasil) (dados não publicados), e ELISA para a proteína gp90 (Biostream do Brasil, Brasil), de acordo com as instruções do fabricante. Para as amostras do Pantanal o teste IDGA foi realizado no Laboratório do Pantanal (Embrapa Pantanal, Corumbá/MS). Para as amostras do Ceará, o teste IDGA foi realizado no Núcleo de Bioprospecção e Experimentação Molecular Aplicada (NUBEM) do Centro Universitário INTA (UNINTA), com autorização prévia do MAPA. Os dois testes ELISA gp90 e p26 foram realizados na empresa Viriontech do Brasil Indústria de Insumos e Serviços em Biotecnologia (Belo Horizonte/MG, Brasil).

4.5. Extração de ácido nucleico

Para as amostras do Pantanal, o DNA proviral foi extraído no Laboratório do Pantanal (Embrapa Pantanal, Corumbá/MS) e enviado para o Laboratório de Vírus/Departamento de Microbiologia/ICB/UFMG. Para extração do DNA proviral a partir da papa de leucócitos foi utilizado o kit NucleoSpin® Blood (MACHEREY-NAGEL) de acordo com instruções do fabricante.

Para extração de DNA proviral a partir de PBMC e órgãos das amostras do Ceará foi utilizado o kit *Wizard Genomic DNA Purification Kit* – A1125 (Promega-USA), de acordo com as instruções do fabricante.

4.5.1. Extração de DNA proviral a partir de PBMC

Para extração de DNA proviral a partir de PBMC foi utilizado o kit *Wizard Genomic DNA Purification Kit* – A1125 (Promega-USA). A partir de uma alíquota de PBMCs foram adicionados 600 µL de *nucleic lysis solution*, a solução foi pipetada para lisar as células até não permanecer nenhum grumo de células visível. Em seguida foram adicionados 3 µL de *RNase solution*, e a solução foi homogeneizada por inversão do

tubo de 2 a 5 vezes. Em seguida incubada por 15 a 30 minutos a 37°C, e depois mantida à temperatura ambiente por 5 minutos. Foram adicionados 200 µL de *protein precipitation solution*, a solução foi homogeneizada em vortex por 20 segundos, e depois incubada no gelo por 5 minutos e centrifugada a 13.000-16.000 g por 4 minutos. O sobrenadante contendo o DNA foi removido cuidadosamente, e transferido para um microtubo de 1,5 mL, contendo 600 µL de isopropanol. A solução foi homogeneizada por inversão do tubo e centrifugada a 13.000-16.000 g por 1 minuto. O isopropanol foi removido cuidadosamente e foram adicionados 600 µL de etanol 70% à temperatura ambiente, o tubo foi homogeneizado por inversão e a amostra foi centrifugada a 13.000-16.000 g por 1 minuto. Após a centrifugação o etanol foi descartado cuidadosamente e o tubo foi invertido e colocado para secar por 10 a 15 minutos à temperatura ambiente. Após o etanol ter evaporado completamente foram adicionados 50 µL de *DNA rehydration solution* e incubado a 65°C por 1 hora e armazenado a -20 °C.

4.5.2. Extração de DNA proviral a partir de órgão

Para extração de DNA proviral a partir de uma amostra de órgão foi utilizado o kit *Wizard Genomic DNA Purification Kit – A1125* (Promega-USA). Primeiro em uma placa de Petri com o auxílio de uma lâmina de bisturi, foi cortado um pequeno fragmento do órgão (20 mg – recomendado pelo kit). O fragmento foi transferido, com o auxílio de uma ponteira, para um tubo tipo *screw cap*, ao qual foram adicionadas 5 *glass beads* de 2 mm (Sigma Aldrich-Germany) e 600 µL de *nucleic lysis solution*, para ajudar na maceração do órgão. A amostra contendo a solução e as beads foram homogeneizadas em *BeadBeater* (BIOSPEC). Após a completa maceração do órgão, o lisado foi incubado a 65°C por 30 minutos. Após o período de incubação, o sobrenadante foi transferido para um novo microtubo de 1,5 mL, ao qual foram adicionados 3 µL de *RNase solution*. A solução foi incubada a 37°C por 30 minutos, em seguida mantida à temperatura ambiente por 5 minutos. Foram adicionados 200 µL de *protein precipitation solution*, e a solução homogeneizada em vortex por 20 segundos, e depois incubada no gelo por 5 minutos e centrifugada a 13.000-16.000 g por 4 minutos. O sobrenadante contendo o DNA foi removido

cuidadosamente, e transferido para um microtubo de 1,5 mL, contendo 600 µL de isopropanol. A solução foi homogeneizada por inversão do tubo e centrifugada a 13.000-16.000 g por 1 minuto. O isopropanol foi removido cuidadosamente e foram adicionados 600 µL de etanol 70% à temperatura ambiente, o tubo foi homogeneizado por inversão, e a amostra foi centrifugada a 13.000-16.000 g por 1 minuto. Após a centrifugação o etanol foi descartado cuidadosamente e o tubo foi invertido e colocado para secar por 10 a 15 minutos a temperatura ambiente. Após o etanol ter evaporado completamente foram adicionados 50 µL de *DNA rehydration solution* e incubado a 65°C por 1 hora e armazenado a -20°C.

4.6. Reações em cadeia da polimerase (PCRs) para amplificação de diferentes regiões do genoma do EIAV

Foram desenvolvidas PCRs para amplificação de diferentes regiões do genoma do EIAV. Para cada PCR desenvolvida foi utilizado o kit *GoTaq® Hot Start Colorless Master Mix* (Promega) e as concentrações dos reagentes foram utilizadas de acordo com o recomendado pelo fabricante. Para uma reação foram utilizadas as seguintes condições: 1X de *GoTaq® Hot Start Colorless Master Mix* (tampão 10X contendo a enzima), 0,5 µM de cada iniciador senso e anti-senso, água livre de nucleases para completar o volume final da reação, 10% de DNA molde do volume total da reação. O controle de reação foi feito utilizando os mesmos reagentes (exceto DNA molde), nas mesmas concentrações. Como controle positivo em todas as PCRs com combinações diferentes de iniciadores foi utilizada uma amostra do Pantanal, sabidamente positiva em testes sorológicos (IDGA, ELISA gp90 e ELISA p26), e sequenciada inicialmente para a região 5' LTR ao exon 1 do gene *tat* (sequência de 143 nucleotídeos obtida na snPCR LTR-tat) e confirmada como EIAV. Esta amostra está identificada como POCONE-BR.

As condições cíclicas das reações, como temperatura de desnaturação, pareamento e extensão, foram adaptadas para cada PCR desenvolvida, considerando-se o tamanho do fragmento alvo a ser amplificado, e a composição de bases do iniciador. Para cada PCR, utilizando combinações diferentes de iniciadores que foram

desenhados, foi feito um gradiente de temperatura para testar os iniciadores. Inicialmente as reações foram feitas com a amostra POCONE-BR, por ser uma amostra positiva em testes sorológicos e que mostrou produzir um rendimento adequado de material amplificado na PCR para diferentes regiões do genoma do EIAV. Foi empregado outra amostra, negativa em testes sorológicos, e o controle de reação, o qual contém todos os reagentes da PCR e água no lugar da amostra. A amostra POCONE-BR e a outra amostra foram testadas nas diferentes temperaturas para a combinação de iniciadores testados, e o controle de reação foi testado na temperatura mais baixa do gradiente de temperatura.

4.6.1. Seleção dos iniciadores

Os iniciadores para as diferentes PCRs foram desenhados a partir de diferentes regiões do genoma do EIAV, baseados em sequências de genoma completo do EIAV disponíveis no GenBank. Essas sequências foram alinhadas pelo Clustaw W no programa MEGA versão 6 (TAMURA et al., 2013), e a partir do alinhamento foram identificadas regiões conservadas manualmente, que foram usadas para selecionar as sequências dos iniciadores. Os iniciadores foram desenhados com o auxílio do programa OligoAnalyzer 3.1 (Integrated DNA Technologies) [<https://www.idtdna.com/calc/analyzer>] e foram analisados parâmetros, como temperatura de pareamento, formação de dímeros e conteúdo de G/C. Após, a definição da sequência do iniciador, este foi analisado quanto à similaridade com sequências depositadas no National Center for Biotechnology Information (NCBI), através da ferramenta nucleotideBLAST (nBLAST) do programa Basic Local Alignment Search Tool (BLAST) (ALTSCHUL et al., 1990). Os iniciadores desenhados para amplificação de DNA de diferentes regiões do genoma do EIAV estão apresentados na Tabela 6, com as localizações no genoma em relação à sequência de genoma completo Miyazaki (JX003263.1), e a sequência 5'-3' de cada iniciador (para facilitar o trabalho com os iniciadores, os iniciadores senso foram identificados por números e o anti-senso por letras).

***TABELA 6: Sequência e Tm dos iniciadores para amplificação do EIAV**

INICIADORES SENSO	Tm	SEQUENCIA 5'-3'
1) EIAV- LTR-28-F	52.9°C	5'-GAAAGTTGCTGATGCTCTCA-3'
2) EIAV-LTR-120-F	58.8°C	5'-AGTTCCGCTTTTGTGACGCG-3'
3) EIAV-LTR-130-F	54.5°C	5'-TTGTGACGCGTTAAGTTCCT-3'
4) EIAV-LTR-211-F4	58.8°C	5'-GTCCCTTCTCTGCTGGGCTA-3'
5) EIAV-TAT-380-F	53.6°C	5'- GGACAGCAGAGGAGAACTTA -3'
6) EIAV-TAT-405-F	55°C	5'-GTCTTCTGGAGGTGTTCTG-3'
12) 636F-ext-gag (OAKS <i>et al.</i> , 1998)	51.3°C	5'-CCATTGCTGGAAGATGTAAC-3'
13) 854F-int-gag (OAKS <i>et al.</i> , 1998)	48.6°C	5'-GGCTGGAAACAGAAATTTTA-3'
7) EIAV-GAG-672-F	53.8°C	5'-TTTGAAGAACATGGTGGGC-3'
15) EIAV-GAG-1641-F (24 nt)	55°C	5'-GCACCTAAAGTGTGTTTAAAGTGC-3'
9) EIAV-POL-1709-F	58.2°C	5'-AAACGGGAAACAAGGGGCTC-3'
10) EIAV-POL-1883-F	54.7°C	5'-TGGACAGTTTGTGGGAGTAAC-3'
16) EIAV-POL-2267-F (21 nt)	54.9°C	5'-GGGCCAAAAATTCCTCAATGG-3'
11) EIAV-POL-4325-F	51.7°C	5'-TGGCATAATCACCAAAGAT-3'
17) EIAV-POL-4841-F	55.1°C	5'-AGGGAAAGTATGGGAGGACA-3'
18) EIAV-ENV-6674-F (23 nt)	57.8°C	5'-GCTGCTACTGCTATTGCTGCTAG-3'

(a)

***(a)** Iniciadores senso, **(b)** Iniciadores anti-senso. A posição no genoma de todos os iniciadores está de acordo com a sequência Miyazaki (JX003263.1). Todos os iniciadores tem 20 nucleotídeos, exceto os que estão indicando o número de nucleotídeos entre parênteses. Os iniciadores descritos na literatura estão indicados com as referências. ** TM – *melting temperature*

TABELA 6: Sequência e Tm dos iniciadores para amplificação do EIAV*

INICIADORES ANTI-SENSO	Tm	SEQUENCIA 5'-3'
A) EIAV-TAT-380-R2 (DONG <i>et al.</i> , 2012)	53.6°C	5'-TAAGTTCTCCTCTGCTGTCC-3'
B) EIAV-TAT-405-R1 (DONG <i>et al.</i> , 2012)	55°C	5'-CAGGAACACCTCCAGAAGAC-3'
C) EIAV-GAG-672-R	53.8°C	5'-GCCACCATGTTCTTTCAAA-3'
D) EIAV-GAG-969-R	49.6°C	5'-AATGCATTCATTTCTCAGA-3'
E) EIAV-GAG-1170-R	52.9°C	5'-TCAAAAGCAGGTTCCATCTG-3'
I) 1399R-ext-gag (OAKS <i>et al.</i> , 1998)	52.3°C	5'-TGCGTTCTGAATAGTCAGTG-3'
J) 1262R-int-gag (OAKS <i>et al.</i> , 1988)	48.7°C	5'-TAGGTTTTCCAATCATCACT-3'
F) EIAV-POL-2648-R	54°C	5'-TGGAATTGTTTCCACAAGG-3'
L) EIAV-POL-2267-R (21 nt)	54.9°C	5'-CCATTGAGGAATTTTGGCCC-3'
G) EIAV-POL-4817-R (24 nt)	53.8°C	5'-GCTCTCATTACTTGTAAACAAAGGG-3'
H) EIAV-POL-4841-R	55.1°C	5'-AGGGAAAGTATGGGAGGACA-3'
M) EIAV-S2-5275-R	56.2°C	5'-ATGCTGACCATGTTACCCCT-3'
O) EIAV-ENV-7145-R (24 nt)	58.2°C	5'-GGAAGCTCCTAATCCAGGAATCCA-3'

(b)

*(a) Iniciadores senso, (b) Iniciadores anti-senso. A posição no genoma de todos os iniciadores está de acordo com a sequência Miyazaki (JX003263.1). Todos os iniciadores tem 20 nucleotídeos, exceto os que estão indicando o número de nucleotídeos entre parênteses. Os iniciadores descritos na literatura estão indicados com as referências. ** TM – *melting temperature*

4.7. Eletroforese em gel de poliacrilamida

Os produtos da PCR foram submetidos à eletroforese em gel de poliacrilamida (PAGE) de 0,75 mm utilizando-se 5 µL. O gel de poliacrilamida 8% é constituído dos seguintes reagentes: 1,4 mL de tampão Tris/Borato/EDTA (TBE) 5X [Tris 0,0445 M, ácido bórico 0,0445 M, ácido etilenodiamino tetra-acético (EDTA) 0,001 M pH 8.0], 1,86 mL de Bis/Acrilamida 29:1, 7 µL de Tetrametiletilendiamina (TEMED) 0,1%, 100 µL de persulfato de amônio (APS) 10%, e 3,74 mL de água. Para inferência do tamanho dos fragmentos amplificados na PCR foi aplicado no gel um marcador de tamanho molecular de 100 pares de bases (Ludwig Biotec, Brazil). As amostras foram submetidas ao fracionamento eletroforético a 100 V utilizando tampão TBE 1X [Tris 0,089 M, ácido bórico 0,089 M, 0,002 M EDTA pH 8.0]. O gel foi corado com

solução de nitrato de prata de acordo com o seguinte protocolo: primeiro o gel foi colocado na solução fixadora 1 (40% metanol, 10% ácido acético, 50% água) por 30 minutos, em seguida colocado na solução fixadora 2 (10% etanol, 5% ácido acético, 85% de água) duas vezes por 15 minutos. Em seguida foi adicionada a solução oxidante 1X (dicromato de potássio 0,0034 M, ácido nítrico 0,0032 M, água) por 5 minutos, depois o gel foi lavado duas vezes por 5 minutos com água deionizada. O gel foi corado com solução de nitrato de prata (0,011 M) por 20 minutos, em seguida lavado três vezes rapidamente com água deionizada. Ao final foi adicionada solução reveladora (carbonato de sódio 0,28 M, paraformaldeído 0,016 M, água). Para interromper a revelação foi adicionada a solução fixadora 1 + 2. O gel foi colocado na solução secadora (etanol 50%, glicerol 5%, ácido acético 5%, água 40%) por aproximadamente 5 minutos, colocado entre duas folhas de papel celofane e mantido a temperatura ambiente para secar completamente.

4.8. Caracterização molecular

4.8.1. Purificação do produto de PCR

O DNA amplificado na PCR de amostras positivas foi purificado para o sequenciamento. Para a purificação o produto da PCR foi fracionado em PAGE 8% de 1.5 mm, o gel foi corado com *SYBR® Gold Nucleic Acid Gel Stain* (Invitrogen-UK), o fragmento de tamanho esperado foi cortado do gel, com uma lâmina de bisturi, e transferido para um microtubo de 0,6 mL com uma abertura no fundo e encaixado em um microtubo de 1,5 mL. O tubo foi centrifugado a 13.000 g por 1 minuto. Em seguida foi adicionada uma solução de NaCl 0,3 M (cloreto de sódio) ao gel triturado, e a solução foi colocada em termoblock a 4°C sob agitação, *overnight*, para eluição do DNA do gel. Após o período de incubação, a solução contendo o gel foi transferida para uma adaptação de coluna (uma ponteira com filtro cortada e encaixada em um microtubo de 1,5 mL). A solução foi centrifugada a 13.000 g por 1 minuto. Após a centrifugação, o filtro foi descartado, e foram adicionados 800 µL de etanol 70% (MERCK-Germany) com glicogênio (Thermo Fisher Scientific-EUA) a 5 ng/µL. A solução foi incubada por 1 hora a -70 °C. Após o período de incubação, a

solução foi centrifugada a 13.000 g, por 30 minutos, a 4 °C. Após a centrifugação, o sobrenadante foi cuidadosamente descartado, e o sedimento de DNA foi colocado para secar à temperatura ambiente até não ser observado nenhum líquido residual no microtubo. Após a secagem, o sedimento foi ressuspenso em 10 µL de água de injeção e armazenado a -20 °C até o preparo da reação de sequenciamento.

Para a purificação das amostras também foi utilizado o protocolo acima modificado. O produto da PCR foi fracionado em PAGE 8% de 1.5 mm, o gel foi corado com *SYBR® Gold Nucleic Acid Gel Stain* (Invitrogen-UK), o fragmento de tamanho esperado foi cortado do gel, com uma lâmina de bisturi, e transferido para um microtubo de 0,6 mL com uma abertura no fundo e encaixado em um microtubo de 1,5 mL. Foram adicionados de 50 a 100 µL de água de injeção a cada amostra, dependendo da intensidade do fragmento de DNA em PAGE. O tubo foi centrifugado a 13.000 g por 1 minuto. A amostra foi incubada *overnight* a 4 °C, para eluição do DNA do gel. Após o período de incubação a amostra foi homogeneizada com *vortex*, centrifugada a 13.000 g por 1 minuto e o sobrenadante coletado para a reação de sequenciamento.

4.8.2. Sequenciamento de Sanger

O sequenciamento foi feito de acordo com o método de dideoxi descrito por SANGER *et al.*, (1977), em sequenciador automático capilar “ABI 3130 DNA Analyzer” (Applied Biosystems), usando o kit “*BigDye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing* (Applied Biosystems), de acordo com as condições de reação e leitura indicadas pelo fabricante. Para cada amostra foram feitas duas reações de sequenciamento, uma para o iniciador senso e outra para o anti-senso. Para cada reação foi utilizada uma quantidade adequada de DNA purificado de acordo com o tamanho do fragmento amplificado na PCR, o iniciador na concentração final de 5 µM, e água de injeção para um volume final de 8 µL.

4.8.3. Análise do sequenciamento

Após o sequenciamento, as sequências nucleotídicas obtidas foram analisadas e foi obtida a sequência consenso final no programa SeqTrace 0.9.0 (STUCKY, 2012). Ao final, a sequência obtida foi comparada com sequências depositadas no National Center for Biotechnology Information (NCBI) [<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>], através da ferramenta nucleotideBLAST (nBLAST) do programa Basic Local Alignment Search Tool (BLAST) (ALTSCHUL *et al.*, 1990) [<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>]. A estimativa da similaridade nucleotídica entre as sequências foi feita pelo cálculo da estimativa da divergência nucleotídica entre as sequências no programa MEGA versão 6 (TAMURA *et al.*, 2013) e MEGA versão X (KUMAR *et al.*, 2018). Para cada grupo de amostras e região do genoma analisados, os parâmetros utilizados foram definidos de acordo com os mesmos parâmetros utilizados para a análise filogenética.

4.9. Análise filogenética

Para cada região do genoma amplificada nas diferentes PCRs foi feita análise filogenética. As sequências de nucleotídeos obtidas foram alinhadas pelo Clustal W, no programa Mega versão 6.0 (TAMURA *et al.*, 2013), com as sequências de genoma completo e parciais do EIAV, disponíveis no GenBank. Para cada grupo de sequências e região do genoma analisada foram feitas análises para determinar o modelo evolutivo mais adequado, análise do sinal filogenético e taxa de saturação das sequências. Para análise do modelo evolutivo mais adequado foi utilizado o programa jModel test (DARRIBA *et al.*, 2012). Para análise do sinal filogenético foi utilizado o program Tree Puzzle 5.3. (SCHIMIDT *et al.*, 2004). Para análise da taxa de saturação das sequências foi utilizado o programda DUMBE 7.0.28 (XIA, 2017). As análises filogenéticas para cada grupo de sequências foram feitas no MEGA versão 6.0 e MEGA versão X (KUMAR *et al.*, 2018).

5. RESULTADOS

5.1. Amplificação de DNA proviral do EIAV: estabelecimento de condições de PCR

Para fazer o estudo do EIAV foi necessário desenvolver novas PCRs ou testar reações desenvolvidas por outros grupos. Para iniciar os estudos foram utilizados os iniciadores descritos por DONG *et al.*, (2012) e foram projetados iniciadores em diversas outras regiões do genoma viral. A figura 26 mostra os locais no genoma do EIAV em que foram desenhados os iniciadores. Sendo que quatro iniciadores são descritos na literatura [A] TAT-380-R2, [B] TAT-405-R1 (DONG *et al.*, 2012), [12] GAG-636-F, [13] GAG-854-F, [I] GAG-1399-R, [J] GAG-1262-R (OAKS *et al.*, 1998). A tabela 7 mostra as combinações de iniciadores que funcionaram, ou seja, onde houve a amplificação do DNA proviral do EIAV, e na qual esta amplificação foi confirmada por sequenciamento. A figura 27 mostra a identificação da sequência dos iniciadores para amplificação da região 5' LTR, exon 1 do gene *tat* e gene *gag* no alinhamento das sequências nucleotídicas de genoma completo do EIAV.

Outras combinações de iniciadores também foram testadas: 1.A., 1.D., 2.B., 2.C., 3.C., 3.D., 3.E., 4.C., 5.D., 5.E., 7.D., 7.E., 12.I., 13.J., 15.L., 9.F., 10.F., 16.F. (Figura 26), e que não apresentaram amplificação do tamanho esperado na PCR, após visualização em PAGE. Em algumas combinações de iniciadores houve amplificação de DNA do tamanho esperado em PAGE, no entanto, após sequenciamento, a sequência obtida com qualidade adequada não confirmou corresponder ao genoma do EIAV.

TABELA 7: Iniciadores para amplificação do DNA proviral do EIAV*

INICIADOR/TM**	CONDIÇÕES PCR	DNA) (bp)
[1] LTR-28-F (52.9°C) [B] TAT-405-R1* (53.8°C)	95°C, 2'; 40 ciclos: 94°C 30''; 56°C 30'', 72°C 30''; 72°C 10' (gradiente 56, 54, 52°C)	397
[1] LTR-28-F (52.9°C) [C] GAG-672-R (53.8°C)	95°C, 2'; 40 ciclos: 94°C 30''; 56°C 30'', 72°C 30''; 72°C 10' (gradiente 56, 54, 52°C)	664
[4] LTR-211-F4 (58.8°C) [B] TAT-405-R1* (53.8°C)	95°C, 2'; 40 ciclos: 94°C 30''; 58°C 30'', 72°C 30''; 72°C 3' (gradiente 60, 58, 56, 54, 52°C)	210
[4] LTR-211-F4 (58.8°C) [A] TAT-380-R2* (53.6°C)	95°C, 2'; 35 ciclos: 94°C 30''; 60°C 30'', 72°C 30''; 72°C 5' (gradiente 60, 58, 56, 54, 52°C)	185
[5] TAT-380-F (53.6°C) [C] GAG-672-R (53.8°C)	95°C, 2'; 40 ciclos: 94°C 30''; 52°C 30'', 72°C 30''; 72°C 3' (gradiente 56, 54, 52, 50°C)	312
[6] TAT-405-F (55°C) [C] GAG-672-R (53.8°C)	95°C, 2'; 40 ciclos: 94°C 30''; 52°C 30'', 72°C 30''; 72°C 10' (gradiente 56, 54, 52, 50°C)	287
[11] POL-4325-F (51.7°C) [G] POL-4817-R (53.8°C)	95°C, 2'; 40 ciclos: 94°C 30''; _ °C 30'', 72°C 30''; 72°C 10' (gradiente 56, 54, 52°C)	512
[11] POL-4325-F (51.7°C) [H] POL-4841-R (55.1°C)	95°C, 2'; 40 ciclos: 94°C 30''; _ °C 30'', 72°C 30''; 72°C 10' (gradiente 56, 54, 52°C)	536
[17] POL-4841-F (55.1°C) [M] S2-5275-R (56.2°C)	95°C, 2'; 40 ciclos: 94°C 30''; _ °C 30'', 72°C 30''; 72°C 10' (gradiente 58, 56, 54, 52°C)	454
[18] ENV-6674-F (57.8°C) [O] ENV-7145-R (58.2°C)	95°C, 2'; 40 ciclos: 94°C 30''; _ °C 30'', 72°C 30''; 72°C 10' (gradiente 60, 58, 56°C)	495

*A posição no genoma de todos os iniciadores está de acordo com a sequência Miyazaki (JX003263.1). ** TM – *melting temperature* *** Os iniciadores descritos na literatura estão destacados por*.

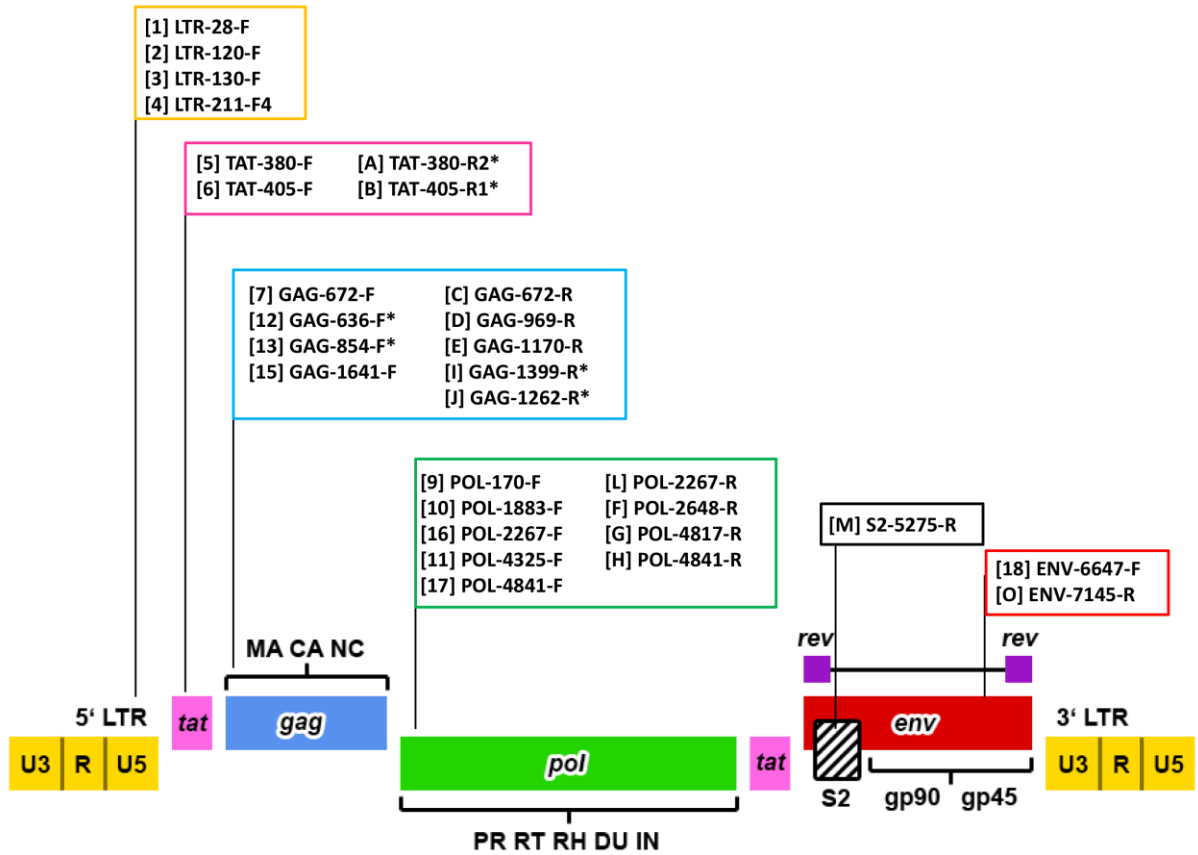


FIGURA 26: Representação dos iniciadores empregados para amplificação do DNA proviral do EIAV e indicação no genoma do EIAV - As cores para cada conjunto de iniciadores corresponde a região do genoma em que o iniciador foi desenhado. A posição no genoma de todos os iniciadores está de acordo com a sequência Miyazaki (JX003263.1). Os iniciadores descritos na literatura estão destacados por*.

FIGURA 27: Identificação da sequência dos iniciadores para as regiões LTR, *tat* e *gag* no alinhamento das sequências nucleotídicas do EIAV – (a) Sequência dos iniciadores EIAVltr-4F, EIAVltr-1R e EAVltr-2R no alinhamento das sequências de genoma completo de EIAV, indicados pelas setas verde, azul e vermelha, respectivamente; **(b)** Sequência dos iniciadores EIAV-tat-380 e gag-672-R no alinhamento das sequências de genoma completo de EIAV, indicados por setas azul e laranja, respectivamente. O alinhamento de todos os iniciadores desenhados foi feito com 16 sequências nucleotídicas de genoma completo de EIAV, disponíveis no GenBank: H3 (JX480634.1), F4 (JX480633.1), F3 (JX480632.1), F2 (JX480631.1) – Irlanda; Liaoning (AF327877.1), Vaccine (AF327878), DV117 (HM141912.1) DLV18-8 (HM141923.1), DV35-20 (HM141911.1), FDDV-10 (GU385360.1) – China; Wyoming (AF033820.1), EIAVuk (AF016316.1), WSU5 (AF247394.1), V26 (AB008197.1), V70 (AB008196.1) – Estados Unidos; e Miyazaki 2011-A (JX003263.1) – Japão. Regiões de identidade nucleotídica estão indicadas por (.), e representadas em cinza. O alinhamento foi feito no programa MEGA, versão 6.0 (TAMURA *et al.*, 2013).

5.1.1. Amplificação de DNA proviral do EIAV por PCR empregando iniciadores de EIAV na região 5' LTR ao exon 1 do gene *tat* – snPCR LTR-*tat* – iniciadores EIAV-LTR-211-F4, EIAV-tat-405-R1 e EIAV-tat-380-R2

Para empregar a semi-nested PCR (snPCR), desenvolvida durante o meu mestrado (CURSINO *et al.*, 2018) para a amplificação da região 5' LTR ao exon 1 do gene *tat* foram utilizados os iniciadores EIAVltr-1R e EIAVltr-2R, baseados no gene *tat*, descritos por DONG *et al.*, (2012), identificados na tabela como EIAV-tat-405-R1 e EIAV-tat-380-R2, respectivamente, junto com o iniciador EIAVltr-4F, desenhado no Laboratório de Virus, baseado na região 5' LTR, identificado na tabela como EIAV-LTR-211-F4 (Tabela 7). A PCR foi feita empregando os iniciadores externos EIAVltr-4F (senso) e EIAVltr-1R (anti-senso), e houve a amplificação de DNA de um fragmento de aproximadamente 210 pb. O produto da PCR foi usado como molde para a snPCR, que foi feita empregando-se os iniciadores internos EIAVltr-4F (senso) e EIAVltr-2R (anti-senso) para a amplificação de um fragmento de aproximadamente 185 pares de bases (pb). As condições da reação foram estabelecidas de acordo com o item 4.6. As temperaturas de pareamento dos iniciadores foram determinadas por gradiente de temperatura de 60, 58, 56, 54 e 52°C. A figura 28 mostra o gradiente de temperatura da PCR e snPCR, utilizando a amostra POCONE-BR (CP) e outra amostra teste (A), indicando que houve amplificação da amostra POCONE-BR (CP) em todas as temperaturas testadas. As condições estabelecidas para a PCR foram as seguintes: uma etapa inicial de desnaturação a 95°C por 2 min, seguida por 40 ciclos de 94°C por 30 seg, temperatura de pareamento a 58°C por 30 seg, 72°C por 30 seg, e extensão final a

72°C por 3 min. A snPCR consiste de uma etapa de desnaturação inicial a 95°C por 2 min, seguida por 35 ciclos a 94°C por 30 seg, temperatura de pareamento a 60°C por 30 seg, 72°C por 30 seg, e extensão final de 72°C por 5 min. Na figura 29-a pode ser visualizado o PAGE do DNA amplificado na snPCR fracionado apresentando um fragmento de aproximadamente 185 pb, próximo ao fragmento de 200 pb do marcador de tamanho molecular, e amostras negativas por não apresentarem amplificação específica. Em (b) o resultado do teste de sensibilidade da snPCR, utilizando a amostra POCONE-BR (CP). Foi observado que o DNA foi amplificado na sn-PCR até a diluição de 1:500, o que corresponde a 3,6 ng/ μ L, conforme dosagem feita em nanodrop (Thermo Fisher Scientific). Os dados desta snPCR LTR-tat foram publicados (anexo 1).

Empregando a snPCR LTR-tat foi possível amplificar o DNA proviral do EIAV em amostras de equídeos do Pantanal e do Ceará, porém após sequenciamento algumas sequências nucleotídicas obtidas apresentaram identidade nucleotídica com sequências de equídeos após pesquisa no BLASTn. Desta forma após identificar este problema todas as amostras de equídeos no qual DNA foi amplificado só foram consideradas como positivas após o sequenciamento. Após a observação desses resultados para um grupo considerável de amostras de cavalos do Pantanal, a snPCR LTR-tat não foi mais utilizada para detecção do DNA proviral do EIAV nas amostras de equídeos do Ceará conforme descrito no item 5.3.

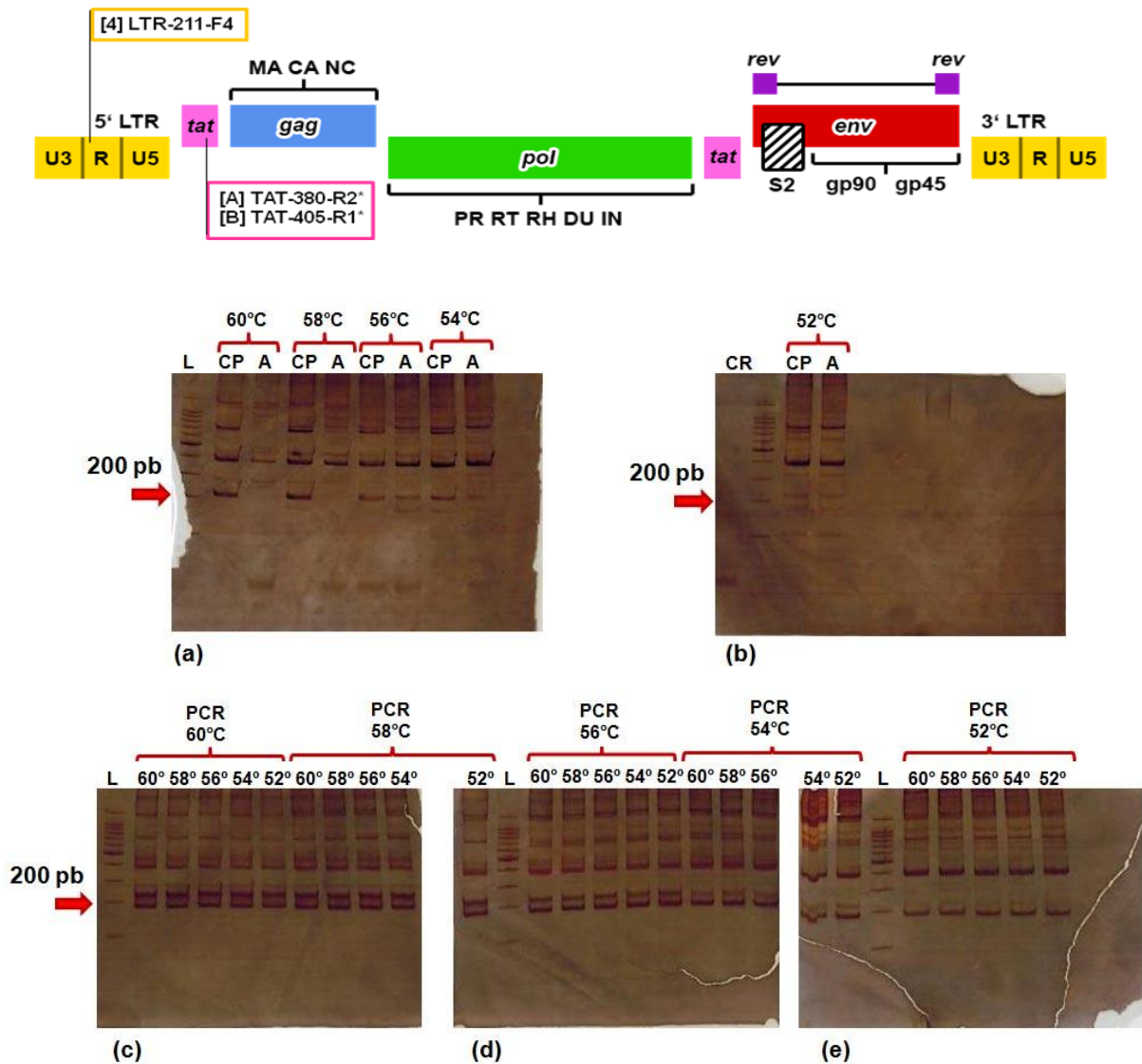


FIGURA 28: Gradiente de temperatura da snPCR LTR-tat para amplificação de DNA proviral do EIAV na região 5' LTR ao exon 1 do gene *tat* (iniciadores EIAVtr-4F, EIAVtr-1R e EIAVtr-2R) – DNA proviral foi extraído das amostras clínicas, amplificado por PCR, fracionado em PAGE e corado com nitrato de prata (a) e (b) gradiente de temperatura da PCR, em que pode ser visualizado o fragmento esperado de aproximadamente 210 pb, (c), (d), (e) gradiente de temperatura da snPCR a partir da PCR, as temperaturas da snPCR a partir de cada temperatura na PCR estão indicadas no PAGE, em que pode ser visualizado o fragmento esperado de aproximadamente 185 pb. L - padrão de tamanho molecular de 100 pb (Ludwig Biotec, Brazil), CR – controle de reação, CP – controle positivo, A – amostra teste.

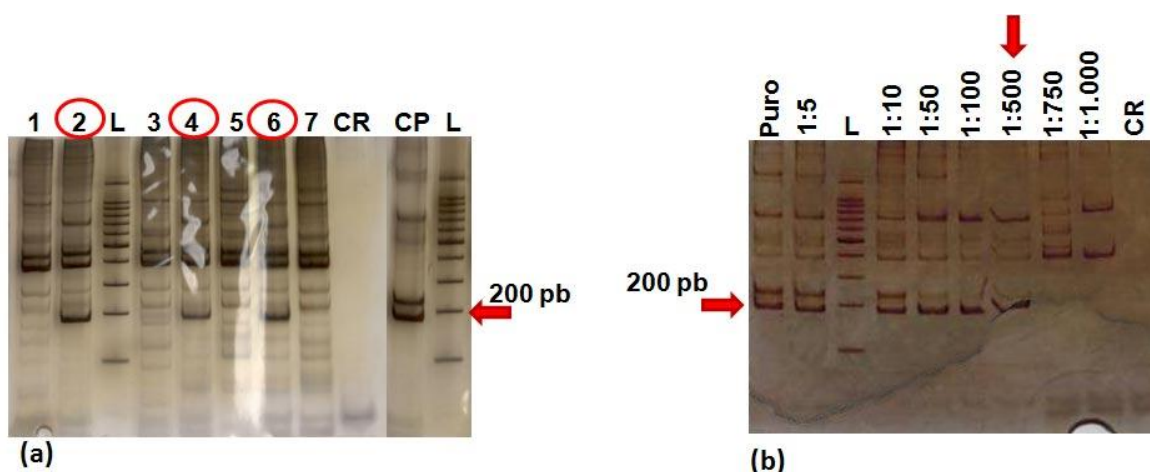


FIGURA 29: Teste de amostras e sensibilidade da snPCR LTR–tat para amplificação de DNA proviral do EIAV na região 5' LTR ao exon 1 do gene *tat* (iniciadores EIAVltr-4F e EIAVltr-2R) – DNA proviral foi extraído das amostras clínicas, amplificado por PCR, fracionado em PAGE e corado com nitrato de prata **(a)** 1, 2, 3, 4, 5 e 6 correspondem a diferentes amostras testadas para snPCR, sendo que 2, 4 e 6 são amostras positivas, ao apresentarem fragmento esperado de aproximadamente 185 pb. **(b)** para o teste de sensibilidade da snPCR o DNA extraído foi diluído até 1:1000, amplificado por PCR, fracionado em PAGE e corado com nitrato de prata. L – padrão de tamanho molecular de 100 pb (Ludwig Biotec, Brazil), CR – Controle de reação, CP – Controle positivo.

5.1.2. Amplificação de DNA proviral do EIAV empregando iniciadores de EIAV na região 5' LTR ao exon 1 do gene *tat* – iniciadores EIAV-LTR-28-F e EIAV-tat-405-1R

Para a caracterização molecular de um fragmento maior da região LTR, foi desenvolvida uma PCR para a amplificação da região 5' LTR ao exon 1 do gene *tat*, utilizando os iniciadores EIAV-LTR-28-F (senso) e EIAV-tat-405-1R (anti-senso), sendo que o iniciador EIAVltr-1R, descrito anteriormente é igual ao iniciador EIAV-tat-405-1R (Tabela 1). Na PCR foi amplificado um fragmento de DNA de aproximadamente 397 pb. As condições da reação foram estabelecidas de acordo com o item 4.6., e as temperaturas de pareamento dos iniciadores foram determinadas por gradiente de temperatura de 56, 54 e 52°C. A amostra POCONE-BR (CP) foi utilizada para estabelecer as condições da reação e apresentou amplificação de DNA do tamanho esperado de aproximadamente 396 pb (Figura 30). Para o teste de outras amostras foram selecionadas as seguintes condições: de desnaturação inicial a 95°C por 2 min, seguida por 40 ciclos de 94°C por 30 seg, 56°C por 30 seg, 72°C por 30 seg, e extensão final a 72°C por 3 min.

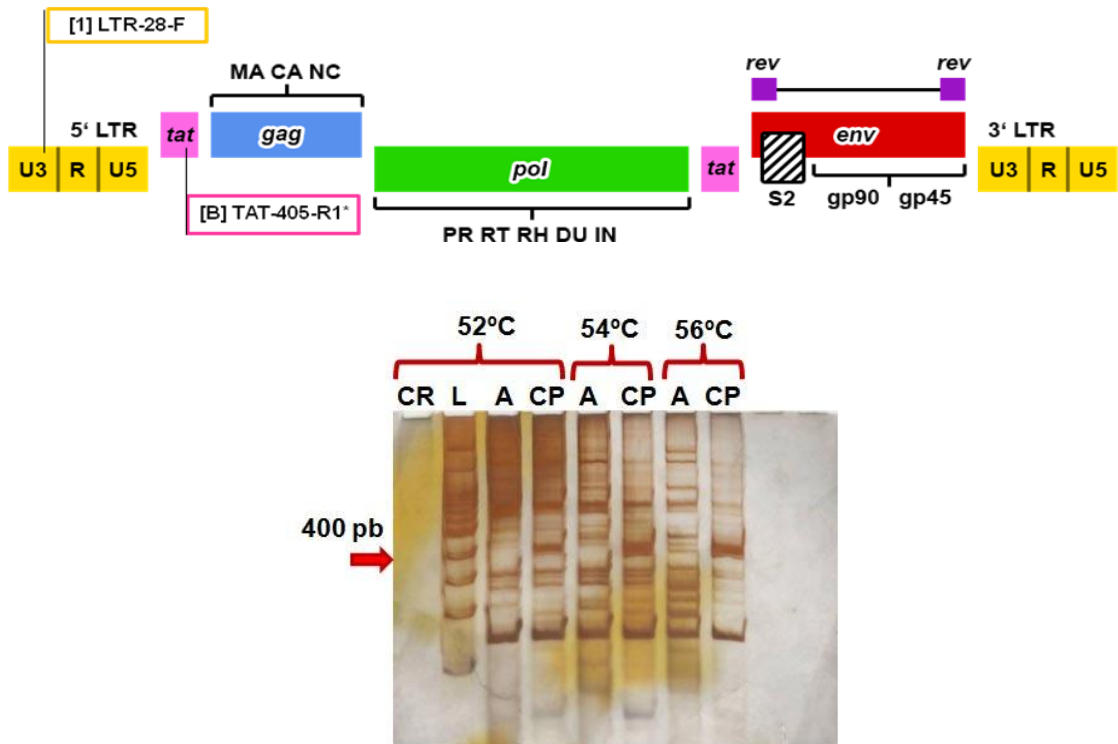


FIGURA 30: Gradiente de temperatura da PCR para amplificação de DNA proviral do EIAV na região 5' LTR ao exon 1 do gene *tat* (iniciadores EIAV-LTR-28-F e EIAV-tat-405-1R) - DNA proviral foi extraído das amostras clínicas, amplificado por PCR, fracionado em PAGE e corado com nitrato de prata. Pode ser visualizado no PAGE o fragmento esperado de aproximadamente 400 pb no controle positivo. L - padrão de tamanho molecular de 100 pb (Ludwig Biotec, Brazil), CR – controle de reação, CP – controle positivo, A – amostra teste.

5.1.3. Amplificação de DNA proviral do EIAV empregando iniciadores de EIAV na região 5'LTR ao gene *gag* – PCR LTR-*gag* – iniciadores EIAV-LTR-28-F e EIAV-*gag*-672-R

Para a caracterização molecular de um fragmento maior da região LTR e do gene *gag* foi desenvolvida uma PCR para a amplificação da região 5' LTR ao gene *gag*, utilizando os iniciadores EIAV-LTR-28-F (senso) e EIAV-*gag*-672-R (anti-senso) (Tabela 7). Na PCR foi amplificado um fragmento de DNA de aproximadamente 663 pb. As condições da reação foram estabelecidas de acordo com o item 4.6., e as temperaturas de pareamento dos iniciadores foram determinadas por gradiente de temperatura de 56, 54 e 52°C. A amostra POCONE-BR (CP) foi utilizada para estabelecer as condições da reação e apresentou amplificação do tamanho esperado de aproximadamente 664 pb (Figura 31). Para o teste de outras amostras

foram selecionadas as seguintes condições: desnaturação inicial a 95°C por 2 min, seguida por 40 ciclos de 94°C por 30 seg, temperatura de pareamento a 56°C por 30 seg, 72°C por 30 seg, e extensão final a 72°C por 3 min.

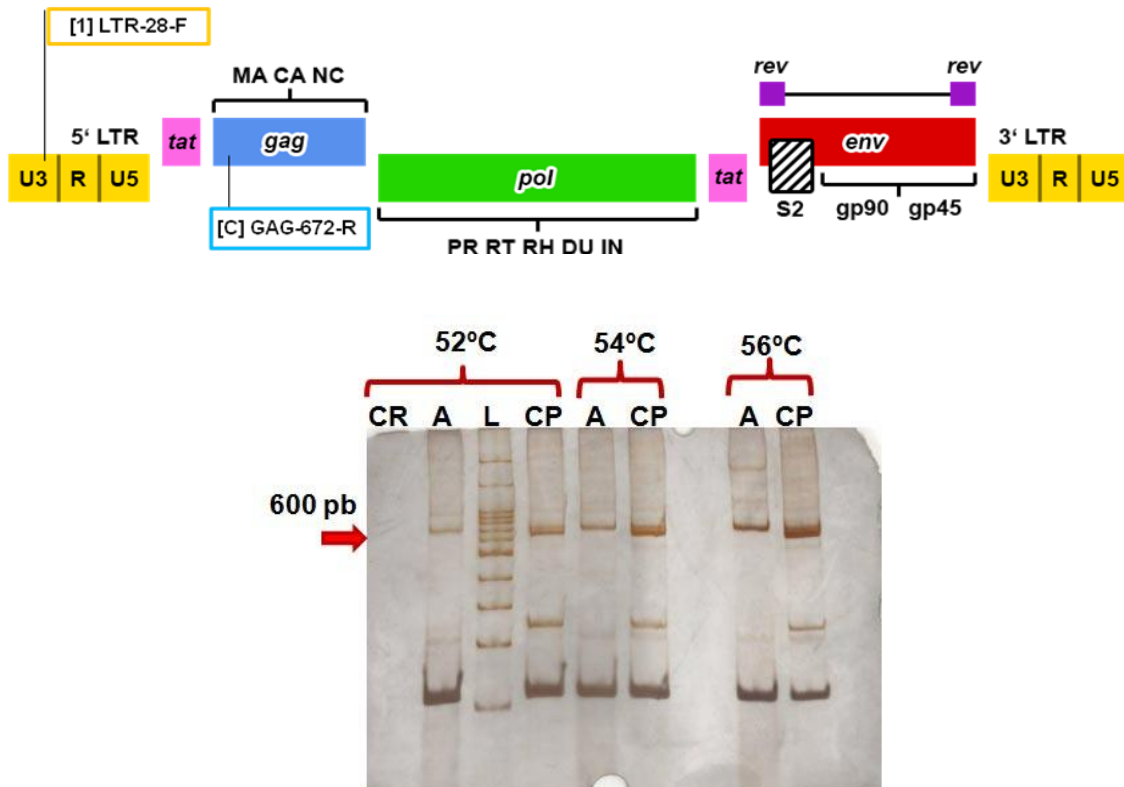


FIGURA 31: Gradiente de temperatura empregado na PCR para amplificação de DNA proviral do EIAV na região 5' LTR ao gene *gag* (iniciadores EIAV-LTR-28-F e EIAV-gag-672-R) - DNA proviral foi extraído das amostras clínicas, amplificado por PCR, fracionado em PAGE e corado com nitrato de prata. Pode ser visualizado no PAGE o fragmento esperado de aproximadamente 600 pb no controle positivo. L - padrão de tamanho molecular de 100 pb (Ludwig Biotec, Brazil), CR – controle de reação, CP – controle positivo, A – amostra teste.

5.1.4. Amplificação de DNA proviral do EIAV empregando iniciadores de EIAV na região do exon 1 do gene *tat* ao gene *gag* – PCR *tat-gag* – iniciadores EIAV-tat-380-F e EIAV-gag-672-R

Para a caracterização molecular do gene *gag* e detecção de DNA proviral do EIAV foi desenvolvida uma PCR para a amplificação do exon 1 do gene *tat* ao gene *gag*, utilizando os iniciadores EIAV-tat-380-F (senso) e EIAV-gag-672-R (anti-senso) (Tabela 7). Na PCR foi amplificado um fragmento de DNA de a 312 pb. As condições da reação foram estabelecidas de acordo com o item 4.6., e as temperaturas de

pareamento dos iniciadores foram determinadas por gradiente de temperatura de 56, 54, 52 e 50°C. Foi desenhado outro iniciador interno EIAV-tat-405-F (senso) para tentar aumentar a sensibilidade da PCR, utilizando em conjunto com o iniciador EIAV-gag-672-R (anti-senso) para uma snPCR, porém não foi observada mudança na sensibilidade da reação, uma vez que foi obtida a mesma taxa de amplificação utilizando somente os iniciadores EIAV-tat-380-F e EIAV-gag-672-R para a PCR. A figura 32-a mostra o gradiente de temperatura da PCR, utilizando a amostra POCONE-BR (CP) e outra amostra teste (A), indicando que houve amplificação da amostra POCONE-BR (CP) em todas as temperaturas testadas. A figura 32-b mostra o resultado do teste de sensibilidade da PCR para a amostra POCONE-BR. Tendo sido observado que a PCR foi capaz de detectar o DNA proviral desta amostra positiva até a diluição de 1:100, o que corresponde a 6,2 ng/μL conforme dosagem feita em nanodrop (Thermo Fisher Scientific). A figura 32-c mostra o resultado da PCR para três amostras diferentes e a amostra POCONE-BR (CP), as amostras 2 e 3 foram consideradas positivas ao apresentarem amplificação específica, uma vez que apresentaram um fragmento de aproximadamente 312 pb, próximo em relação ao fragmento de 300 pb do marcador de tamanho molecular. Foi observada amplificação específica para a amostra POCONE-BR (CP) em todas as temperaturas testadas, e o fragmento amplificado nas temperaturas de 56°C e 54°C foi sequenciado e confirmou corresponder ao genoma do EIAV. Contudo, para a triagem das amostras do Pantanal e do Ceará foi definida a temperatura de pareamento de 52°C, em que a amostra POCONE-BR (CP) também amplificou. Assim, as condições estabelecidas para a PCR tat-gag consistem de temperatura de desnaturação inicial a 95°C por 2 min, seguida por 40 ciclos de 94°C por 30 seg, temperatura de pareamento a 52°C por 30 seg, 72°C por 30 seg, e extensão final a 72°C por 3 min.

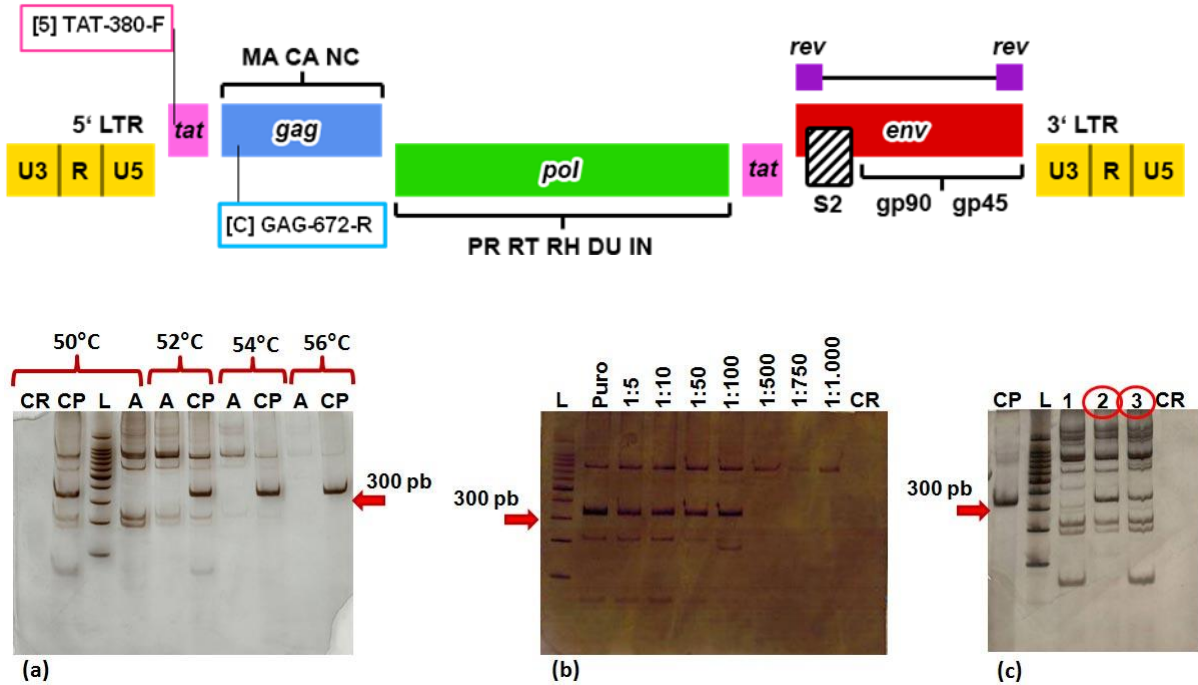


FIGURA 32: Gradiente de temperatura e sensibilidade de PCR para amplificação de DNA proviral do EIAV na região do exon 1 do gene *tat* ao gene *gag* (iniciadores EIAV-tat-380-F e EIAV-gag-672-R) – DNA proviral foi extraído das amostras clínicas, amplificado por PCR, fracionado em PAGE e corado com nitrato de prata. (a) Gradiente de temperatura da amostra POCONE-BR (CP) e uma amostra teste (A) nas temperaturas de 56, 54, 52 e 50°C. (b) Teste de sensibilidade para a amostra POCONE-BR (CP), puro – indica a amostra sem diluir, e nas diluições 1:5, 1:10, 1:50, 1:100, 1:500, 1:750 e 1:1.000. (c) 1, 2 e 3 correspondem a diferentes amostras testadas na PCR. Pode ser visualizado no PAGE o fragmento esperado de aproximadamente 600 pb no CP e nas amostras 2 e 3. L – padrão de tamanho molecular de 100 pb (Ludwig Biotec, Brazil), CR – controle de reação, CP – controle positivo, A – amostra teste.

Como pode ser observado no PAGE da figura 32-a do teste de gradiente de temperatura, a amostra POCONE-BR (CP) apresentou um perfil de amplificação melhor na temperatura de 56°C quando comparado às demais temperaturas, uma vez que praticamente não foram observadas amplificações inespecíficas, apenas um fragmento com intensidade muito pequena quando comparado às amplificações nas demais temperaturas. Então, inicialmente um grupo de amostras do Pantanal foi triado na PCR *tat-gag* utilizando a temperatura de pareamento de 52 °C. Em seguida todas as amostras, incluindo as amostras positivas e negativas a 52°C foram testadas a 56°C. Como resultado foram observados resultados diferentes, uma vez que de 72 amostras negativas a 52°C oito amplificaram a 56°C, enquanto que de 40 amostras positivas a 52 °C apenas 21 amostras também amplificaram a 56°C, e as

outras 19 amostras foram negativas. Assim, apesar do perfil de amplificação em PAGE ser melhor a 56°C, a melhor temperatura para a PCR tat-gag foi 52°C, uma vez que ela permitiu uma maior taxa de amplificação nas 132 amostras do Pantanal testadas.

5.1.5. Amplificação de DNA proviral do EIAV empregando iniciadores de EIAV na região do gene *pol* – iniciadores EIAV-pol-4325-F, EIAV-pol-4817-R e EIAV-pol-4841-R

Para a caracterização molecular do gene *pol* foram desenhados iniciadores e combinados para a PCR para amplificação. Foi desenvolvida uma PCR para a amplificação de uma região parcial do gene *pol*, utilizando os iniciadores EIAV-pol-4325-F (senso) e EIAV-pol-4817-R (anti-senso) (Tabela 7). Na PCR foi amplificado um fragmento de DNA de aproximadamente 512 pb. As condições da reação foram estabelecidas de acordo com o item 4.6., e as temperaturas de pareamento dos iniciadores foram determinadas por gradiente de temperatura de 56, 54 e 52°C. A figura 33 mostra o gradiente de temperatura da PCR, utilizando a amostra POCONE-BR (CP) e outra amostra teste (A), indicando que houve amplificação da amostra POCONE-BR (CP) em todas as temperaturas testadas, ao apresentar um fragmento do tamanho esperado de aproximadamente 511 pb, acima em relação ao fragmento de 500 pb do marcador de tamanho molecular. As condições da PCR foram de temperatura de desnaturação inicial a 95°C por 2 min, seguida por 40 ciclos de 94°C por 30 seg, temperatura de pareamento a 56, 54 e 52°C (gradiente de temperatura) por 30 seg, 72°C por 30 seg, e extensão final a 72°C por 3 min.

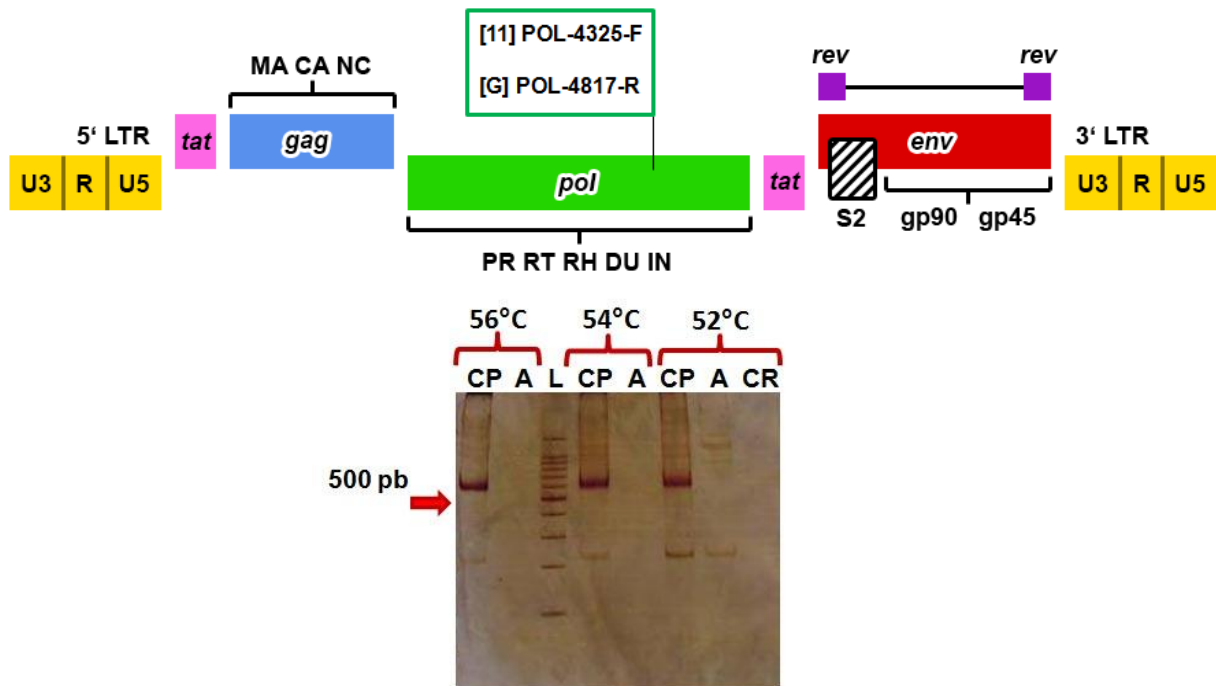


FIGURA 33: Gradiente de temperatura em PCR para amplificação de DNA proviral do EIAV na região do gene *pol* (iniciadores EIAV-pol-4325-F e EIAV-pol-4817-R) – DNA proviral foi extraído das amostras clínicas, amplificado por PCR, fracionado em PAGE e corado com nitrato de prata (a) Gradiente de temperatura da amostra POCONE-BR (CP) e amostra teste (A) nas temperaturas de 56, 54 e 52°C, mostrando amplificação do CP em todas as temperaturas testadas ao ser visualizado um fragmento em PAGE de aproximadamente 500 pb. L - padrão de tamanho molecular de 100 pb (Ludwig Biotec, Brazil), CR – controle de reação.

A outra PCR para a amplificação de uma região parcial do gene *pol*, foi feita utilizando os iniciadores EIAV-pol-4325-F (senso) e EIAV-pol-4841-R (anti-senso) (Tabela 7). NA PCR foi amplificado um fragmento de DNA de aproximadamente 535 pb. As condições da reação foram estabelecidas de acordo com o item 4.6., e as temperaturas de pareamento dos iniciadores foram determinadas por gradiente de temperatura de 56, 54 e 52°C. A figura 34 mostra o gradiente de temperatura da PCR, utilizando a amostra POCONE-BR (CP) e outra amostra teste (A), indicando que houve amplificação do CP e da amostra teste em todas as temperaturas testadas, ao apresentarem um fragmento do tamanho esperado de aproximadamente 536 pb, acima em relação ao fragmento de 500 pb do marcador de tamanho molecular. Porém, após sequenciamento, apenas o controle positivo confirmou ser EIAV. As condições da PCR foram de temperatura de desnaturação inicial a 95°C por 2 min, seguida por 40 ciclos de 94°C por 30 seg, temperatura de

pareamento a 56, 54 e 52°C (gradiente de temperatura) por 30 seg, 72°C por 30 seg, e extensão final a 72°C por 3 min.

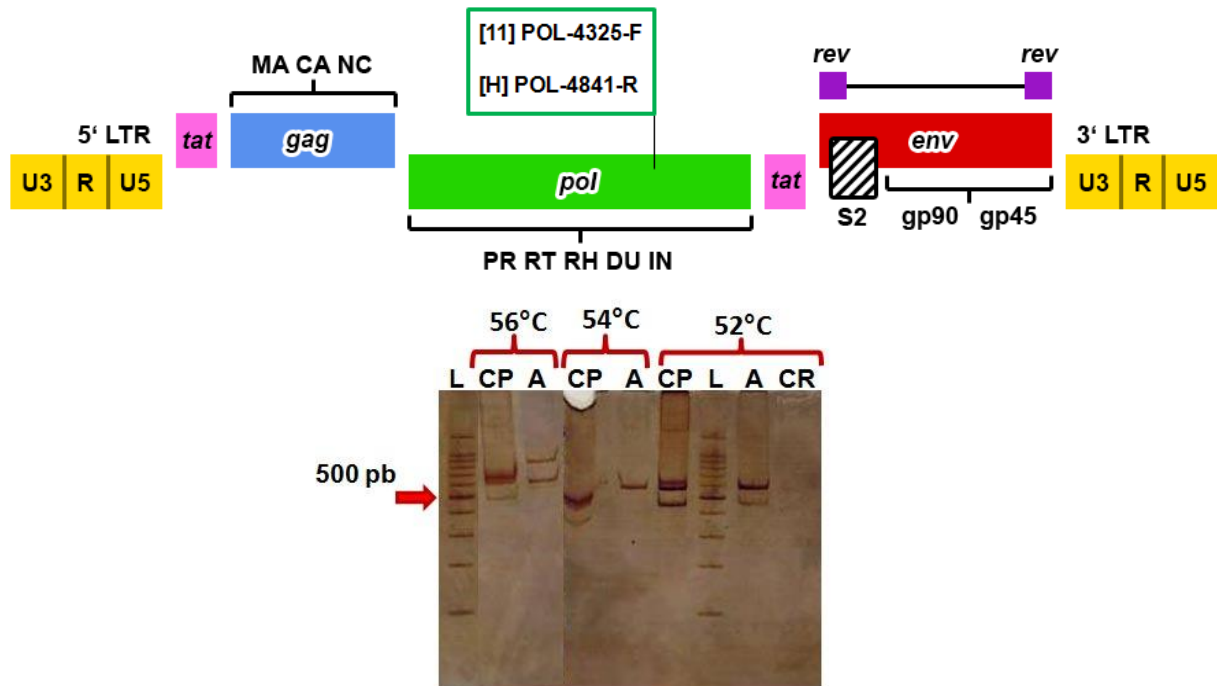


FIGURA 34: Gradiente de temperatura em PCR para amplificação de DNA proviral do EIAV na região do gene *pol* (iniciadores EIAV-pol-4325-F e EIAV-pol-4841-R) – DNA proviral foi extraído das amostras clínicas, amplificado por PCR, fracionado em PAGE e corado com nitrato de prata. (a) Gradiente de temperatura da amostra POCONE-BR (CP) e amostra teste (A) nas temperaturas de 56, 54 e 52°C, mostrando amplificação do CP em todas as temperaturas testadas ao ser visualizado um fragmento em PAGE de aproximadamente 500 pb. L - padrão de tamanho molecular de 100 pb (Ludwig Biotec, Brazil), CR – controle de reação.

5.1.6. Amplificação de DNA proviral do EIAV empregando iniciadores de EIAV na região do gene *pol* a ORF S2 – iniciadores EIAV-pol-4841-F e EIAV-S2-5275-R

Para a caracterização molecular do gene *pol* a ORF S2 foram desenhados iniciadores e combinados para a PCR para amplificação de uma região parcial do gene *pol* a ORF S2, utilizando os iniciadores EIAV-pol-4841-F (senso) e EIAV-S2-5275-R (anti-senso) (Tabela 7). NA PCR foi amplificado um fragmento de DNA de aproximadamente 454 pb. As condições da reação foram estabelecidas de acordo com o item 4.6., e as temperaturas de pareamento dos iniciadores foram determinadas por gradiente de temperatura de 58, 56, 54 e 52°C. A figura 35 mostra

o gradiente de temperatura da PCR, utilizando a amostra POCONE-BR (CP) e outra amostra teste (A), indicando que houve amplificação do CP em todas as temperaturas testadas, ao apresentarem um fragmento do tamanho esperado de aproximadamente 453 pb, abaixo em relação ao fragmento de 500 pb do marcador de tamanho molecular. As condições da PCR foram de temperatura de desnaturação inicial a 95°C por 2 min, seguida por 40 ciclos de 94°C por 30 seg, temperatura de pareamento a 58, 56, 54 e 52°C (gradiente de temperatura) por 30 seg, 72°C por 30 seg, e extensão final a 72°C por 3 min.

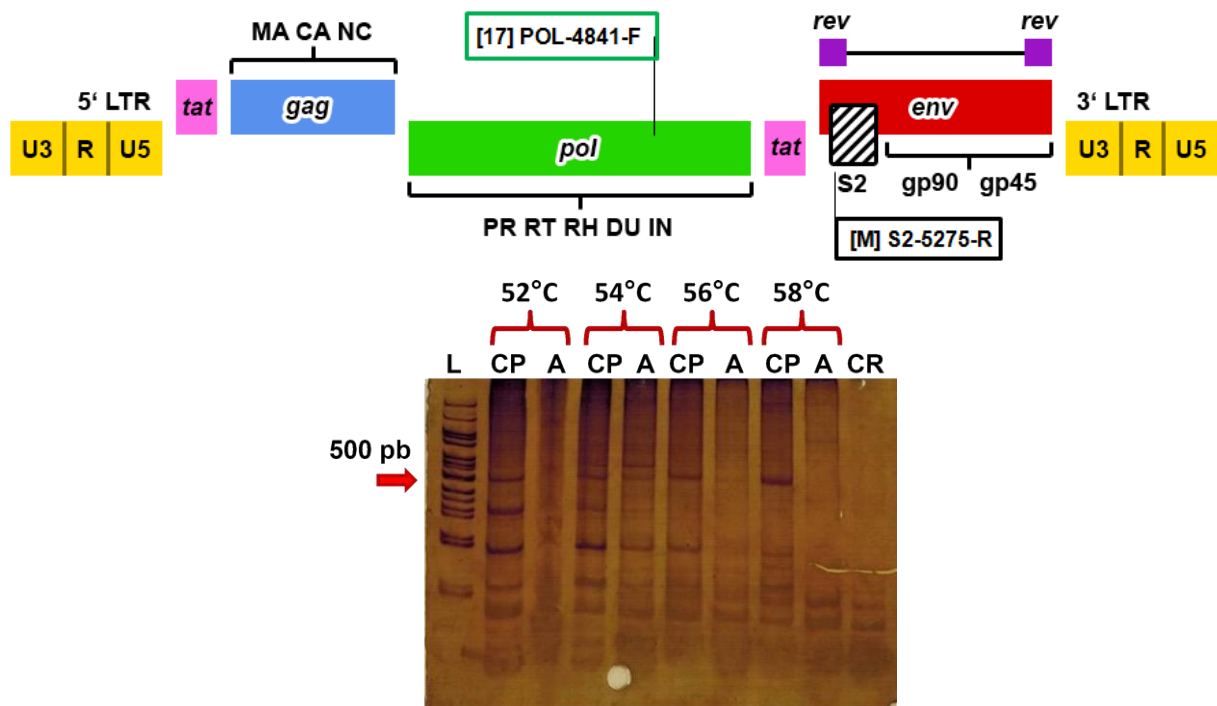


FIGURA 35: Gradiente de temperatura em PCR para amplificação de DNA proviral do EIAV na região do gene *pol* a orf S2 (iniciadores EIAV-pol-4841-F e EIAV-S2-5275-R) – DNA proviral foi extraído das amostras clínicas, amplificado por PCR, fracionado em PAGE e corado com nitrato de prata. (a) Gradiente de temperatura da amostra POCONE-BR (CP) e amostra teste (A) nas temperaturas de 58, 56, 54 e 52°C, mostrando amplificação do CP em todas as temperaturas testadas ao ser visualizado um fragmento em PAGE de aproximadamente 500 pb. L - padrão de tamanho molecular de 100 pb (BIORON), CR – controle de reação.

5.1.7. Amplificação de DNA proviral do EIAV empregando iniciadores de EIAV na região do gene *env* – iniciadores EIAV-ENV-6674-F e EIAV-ENV-7145-R

Para a caracterização molecular do gene *env* foram desenhados iniciadores e combinados para a PCR para amplificação de uma região parcial do gene *env*, utilizando os iniciadores EIAV-ENV-6674-F (senso) e EIAV-ENV-7145-R (anti-senso) (Tabela 7). Na PCR foi amplificado um fragmento de DNA de aproximadamente 495 pb. As condições da reação foram estabelecidas de acordo com o item 4.6., e as temperaturas de pareamento dos iniciadores foram determinadas por gradiente de temperatura de 60, 58 e 56°C. A figura 36 mostra o gradiente de temperatura da PCR, utilizando a amostra POCONE-BR (CP) e outra amostra teste (A), indicando que houve amplificação do CP e da amostra teste em todas as temperaturas testadas, ao apresentarem um fragmento do tamanho esperado de aproximadamente 495 pb, abaixo em relação ao fragmento de 500 pb do marcador de tamanho molecular. Porém, após sequenciamento, apenas o controle positivo confirmou ser EIAV. As condições da PCR foram de temperatura de desnaturação inicial a 95°C por 2 min, seguida por 40 ciclos de 94°C por 30 seg, temperatura de pareamento a 60, 58 e 56°C (gradiente de temperatura) por 30 seg, 72°C por 30 seg, e extensão final a 72°C por 3 min.

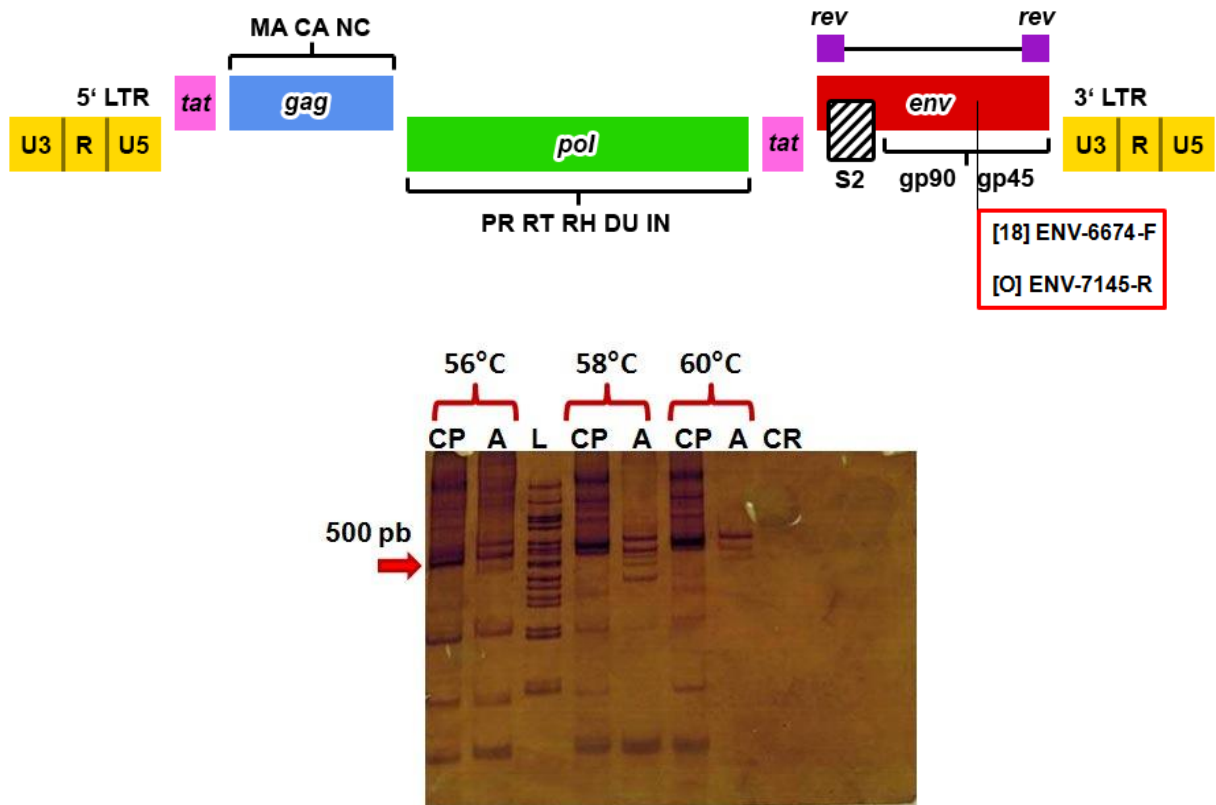


FIGURA 36: Gradiente de temperatura em PCR para amplificação de DNA proviral do EIAV na região do gene *env* (iniciadores EIAV-ENV-6674-F e EIAV-ENV-7145-R) – DNA proviral foi extraído das amostras clínicas, amplificado por PCR, fracionado em PAGE e corado com nitrato de prata. (a) Gradiente de temperatura da amostra POCONE-BR (CP) e amostra teste (A) nas temperaturas de 56, 58 e 60°C, mostrando amplificação do CP em todas as temperaturas testadas ao ser visualizado um fragmento em PAGE de aproximadamente 500 pb. L - padrão de tamanho molecular de 100 pb (BIORON), CR – controle de reação.

5.2. Análise molecular e sorológica para identificação de casos de anemia infecciosa equina (AIE) em equídeos do Pantanal brasileiro

5.2.1. Amplificação do DNA proviral do EIAV em amostras clínicas

5.2.1.1. Amostra POCONE-BR

A amostra POCONE-BR teve seu DNA amplificado na snPCR LTR-tat (iniciadores EIAV-LTR-211-F4 e EIAV-tat-380-R2) para a região 5' LTR ao exon 1 do gene *tat*, que amplifica um fragmento de aproximadamente 185 pb, Na região *tat-gag* (iniciadores EIAV-tat-380-F e gag-672-R) para o exon 1 do gene *tat* ao gene *gag* foi amplificado um fragmento de aproximadamente 312 pb. Além disso, também nas

outras PCRs para outras regiões do genoma, o DNA foi amplificado utilizando os seguintes iniciadores: LTR-tat (EIAV-LTR-28-F e EIAV-tat-405-1R) - 397 pb; LTR-gag (EIAV-LTR-28-F e EIAV-gag-672-R) - 664 pb; pol (EIAV-pol-4325-F e EIAV-pol-4817-R) - 512 pb; pol (EIAV-pol-4325-F e EIAV-pol-4841-R) - 536 pb; pol-S2 (EIAV-pol-4841-F e EIAV-S2-5275-R) - 454 pb; env (EIAV-ENV-6647-F e EIAV-ENV-7145-R) - 495 pb.

5.2.1.2. Amostras clínicas de equídeos do Pantanal brasileiro

Para a detecção do DNA proviral das amostras clínicas de equídeos do Pantanal brasileiro foram utilizadas a snPCR LTR-tat (iniciadores EIAV-LTR-211-F4, EIAV-tat-405-R1 e EIAV-tat-380-R2) e PCR tat-gag (iniciadores EIAV-tat-380-F e EIAV-gag-672-R). Do total de 133 amostras, 58 foram positivas para a PCR tat-gag e 36 positivas para a snPCR LTR-tat. Desse total 24 amostras foram positivas nas duas reações - PCR tat-gag e snPCR LTR-tat (Tabela 8).

TABELA 8: Resultado da PCR tat-gag e snPCR LTR-tat para amplificação do DNA proviral do EIAV em amostras de equídeos do Pantanal brasileiro

Amostras	PCR tat-gag	snPCR LTR-tat
POCONE-BR-01	P	P
PAN-BR-01	N	P
PAN-BR-02	P	P
PAN-BR-03	P	P
PAN-BR-04	P	P
PAN-BR-05	P	P
PAN-BR-06	P	P
PAN-BR-07	P	P
PAN-BR-08	N	P
PAN-BR-09	P	P
PAN-BR-10	N	P
PAN-BR-11	P	P
PAN-BR-12	N	P
PAN-BR-13	P	P
PAN-BR-14	P	P
PAN-BR-15	P	P
PAN-BR-16	N	P

TABELA 8: Resultado da PCR tat-gag e snPCR LTR-tat para amplificação do DNA proviral do EIAV em amostras de equídeos do Pantanal brasileiro

Amostras	PCR tat-gag	snPCR LTR-tat
PAN-BR-17	N	P
PAN-BR-18	P	P
PAN-BR-19	P	P
PAN-BR-20	P	P
PAN-BR-21	P	P
PAN-BR-22	N	P
PAN-BR-23	P	N
PAN-BR-24	P	P
PAN-BR-25	P	P
PAN-BR-26	P	P
PAN-BR-27	P	N
PAN-BR-28	P	N
PAN-BR-29	P	N
PAN-BR-30	N	N
PAN-BR-31	N	N
PAN-BR-32	N	N
PAN-BR-33	N	N
PAN-BR-34	N	N
PAN-BR-35	N	N
PAN-BR-36	N	N
PAN-BR-37	N	N
PAN-BR-38	N	N
PAN-BR-39	N	N
PAN-BR-40	N	N
PAN-BR-41	N	N
PAN-BR-42	N	N
PAN-BR-43	N	N
PAN-BR-44	N	N
PAN-BR-45	N	N
PAN-BR-46	N	N
PAN-BR-47	N	N
PAN-BR-48	N	N
PAN-BR-49	N	N
PAN-BR-50	N	N
PAN-BR-51	N	N
PAN-BR-52	N	N
PAN-BR-53	N	N

TABELA 8: Resultado da PCR tat-gag e snPCR LTR-tat para amplificação do DNA proviral do EIAV em amostras de equídeos do Pantanal brasileiro

Amostras	PCR tat-gag	snPCR LTR-tat
PAN-BR-54	N	N
PAN-BR-55	N	N
PAN-BR-56	N	N
PAN-BR-57	N	N
PAN-BR-58	P	N
PAN-BR-59	N	N
PAN-BR-7528	N	N
PAN-BR-7537	N	N
PAN-BR-7538	N	N
PAN-BR-7540	P	P
PAN-BR-7541	N	N
PAN-BR-7542	N	N
PAN-BR-7543	P	N
PAN-BR-7544	P	N
PAN-BR-7548	P	N
PAN-BR-7562	N	N
PAN-BR-7570	N	P
PAN-BR-7572	N	N
PAN-BR-7573	N	N
PAN-BR-7575	P	N
PAN-BR-7584	N	N
PAN-BR-7598	P	N
PAN-BR-7612	P	N
PAN-BR-7617	N	N
PAN-BR-7683	N	P
PAN-BR-7693	N	N
PAN-BR-7697	P	N
PAN-BR-7704	P	N
PAN-BR-7716	N	N
PAN-BR-7718	N	N
PAN-BR-7719	N	N
PAN-BR-7721	P	N
PAN-BR-7725	N	N
PAN-BR-7731	N	N
PAN-BR-7734	P	N
PAN-BR-7738	P	N
PAN-BR-7740	P	N
PAN-BR-7960	P	N

TABELA 8: Resultado da PCR tat-gag e snPCR LTR-tat para amplificação do DNA proviral do EIAV em amostras de equídeos do Pantanal brasileiro

Amostras	PCR tat-gag	snPCR LTR-tat
PAN-BR-7961	P	N
PAN-BR-7962	N	N
PAN-BR-7963	P	N
PAN-BR-7968	N	N
PAN-BR-7972	N	N
PAN-BR-7984	P	N
PAN-BR-7991	N	N
PAN-BR-7994	N	N
PAN-BR-8001	N	P
PAN-BR-8002	P	P
PAN-BR-8003	P	N
PAN-BR-8005	N	N
PAN-BR-8013	N	N
PAN-BR-8014	N	N
PAN-BR-8016	P	N
PAN-BR-8017	N	N
PAN-BR-8019	N	N
PAN-BR-8028	N	P
PAN-BR-8052	N	N
PAN-BR-8054	P	N
PAN-BR-8063	N	N
PAN-BR-8065	N	N
PAN-BR-8083	P	N
PAN-BR-8084	P	N
PAN-BR-8086	P	N
PAN-BR-8087	P	N
PAN-BR-8088	P	N
PAN-BR-8095	N	P
PAN-BR-8098	P	P
PAN-BR-8101	N	N
PAN-BR-8103	P	P
PAN-BR-8110	N	N
PAN-BR-8117	P	N
PAN-BR-8135	P	P
PAN-BR-8142	N	N
PAN-BR-8145	P	N
PAN-BR-8147	P	N
PAN-BR-8151	N	N

TABELA 8: Resultado da PCR *tat-gag* e snPCR LTR-*tat* para amplificação do DNA proviral do EIAV em amostras de equídeos do Pantanal brasileiro

Amostras	PCR <i>tat-gag</i>	snPCR LTR- <i>tat</i>
PAN-BR-8152	N	N
PAN-BR-8156	P	N
PAN-BR-8159	P	N

(P) amostras que apresentaram amplificação de DNA específica na PCR, (N) amostras que não apresentaram amplificação de DNA específica na PCR. As amostras positivas estão destacadas em cinza na tabela.

5.2.2. Sequenciamento e análise filogenética de DNA amplificado de amostras de equídeos do Pantanal brasileiro

Todas as amostras do Pantanal brasileiro que amplificaram nas diferentes PCRs foram sequenciadas. As sequências nucleotídicas apresentaram identidade nucleotídica com outras sequências do EIAV previamente publicadas no GenBank. As sequências das amostras do Pantanal brasileiro foram alinhadas com a região correspondente de sequências de genoma completo e parciais do EIAV disponíveis no GenBank. Para o alinhamento foram retiradas as sequências dos iniciadores senso e anti-senso. Para todos os alinhamentos, o início e final da sequência nucleotídica obtida para cada região do genoma sequenciada está identificado de acordo com a sequência Miyazaki (JX003263.1).

5.2.2.1. Análise molecular empregando as sequências nucleotídicas da região 5'LTR (nt 211) ao exon 1 do gene *tat* (nt 380) amplificadas de amostras de equídeos do pantanal brasileiro

Das 36 amostras do Pantanal positivas na snPCR LTR-*tat* (iniciadores EIAV-LTR-211-F4 e EIAV-*tat*-380-R2) foram obtidas 23 sequências nucleotídicas, incluindo a sequência da amostra POCONE-BR. A figura 37 mostra o alinhamento das 23 sequências nucleotídicas variando de 141 a 145 pb do EIAV de equídeos do Pantanal brasileiro para a região 5' LTR ao exon 1 do gene *tat* com seis sequências mundiais do EIAV, sendo quatro sequências de genoma completo: isoladas da China (Liaoning), Estados Unidos (Wyoming), Japão (Miyazaki) e Irlanda (H3); três

sequências parciais, isoladas da Itália (Ita-1), e duas da Mongólia (Mongolia-1 e Mongolia-2).

A identificação da região 5' LTR e do exon 1 do gene *tat* para as sequências do Pantanal foram preditos baseado na região 5' LTR das sequências Miyazaki e da Mongólia já caracterizadas (DONG *et al.*, 2013, SHARAV *et al.*, 2017). A identificação na sequência correspondente a região 5'LTR, a região não codificadora (NCR), e o exon 1 do gene *tat* estão indicados, assim como o sinal de poliadenilação (Poly A) – AATAA, está destacado em vermelho, e os domínios estruturais R e U5 estão identificados por setas na figura 37. As sequências obtidas para as amostras brasileiras correspondem à posição no genoma 231 a 379 em relação à sequência Miyazaki, sendo que a região 5' LTR corresponde a posição 231 a 306 (76 pb), a região não codificadora corresponde a posição 307 a 348 (42 pb), e o exon 1 do gene *tat* corresponde a posição 348 a 379 (31 pb).

No alinhamento pode-se observar grandes regiões conservadas entre as sequências brasileiras, e regiões variáveis com substituições nucleotídicas. Foram consideradas substituições nucleotídicas apenas quando as sequências brasileiras apresentaram bases diferentes em relação a todas as sequências mundiais do EIAV analisadas no alinhamento. A análise das sequências brasileiras mostrou que o fragmento de 76 pb para a região 5' LTR apresentou nove substituições nucleotídicas em diferentes localizações, sendo cinco transições (nas posições 2, 11, 42, 48, 67 no alinhamento), uma transversão (na posição 43 no alinhamento), e três podem ser transição ou transversão (nas posições 9, 12 e 47 no alinhamento) dependendo em relação a qual sequência mundial do EIAV se compara. Também foram indentificadas três inserções (nas posições 10, 33 e 65), e cinco deleções (nas posições 15, 43, 45, 58, 66). O fragmento de 42 pb para a região não codificadora apresentou cinco transversões (nas posições 98, 103, 104, 117, 118 no alinhamento). Enquanto que para o fragmento de 31 pb para o exon 1 do gene *tat* não foi observada nenhuma substituição nucleotídica entre as sequências brasileiras (figura 37).

início e fim da região 5' LTR e do exon 1 da *tat* estão destacados no topo da figura, e o número de nucleotídeos da sequência estão identificados na base da figura.

A tabela 9 mostra os valores de similaridade nucleotídica para as 23 sequências nucleotídicas do EIAV de equídeos do Pantanal brasileiro para a região 5' LTR ao exon 1 do gene *tat*, entre elas e com quatro sequências de referência de genoma completo do EIAV. As sequências do EIAV do Pantanal apresentaram elevados valores de similaridade nucleotídica entre si, variando de 93,5% a 100%. Enquanto que as sequências do EIAV do Pantanal, comparadas às outras quatro sequências de referência do EIAV, apresentaram valores variáveis de similaridade nucleotídica, variando de 85,4% a 89,1% com Wyoming, 85,4% a 88,1% com Liaoning, 82,4% a 86,2% com Miyazaki, 87,1% a 90,7% com H3, 86,2% a 89,8% com Ita-1, 87,9% a 90,7% com Mongolia-1 e 84,3% a 87,1% com Mongolia-2. Os dados de caracterização molecular das 23 amostras do Pantanal brasileiro amplificadas na snPCR LTR-*tat* foram publicados (anexo 1).

Tabela 9: Similaridade nucleotídica de 30 sequências nucleotídicas do EIAV para a região 5' LTR ao exon 1 do gene *tat*

	Wyoming	Liaoning	Miyazaki	H3	Ita-1	Mongolia-1	Mongolia-2	PAN-BR-01	PAN-BR-02	PAN-BR-03	PAN-BR-04	PAN-BR-05	PAN-BR-06	PAN-BR-07	PAN-BR-08	PAN-BR-09	PAN-BR-10	PAN-BR-11	PAN-BR-12	PAN-BR-13	PAN-BR-14	PAN-BR-15	PAN-BR-16	PAN-BR-17	PAN-BR-18	PAN-BR-19	PAN-BR-20	PAN-BR-21	PAN-BR-22	POCONE-BR-01
Wyoming																														
Liaoning	83,6																													
Miyazaki	82,6	80,8																												
H3	91,8	82,3	85,3																											
Ita-1	92,6	81,4	84,4	99,2																										
Mongolia-1	90,0	84,2	86,0	90,8	90,0																									
Mongolia-2	89,1	83,5	80,4	88,1	89,0	92,7																								
PAN-BR-01	85,4	87,2	85,2	87,1	86,2	87,9	84,3																							
PAN-BR-02	87,3	88,1	83,4	88,0	87,1	88,9	85,3	96,0																						
PAN-BR-03	86,4	87,2	84,4	88,0	87,1	88,9	85,3	97,6	98,4																					
PAN-BR-04	87,3	87,2	83,4	88,0	87,1	88,9	85,3	95,2	99,2	97,6																				
PAN-BR-05	85,4	87,2	85,2	87,1	86,2	87,9	84,3	100,0	96,0	97,6	95,2																			
PAN-BR-06	85,4	87,2	85,2	87,1	86,2	87,9	84,3	100,0	96,0	97,6	95,2	100,0																		
PAN-BR-07	86,4	87,2	82,4	87,1	86,2	88,0	86,2	95,2	99,2	97,6	98,4	95,2	95,2																	
PAN-BR-08	87,3	87,2	83,4	88,0	87,1	88,9	85,3	95,2	99,2	97,6	100,0	95,2	95,2	98,4																
PAN-BR-09	86,4	87,2	82,4	87,1	86,2	88,0	86,2	95,2	99,2	97,6	98,4	95,2	95,2	100,0	98,4															
PAN-BR-10	85,4	87,2	85,2	87,1	86,2	87,9	84,3	100,0	96,0	97,6	95,2	100,0	100,0	95,2	95,2	95,2														
PAN-BR-11	89,1	86,3	85,3	89,8	88,9	90,7	87,1	94,4	98,4	96,9	97,6	94,4	94,4	97,6	97,6	97,6	94,4													
PAN-BR-12	86,4	87,2	82,4	87,1	86,2	88,0	86,2	95,2	99,2	97,6	98,4	95,2	95,2	100,0	98,4	100,0	95,2	97,6												
PAN-BR-13	85,4	87,2	85,2	87,1	86,2	87,9	84,3	100,0	96,0	97,6	95,2	100,0	100,0	95,2	95,2	95,2	100,0	94,4	95,2											
PAN-BR-14	87,3	86,3	83,4	88,0	87,1	88,9	87,1	94,4	98,4	96,9	97,6	94,4	94,4	99,2	97,6	99,2	94,4	98,4	99,2	94,4										
PAN-BR-15	85,4	87,2	85,2	87,1	86,2	87,9	84,3	100,0	96,0	97,6	95,2	100,0	100,0	95,2	95,2	95,2	100,0	94,4	95,2	100,0	94,4									
PAN-BR-16	86,4	86,3	82,4	87,1	86,2	88,0	86,2	94,4	98,4	96,8	99,2	94,4	94,4	99,2	99,2	99,2	94,4	96,8	99,2	94,4	98,4	94,4	94,4							
PAN-BR-17	87,3	87,2	83,4	88,0	87,1	88,9	85,3	95,2	99,2	97,6	100,0	95,2	95,2	98,4	100,0	98,4	95,2	97,6	98,4	95,2	97,6	95,2	99,2							
PAN-BR-18	88,2	85,4	85,2	89,8	88,9	89,8	86,2	94,3	96,0	96,8	95,2	94,3	94,3	95,2	95,2	95,2	94,3	97,6	95,2	94,3	96,0	94,3	94,4	95,2						
PAN-BR-19	88,2	85,4	85,2	89,8	88,9	89,8	86,2	94,3	96,0	96,8	95,2	94,3	94,3	95,2	95,2	95,2	94,3	97,6	95,2	94,3	96,0	94,3	94,4	95,2	100,0					
PAN-BR-20	86,4	87,2	83,4	88,0	87,1	88,0	84,3	96,0	97,6	98,4	96,8	96,0	96,0	96,8	96,8	96,8	96,0	96,0	96,8	96,0	96,0	96,0	96,0	96,8	97,7	97,7				
PAN-BR-21	88,2	85,4	85,2	89,8	88,9	89,8	86,2	94,3	96,0	96,8	95,2	94,3	94,3	95,2	95,2	95,2	94,3	97,6	95,2	94,3	96,0	94,3	94,4	95,2	100,0	100,0	97,7			
PAN-BR-22	89,1	86,3	86,2	90,7	89,8	88,9	85,3	95,2	95,2	96,0	94,4	95,2	95,2	94,4	94,4	94,4	95,2	95,2	94,4	95,2	95,2	95,2	93,5	94,4	97,6	97,6	96,9	97,6		
POCONE-BR-01	87,3	87,2	83,4	88,0	87,1	88,9	85,2	95,2	95,2	96,0	95,2	95,2	94,4	96,0	94,4	94,4	95,2	95,2	94,4	95,2	95,2	95,2	95,2	95,2	96,0	93,5	93,5	93,5	93,5	94,3

*Estimativa da similaridade nucleotídica entre 30 sequências nucleotídicas do EIAV: 23 sequências do Pantanal brasileiro: PAN-BR-01 (MK158955), PAN-BR-02 (MK174360), PAN-BR-03 (MK174376), PAN-BR-04 (MK174361), PAN-BR-05 (MK158956), PAN-BR-06 (MK158957), PAN-BR-07 (MK174362), PAN-BR-08 (MK174363), PAN-BR-09 (MK174364), PAN-BR-10 (MK158958), PAN-BR-

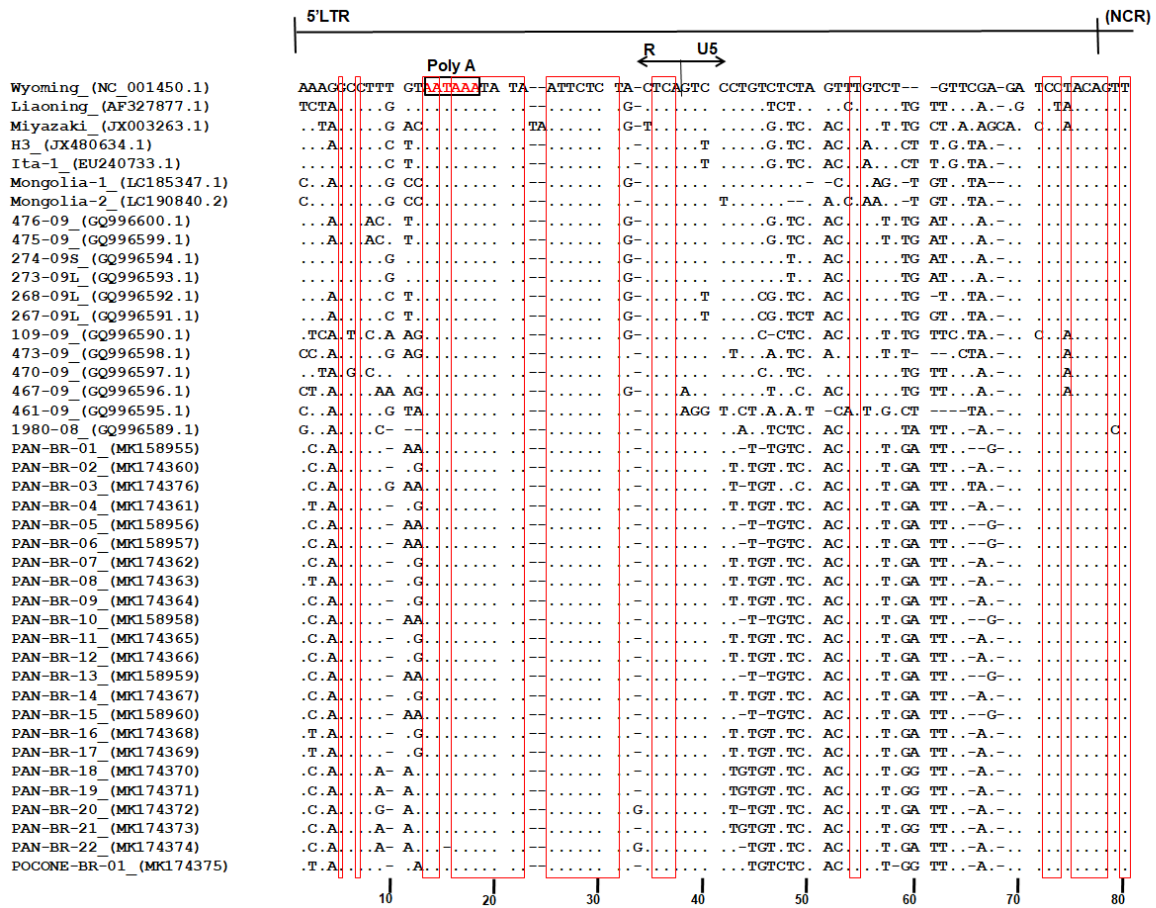
11 (MK174365), PAN-BR-12 (MK174366), PAN-BR-13 (MK158959), PAN-BR-14 (MK174367), PAN-BR-15 (MK158960), PAN-BR-16 (MK174368), PAN-BR-17 (MK174369), PAN-BR-18 (MK174370), PAN-BR-19 (MK174371), PAN-BR-20 (MK174372), PAN-BR-21 (MK174373), PAN-BR-22 (MK174374), POCONE-BR-01 (MK174375); e sete sequências mundiais do EIAV, sendo quatro sequências de genoma completo: Liaoning (AF327877.1), Wyoming (AF033820.1), Miyazaki (JX003263.1), H3 (JX480634.1), e três sequências parciais: Ita1 (EU240733.1), Mongolia-1 (LC185347.1) e Mongolia-2 (LC190840.2). Os valores foram obtidos pelo cálculo da estimativa da divergência nucleotídica entre as sequências no programa MEGA versão 6.0 (TAMURA *et al.*, 2013) empregando o método Maximum Composite Likelihood.

Foi feito o alinhamento das 23 sequências nucleotídicas do Pantanal com mais 19 sequências mundiais do EIAV, sendo quatro sequências de genoma completo: Liaoning (China), Wyoming (Estados Unidos), Miyazaki (Japão) e H3 (Irlanda). Foram também usadas 15 sequências parciais, sendo uma sequência da Itália (Ita-1), duas sequências da Mongólia (Mongolia-1 e Mongolia-2), sete sequências da Hungria (109-09, 267-09L, 268-09L, 274-09S, 273-09L, 476-09, 475-09), quatro sequências da Bósnia e Herzegovina (461-09, 467-09, 470-09, 473-09), e uma sequência da França (1980-08) (Figura 38).

Quando é feita a análise desse grupo de sequências mundiais em conjunto com as sequências brasileiras, pode se observar regiões nucleotídicas conservadas e variáveis no alinhamento. Para o fragmento de 76 pb para a região 5' LTR foram identificadas 43 substituições nucleotídicas, sendo 13 transições (nas posições 4, 8, 32, 38, 41, 42, 51, 52, 66, 67, 69, 70, 71 no alinhamento), seis transversões (nas posições 39, 44, 50, 56, 62, 65), 24 transições ou transversões (nas posições 1, 2, 3, 6, 9, 10, 11, 12, 40, 43, 45, 46, 47, 48, 49, 53, 55, 57, 59, 60, 61, 63, 64, 74) dependendo em relação a qual sequência mundial do EIAV se compara. Na região 5' LTR foram identificadas também quatro inserções (nas posições 23 e 24 para a sequência Miyazaki, na posição 33 em duas sequências brasileiras, na posição 68 na sequência Miyazaki), e duas deleções (nas posições 15 e 58 em sequências brasileiras).

Para o fragmento de 42 pb para a região não codificadora foram identificadas nove substituições nucleotídicas, sendo oito transições (nas posições 78, 98, 101, 102, 103, 104, 111 e 119 no alinhamento), uma transição ou transversão (na posição 118 no alinhamento) dependendo em relação a qual sequência mundial do EIAV se

compara. Também foram identificadas duas inserções (na posição 105 para uma sequência da Bósnia e Herzegovina, e na posição 120 para uma sequência da Hungria). Para o fragmento de 31 pb para o exon 1 do gene *tat* foram identificadas 10 substituições nucleotídicas, sendo nove transições (nas posições 125, 128, 136, 140, 141, 144, 145, 151, 152 no alinhamento), uma transição ou transversão (na posição 148 no alinhamento) dependendo em relação a qual sequência mundial do EIAV se compara. Também foi identificada uma deleção na posição 127 para uma sequência da França (Figura 38).



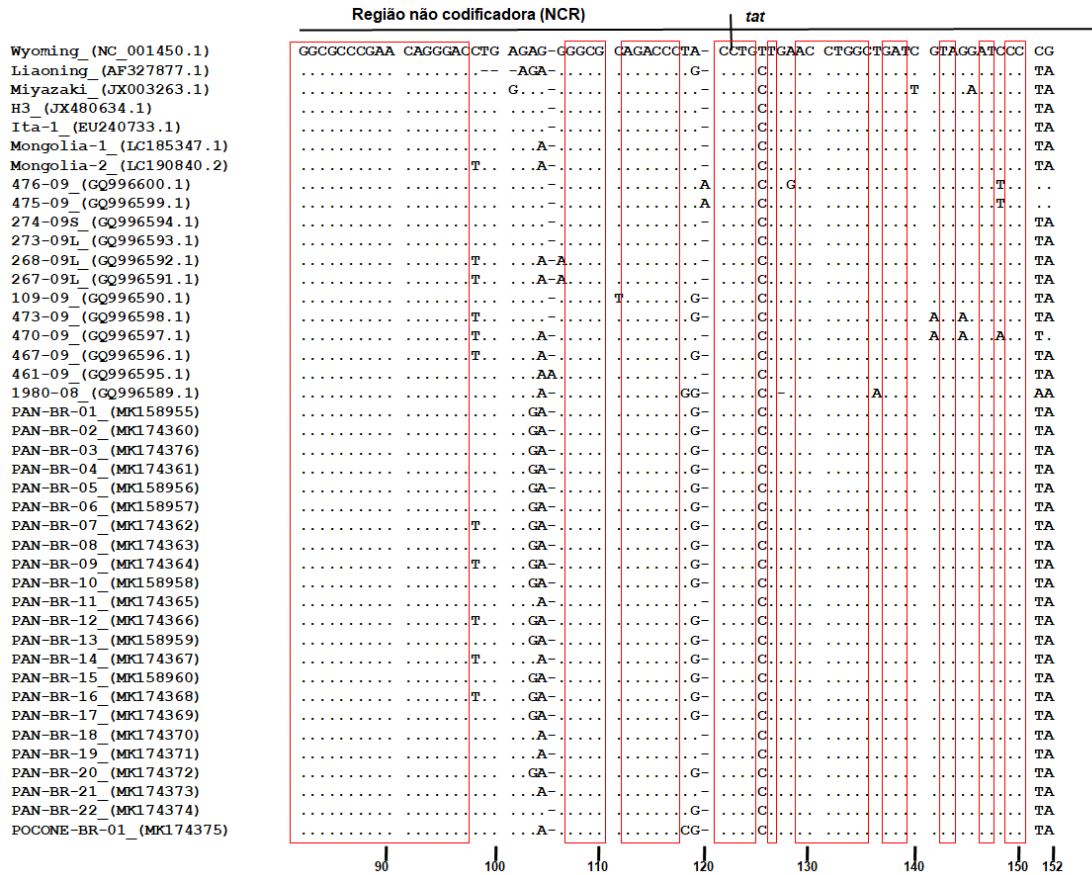


FIGURA 38: Alinhamento das sequências nucleotídicas do EIAV de equídeos do Pantanal brasileiro para a região 5' LTR ao exon 1 do gene *tat* – Alinhamento de 42 sequências nucleotídicas do EIAV: 23 sequências obtidas a partir de DNA proviral de equídeos do Pantanal brasileiro com 19 sequências mundiais do EIAV, sendo quatro sequências de genoma completo: H3, Liaoning, Wyoming, e Miyazaki; e 15 sequências parciais: Ita1, Mongolia-1, Mongolia-2, 109-09, 267-09L, 268-09L, 274-09S, 273-09L, 476-09, 475-09, 461-09, 467-09, 470-09, 473-09, e 1980-08. O número de acesso para cada sequência está identificado entre parênteses. O alinhamento foi feito no programa Mega, versão 6.0 (TAMURA *et al.*, 2013), com um *data set* final de 152 posições nucleotídicas. Regiões conservadas em todas as sequências estão identificadas por retângulos vermelhos. O início e fim da região 5' LTR e do exon 1 do gene *tat* estão destacados no topo da figura, e o número de nucleotídeos da sequência estão identificados na base da figura.

A análise das 23 sequências brasileiras com sequências parciais do EIAV apresentaram os seguintes valores de similaridade nucleotídica: as duas sequências da Mongólia apresentaram similaridade nucleotídica de 93,9% entre si, e quando comparadas as sequências brasileiras valores de 82,5% a 88,2%. As sete sequências da Hungria (109-09, 267-09L, 268-09L, 274-09S, 273-09L, 476-09, 475-09) apresentaram similaridade nucleotídica entre si de 81,4% a 100%, e quando comparadas as sequências brasileiras valores de 81,4% a 89,3%. As quatro sequências da Bósnia e Herzegovina (461-09, 467-09, 470-09, 473-09) apresentaram similaridade nucleotídica entre si de 72,5% a 88,1%, e quando comparadas as sequências brasileiras valores de 78,3% a 90,8%. Uma sequência da França (1980-08) quando comparada as sequências brasileiras apresentou valores de 87,3% a 89,9% (Tabela 10).

Tabela 10: Similaridade nucleotídica entre 42 sequências nucleotídicas do EIAV para a região 5' LTR ao exon 1 do gene *tat* *

*Estimativa da similaridade nucleotídica entre 42 sequências nucleotídicas do EIAV: 23 sequências do Pantanal brasileiro PAN-BR-01 (MK158955), PAN-BR-02 (MK174360), PAN-BR-03 (MK174376), PAN-BR-04 (MK174361), PAN-BR-05 (MK158956), PAN-BR-06 (MK158957), PAN-BR-07 (MK174362), PAN-BR-08 (MK174363), PAN-BR-09 (MK174364), PAN-BR-10 (MK158958), PAN-BR-11 (MK174365), PAN-BR-12 (MK174366), PAN-BR-13 (MK158959), PAN-BR-14 (MK174367), PAN-BR-15 (MK158960), PAN-BR-16 (MK174368), PAN-BR-17 (MK174369), PAN-BR-18 (MK174370), PAN-BR-19 (MK174371), PAN-BR-20 (MK174372), PAN-BR-21 (MK174373), PAN-BR-22 (MK174374), POCONE-BR-01 (MK174375); 19 sequências mundiais do EIAV, sendo quatro sequências de genoma completo: Liaoning (AF327877.1), Wyoming (AF033820.1), Miyazaki (JX003263.1) e H3 (JX480634.1); e 15 sequências parciais: Ita1 (EU240733.1), Mongolia-1 (LC185347.1), Mongolia-2 (LC190840.2), 109-09 (GQ996590.1), 267-09L (GQ996591.1), 268-09L (GQ996592.1), 274-09S (GQ996594.1), 273-09L (GQ996593.1), 476-09 (GQ996600.1), 475-09 (GQ996599.1), 461-09 (GQ996595.1), 467-09 (GQ996596.1), 470-09 (GQ996597.1), 473-09 (GQ996598.1), e 1980-08 (GQ996589.1). A estimativa da similaridade nucleotídica entre as sequências foi feita pelo cálculo da estimativa da divergência evolutiva entre as sequências no programa MEGA X (KUMAR *et al.*, 2018), empregando o modelo Tamura-Nei, a taxa de variação entre os sítios foi modelada com uma distribuição gamma (shape parameter = 4).

Um alinhamento da sequência de 10 aminoácidos deduzidas de EIAV para as 23 sequências do Pantanal a partir de uma sequência nucleotídica de 31 pb para o exon 1 do gene *tat* com mais 19 sequências mundiais do EIAV, sendo quatro sequências de genoma completo: Liaoning (China), Wyoming (Estados Unidos), Miyazaki (Japão) e H3 (Irlanda) foi feito. Foram empregadas também 15 sequências parciais, sendo uma sequência da Itália (Ita-1), duas sequências da Mongólia (Mongolia-1 e Mongolia-2), sete sequências da Hungria (109-09, 267-09L, 268-09L, 274-09S, 273-09L, 476-09, 475-09), quatro sequências da Bósnia e Herzegovina (461-09, 467-09, 470-09, 473-09), e uma sequência da França (1980-08). O alinhamento mostrou que o fragmento de 10 aa para o exon 1 do gene *tat* foi conservado em todas as sequências brasileiras. Foram observados também quatro locais de trocas de aminoácidos entre as sequências mundiais (Figura 39).

Wyoming_ (NC_001450.1)	LLNLADRRIP
Liaoning_ (AF327877.1)
Miyazaki_ (JX003263.1)C...
H3_ (JX480634.1)
Ita-1_ (EU240733.1)
Mongolia-1_ (LC185347.1)
Mongolia-2_ (LC190840.2)
476-09_ (GQ996600.1)	..D.....
475-09_ (GQ996599.1)
274-09S_ (GQ996594.1)
273-09L_ (GQ996593.1)
268-09L_ (GQ996592.1)
267-09L_ (GQ996591.1)
109-09_ (GQ996590.1)
473-09_ (GQ996598.1)HK..
470-09_ (GQ996597.1)HK..
467-09_ (GQ996596.1)
461-09_ (GQ996595.1)
1980-08_ (GQ996589.1)	.?.....
PAN-BR-01_ (MK158955)
PAN-BR-02_ (MK174360)
PAN-BR-03_ (MK174376)
PAN-BR-04_ (MK174361)
PAN-BR-05_ (MK158956)
PAN-BR-06_ (MK158957)
PAN-BR-07_ (MK174362)
PAN-BR-08_ (MK174363)
PAN-BR-09_ (MK174364)
PAN-BR-10_ (MK158958) (2)
PAN-BR-11_ (MK174365) (2)
PAN-BR-12_ (MK174366) (2)
PAN-BR-13_ (MK158959) (2)
PAN-BR-14_ (MK174367) (2)
PAN-BR-15_ (MK158960) (2)
PAN-BR-16_ (MK174368) (2)
PAN-BR-17_ (MK174369) (2)
PAN-BR-18_ (MK174370) (2)
PAN-BR-19_ (MK174371) (2)
PAN-BR-20_ (MK174372) (2)
PAN-BR-21_ (MK174373) (2)
PAN-BR-22_ (MK174374) (2)
POCONE-BR-01_ (MK174375) (2)

FIGURA 39: Alinhamento das sequências de aminoácidos do EIAV de equídeos do Pantanal brasileiro para o exon 1 do gene *tat* – Alinhamento de 42 sequências de 10 aminoácidos cada do EIAV: 23 sequências do Pantanal brasileiro PAN-BR-01, 02, 03, 04, 05, 06, 07, 08, 09, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, POCONE-BR-01; 19 sequências mundiais, sendo quatro sequências de genoma completo: Liaoning, Wyoming, Miyazaki e H3; e 15 sequências parciais: Ita1, Mongolia-1, Mongolia-2, 109-09, 267-09L, 268-09L, 274-09S, 273-09L, 476-09, 475-09, 461-09, 467-09, 470-09, 473-09, e 1980-08. O número de acesso para cada sequência está identificado entre parênteses. O alinhamento foi realizado no programa MEGA versão 6 (TAMURA *et al.*, 2018). Alanina (A), Cisteína (C), Ácido aspártico (D), Ácido glutâmico (E), Fenilalanina (F), Glicina (G), Histidina (H), Isoleucina (I), Lisina (K), Leucina (L), Metionina (M), Asparagina (N), Prolina (P), Glutamina (Q), Arginina (R), Serina (S), Treonina (T), Valina (V), Triptofano (W), Tirosina (Y).

A análise filogenética para região 5' LTR ao exon 1 do gene *tat* foi feita com as 23 sequências nucleotídicas obtidas de 153 posições nucleotídicas comparada a mesma região de 19 sequências mundiais do EIAV disponíveis no GenBank. A árvore filogenética mostrou que as sequências do EIAV do Pantanal agrupam em um clado separado, apoiado por um valor de bootstrap de 90. As sequências da China (Liaoning, Vaccine, DLV18-8, DV35-20, FDDV-10), Estados Unidos (Wyoming, EIAVuk, WSU5, V26, V70), Irlanda (H3, F4, F3, F2) e uma sequência da Itália (Ita-1), e Japão (Miyazaki) formam quatro clados separados, apoiados por um elevado valor de bootstrap, corroborando os dados da literatura (Figura 40).

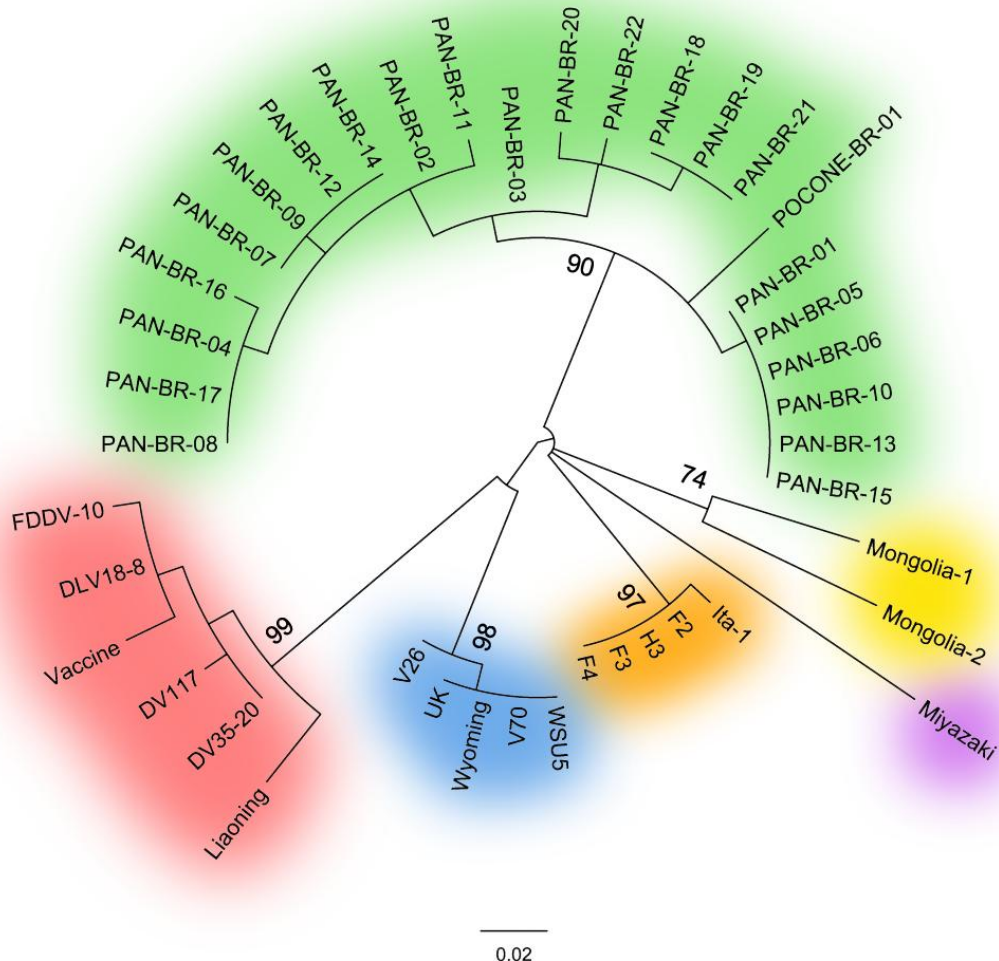


FIGURA 40: Análise filogenética de 23 sequências nucleotídicas do EIAV do Pantanal brasileiro para a região 5' LTR ao exon 1 do gene *tat* – Análise filogenética baseada em 42 sequências nucleotídicas do EIAV: 23 sequências nucleotídicas obtidas a partir do DNA proviral de equídeos do Pantanal brasileiro - PAN-BR-01 (MK158955), PAN-BR-02 (MK174360), PAN-BR-03 (MK174376), PAN-BR-04 (MK174361), PAN-BR-05 (MK158956), PAN-BR-06 (MK158957), PAN-BR-07 (MK174362), PAN-BR-08 (MK174363), PAN-BR-09 (MK174364), PAN-BR-10 (MK158958), PAN-BR-

11 (MK174365), PAN-BR-12 (MK174366), PAN-BR-13 (MK158959), PAN-BR-14 (MK174367), PAN-BR-15 (MK158960), PAN-BR-16 (MK174368), PAN-BR-17 (MK174369), PAN-BR-18 (MK174370), PAN-BR-19 (MK174371), PAN-BR-20 (MK174372), PAN-BR-21 (MK174373), PAN-BR-22 (MK174374), POCONE-BR-01 (MK174375); e 19 sequências mundiais do EIAV: 16 sequências de genoma completo - H3 (JX480634.1), F4 (JX480633.1), F3 (JX480632.1), F2 (JX480631.1), Liaoning (AF327877.1), Vaccine (AF327878), DV117 (HM141912.1), DLV18-8 (HM141923.1), DV35-20 (HM141911.1), FDDV-10 (GU385360.1), Wyoming (AF033820.1), EIAVuk (AF016316.1), WSU5 (AF247394.1), V26 (AB008197.1), V70 (AB008196.1), e Miyazaki 2011-A (JX003263.1), três sequências parciais - Ita-1 (EU240733.1), Mongólia-1 (LC185347.1) e Mongólia 2 (LC190840.2). A árvore filogenética foi inferida utilizando o método de máxima verossimilhança junto com o modelo General Time Reversible e Gama distributed no programa Mega versão 6.0 (TAMURA *et al.*, 2013). Os valores de bootstrap foram determinados baseado em 1000 interações. O clado das sequências do Brasil está destacado em verde, da China em vermelho, dos Estados Unidos em azul, do Japão em roxo, da Irlanda em laranja, e da Mongólia em amarelo.

5.2.2.2. Análise molecular empregando as sequências nucleotídicas da região do exon 1 do gene *tat* (nt 380) ao gene *gag* (nt 672) amplificadas de amostras de equídeos do Pantanal brasileiro

Empregando o PCR para amplificar a região do exon 1 do gene *tat* ao gene *gag* (EIAV-tat-380-F e EIAV-gag-672-R2) de 58 amostras positivas foram obtidas 49 sequências nucleotídicas, incluindo a sequência para a amostra POCONE-BR. A figura 41 mostra o alinhamento das 49 sequências nucleotídicas de 272 pb do EIAV de equídeos do Pantanal brasileiro para o exon 1 do gene *tat* ao gene *gag* com sete sequências mundiais do EIAV, sendo quatro sequências de genoma completo: Liaoning (China), Wyoming (Estados Unidos), Miyazaki (Japão) e H3 (Irlanda), e três sequências parciais da Itália (Ita-1, SA e DE).

A numeração da sequência nucleotídica que se estende do exon 1 do gene *tat* ao gene *gag* para as sequências do Pantanal foi baseado na sequência Miyazaki previamente caracterizada (DONG *et al.*, 2013). As sequências obtidas para as amostras brasileiras correspondem à posição no genoma 400 a 671 em relação à sequência Miyazaki, sendo que o exon 1 do gene *tat* corresponde a posição 400 a 444 (45 pb), região não codificadora (NCR) corresponde a posição 445 a 449 (5 pb), o gene *gag* corresponde a posição 450 a 671 (222 pb), correspondendo a proteína p15 (Figura 41).

No alinhamento pode-se observar regiões conservadas e variáveis entre as sequências brasileiras, apresentando entre si 97 substituições nucleotídicas. Foram consideradas substituições nucleotídicas apenas quando as sequências brasileiras apresentaram bases diferentes em relação a todas sequências mundiais do EIAV analisadas no alinhamento. Quando se analisa somente as sequências brasileiras entre si, a sequência de 50 nucleotídeos para exon 1 do gene *tat* foi relativamente conservada, apresentando oito substituições nucleotídicas, sendo seis transições (nas posições 22, 24, 30, 37, 39 e 40 no alinhamento), uma transversão (na posição 5 no alinhamento), e uma pode ser transição ou transversão (na posição 32) dependendo em relação a qual sequência mundial do EIAV se compara.

A sequência de 222 nucleotídeos para gene *gag* apresentou 89 substituições nucleotídicas, sendo 53 transições (nas posições 59, 60, 65, 78, 85, 86, 88, 90, 109, 110, 113, 119, 121, 122, 125, 130, 132, 133, 137, 142, 149, 156, 161, 167, 168, 176, 179, 180, 181, 193, 197, 207, 209, 211, 212, 213, 215, 216, 217, 220, 227, 228, 230, 236, 237, 241, 242, 245, 249, 260, 263, 265 e 266 no alinhamento), 19 transversões (nas posições 67, 68, 72, 107, 108, 114, 115, 123, 128, 134, 141, 165, 69, 182, 188, 192, 221, 240, 259), e 17 podem ser transição ou transversão (nas posições 62, 63, 127, 129, 131, 143, 152, 184, 185, 186, 187, 191, 233, 239, 248, 257, 272) dependendo em relação a qual sequência mundial do EIAV se compara (Figura 41).

	GAGCAAAGCG	CTCAAGAACT	TAGAGAAGGT	GACGGTTCAG	GGTCTCAA	AAT	GAAAGC	GACTANTTGT
H3								
Liaoning				A . A		. GC	A . CTAA	TG . . . C . . .
Wyoming	. G			A . A		. G	A . CTA .	TG . . . C . . .
Miyazaki			. C	C G	AC . C .	AG . A
SA								
DE								
Ita-1							. G	
POCONE-BR-01	 C		. TC .	. A TT .	AG . A
PAN-BR-02	 G . C		. TC .		. G	A . T . .	CG . A
PAN-BR-03	 C TC G	. G TA .	AG . A
PAN-BR-04	 G . C		. TC .		. G	A . CT . .	CG . A
PAN-BR-05	 G TC .		. G CA .	AG . A
PAN-BR-06	 G . C		. TC .		. G	A . T . .	CG . A
PAN-BR-07	 G . C		. TC .		. G	A . CT . .	CG . A
PAN-BR-09	 G . C		. TC .		. G	A . T . .	CG . A
PAN-BR-11	 G . C		. TC .		. G	A . T . .	CG . A
PAN-BR-14	 C TC .		. G	A . T . .	CG . A
PAN-BR-15	 C TC .		. G TA .	. G . A
PAN-BR-18 A A C AC .		. G	A . T . .	. G . A
PAN-BR-19 A A C AC .		. G	A . CT . .	. G . A
PAN-BR-20 A A C TT CT . .	AG . A
PAN-BR-21 A A C AC .		. G	A . CT . .	. G . A
PAN-BR-23				. TC .		. GA CA .	AG . A
PAN-BR-24		 C TC .		. G	A . T . .	CG . A
PAN-BR-25	 C GTCA CTAT .	TG . G
PAN-BR-26	 C TC A G TAT .	AG . A
PAN-BR-27	 G . C		. TC .		. G	A . T . .	CG . A
PAN-BR-28	 G . C		. TC A G	A . CT . .	CG . A
PAN-BR-29	 C TC .		. G CTA .	AG . A
PAN-BR-7540	 C G TC CTA .	. G . A
PAN-BR-7544	 C TC GTAT .	. G . A
PAN-BR-7575	 C TT .		. GG GTA .	AG . A
PAN-BR-7612	 C TC .		. G TA .	CG . G
PAN-BR-7697	 C GTCA GCA .	AG . A
PAN-BR-7704	 C GTCA CAT .	AG . A
PAN-BR-7738 A A C AC .		. G	A . CT . .	. G . A
PAN-BR-7740	 G C TC .		. GG TA .	AG . A
PAN-BR-7961	 G . C		. TC .		. G	A . CT . .	CG . A
PAN-BR-7963	 C TC .		. G TA .	CG . G
PAN-BR-7984	 C TC .		. G GTA .	CG . G
PAN-BR-8002	 C TC .		. G CTA .	AG . A
PAN-BR-8003	 C G TC .		. G CTA .	. G . A
PAN-BR-8016	 C TC .		. G TA .	CG . G
PAN-BR-8054	 G C TC A TT .	AG . A
PAN-BR-8083	. C A A C AC .		. G	A . CT . .	. G . A
PAN-BR-8084	 G . C		. TC .		. G	A . T . .	CG . A
PAN-BR-8086	 G . C		. TC .		. G	A . CT . .	CG . A
PAN-BR-8087	 G . C		. TC .		. G	A . CT . .	CG . A
PAN-BR-8098	 C AC AA G GTA .	AG . A
PAN-BR-8103	 C TC .		. G CTA .	AG . A
PAN-BR-8117	 C TC .		. G TAT .	. AA . C
PAN-BR-8135	 C TC .		. G TA .	CG . G
PAN-BR-8145	 C TC .		. G GTAT .	. G . A . C
PAN-BR-8147 A A C AC .		. G	A . CT . .	. G . A
PAN-BR-8156	 C TC .		. G CTA .	AG . A . C
PAN-BR-8159 A A C AC .		. G	A . CT . .	. G . A

80 90 100 110 120 130 140

	CTGTGGGCGC	TAAGTTGGT	GCACTTACTG	CATGACACCA	ATTCAGTAA	AGAAAAAGAC	TGGCAATGA
H3	CTGTGGGCGC	TAAGTTGGT	GCACTTACTG	CATGACACCA	ATTCAGTAA	AGAAAAAGAC	TGGCAATGA
Liaoning	AAT	G.A	A	T.C	TT		A
Wyoming	AAT	C.A	A	T.T	T	C.TGTA	GC
Miyazaki	AAC		T	T.C	C	T.TG	G.G
SA							
DE							
Ita-1							
POCONE-BR-01	AAT		T	GTAT	ATTG	G	
PAN-BR-02	AAA		T	GTAT	G G	GGTG	G G
PAN-BR-03	AAT		A	T	GT T	TGTA	G
PAN-BR-04	AAC		T	GTAT		GGTG	G
PAN-BR-05	AAC		T	GTAT		ATG.G	G
PAN-BR-06	AAA		T	GTAT		GGTG	G
PAN-BR-07	AAA		T	GTAT		GGTG	G
PAN-BR-09	.AA		T	GTAT		GGTG	G
PAN-BR-11	AAC		T	GTAT		GGTG	G
PAN-BR-14	AGA		T	GTAT		GGTG	G
PAN-BR-15	AAT		T	GTAT	TG	C	T.TG
PAN-BR-18	AAT		C	T	TAT		TGTA
PAN-BR-19	AAT		C	T	GTAT		TGTA
PAN-BR-20	AAC		T	GT T		TGTA	G
PAN-BR-21	AAT		C	T	GTAT		TGTA
PAN-BR-23	AAC		T	GTAT		ATG.G	G
PAN-BR-24	.AA	G	T	GTAT		G.TG	G
PAN-BR-25	AAT		T	GT T		C	TGTA
PAN-BR-26	AAT		T	GTAT	G	C	T.TG
PAN-BR-27	AAA		T	GTAT		GGTG	G
PAN-BR-28	AAA	A	T	GTAT	G		GGTG
PAN-BR-29	AAT		A	T	GT T	T	ATGTG
PAN-BR-7540	AAT		T	GT T		ATGTG	G
PAN-BR-7544	AAT		T	G T		ATGTA	G
PAN-BR-7575	AAT		T	GT T		TG.G	G
PAN-BR-7612	AAT		A	T	GT T		T.TG
PAN-BR-7697	AAT		T	TAT		G	GG.CG
PAN-BR-7704	AAT		A	T	GT T		T.TG
PAN-BR-7738	AAT		C	T	GTAT		TGTA
PAN-BR-7740	AAT		T	GT T		TG.G	G
PAN-BR-7961	AAA		T	GTAT		GGTG	G
PAN-BR-7963	AAT		A	T	GT T		T.TG
PAN-BR-7984	AAT		A	T	GT T		T.TG
PAN-BR-8002	AAT		T	GT T		TGTA	G
PAN-BR-8003	AAT		T	GT T		ATGTG	T
PAN-BR-8016	AAT		A	T	G T		T.TG
PAN-BR-8054	AAT		T	GTAT		ATTG	G
PAN-BR-8083	AAT		C	T	GTAT		TGTA
PAN-BR-8084	AAA		T	TAT		GGTG	G
PAN-BR-8086	AAA		T	GTAT		GGTG	G
PAN-BR-8087	AAA		T	GTAT		GGTG	G
PAN-BR-8098	AAC		T	GT T		AT.TG	G
PAN-BR-8103	AAT		T	T T		ATCAG	G
PAN-BR-8117	AAT		A	T	T T		TGTA
PAN-BR-8135	AAT		A	TG	G T		G
PAN-BR-8145	AAT		T	T T		TGTA	G
PAN-BR-8147	AAT		C	T	GTAT		TGTA
PAN-BR-8156	AAT	T	T	TAT		ATGTG	G
PAN-BR-8159	AAT		C	T	GTAT		TGTA

150 160 170 180 190 200 210

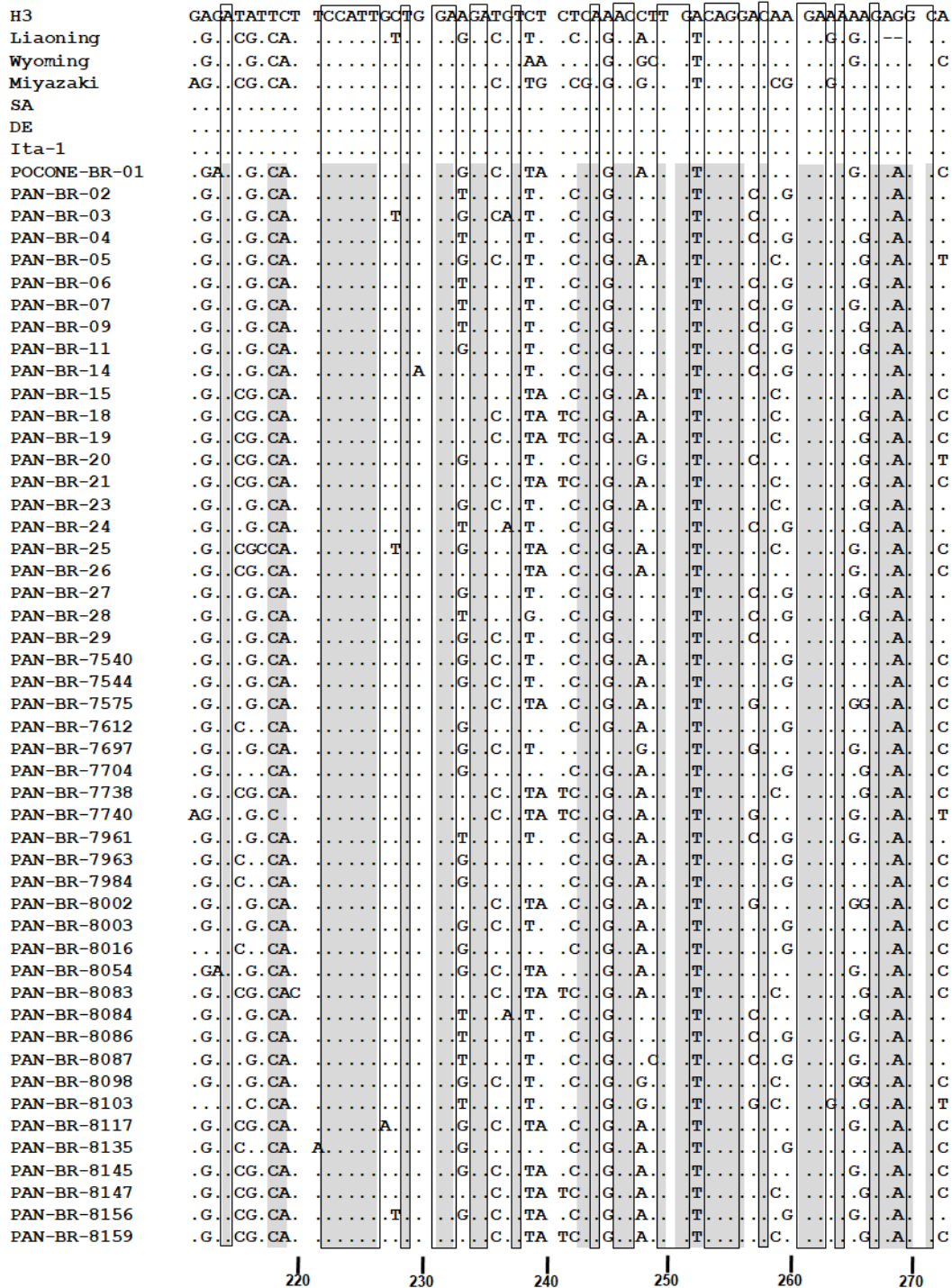


FIGURA 41: Alinhamento das sequências nucleotídicas do EIAV de amostras de equídeos do Pantanal brasileiro para o exon 1 do gene *tat* ao gene *gag* – Alinhamento de 56 sequências nucleotídicas de 272 pb do EIAV: 49 sequências obtidas a partir de DNA proviral de equídeos do Pantanal brasileiro com sete sequências mundiais do EIAV, sendo quatro sequências de genoma completo: H3 (JX480634.1), Liaoning (AF327877.1), Wyoming (AF033820.1), e Miyazaki (JX003263.1); e três sequências parciais: Ita1 (EU240733.1), SA (KM247555.2) e DE (KM247554.1). O alinhamento foi feito no programa Mega, versão 6.0 (TAMURA *et al.*, 2013). Regiões conservadas em todas as sequências estão identificadas por retângulos pretos, e regiões conservadas somente nas sequências de EIAV do Pantanal estão destacadas em cinza. O início e fim do exon 1 do gene *tat*

e início do gene *gag* estão destacados no topo da figura, e o número de nucleotídeos da sequência estão identificados na base da figura.

As sequências brasileiras apresentaram valores variáveis de similaridade nucleotídica entre si variando de 85% a 100%, e quando comparadas as sequências de EIAV mundiais apresentaram similaridade nucleotídica variável, de 77,6% a 84,3% com H3 (Irlanda), 78,1% a 87,4% com Liaoning (China), 78,9% a 86,5% com Wyoming (Estados Unidos), 78,8% a 84,1% com Miyazaki (Japão),, 77,6% a 84,3% com SA e DE (Itália) (Tabela 11).

Tabela 11: Similaridade nucleotídica de 55 sequências nucleotídicas do EIAV para o exon 1 do gene *tat* ao gene *gag* de amostras amplificadas de equídeos do Pantanal brasileiro*

	H3	Liãoing	Wyoming	DE	SA	Miyazaki	POCONE-BR-01	PAN-BR-23	PAN-BR-02	PAN-BR-03	PAN-BR-04	PAN-BR-05	PAN-BR-06	PAN-BR-24	PAN-BR-07	PAN-BR-09	PAN-BR-27	PAN-BR-11	PAN-BR-25	PAN-BR-26	PAN-BR-14	PAN-BR-15	PAN-BR-28	
H3	81,3																							
Liãoing	80,3	85,0																						
Wyoming	100,0	81,3	80,3																					
DE	100,0	81,3	80,3	100,0																				
SA	77,1	79,7	80,5	77,1	77,1																			
Miyazaki	77,1	79,7	80,5	77,1	77,1																			
POCONE-BR-01	82,2	81,6	83,0	82,2	82,2	81,7																		
PAN-BR-23	82,3	83,7	80,5	82,3	83,6	92,1																		
PAN-BR-02	81,4	79,1	79,5	81,4	80,9	89,0																		
PAN-BR-03	82,5	84,7	83,6	82,5	82,6	92,1	92,9	92,1																
PAN-BR-04	81,3	80,2	80,6	81,3	81,3	81,4	89,0	91,2	98,1	92,1														
PAN-BR-05	82,3	83,3	80,1	82,3	82,3	82,6	91,7	98,5	89,0	92,0	90,3													
PAN-BR-06	81,9	79,6	80,0	81,9	81,9	81,4	89,5	91,2	98,9	92,6	99,3	90,3												
PAN-BR-24	81,9	79,0	78,9	81,9	81,9	81,3	88,1	90,3	96,6	91,7	97,0	89,4	97,8											
PAN-BR-07	81,3	81,1	81,5	81,3	81,3	80,8	89,9	89,9	98,5	92,1	98,9	89,0	98,9	96,6										
PAN-BR-09	81,9	78,5	79,9	81,9	81,9	81,3	88,6	91,1	98,1	91,7	98,5	90,3	99,3	98,5	98,1									
PAN-BR-27	81,9	80,1	80,0	81,9	81,9	81,4	89,9	91,6	98,5	93,0	98,9	90,8	99,6	97,4	98,5	98,9								
PAN-BR-11	81,9	80,2	80,1	81,9	81,9	82,0	90,0	92,1	98,1	93,0	99,3	91,2	99,3	97,0	98,1	98,5	99,6							
PAN-BR-25	77,6	85,2	84,3	77,6	77,6	82,7	89,9	89,1	86,8	89,9	87,7	88,7	87,2	85,4	88,6	86,3	87,7	87,7						
PAN-BR-26	79,8	82,5	84,0	79,8	79,8	83,0	92,2	90,8	89,5	91,3	88,6	90,4	89,1	89,0	89,5	89,0	89,1	89,1	91,3					
PAN-BR-14	81,9	79,1	80,0	81,9	81,9	81,4	88,6	89,9	97,0	91,8	96,6	89,0	97,4	95,8	97,0	96,6	97,4	97,0	86,8	88,7				
PAN-BR-15	80,8	81,6	83,6	80,8	80,8	84,1	91,3	91,7	89,9	91,3	89,1	91,3	89,5	89,5	89,0	89,5	89,5	89,6	90,9	97,7	89,1			
PAN-BR-28	79,8	78,1	79,1	79,8	79,8	78,8	88,1	89,0	97,0	97,0	90,4	98,1	88,0	98,1	95,8	97,8	97,4	97,7	97,4	85,9	87,7	95,4	88,1	
PAN-BR-29	82,4	83,7	84,4	82,4	82,4	82,5	92,9	93,7	92,9	93,8	92,9	93,4	91,7	93,8	92,5	95,8	95,8	89,9	90,8	92,6	90,8	92,1		
PAN-BR-18	80,8	82,2	83,2	80,8	80,8	82,7	90,0	91,3	88,6	89,5	89,4	90,9	89,9	88,1	88,5	89,0	89,9	89,9	88,8	90,0	89,0	91,8	87,6	
PAN-BR-19	79,7	82,2	83,2	79,7	79,7	81,7	90,0	91,3	88,5	89,5	90,3	90,9	89,8	88,0	89,4	88,9	89,9	89,9	89,6	90,0	89,0	91,7	88,5	
PAN-BR-20	81,2	80,8	83,1	81,2	81,2	82,5	89,0	89,5	89,9	90,4	92,1	89,5	91,2	89,9	90,8	90,3	91,6	92,1	88,7	87,8	89,9	87,8	89,9	
PAN-BR-21	79,7	82,2	83,2	79,7	79,7	81,7	90,0	91,3	88,5	89,5	90,3	90,9	89,8	88,0	89,4	88,9	89,9	89,9	89,6	90,0	89,0	91,7	88,5	
PAN-BR-7540	82,8	83,7	83,1	82,8	82,8	83,1	94,2	93,3	91,2	94,4	92,1	92,9	91,6	89,9	92,0	90,7	92,0	92,1	91,7	91,3	90,8	92,1	90,3	
PAN-BR-7544	83,3	83,1	82,6	83,3	83,3	82,2	93,4	92,5	90,4	93,4	90,8	92,1	90,8	89,0	90,8	89,9	91,2	91,3	91,2	91,3	90,0	91,3	89,0	
PAN-BR-7575	81,4	84,7	84,2	81,4	81,4	82,7	91,7	93,4	88,2	92,1	89,5	93,0	89,5	88,6	89,4	89,5	89,5	90,1	93,0	88,6	92,2	87,6		
PAN-BR-7612	83,8	82,8	81,4	83,8	83,8	80,7	90,5	90,0	90,9	92,6	90,9	89,6	91,3	90,4	90,8	90,4	91,7	91,7	90,9	91,3	90,9	91,3	89,5	
PAN-BR-7697	83,2	81,7	83,5	83,2	83,2	81,4	92,1	89,5	87,8	89,5	88,2	90,0	88,2	87,3	89,0	87,3	88,7	88,7	88,2	88,7	87,3	87,8	86,3	
PAN-BR-7704	83,4	82,8	82,8	83,4	83,4	81,7	90,5	90,8	89,1	91,7	90,0	90,4	90,4	88,9	89,5	89,1	89,5	90,8	90,9	91,3	91,3	88,7	90,5	88,6
PAN-BR-7738	79,7	82,2	83,2	79,7	79,7	81,7	90,0	91,3	88,5	89,5	90,3	90,9	89,8	88,0	89,4	88,9	89,9	89,9	89,6	90,0	89,0	91,7	88,5	
PAN-BR-7740	80,5	82,8	82,7	80,5	80,5	82,7	90,9	92,1	87,7	92,1	87,7	93,0	88,1	87,2	88,5	88,1	88,2	88,2	88,7	93,0	88,2	92,1	85,8	
PAN-BR-7961	80,3	81,7	81,6	80,3	80,3	80,9	89,9	90,3	97,7	91,3	98,1	89,4	98,1	95,8	99,3	97,4	97,7	97,4	89,0	89,5	97,0	89,1	97,0	
PAN-BR-7963	83,8	82,8	81,4	83,8	83,8	80,7	90,5	90,0	92,6	90,9	89,6	91,3	90,4	90,8	90,4	91,7	91,7	90,9	91,3	90,5	91,8	89,5		
PAN-BR-7984	83,4	82,8	81,4	83,4	83,4	80,2	90,0	89,6	90,4	92,2	90,9	89,2	90,9	90,0	90,8	90,0	91,3	91,3	90,9	90,9	90,0	91,3	89,5	
PAN-BR-8002	81,3	85,2	85,6	81,3	81,3	83,7	93,0	93,7	89,5	93,4	91,2	93,3	90,8	89,9	91,2	90,7	90,8	90,8	91,8	94,2	89,9	93,4	89,5	
PAN-BR-8003	82,2	83,2	82,6	82,2	82,6	93,8	92,9	91,2	93,7	92,0	92,5	91,6	89,8	92,0	90,7	92,0	92,0	91,7	90,8	90,8	91,7	90,3		
PAN-BR-8016	84,3	81,4	79,9	84,3	84,3	80,2	89,2	88,7	89,6	91,3	89,6	88,3	90,0	89,1	89,6	89,1	90,5	90,5	90,1	89,2	90,5	88,2		
PAN-BR-8054	81,7	81,1	82,6	81,7	81,7	81,2	99,6	91,7	88,6	92,1	88,6	92,1	89,0	87,7	89,4	88,1	89,5	89,5	89,5	91,7	88,2	90,9	87,6	
PAN-BR-8084	82,3	80,1	80,5	82,3	82,3	80,8	89,0	90,8	97,8	93,0	98,1	89,9	98,9	97,4	97,8	98,1	98,5	98,1	86,8	88,6	96,2	89,1	97,0	
PAN-BR-8086	81,3	81,1	81,5	81,3	81,3	80,8	89,9	89,9	98,1	98,1	95,8	89,3	97,4	97,7	97,4	87,7	98,1	87,7	88,2	88,5	96,2	89,0	97,0	
PAN-BR-8087	80,8	80,6	82,0	80,8	80,8	80,3	89,4	89,4	98,1	91,7	98,5	88,5	98,5	98,2	99,6	97,7	98,1	97,7	88,1	89,0	96,6	88,6	97,4	
PAN-BR-8098	79,3	82,1	83,0	79,3	79,3	83,4	90,8	92,9	87,6	91,1	89,4	92,5	88,9	88,9	88,9	88,9	89,4	89,4	86,9	89,5	87,6	90,4	88,5	
PAN-BR-8103	81,7	81,7	82,9	81,7	81,7	82,9	88,6	91,7	88,5	90,3	91,7	89,8	89,8	89,4	89,4	88,9	89,4	88,9	89,5	87,6	90,4	88,5		
PAN-BR-8117	79,9	85,1	85,1	79,9	79,9	81,8	90,1	89,6	86,9	90,9	86,9	89,2	87,3	86,4	87,7	87,3	87,8	87,8	89,7	92,2	86,9	91,4	85,0	
PAN-BR-8135	82,7	80,7	79,7	82,7	82,7	79,1	88,7	88,1	89,1	90,8	89,1	87,7	89,5	88,6	89,0	88,6	90,0	89,5	90,0	89,5	90,0	88,7	90,4	87,7
PAN-BR-8145	80,9	87,4	86,5	80,9	80,9	83,7	91,7	91,3	88,6	91,7	89,1	90,9	89,1	88,2	89,9	89,0	89,5	88,6	91,8	93,8	88,7	93,0	87,2	
PAN-BR-8147	79,7	82,2	83,2	79,7	79,7	81,7	90,0	91,3	88,5	89,5	90,9	89,8	88,0	89,4	88,9	89,9	89,9	89,9	89,6	90,0	89,0	91,7	88,5	
PAN-BR-8156	78,2	87,0	84,1	78,2	78,2	83,6	91,3</																	

Foi feito o alinhamento da sequência de 15 aminoácidos deduzidas de EIAV para as 49 sequências do Pantanal a partir de uma sequência nucleotídica de 50 pb para o exon 1 do gene *tat* com sete sequências de EIAV mundiais, sendo quatro sequências de genoma completo: Liaoning (China), Wyoming (Estados Unidos), Miyazaki (Japão) e H3 (Irlanda), e três sequências parciais da Itália (Ita-1, SA e DE). As sequências brasileiras apresentaram três mutações de aa em relação às demais sequências mundiais, todas não-conservativas. Foram consideradas mutações apenas quando a troca de aa na sequência brasileira foi diferente em relação a todas as sequências mundiais. Houve troca de uma prolina (P) por uma serina (S) na sequência PAN-BR-8117 na posição 8 no alinhamento e troca de uma isoleucina (I) por uma serina (S) ou asparagina (N) na sequência PAN-BR-20 na posição 11 no alinhamento. Também houve troca de glicina (G) por arginina (R) para as sequências PAN-BR-7612, PAN-BR-7963, PAN-BR-7984, PAN-BR-8016 e PAN-BR-8135 na posição 13 do alinhamento (Figura 42).

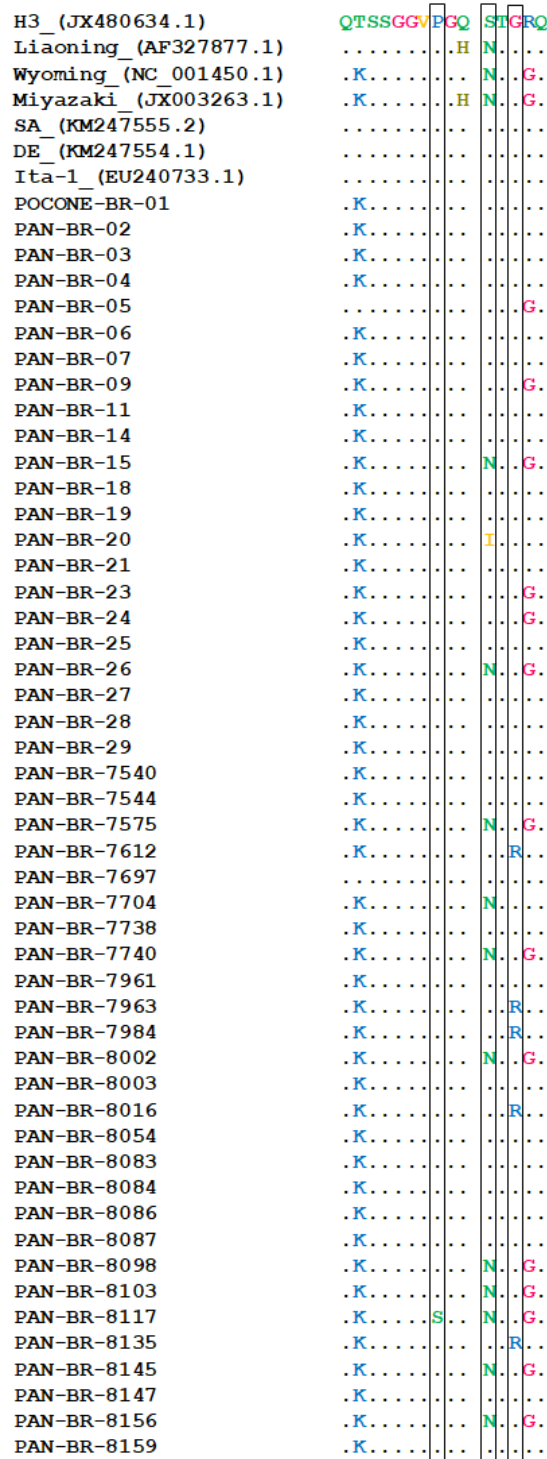


FIGURA 42: Alinhamento das seqüências de aminoácidos do EIAV obtidas de amplificação de DNA de amostras de equídeos do Pantanal brasileiro para o exon 1 do gene *tat* – Alinhamento de 30 seqüências de 15 aminoácidos cada para o exon 1 do gene *tat*. 23 seqüências de aminoácidos obtidas a partir de DNA proviral de equídeos do Pantanal brasileiro com sete seqüências mundiais do EIAV, sendo quatro seqüências de genoma completo: H3, Liaoning, Wyoming, e Miyazaki; e três seqüências parciais: Ita1, Mongolia-1 e Mongolia-2. O número de acesso para cada seqüência está identificado entre parênteses. O alinhamento foi realizado no programa MEGA versão 6 (TAMURA *et al.*, 2013). Alanina (A), Cisteína (C), Ácido aspártico (D), Ácido glutâmico (E), Fenilalanina (F), Glicina (G), Histidina (H), Isoleucina (I), Lisina (K), Leucina (L), Metionina (M), Asparagina (N), Prolina (P),

Glutamina (Q), Arginina (R), Serina (S), Treonina (T), Valina (V), Triptofano (W), Tirosina (Y). Regiões variáveis nas sequências Brasileiras em relação às demais sequências estão identificadas por retângulos pretos.

Existem muitas sequências mundiais para o gene *gag* disponíveis no GenBank algumas do gene completo e outras parciais. Foi feito o alinhamento dessas sequências que correspondem a mesma região de *gag* caracterizada para as 49 sequências do Pantanal brasileiro. No total, 65 sequências, sendo quatro sequências de genoma completo: Liaoning (China), Wyoming (Estados Unidos), Miyazaki (Japão) e H3 (Irlanda) e 61 sequências parciais: duas do Japão (Tokyo 548V e Goshun 482V), três da Bélgica (Warsage clone 2, Warsage clone 1 e Assebroek clone 1), 12 da França (Gag-EIAV-FR-1, 2, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 11, 12, 13 e 14), 28 da Eslovênia (SLO-1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 11, 12, 13, 14, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 26, 27, 28, 29, 30 e 31), oito da Itália (SA, DE, Ita-1, 2, 3, 4, 5 e 6), quatro da Romênia (Rom-1, 2, 4 e 5), quatro do Canadá (Can1, 3, 7 e 10), e uma da Alemanha (EIAVGER-1), foram usadas (Figura 43).

	ATGGGAGACC	CAGTGACATG	GAGCAAAGCG	CTCAAGAAGT	TAGAGAAGGT	GACGGTTCAG
H3_ (JX480634.1)						
Liaoning_ (AF327877.1)		T				A..A
Wyoming_ (NC_001450.1)		TT		G		A..A
Miyazaki_ (JX003263.1)	G	T	C	AT		C...
SA_ (KM247555.2)						
DE_ (KM247554.1)						
POCONE-BR-01		T			C	TC
PAN-BR-02		A	T		G	C
PAN-BR-03		T	T		C	TC
PAN-BR-04		A	T		G	C
PAN-BR-05		C	T		G	TC
PAN-BR-06		A	T		G	C
PAN-BR-07		A	T		G	C
PAN-BR-09		A	T		G	C
PAN-BR-11		A	T		G	C
PAN-BR-14		A	A	T		C
PAN-BR-15		G	T			C
PAN-BR-18		C	G	A	A	C
PAN-BR-19		C	G	A	A	C
PAN-BR-20		T	T	A		C
PAN-BR-21		C	G	A	A	C
PAN-BR-23		C	T			C
PAN-BR-24		A	T			C
PAN-BR-25	T	C	T			C
PAN-BR-26	G	T				C
PAN-BR-27		A	T			G
PAN-BR-28		A	T			G
PAN-BR-29		T				C
PAN-BR-7540		GT				C
PAN-BR-7544		GT				C
PAN-BR-7575		C	T			C
PAN-BR-7612		T				C
PAN-BR-7697		T				C
PAN-BR-7704		T				C
PAN-BR-7738		C	G	A	A	C
PAN-BR-7740		GC	T		G	C
PAN-BR-7961		A	A	T		G
PAN-BR-7963		T				C
PAN-BR-7984		T				C
PAN-BR-8002		C	T			C
PAN-BR-8003		GT				C
PAN-BR-8016		T				C
PAN-BR-8054	T	T			G	C
PAN-BR-8083		C	G	C	A	A
PAN-BR-8084		A	T			G
PAN-BR-8086		A	T			G
PAN-BR-8087		A	T			G
PAN-BR-8098		G	G			C
PAN-BR-8103		T				C
PAN-BR-8117		T	T			C
PAN-BR-8135		T				C
PAN-BR-8145		T	T			C
PAN-BR-8147		C	G	A	A	C
PAN-BR-8156		T	T			C
PAN-BR-8159		C	G	A	A	C
Tokyo_548V_ (AB675094.1)	G	T	T			C
Goshun_482V_ (AB675093.1)			GT	A		C
Warsage_clone_2_ (JX193072.1)						C
Warsage_clone_1_ (JX193071.1)						C
Assebroek_clone_1_ (JX193070.1)		T				C

10 20 30 40 50 60

H3 (JX480634.1)
 Liaoning (AF327877.1)
 Wyoming (NC 001450.1)
 Miyazaki (JX003263.1)
 SA (KM247555.2)
 DE (KM247554.1)
 POCONE-BR-01
 PAN-BR-02
 PAN-BR-03
 PAN-BR-04
 PAN-BR-05
 PAN-BR-06
 PAN-BR-07
 PAN-BR-09
 PAN-BR-11
 PAN-BR-14
 PAN-BR-15
 PAN-BR-18
 PAN-BR-19
 PAN-BR-20
 PAN-BR-21
 PAN-BR-23
 PAN-BR-24
 PAN-BR-25
 PAN-BR-26
 PAN-BR-27
 PAN-BR-28
 PAN-BR-29
 PAN-BR-7540
 PAN-BR-7544
 PAN-BR-7575
 PAN-BR-7612
 PAN-BR-7697
 PAN-BR-7704
 PAN-BR-7738
 PAN-BR-7740
 PAN-BR-7961
 PAN-BR-7963
 PAN-BR-7984
 PAN-BR-8002
 PAN-BR-8003
 PAN-BR-8016
 PAN-BR-8054
 PAN-BR-8083
 PAN-BR-8084
 PAN-BR-8086
 PAN-BR-8087
 PAN-BR-8098
 PAN-BR-8103
 PAN-BR-8117
 PAN-BR-8135
 PAN-BR-8145
 PAN-BR-8147
 PAN-BR-8156
 PAN-BR-8159
 Tokyo_548V (AB675094.1)
 Goshun_482V (AB675093.1)
 Warsage_clone_2 (JX193072.1)
 Warsage_clone_1 (JX193071.1)
 Assebroek_clone_1 (JX193070.1)

```

GGGTCTCAAA AATTGAAAGC GAGTAATTGT CTGTGGGCGC TAAGTTTGGT GGACTIONACTG
.....G. ....A.CTAA TG...C... AAT..... G.A.....A.....T.C
.....G. ....A.CTA. TG...C... AAT..... C.A...A.....T.T
...C.G. ....AC..C. AG.A... AAC..... T...T.C
.....TT. AG.A... AAT..... T...GTAT
...G.A..T.. CG.A... AAA..... T...GTAT
...G....TA. AG.A... AAT..... A...T...GT.T
...G.A.CT.. CG.A... AAC..... T...GTAT
...G....CA. AG.A... AAC..... T...GTAT
...G.A..T.. CG.A... AAA..... T...GTAT
...G.A.CT.. CG.A... AAA..... T...GTAT
...G.A..T.. CG.A... AA..... T...GTAT
...G.A..T.. CG.A... AGA..... T...GTAT
...G....TA. .G.A... AAT..... T...GTAT
...G.A..T.. .G.A... AAT..... C.....T...TAT
...G.A.CT.. .G.A... AAT..... T...GTAT
...G....CT.. AG.A... AAC..... T...GT.T
...G.A.CT.. .G.A... AAT..... C.....T...GTAT
...G.A..T.. CG.A... AA..... G.....T...GTAT
...G....CTAT TG.G... AAT..... T...GT.T
...A....G....TAT AG.A... AAT..... T...GTAT
...G.A..T.. CG.A... AAA..... T...GTAT
...A....G.A.CT.. CG.A... AAA..... A.....T...GTAT
...G....CTA. AG.A... AAT..... A...T...GT.T
...G....CTA. .G.A... AAT..... T...GT.T
...G....GTAT .G.A... AAT..... T...G..T
GG....GTA. AG.A... AAT..... T...GT.T
...G....TA. CG.G... AAT..... A...T...GT.T
...G....CAT. AG.A... AAT..... A...T...GT.T
...G.A.CT.. .G.A... AAT..... C.....T...GTAT
GG....TA. AG.A... AAT..... T...GT.T
...G.A.CT.. CG.A... AAA..... T...GTAT
...G....TA. CG.G... AAT..... A...T...GT.T
...G....GTA. CG.G... AAT..... A...T...GT.T
...G....CTA. AG.A... AAT..... T...GT.T
...G....CTA. .G.A... AAT..... T...GT.T
...G....TA. CG.G... AAT..... A...T...G..T
...A....TT. AG.A... AAT..... T...GTAT
...G.A.CT.. .G.A... AAT..... C.....T...GTAT
...G.A..T.. CG.A... AAA..... T...TAT
...G.A.CT.. CG.A... AAA..... T...GTAT
...G.A.CT.. CG.A... AAA..... T...GTAT
...AA....G....GTA. AG.A... AAC..... T...GT.T
...G....CTA. AG.A... AAT..... T...T.T
...G....TAT ..AA.C. AAT..... A...T...T.T
...G....TA. CG.G... AAT..... A...TG...T
...G....GTAT .G.A.C. AAT..... T...T.T
...G.A.CT.. .G.A... AAT..... C.....T...GTAT
...G....CTA. AG.A.C. AAT..... T...TAT
...G.A.CT.. .G.A... AAT..... C.....T...GTAT
...C....A.C.A. .G.A... AAT..... C.....T...GT.T
...G....ATC.CT AG.A... AAT..... C.A...T...TAT
...C.G....G....C.CA TG.A... AAC..... C.....T...T..
...C....G....C.CA TG.A... AAC..... C.....T...T..
...A.CT.T TG... AAT..... T...T.C
    
```

70 80 90 100 110 120

H3 (JX480634.1)
 Liaoning_(AF327877.1)
 Wyoming_(NC_001450.1)
 Miyazaki_(JX003263.1)
 SA_(KM247555.2)
 DE_(KM247554.1)
 POCONE-BR-01
 PAN-BR-02
 PAN-BR-03
 PAN-BR-04
 PAN-BR-05
 PAN-BR-06
 PAN-BR-07
 PAN-BR-09
 PAN-BR-11
 PAN-BR-14
 PAN-BR-15
 PAN-BR-18
 PAN-BR-19
 PAN-BR-20
 PAN-BR-21
 PAN-BR-23
 PAN-BR-24
 PAN-BR-25
 PAN-BR-26
 PAN-BR-27
 PAN-BR-28
 PAN-BR-29
 PAN-BR-7540
 PAN-BR-7544
 PAN-BR-7575
 PAN-BR-7612
 PAN-BR-7697
 PAN-BR-7704
 PAN-BR-7738
 PAN-BR-7740
 PAN-BR-7961
 PAN-BR-7963
 PAN-BR-7984
 PAN-BR-8002
 PAN-BR-8003
 PAN-BR-8016
 PAN-BR-8054
 PAN-BR-8083
 PAN-BR-8084
 PAN-BR-8086
 PAN-BR-8087
 PAN-BR-8098
 PAN-BR-8103
 PAN-BR-8117
 PAN-BR-8135
 PAN-BR-8145
 PAN-BR-8147
 PAN-BR-8156
 PAN-BR-8159
 Tokyo_548V_(AB675094.1)
 Goshun_482V_(AB675093.1)
 Warsage_clone_2_(JX193072.1)
 Warsage_clone_1_(JX193071.1)
 Assebroek_clone_1_(JX193070.1)

```

GAAGATGCT CTCAAACCTT GACAGGACAA GAAAAAGAGG CA
..G..C..T..C..G..A..T.....G.G.--..
.....AA...G..GC..T.....G.....C
.....C..TG..CG..G..G..T.....CG..G.....
.....
..G..C..TA...G..A..T.....G..A..C
..T...T..C..G.....T...C..G.....A..
..G..CA..T..C..G.....T...C...A..
..T...T..C..G.....T...C..G.....G..A..
..G..C..T..C..G..A..T...C...G..A..T
..T...T..C..G.....T...C..G.....G..A..
..T...T..C..G.....T...C..G.....G..A..
..G...T..C..G.....T...C..G.....G..A..
.....T..C..G.....T...C..G.....A..
.....TA..C..G..A..T...C...A..C
.....C..TA..TC..G..A..T...C...G..A..C
.....C..TA..TC..G..A..T...C...G..A..C
..G...T..C...G...T...C...G..A..T
.....C..TA..TC..G..A..T...C...G..A..C
..T...A..T..C..G.....T...C..G.....G..A..
..G...TA..C..G..A..T...C...G..A..C
.....TA..C..G..A..T...G...G..A..C
..G...T..C..G.....T...C..G.....G..A..
..T...G..C..G.....T...C..G.....G..A..
..G..C..T..C..G..A..T...G...G..A..C
..G..C..T..C..G..A..T...G...G..A..C
..G..C..TA...G..A..T...G...G..A..C
.....C..TA..TC..G..A..T...C...G..A..C
..T...A..T..C..G.....T...C...G..A..
..T...T..C..G.....T...C..G.....G..A..
..G..C..T..C..G..G..T...C...GG..A..C
..T...T...G..G..T...G..C...G..A..T
..G..C..TA..C..G..A..T...G...G..A..C
..G...C..TA..TC..G..A..T...C...G..A..C
..G..C..TA..C..G..A..T...G...G..A..
.....C..TA..TC..G..A..T...C...G..A..C
.....TC..T...G..A..T...G...G...
..G..C..TA..C..G..A..T...CC...GG..T..
..G..C..AA..C..G..A...C...G.G...
..G..C..AA..C..G..A...C...G.G...
.....TC..AGA..T..A..A..G..G...CG...

```

190 200 210 220 222

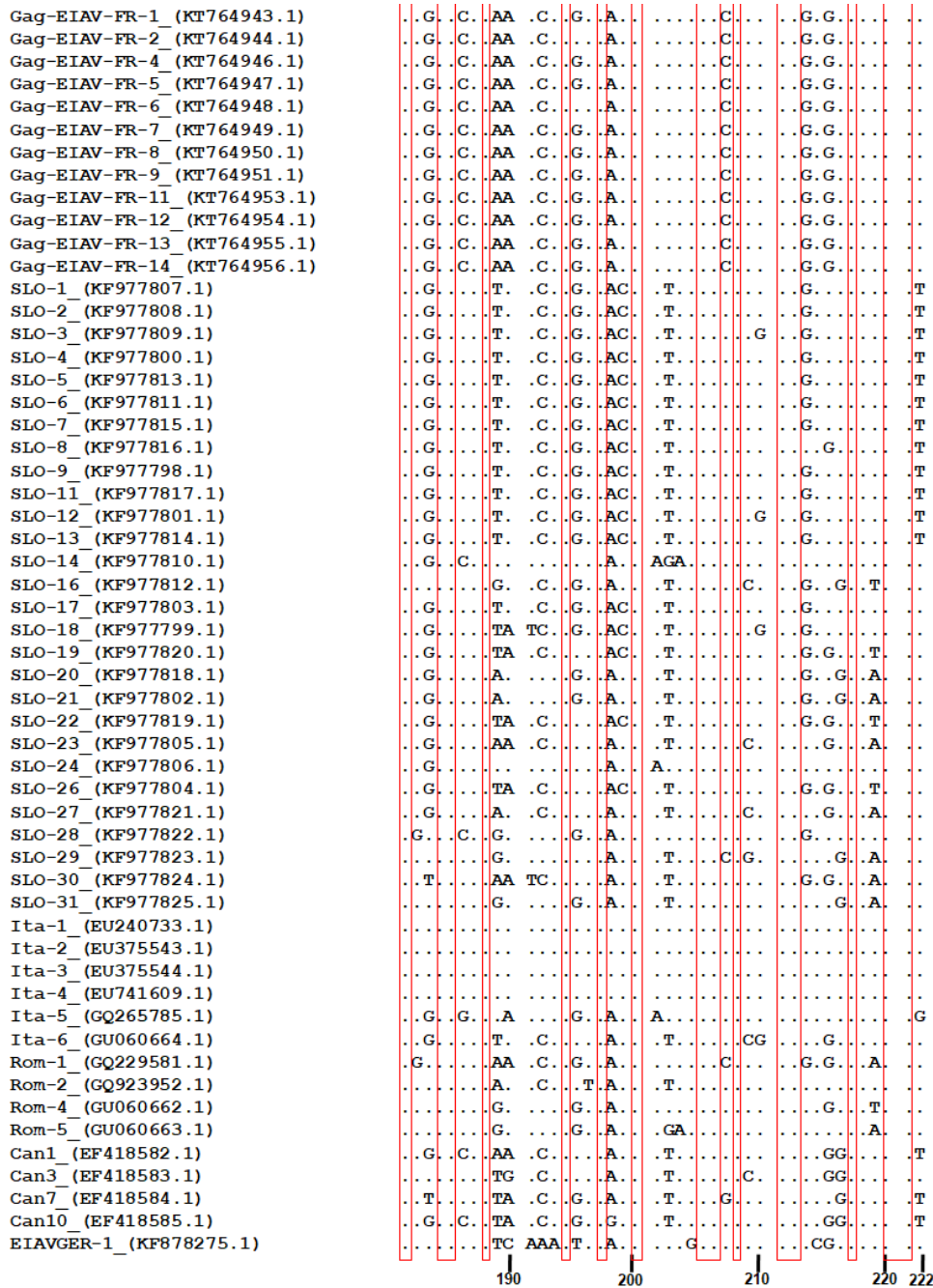


FIGURA 43: Alinhamento das seqüências nucleotídicas do EIAV de amostras de equídeos do Pantanal brasileiro para o gene gag – Alinhamento de 115 seqüências nucleotídicas de 222 pb do EIAV: 49 seqüências obtidas a partir de DNA proviral de equídeos do Pantanal brasileiro com 65 seqüências mundiais do EIAV, sendo quatro seqüências de genoma completo: H3, Liaoning, Wyoming, Miyazaki; e 61 seqüências parciais: duas do Japão (Tokyo 548V e Goshun 482V), três da Bélgica (Warsage clone 2, Warsage clone 1 e Assebroek clone 1), 12 da França (Gag-EIAV-FR-1, 2, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 11, 12, 13 e 14), 28 da Eslovênia (SLO-1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 11, 12, 13, 14, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 26, 27, 28, 29, 30 e 31), sete da Itália (SA, DE, Ita-2, 3, 4, 5 e 6), quatro da Romênia (Rom-1, 2, 4 e 5), quatro do Canadá (Can1, 3, 7 e 10), e uma da Alemanha (EIAVGER-1). O número de acesso para cada seqüência está entre parênteses no alinhamento. O alinhamento foi feito no programa Mega, versão 6.0 (TAMURA *et al.*, 2013). Regiões conservadas em todas as seqüências estão identificadas por retângulos vermelhos. O número de nucleotídeos das seqüências

está identificado na base da figura. O alinhamento das 115 sequências está dividido entre duas páginas.

A similaridade nucleotídica entre as 65 sequências parciais e as sequências brasileiras para o fragmento de 222 pb correspondente a proteína p15 do gene *gag* foi variável. As sequências brasileiras apresentaram valores de similaridade nucleotídica entre si variando de 81,1% a 100%. Quando comparadas as sequências de EIAV mundiais apresentaram valores de similaridade nucleotídica de 70% a 88,9% (Tabela 12): 73% a 82,7% com H3 (Irlanda); 74,3% a 85,5% com Liaoning (China); 73,8% a 83,1% com Wyoming (Estados Unidos); 76,3% a 81,7% com Miyazaki (Japão); 73% a 82,7% com SA e DE (Itália); 79,4% a 86,8% com Tokyo548V e Goshum482V (Japão); 70,8% a 86,1% com Warsage clone2, Warsage clone1 e Assebroek clone1 (Bélgica); 79% a 86,7% com Gag-EIAV-FR-1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 11, 12, 13, 14 (França); 72,6% a 89,3% com SLO-1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 11, 12, 13, 14, 16, 17, 18, 19, 20,21, 22, 23, 24, 26, 27, 28, 29, 30 e 31 (Eslovênia); 72,3% a 86,4% com Ita-1, 2, 3, 4, 5 e 6 (Itália); 73% a 86,9% com Rom-1, 2, 4 e 5 (Romênia); 77,1% a 87,5% com Can-1, 3, 7 e 10 (Canadá); e 69,3% a 78,5% com EIAVGER-1 (Alemanha) (Tabela 12).

Tabela 12: Similaridade nucleotídica de 149 sequências nucleotídicas do EIAV para o gene *gag**

	H3	Liaoning	Wyoming	Miyazaki	SA	DE	POCONE-BR01	PAN-BR02	PAN-BR03	PAN-BR04	PAN-BR05	PAN-BR06	PAN-BR07	PAN-BR09	PAN-BR11	PAN-BR14	PAN-BR15	PAN-BR18	PAN-BR19	PAN-BR20	PAN-BR21	PAN-BR23	PAN-BR24
H3																							
Liaoning	77.6																						
Wyoming	77.0	83.0																					
Miyazaki	75.2	76.8	77.4																				
SA	100.0	77.6	77.0	75.2																			
DE	78.2	78.8	79.9	80.0	100.0																		
POCONE-BR01	77.1	75.6	75.2	79.0	77.1	77.1	86.3																
PAN-BR-02	78.5	82.6	80.6	81.1	78.5	78.5	90.1	90.2															
PAN-BR-03	76.9	77.1	76.7	79.6	76.9	76.9	86.3	97.7	90.2														
PAN-BR-04	78.3	80.8	76.2	81.1	78.3	78.3	90.8	87.4	91.2	89.0													
PAN-BR-05	77.7	76.2	75.9	79.6	77.7	77.7	86.8	98.6	90.7	99.1	89.0												
PAN-BR-06	77.0	78.2	77.8	78.9	77.0	77.0	87.3	98.2	90.2	98.6	87.3	98.6											
PAN-BR-07	78.4	75.5	75.1	78.9	78.4	78.4	86.2	98.2	90.2	98.6	88.4	99.5	98.2										
PAN-BR-09	77.7	77.1	76.0	80.3	77.7	77.7	87.5	97.7	91.3	99.1	90.1	99.1	97.7	98.6									
PAN-BR-11	78.4	76.3	76.6	80.3	78.4	78.4	86.3	96.8	90.2	96.3	88.0	97.2	96.8	96.8									
PAN-BR-14	77.7	78.8	78.3	81.8	77.7	77.7	88.5	95.2	90.1	88.8	87.4	86.0	87.7	88.0	88.0								
PAN-BR-15	76.4	79.5	80.1	81.2	76.4	76.4	87.5	85.7	86.9	86.8	89.8	87.3	85.6	86.7	87.4	86.8	90.8						
PAN-BR-18	75.0	79.6	80.2	79.9	75.0	75.0	87.5	85.6	86.8	87.9	89.7	87.3	86.8	86.7	87.4	86.8	90.8	99.1					
PAN-BR-19	77.7	77.8	80.1	81.1	77.7	77.7	87.0	87.9	88.7	89.7	88.7	89.6	89.1	89.0	90.7	88.5	85.9	87.0	88.1				
PAN-BR-21	75.0	79.6	80.2	79.9	75.0	75.0	87.5	85.6	86.8	87.9	89.7	87.3	86.8	86.7	87.4	86.8	90.8	99.1	100.0	88.1			
PAN-BR-23	78.9	82.0	76.0	81.7	78.9	78.9	90.7	87.9	91.7	89.5	98.6	89.5	87.9	89.0	90.7	88.5	90.2	89.7	89.7	88.1	89.7		
PAN-BR-24	78.4	76.2	73.8	78.9	78.4	78.4	85.6	96.3	90.2	96.7	87.3	97.7	96.3	98.2	96.7	95.8	87.4	85.6	85.6	88.5	85.6	87.9	
PAN-BR-25	73.0	83.9	82.2	80.6	73.0	73.0	88.1	84.0	88.0	85.3	87.6	84.6	86.3	84.0	85.3	84.6	90.2	86.5	87.7	87.1	87.7	87.5	82.8
PAN-BR-26	76.4	80.0	79.9	80.5	76.4	76.4	91.3	88.0	90.2	86.9	89.2	87.4	87.9	86.8	87.5	87.4	97.2	88.6	88.6	85.9	88.6	89.1	86.8
PAN-BR-27	77.8	77.0	75.9	79.7	77.8	77.8	87.4	98.2	91.3	96.6	89.6	99.5	98.2	99.1	99.5	97.2	88.0	87.4	87.3	90.1	87.3	90.1	97.2
PAN-BR-28	74.9	78.4	74.7	80.9	78.2	78.2	89.0	87.2	89.1	89.7	87.9	82.7	89.2	89.6	89.6	90.6	89.7	91.8	87.0	86.9	88.2	86.9	89.1
PAN-BR-29	78.5	81.4	81.6	81.0	78.5	78.5	91.2	91.2	96.3	92.3	92.3	91.7	92.3	91.2	92.3	91.2	89.6	88.8	88.0	90.8	88.0	92.8	90.1
PAN-BR-7540	78.9	81.4	80.0	81.7	78.9	78.9	92.8	89.0	92.8	90.1	92.3	89.5	90.1	88.9	90.1	89.0	91.2	88.5	89.6	89.2	89.6	92.2	87.9
PAN-BR-7544	79.6	80.7	79.4	80.7	79.6	79.6	91.8	88.0	91.8	88.5	91.3	88.5	88.5	87.9	89.1	88.0	90.2	88.6	89.1	87.6	89.1	91.3	86.8
PAN-BR-7545	78.4	82.7	80.2	80.1	78.4	78.4	90.7	86.2	91.2	87.9	92.3	87.9	87.9	87.3	88.0	87.4	90.3	89.7	90.2	88.1	90.2	92.3	86.2
PAN-BR-7612	81.5	81.5	81.9	80.0	81.5	81.5	89.2	89.7	91.8	89.7	89.2	90.2	89.6	89.6	90.8	89.7	91.8	87.0	86.9	88.2	86.9	89.1	89.6
PAN-BR-7697	78.8	78.2	81.1	80.3	78.8	78.8	90.7	85.2	87.5	85.8	88.1	85.8	86.9	85.2	86.4	85.3	86.5	83.0	82.3	87.0	82.3	88.0	85.2
PAN-BR-7704	80.3	79.7	78.9	79.4	80.3	80.3	88.7	86.9	90.3	88.0	89.7	88.5	86.9	88.0	89.1	86.9	88.7	84.8	84.7	87.7	84.7	89.7	88.0
PAN-BR-7738	75.0	79.6	80.2	79.9	75.0	75.0	87.5	85.6	86.8	87.9	89.7	87.3	86.8	86.7	87.4	86.8	90.8	99.1	100.0	88.1	100.0	89.7	85.6
PAN-BR-7740	77.3	80.3	78.3	80.0	77.3	77.3	89.7	85.6	91.2	85.6	92.3	86.2	86.7	85.6	86.3	86.8	90.2	88.6	88.6	86.0	88.6	90.7	84.4
PAN-BR-7961	75.6	78.9	77.9	79.0	78.6	78.6	87.4	97.2	89.1	87.7	87.9	82.7	99.1	97.2	96.7	96.7	87.4	86.2	87.4	89.1	87.4	88.5	95.3
PAN-BR-7963	81.5	81.5	78.9	80.0	81.5	81.5	89.2	89.7	91.8	89.7	89.2	90.2	89.6	89.6	90.6	89.7	91.8	87.0	86.9	88.2	86.9	89.1	89.6
PAN-BR-7984	80.9	81.5	78.9	79.4	80.9	80.9	88.6	89.1	91.3	89.7	88.7	89.7	89.6	89.1	90.3	89.2	91.3	86.4	86.9	88.2	86.9	88.6	89.1
PAN-BR-8002	78.3	83.3	82.0	81.3	78.3	78.3	92.3	87.9	92.8	90.1	92.8	89.5	90.1	88.9	89.6	89.0	91.8	91.3	92.3	89.8	92.3	92.7	87.9
PAN-BR-8003	78.2	80.7	79.3	81.1	78.2	78.2	92.3	88.9	92.2	90.1	91.8	89.5	90.1	88.9	90.1	89.0	90.7	87.9	89.1	89.2	89.1	91.7	87.8
PAN-BR-8016	82.7	80.4	77.7	78.8	82.7	82.7	88.1	88.6	90.8	88.6	88.2	89.1	88.6	88.6	89.7	88.6	90.8	85.9	85.8	87.1	85.8	88.1	88.6
PAN-BR-8053	77.5	78.2	79.3	79.4	77.5	77.5	99.5	85.7	89.6	85.7	91.3	86.3	86.8	85.6	86.9	85.7	89.8	87.0	86.9	86.4	86.9	90.2	85.1
PAN-BR-8084	73.6	78.3	78.9	78.7	73.6	73.6	86.4	84.4	85.7	86.8	88.7	86.2	85.6	85.6	86.3	85.6	89.7	98.2	99.1	87.0	99.1	88.6	84.4
PAN-BR-8084	78.3	76.9	76.5	79.0	78.3	78.3	86.3	97.2	91.3	97.7	88.5	98.6	97.2	98.2	97.7	95.8	87.4	87.9	86.7	89.0	86.7	89.0	97.2
PAN-BR-8086	77.0	78.2	77.8	78.9	77.0	77.0	87.3	97.2	90.2	97.7	87.3	97.7	99.1	97.2	96.7	95.8	87.4	85.6	86.8	88.0	86.8	87.9	95.3
PAN-BR-8087	76.4	77.6	78.4	78.3	76.4	76.4	86.8	97.7	89.7	86.2	86.8	98.2	99.5	97.7	97.2	96.3	86.8	85.1	86.2	86.5	86.2	87.3	95.8
PAN-BR-8098	75.7	81.7	80.5	80.9	75.7	75.7	89.5	85.2	90.1	87.8	81.8	80.1	82.7	86.6	85.4	85.5	89.7	88.6	88.6	89.7	88.6	89.7	86.6
PAN-BR-8103	78.8	79.0	78.4	80.3	78.8	78.8	88.0	86.7	89.0	89.0	90.8	88.4	87.8	87.8	87.8	86.1	88.0	85.7	85.8	88.5	85.8	90.2	87.2
PAN-BR-8117	77.2	83.8	82.0	79.6	77.2	77.2	89.2	85.2	90.2	85.2	88.2	85.7	86.3	85.1	86.4	85.8	89.8	88.7	87.6	86.6	87.6	88.1	84.0
PAN-BR-8135	80.1	78.9	76.9	77.9	80.1	80.1	86.9	87.4	89.7	87.4	87.0	88.0	87.4	87.4	88.6	87.4	90.2	84.6	84.6	85.9	84.6	86.9	87.4
PAN-BR-8145	77.9	86.1	83.1	81.3	77.9	77.9	90.8	86.9	90.8	87.4	89.8	87.4	88.5	86.8	88.0	87.4	91.3	90.3	89.8	88.7	89.8	89.7	85.7
PAN-BR-8147	75.0	79.6	80.2	79.9	75.0	75.0	87.5	85.6	86.8	87.9	89.7	87.3	86.8	86.7	87.4	86.8	90.8	99.1	100.0	88.1	100.0	89.7	85.6
PAN-BR-8156	75.2	85.5	80.7	81.3	75.2	75.2	90.8	87.4	90.7	88.6	90.3	88.0	89.6	87.4	88.6	88.0	89.2	88.1	88.2	87.6	88.2	90.8	86.3
PAN-BR-8159	75.0	79.6	80.2	79.9	75.0	75.0	87.5	85.6	86.8	87.9	89.7	87.3	86.8	86.7	87.4	86.8	90.8	99.1	100.0	88.1	100.0	89.7	85.6
Tokyo_548V	79.9	81.7	81.2	80.7	79.9	79.9	82.9	81.1	83.7	82.4	82.5	81.7	82.4	81.1	81.8	82.4	85.8	85.2	86.4	84.3	86.4	83.1	79.8
Goshun_482V	72.1	81.0	76.5	82.6	72.1	72.1	84.0	90.7	82.0	83.2	83.8	82.5	83.2	81.8	83.2	80.7	82.8	86.7	86.8	85.9	86.8	84.4	81.2
Warsage_clone_2	78.3	85.5	81.8	83.8	78.3	78.3	82.0	79.5	83.8	81.4	81.7	80.1	82.0	79.4	81.4	79.5	81.3	82.5	82.5	82.2	82.5	82.3	78.8
Assesbroek_clone_1	76.6	79.2	77.7	79.8	76.6	76.6	79.5	73.0	73.8	73.9	71.1	73.0	75.1	72.2	73.2	73.7	76.4	77.1	77.2	76.8	77.2	71.8	71.5
Gag-EI4V-FR-1	76.7	84.4	80.1	81.9	76.7	76.7	81.3	80.1	83.2	81.5	81.7	80.1	82.0	79.4	81.5	79.6	82.5	81.3	81.4	81.6	81.4	82.3	80.1
Gag-EI4V-FR-2	78.0	84.4	80.1	82.0	78.0	78.0	81.3	79.6	83.3	81.5	81.8	80.2	82.1	79.5	81.5	79.6</							

	PAN-BR-25	PAN-BR-26	PAN-BR-27	PAN-BR-28	PAN-BR-29	PAN-BR-7540	PAN-BR-7544	PAN-BR-7575	PAN-BR-7612	PAN-BR-7697	PAN-BR-7704	PAN-BR-7738	PAN-BR-7740	PAN-BR-7961	PAN-BR-7963	PAN-BR-7984	PAN-BR-8002	PAN-BR-8003	PAN-BR-8016	PAN-BR-8054	PAN-BR-8083	PAN-BR-8084	PAN-BR-8086	
H3																								
Liaoning																								
Wyoming																								
Miyazaki																								
SA																								
DE																								
POCCONE-BR-01																								
PAN-BR-02																								
PAN-BR-03																								
PAN-BR-04																								
PAN-BR-05																								
PAN-BR-06																								
PAN-BR-07																								
PAN-BR-09																								
PAN-BR-11																								
PAN-BR-14																								
PAN-BR-15																								
PAN-BR-18																								
PAN-BR-19																								
PAN-BR-20																								
PAN-BR-21																								
PAN-BR-23																								
PAN-BR-24																								
PAN-BR-25																								
PAN-BR-26	90,7																							
PAN-BR-27	85,2	87,4																						
PAN-BR-28	82,8	85,6	87,2																					
PAN-BR-29	88,1	89,6	92,3	90,2																				
PAN-BR-7540	90,2	90,2	90,1	87,9	94,8																			
PAN-BR-7544	89,7	90,2	89,1	86,2	93,3	97,7																		
PAN-BR-7575	89,3	91,3	87,9	85,6	91,7	91,8	91,3																	
PAN-BR-7612	90,3	91,3	90,7	88,0	91,8	92,8	91,9	90,3																
PAN-BR-7697	86,4	87,6	86,4	83,4	89,6	89,2	88,7	88,6	86,0															
PAN-BR-7704	90,3	89,7	89,1	86,2	90,2	91,8	91,9	89,8	95,8	88,7														
PAN-BR-7738	87,7	88,6	87,3	85,6	88,0	89,6	89,1	90,2	86,9	82,3	84,7													
PAN-BR-7740	87,6	91,3	86,2	83,2	90,7	90,2	89,2	95,3	88,1	86,4	86,5	88,6												
PAN-BR-7961	86,9	88,0	87,2	96,3	91,2	90,1	88,5	88,5	89,7	86,3	86,9	87,4	87,3											
PAN-BR-7963	90,3	91,3	90,7	88,0	91,8	92,8	91,9	90,3	100,0	86,0	95,8	86,9	88,1	89,7										
PAN-BR-7984	90,3	90,8	90,2	88,0	91,8	92,8	92,4	90,8	99,5	86,5	95,3	86,9	87,6	89,7	99,5									
PAN-BR-8002	91,4	92,8	89,6	87,9	93,8	93,8	92,3	98,2	91,8	89,1	91,3	92,3	94,8	90,6	91,8	91,8								
PAN-BR-8003	90,2	89,6	90,1	87,9	94,3	99,5	97,2	91,2	92,8	88,6	91,8	89,1	89,6	90,1	92,8	92,8	93,3							
PAN-BR-8016	89,3	90,3	89,7	86,9	90,8	91,8	91,9	89,2	99,1	84,9	94,9	85,8	87,1	88,6	99,1	98,6	90,8	91,8						
PAN-BR-8054	87,5	90,8	86,9	84,5	90,7	92,3	91,3	90,2	88,6	90,2	88,1	86,9	90,2	86,8	88,6	88,1	91,8	91,7	87,6					
PAN-BR-8083	86,5	87,5	86,2	84,4	86,8	88,5	88,0	89,1	85,8	81,1	83,6	99,1	87,5	86,2	85,8	85,8	91,3	88,0	84,7	85,8				
PAN-BR-8084	84,0	86,9	98,2	96,3	91,2	87,9	86,9	87,4	88,6	86,3	86,9	86,7	85,6	96,3	88,6	88,0	89,0	87,9	87,5	85,7	85,6			
PAN-BR-8086	85,2	87,9	97,2	96,3	92,3	90,1	88,5	87,9	88,6	86,9	85,7	86,8	86,7	98,2	88,6	88,6	90,1	89,5	87,5	86,8	85,6	96,3		
PAN-BR-8087	85,8	87,4	97,7	96,8	91,8	89,6	87,9	87,3	89,1	86,3	86,3	86,2	86,2	98,6	89,1	89,1	89,6	89,5	88,0	86,2	85,1	96,8	98,6	
PAN-BR-8098	86,4	90,7	87,8	84,8	92,2	91,2	90,7	90,7	88,6	89,1	88,1	88,6	88,5	86,6	88,6	89,1	91,7	90,7	87,5	89,1	87,5	86,6	87,2	
PAN-BR-8103	85,3	86,8	87,8	86,7	92,2	90,2	88,6	89,7	88,0	89,0	87,5	85,8	88,0	87,3	88,0	88,0	91,2	89,7	88,1	87,5	84,6	86,9	87,8	
PAN-BR-8117	89,3	90,8	86,3	82,8	91,2	90,8	90,8	91,4	91,4	86,5	89,5	87,6	89,3	86,9	91,4	90,8	92,9	90,2	90,3	86,7	86,5	86,3	86,3	
PAN-BR-8135	88,6	89,6	88,5	86,6	89,6	90,7	90,7	88,2	84,8	93,8	84,6	85,9	87,4	98,2	97,7	89,7	90,7	98,2	86,4	83,4	86,3	86,3		
PAN-BR-8145	91,4	92,3	88,0	85,1	92,3	92,8	93,3	93,9	91,9	89,2	89,8	89,8	90,9	89,0	91,9	92,4	94,9	92,3	90,8	90,3	88,7	88,0	88,5	
PAN-BR-8147	87,7	88,6	87,3	85,6	88,0	89,6	89,1	90,2	86,9	82,3	84,7	100,0	88,6	87,4	86,9	86,9	92,3	89,1	85,8	86,9	99,1	86,7	86,8	
PAN-BR-8156	89,2	90,3	88,5	86,3	92,8	92,3	90,8	91,3	90,2	88,1	87,6	88,2	89,2	90,2	90,2	90,2	93,4	91,8	89,2	90,3	87,1	87,4	89,6	
PAN-BR-8159	87,7	88,6	87,3	85,8	88,0	89,6	89,1	90,2	86,9	82,3	84,7	100,0	88,6	87,4	86,9	86,9	92,3	89,1	85,8	86,9	99,1	86,7	86,8	
Tokyo_548V	85,4	84,7	81,8	79,9	84,9	86,5	84,8	85,4	84,8	80,0	83,2	86,4	84,8	83,0	84,8	84,8	87,1	85,9	84,9	82,3	85,2	81,1	82,4	
Goshun_482V	85,6	83,9	83,2	80,7	83,3	85,6	86,2	83,8	82,0	81,4	84,4	86,8	80,8	83,2	82,0	82,0	85,6	85,6	80,9	83,4	85,6	82,5	82,0	
Warsage_clone_2	84,0	82,5	80,8	79,0	85,0	83,7	83,7	83,7	82,1	80,7	81,5	82,5	81,9	82,0	82,1	82,1	85,6	83,1	80,9	81,4	81,3	80,7	82,0	
PAN-BR-8098	84,0	82,5	80,8	79,0	85,0	83,7	83,7	83,7	82,1	80,7	81,5	82,5	81,9	82,0	82,1	82,1	85,6	83,1	80,9	81,4	81,3	80,7	82,0	
Warsage_clone_1	84,0	82,5	80,8	79,0	85,0	83,7	83,7	83,7	82,1	80,7	81,5	82,5	81,9	82,0	82,1	82,1	85,6	83,1	80,9	81,4	81,3	80,7	82,0	
Asselbrook_clone_1	84,0	82,5	80,8	79,0	85,0	83,7	83,7	83,7	82,1	80,7	81,5	82,5	81,9	82,0	82,1	82,1	85,6	83,1	80,9	81,4	81,3	80,7	82,0	
PAN-BR-8103	78,1	78,3	73,0	71,6	75,3	75,9	76,5	77,9	76,7	74,0	75,4	77,2	77,9	75,8	76,7	76,7	79,9	75,1	75,4	72,8	75,8	73,6	75,1	
Gag-EI4V-FR-1	84,6	83,7	80,8	79,0	84,5	83,2	83,1	83,2	82,7	83,2	83,3	81,4	81,3	82,1	82,7	82,7	85,0	82,5	82,7	80,7	80,1	80,7	82,0	
Gag-EI4V-FR-2	84,6	83,7	80,9	79,1	84,5	83,2	83,1	83,2	82,7	84,4	83,3	81,4	81,4	82,1	82,7	82,7	85,0	82,6	82,7	80,7	80,2	80,8	82,1	
Gag-EI4V-FR-4	85,1	84,3	81,4	79,6	85,0	83,7	82,5	83,7	83,3	83,8	83,8	81,9	81,9	82,6	83,3	83,3	85,6	83,1	82,1	81,3	80,7	81,3	82,6	
Gag-EI4V-FR-5	85,0	83,7	80,9	79,1	84,5	84,4	83,2	83,2	82,7	83,7	83,8	81,4	81,4	82,1	82,7	82,7	85,0	83,7	81,6	81,9	80,2	80,8	82,1	
Gag-EI4V-FR-6	84,6	83,7	80,9	79,1	84,5	83,2	83,1	83,2	82,7	84,4	83,3	81,4	81,4	82,1	82,7	82,7	85,0	82,6	82,7	80,7	80,2	80,8	82,1	
Gag-EI4V-FR-7	85,2	84,3	81,5	79,7	85,1	83,8	83,7	83,8	83,3	83,8	83,9	82,0	82,0	82,7	83,3	83,3	85,6	83,2	83,3	81,3	80,8	81,4	82,7	
Gag-EI4V-FR-8	84,5	83,7	80,8	79,0	84,5	83,2	83,1	83,2	82,7	83,2	83,3	81,4	81,3	82,1	82,7	82,7	85,0	82,5	82,7	80,7	80,1	80,7	82,0	
Gag-EI4V-FR-9	84,5	83,7	80,8	79,0	84,5	83,2	83,1	83,2	82,7	83,2	83,3	81,4	81,3	82,1	82,7	82,7	85,0	82,5	82,7	80,7	80,1	80,7	82,0	
Gag-EI4V-FR-11	85,2	84,3	81,5	79,7	85,1	83,8	83,7	83,8	83,3	83,8	83,9	82,0	82,0	82,7	83,3									

	Gag-ENV-FR-12	Gag-ENV-FR-13	Gag-ENV-FR-14	SLO-1	SLO-2	SLO-3	SLO-4	SLO-5	SLO-6	SLO-7	SLO-8	SLO-9	SLO-11	SLO-12	SLO-13	SLO-16	SLO-17	SLO-18	SLO-19	SLO-20	SLO-21	SLO-22	SLO-23	
H3																								
Liaoning																								
Wyoming																								
Miyazaki																								
SA																								
DE																								
POCONE-BR-01																								
PAN-BR-02																								
PAN-BR-03																								
PAN-BR-04																								
PAN-BR-05																								
PAN-BR-06																								
PAN-BR-07																								
PAN-BR-09																								
PAN-BR-11																								
PAN-BR-14																								
PAN-BR-15																								
PAN-BR-18																								
PAN-BR-19																								
PAN-BR-20																								
PAN-BR-21																								
PAN-BR-23																								
PAN-BR-24																								
PAN-BR-25																								
PAN-BR-26																								
PAN-BR-27																								
PAN-BR-28																								
PAN-BR-29																								
PAN-BR-7540																								
PAN-BR-7544																								
PAN-BR-7575																								
PAN-BR-7612																								
PAN-BR-7697																								
PAN-BR-7704																								
PAN-BR-7738																								
PAN-BR-7740																								
PAN-BR-7961																								
PAN-BR-7963																								
PAN-BR-7984																								
PAN-BR-8002																								
PAN-BR-8003																								
PAN-BR-8016																								
PAN-BR-8054																								
PAN-BR-8083																								
PAN-BR-8084																								
PAN-BR-8086																								
PAN-BR-8087																								
PAN-BR-8098																								
PAN-BR-8103																								
PAN-BR-8117																								
PAN-BR-8135																								
PAN-BR-8145																								
PAN-BR-8147																								
PAN-BR-8156																								
PAN-BR-8159																								
Tokyo_548V																								
Goshun_482V																								
Warsage_clone_2																								
Warsage_clone_1																								
Asselbroek_clone_1																								
Gag-EIIV-FR-1																								
Gag-EIIV-FR-2																								
Gag-EIIV-FR-4																								
Gag-EIIV-FR-5																								
Gag-EIIV-FR-6																								
Gag-EIIV-FR-7																								
Gag-EIIV-FR-8																								
Gag-EIIV-FR-9																								
Gag-EIIV-FR-11																								
Gag-EIIV-FR-12																								
Gag-EIIV-FR-13	100,0																							
Gag-EIIV-FR-14	99,1	99,1																						
SLO-1	85,2	85,2	86,4																					
SLO-2	84,6	84,6	85,8	98,6																				
SLO-3	84,6	84,6	85,8	99,1	98,6																			
SLO-4	84,6	84,6	85,8	98,6	100,0	98,6																		
SLO-5	85,7	85,7	86,9	99,1	98,6	99,1	98,6																	
SLO-6	85,2	85,2	86,3	99,1	99,5	99,1	99,5	99,1																
SLO-7	84,0	84,0	85,2	98,2	99,5	98,2	99,5	98,2	99,1															
SLO-8	85,2	85,2	86,3	98,2	98,2	98,2	98,2	98,2	98,6	97,7														
SLO-9	84,7	84,7	85,8	99,1	99,5	99,1	99,5	99,1	99,1	99,1	98,2													
SLO-11	85,2	85,2	86,4	99,5	99,1	99,5	99,1	99,5	99,5	98,6	98,6	99,5												
SLO-12	84,6	84,6	85,8	99,1	98,6	100,0	98,6	99,1	99,1	98,2	98,2	99,1	99,5											
SLO-13	85,2	85,2	86,4	99,5	99,1	99,5	99,1	99,5	99,5	98,6	98,6	99,5	100,0	99,5										
SLO-16	82,8	82,8	84,0	85,7	86,3	84,6	86,3	85,7	85,8	85,8	84,1	85,7	85,2	84,6	85,2									
SLO-17	84,6	84,6	84,6	90,2	90,7	89,1	90,7	89,1	90,2	90,2	88,6	90,2	89,6	89,1	89,6	85,8								
SLO-18	81,1	81,1	82,3	88,0	87,0	88,0	87,0	86,9	87,5	86,4	86,9	86,9	87,5	88,0	87,5	80,2	86,4							
SLO-19	86,3	86,3	87,5	87,4	88,5	86,9	88,5	86,9	88,0	88,0	87,5	88,0	87,4	86,9	87,4	82,9	88,0	85,4						
SLO-20	80,1	80,1	80,1	85,1	85,7	84,0	85,7	85,1	85,2	85,1	85,4	85,1	84,5	84,0	84,5	87,4	85,7	81,8	82,6					
SLO-21	80,1	80,1	80,2	85,7	86,3	84,6	86,3	85,7	85,8	85,7	84,1	85,7	85,2	84,6	85,2	86,9	85,7	81,8	82,6	99,1				
SLO-22	85,1	85,1	86,3	87,4	88,5	86,8	88,5	86,8	88,0	88,0	87,4	87,9	87,4	86,8	87,4	82,8	87,9	85,3	98,2	82,5	82,5			
SLO-23	85,1	85,1	86,3	86,4	86,4	85,3	86,4	86,4	85,9	85,9	87,5	86,4	85,8	85,3	85,8	88,0	86,4	81,9	85,8	85,1	84,6	85,7		
SLO-26	86,3	86,3	87,5	88,5	89,6	88,0	89,6	88,0	89,1	89,1	88,6	89,0	88,5	88,0	88,5	84,0	89,0	86,5	99,1	83,7	83,8	99,1	86,9	
SLO-27	85,1	85,1	86,3	86,4	86,4	85,3	86,4	86,4	85,9	85,9	87,5	86,4	85,8	85,3	85,8	89,2	87,5	81,9	85,8	85,1	84,6	85,7	99,1	
SLO-30	81,1	8																						

	SLO-26	SLO-27	SLO-30	SLO-28	SLO-28	SLO-29	SLO-14	SLO-31	Ita-1	Ita-2	Ita-3	Ita-4	Ita-5	Ita-6	Rom-1	Rom-2	Rom-4	Rom-5	Can1	Can3	Can7	Can10	EIAVGER-1	
H3																								
Liaoning																								
Wyoming																								
Miyazaki																								
SA																								
DE																								
POCONE-BR-01																								
PAN-BR-02																								
PAN-BR-03																								
PAN-BR-04																								
PAN-BR-05																								
PAN-BR-06																								
PAN-BR-07																								
PAN-BR-09																								
PAN-BR-11																								
PAN-BR-14																								
PAN-BR-15																								
PAN-BR-18																								
PAN-BR-19																								
PAN-BR-20																								
PAN-BR-21																								
PAN-BR-23																								
PAN-BR-24																								
PAN-BR-25																								
PAN-BR-26																								
PAN-BR-27																								
PAN-BR-28																								
PAN-BR-29																								
PAN-BR-7540																								
PAN-BR-7544																								
PAN-BR-7575																								
PAN-BR-7612																								
PAN-BR-7697																								
PAN-BR-7704																								
PAN-BR-7738																								
PAN-BR-7740																								
PAN-BR-7961																								
PAN-BR-7963																								
PAN-BR-7984																								
PAN-BR-8002																								
PAN-BR-8003																								
PAN-BR-8016																								
PAN-BR-8054																								
PAN-BR-8083																								
PAN-BR-8084																								
PAN-BR-8086																								
PAN-BR-8087																								
PAN-BR-8098																								
PAN-BR-8103																								
PAN-BR-8117																								
PAN-BR-8135																								
PAN-BR-8145																								
PAN-BR-8147																								
PAN-BR-8156																								
PAN-BR-8159																								
Tokyo_548V																								
Goshun_482V																								
Warsage_clone_2																								
Warsage_clone_1																								
Asselbroek_clone_1																								
Gag-EIAV-FR-1																								
Gag-EIAV-FR-2																								
Gag-EIAV-FR-4																								
Gag-EIAV-FR-5																								
Gag-EIAV-FR-6																								
Gag-EIAV-FR-7																								
Gag-EIAV-FR-8																								
Gag-EIAV-FR-9																								
Gag-EIAV-FR-11																								
Gag-EIAV-FR-12																								
Gag-EIAV-FR-13																								
Gag-EIAV-FR-14																								
SLO-1																								
SLO-2																								
SLO-3																								
SLO-4																								
SLO-5																								
SLO-6																								
SLO-7																								
SLO-8																								
SLO-9																								
SLO-11																								
SLO-12																								
SLO-13																								
SLO-16																								
SLO-17																								
SLO-18																								
SLO-19																								
SLO-20																								
SLO-21																								
SLO-22																								
SLO-23																								
SLO-26																								
SLO-27		86,9																						
SLO-30		83,5	85,8																					
SLO-24		78,7	85,2	75,5																				
SLO-28		82,2	83,0	72,9	85,5																			
SLO-29		81,6	88,0	77,4	83,1	84,2																		
SLO-14		81,5	86,2	79,5	90,2	84,6	81,8																	
SLO-31		81,7	88,0	78,1	85,3	85,1	89,1	84,6																
Ita-1		74,9	83,7	73,6	84,5	82,1	80,0	84,4	80,6															
Ita-2		74,8	83,7	73,5	85,0	82,1	79,9	84,4	80,6	99,1														
Ita-3		74,8	83,7	73,5	84,5	82,1	79,9	84,4	80,6	99,1	99,1													
Ita-4		74,9	83,7	73,6	84,5	82,1	80,0	84,4	80,6	100,0	99,1	99,1												
Ita-5		79,2	86,7	75,8	86,9	82,8	81,5	89,0	83,2	83,7	83													

*Estimativa da similaridade nucleotídica entre 115 sequências nucleotídicas de 222 pb do EIAV: 49 sequências do Pantanal brasileiro; 65 sequências mundiais do EIAV, sendo quatro sequências de genoma completo: H3 (JX480634.1), Liaoning (AF327877.1), Wyoming (NC_001450.1), Miyazaki (JX003263.1); e 61 sequências parciais: duas do Japão - Tokyo 548V (AB675094.1) e Goshun 482V (AB675093.1), três da Bélgica - Warsage clone 2 (JX193072.1), Warsage clone 1 (JX193071.1) e Assebroek clone 1 (JX193070.1), 12 da França - Gag-EIAV-FR-1 (KT764943.1), 2 (KT764944.1), 4 (KT764946.1), 5 (KT764947.1), 6 (KT764948.1), 7 (KT764949.1), 8 (KT764950.1), 9 (KT764951.1), 11 (KT764953.1), 12 (KT764954.1), 13 (KT764955.1) e 14 (KT764956.1), 28 da Eslovênia - SLO-1 (KF977807.1), 2 (KF977808.1), 3 (KF977809.1), 4 (KF977800.1), 5 (KF977813.1), 6 (KF977811.1), 7 (KF977815.1), 8 (KF977816.1), 9 (KF977798.1), 11 (KF977817.1), 12 (KF977801.1), 13 (KF977814.1), 14 (KF977810.1), 16 (KF977812.1), 17 (KF977803.1), 18 (KF977799.1), 19 (KF977820.1), 20 (KF977818.1), 21 (KF977802.1), 22 (KF977819.1), 23 (KF977805.1), 24 (KF977806.1), 26 (KF977804.1), 27 (KF977821.1), 28 (KF977822.1), 29 (KF977823.1), 30 (KF977824.1) e 31 (KF977825.1), oito da Itália - SA (KM247555.2), DE (KM247554.1), Ita-1 (EU240733.1), 2 (EU375543.1), 3 (EU375544.1), 4 (EU741609.1), 5 (GQ265785.1) e 6 (GU060664.1), quatro da Romênia - Rom-1 (GQ229581.1), 2 (GQ923952.1), 4 (GU060662.1) e 5 (GU060663.1), quatro do Canadá - Can1 (EF418582.1), 3 (EF418583.1), 7 (EF418584.1) e 10 (EF418585.1), e uma da Alemanha - EIAVGER-1 (KF878275.1). A estimativa da similaridade nucleotídica entre as sequências foi feita pelo cálculo da estimativa da divergência evolutiva entre as sequências no programa MEGA X (KUMAR *et al.*, 2018), empregando o modelo de Máxima Verossimilhança, a taxa de variação entre os sítios foi modelada com uma distribuição gamma (shape parameter = 5).

Foi feito o alinhamento da sequência de 74 aminoácidos deduzidas de EIAV para as 49 sequências do Pantanal a partir de uma sequência nucleotídica de 222 pb, que corresponde a proteína p15 do gene *gag*, com mais 65 sequências de aa deduzidas de sequências de EIAV mundiais, sendo quatro sequências de genoma completo: Liaoning (China), Wyoming (Estados Unidos), Miyazaki (Japão) e H3 (Irlanda). E 61 sequências parciais: duas do Japão (Tokyo 548V e Goshun 482V), três da Bélgica (Warsage clone 2, Warsage clone 1 e Assebroek clone 1), 12 da França (Gag-EIAV-FR-1, 2, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 11, 12, 13 e 14), 28 da Eslovênia (SLO-1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 11, 12, 13, 14, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 26, 27, 28, 29, 30 e 31), oito da Itália (SA, DE, Ita-1, 2, 3, 4, 5 e 6), quatro da Romênia (Rom-1, 2, 4 e 5), quatro do Canadá (Can1, 3, 7 e 10), e uma da Alemanha (EIAVGER-1) (Figura 44).

Foram observadas 15 mutações de aa das sequências brasileiras em relação às demais sequências analisadas no alinhamento, sendo quatro mutações conservativas. Foram consideradas mutações apenas quando o aa da sequência brasileira foi diferente em relação a todas as sequências analisadas no alinhamento. Ocorreu a troca de uma serina (S) por arginina (R) na posição 8 no alinhamento – mutação não-conservativa; troca de lisina (K) ou ácido glutâmico (E) por arginina (R)

na posição 12, podendo ser uma mutação conservativa ou não-conservativa dependendo em relação a qual sequência do EIAV se compara, porém apenas a sequência Ita-6 apresentou um ácido glutâmico (E) nesta posição; troca de lisina (K) por arginina (R) na posição 13, mutação conservativa; troca de glutamina (Q) ou valina (V) por serina (S) ou leucina (L) na posição 20 no alinhamento, podendo ser uma mutação conservativa ou não-conservativa dependendo em relação a qual sequência do EIAV se compara, porém apenas a sequência Ita-5 apresentou uma valina (V) nesta posição; troca de serina (S) ou alanina (A) por treonina (T) ou asparagina (N) na posição 22 no alinhamento, podendo ser uma mutação conservativa ou não-conservativa dependendo em relação a qual sequência do EIAV se compara, porém apenas a sequência Ita-5 apresentou uma alanina (A) nesta posição; troca de lisina (K) por arginina (R) na posição 24 no alinhamento, mutação conservativa; troca de leucina (L) por metionina (M) na posição 25 no alinhamento, mutação conservativa. Na posição 27 no alinhamento todas as sequências brasileiras e mundiais apresentaram várias trocas de aa, e as sequências brasileiras apresentaram o aa metionina (M) que foi diferente em relação às demais sequências, mutação não-conservativa; troca de leucina (L) por lisina (K) ou arginina (R) na posição 31, mutação não-conservativa; troca de lisina (K) por asparagina (N) na posição 46 para a sequência PAN-BR-8003, que também foi encontrada na sequência SLO-14, mutação não-conservativa; troca de ácido aspártico (D) ou valina (V) por asparagina (N) na posição 55, sendo que apenas a sequência Rom-2 apresentou um (V) nesta posição, mutação não-conservativa; e a troca de valina (V) por isoleucina (I) na posição 63 no alinhamento, mutação conservativa. Em várias posições no alinhamento, todas as sequências apresentaram variações entre si, estes locais em que mesmo com variações as sequências brasileiras apresentaram um aa diferente em relação aos demais, foram na posição 44 para a sequência PAN-BR-02, na posição 45 para a sequência PAN-BR-7697, e na posição 46 para diferentes sequências (Figura 44).

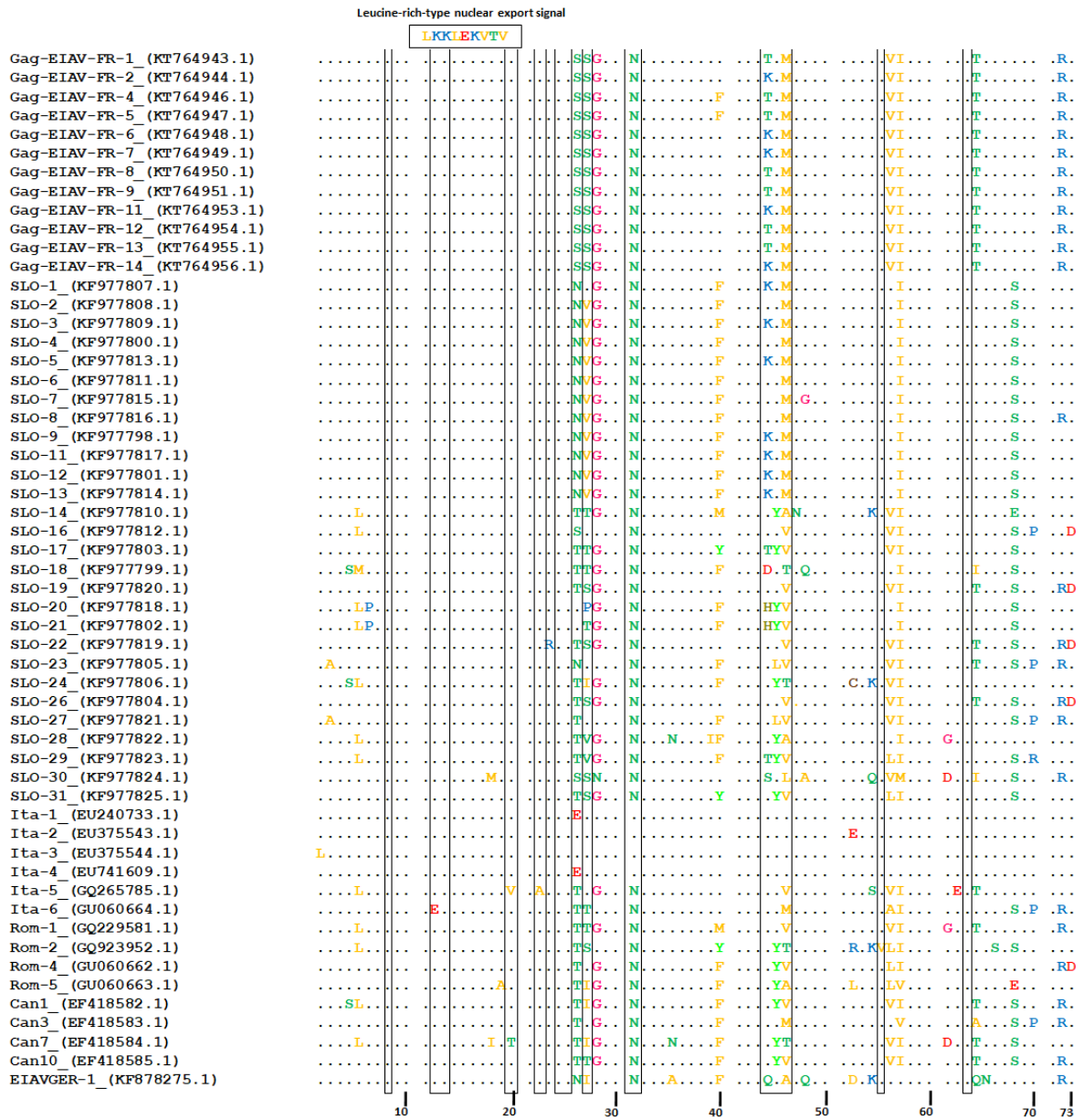
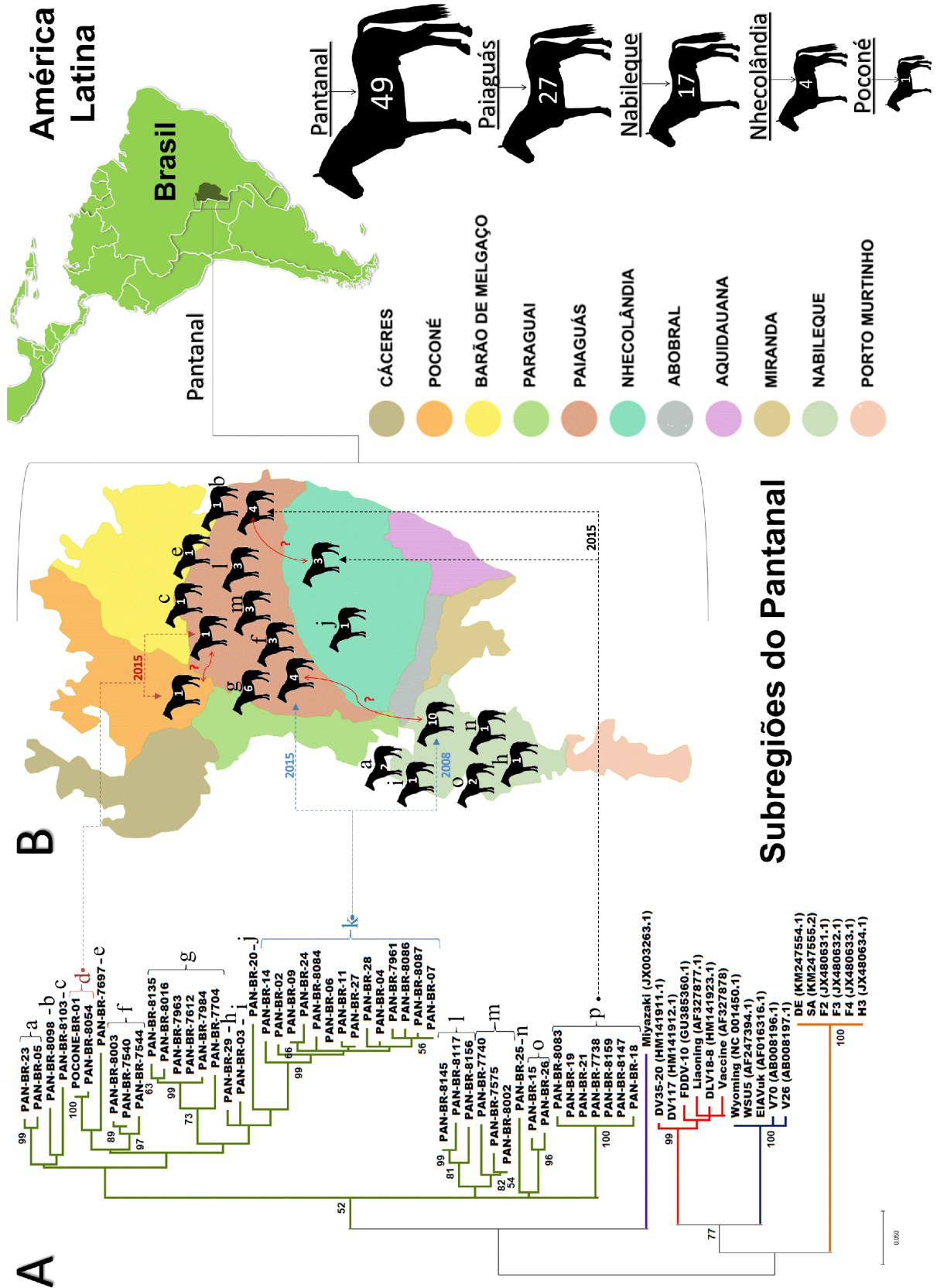


FIGURA 44: Alinhamento das seqüências de aminoácidos do EIAV de amostras de equídeos do Pantanal brasileiro para o gene gag – Alinhamento de 115 seqüências do EIAV de 74 aminoácidos cada correspondente à proteína p15 do gene gag: 49 seqüências obtidas a partir de DNA proviral de equídeos do Pantanal brasileiro com 65 seqüências mundiais do EIAV, sendo quatro seqüências de genoma completo: H3, Liaoning, Wyoming, Miyazaki; e 61 seqüências parciais: duas do Japão (Tokyo 548V e Goshun 482V), três da Bélgica (Warsage clone 2, Warsage clone 1 e Assebroek clone 1), 12 da França (Gag-EIAV-FR-1, 2, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 11, 12, 13 e 14), 28 da Eslovênia (SLO-1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 11, 12, 13, 14, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 26, 27, 28, 29, 30 e 31), oito da Itália (SA, DE, Ita-1, 2, 3, 4, 5 e 6), quatro da Romênia (Rom-1, 2, 4 e 5), quatro do Canadá (Can1, 3, 7 e 10), e uma da Alemanha (EIAVGER-1). O número de acesso para cada seqüência está entre parênteses no alinhamento. O alinhamento foi realizado no programa Mega, versão 6.0 (TAMURA *et al.*, 2013). Regiões variáveis nas seqüências Brasileiras em relação às demais seqüências estão identificadas por retângulos pretos. O alinhamento das 115 seqüências foi dividido entre duas páginas.

No alinhamento de aa está destacado um *motif* que corresponde a um potencial sinal de exportação nuclear *leucine-rich-type*, previamente caracterizado para sequências de genoma completo do EIAV (DONG *et al.*, 2014), que corresponde aos aminoácidos LKKLEKVT para as sequências H3, Liaoning, Wyoming, Miyazaki, SA e DE. Neste *motif* para 15 sequências do Pantanal ocorreu a troca do aminoácido lisina (K) por arginina (R), nas posições 12 e 13 no alinhamento, sendo uma mutação conservativa. Para uma sequência da Itália, Ita-6, ocorreu uma troca do aminoácido lisina (K) por ácido glutâmico (E), na posição 11 no alinhamento, sendo uma mutação não-conservativa (Figura 44).

A análise filogenética das 49 sequências nucleotídicas brasileiras de 272 pb para o exon 1 do gene *tat* ao gene *gag* em comparação com a mesma região de 18 sequências mundiais do EIAV, mostrou que as sequências do EIAV do Pantanal (POCONE-BR-01, PAN-BR-02, 03, 04, 05, 06, 07, 09, 11, 14, 15, 18, 19, 20, 21, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 7540, 7544, 7575, 7612, 7697, 7704, 7738, 7740, 7961, 7963, 7984, 8002, 8003, 8016, 8054, 8083, 8084, 8086, 8087, 8098, 8103, 8117, 8135, 8145, 8147, 8156, 8159) agrupam em um clado separado, apoiado por um valor de bootstrap de 52. As sequências da China (Liaoning, Vaccine, DV117, DLV18-8, DV35-20, FDDV-10), Estados Unidos (Wyoming, EIAVuk, WSU5, V26, V70), Irlanda (H3, F4, F3, F2) e Itália (SA e DE), e uma sequência do Japão (Miyazaki) formam quatro cladogramas separados, corroborando os dados da literatura (Figura 45-A). A figura 45-B mostra a localização das 11 subregiões do Pantanal em que as amostras de equídeos foram coletadas, relacionando a local de coleta das amostras com o agrupamento das sequências nos cladogramas na árvore filogenética.



Subregiões do Pantanal

FIGURA 45: Análise filogenética de 49 sequências nucleotídicas do EIAV de amostras de equídeos do Pantanal brasileiro para o exon 1 do gene *tat* ao gene *gag* – A) Árvore filogenética

baseada em 67 sequências nucleotídicas do EIAV: 49 sequências nucleotídicas obtidas a partir do DNA proviral de equídeos do Pantanal brasileiro: POCONE-BR-01, PAN-BR-02, 03, 04, 05, 06, 07, 09, 11, 14, 15, 18, 19, 20, 21, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 7540, 7544, 7575, 7612, 7697, 7704, 7738, 7740, 7961, 7963, 7984, 8002, 8003, 8016, 8054, 8083, 8084, 8086, 8087, 8098, 8103, 8117, 8135, 8145, 8147, 8156, 8159. E 18 sequências mundiais do EIAV: 16 sequências de genoma completo - H3, F4, F3, F2, Liaoning, Vaccine, DV117, DLV18-8, DV35-20, FDDV-10, Wyoming, EIAVuk, WSU5, V26, V70, e Miyazaki; e duas sequências parciais - SA e DE. O número de acesso para cada sequência está identificado entre parênteses. A árvore filogenética foi construída no programa MEGA versão X (KUMAR *et al.*, 2018), baseado em um conjunto de dados final de 275 posições nucleotídicas, utilizando o método máxima verossimilhança, baseado no modelo Tamura Nei. Distribuição gamma discreta foi usada para modelar diferenças de taxas evolutivas entre os sítios (5 categorias (+G, parâmetro=0.6606)). O modelo de taxa de variação permitiu que alguns sítios fossem evolutivamente invariáveis ([+I], 28.36% of sites). Os valores de bootstrap foram determinados baseado em 1000 replicatas. Somente valores de bootstrap acima de 50 estão representados. Os cinco clados na árvore estão destacados por cores: sequências Brasileiras em verde, da China em vermelho, dos Estados Unidos em azul, da Irlanda e Itália em laranja, e do Japão em roxo. **B) Localização das 11 subregiões do Pantanal e os locais de coleta das amostras de equídeos** – A direita do mapa está identificado em cada cavalo o número de sequências obtidas no total e em cada subregião no Pantanal. Os cavalos no mapa representam os clados na árvore, correspondendo ao local de coleta da amostra. Os números nos cavalos representam a quantidade de sequências em cada clado. As letras em cada cavalo representam cada clado na árvore. As setas pontilhadas representam rotas hipotéticas vias de circulação traçadas pelo EIAV entre as diferentes subregiões do Pantanal.

A análise filogenética apenas para a sequência parcial de 222 pb para o gene *gag* das 49 sequências do Pantanal brasileiro com 89 sequências mundiais do EIAV, sendo 18 sequências de genoma completo, e mais 71 sequências parciais, mostrou que as sequências do EIAV do Pantanal agrupam em um clado separado das sequências mundiais, porém o valor de bootstrap para o ramo que agrupa todas as sequências brasileiras não foi significativo. No entanto, os ramos dentro do clado das sequências brasileiras apresentaram elevados valores de bootstrap. Uma sequência do Japão (Goshun 482V) agrupou junto com as sequências brasileiras, porém o valor de bootstrap não foi significativo (Figura 46). As sequências da China (Liaoning, Vaccine, DV117, DLV18-8, DV35-20, FDDV-10); Estados Unidos (Wyoming, EIAVuk, WSU5, V26, V70); Irlanda (H3, F4, F3, F2) e seis da Itália (SA, DE, Ita-1, 2, 3, 4); 12 do Japão (Miyazaki, Miy 5, 25, 29, 35, 47, 53, 56, 65, 67, 69, 75, Tokyo 548V); 12 da França (Gag-EIAV-FR-1, 2, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 11, 12, 13 e 14) agruparam juntas em clados separados das demais sequências. Enquanto que as demais sequências mundiais, duas da Itália, três da Bélgica, 28 da Eslovênia, quatro da Romênia, quatro do Canadá, e uma da Alemanha apresentaram diferentes padrões de agrupamento, com sequências de países diferentes agrupando em ramos próximos.



FIGURA 46: Análise filogenética de 49 sequências nucleotídicas do EIAV de amostras de equídeos do Pantanal brasileiro para o gene gag – Análise filogenética baseada em 138 sequências nucleotídicas do EIAV: 49 sequências nucleotídicas obtidas a partir do DNA proviral de equídeos do Pantanal brasileiro – POCONE-BR-01, PAN-BR-02, 03, 04, 05, 06, 07, 09, 11, 14, 15, 18, 19, 20, 21, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 7540, 7544, 7575, 7612, 7697, 7704, 7738, 7740, 7961, 7963, 7984, 8002, 8003, 8016, 8054, 8083, 8084, 8086, 8087, 8098, 8103, 8117, 8135, 8145, 8147, 8156, 8159. E 89 sequências mundiais do EIAV, sendo 18 sequências de genoma completo: H3, F4, F3, F2 (Irlanda); Liaoning, Vaccine, DV117, DLV18-8, DV35-20, FDDV-10 (China); Wyoming, EIAVuk, WSU5, V26, V70 (Estados Unidos); Miyazaki (Japão); e 71 sequências parciais: 13 do Japão (Miy 5, 25, 29, 35, 47, 53, 56, 65, 67, 69, 75, Tokyo 548V e Goshun 482V), três da Bélgica (Warsage clone 2, Warsage clone 1 e Assebroek clone 1), 12 da França (Gag-EIAV-FR-1, 2, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 11, 12, 13 e 14), 28 da Eslovênia (SLO-1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 11, 12, 13, 14, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 26, 27, 28, 29, 30 e 31), sete da Itália (SA, DE, Ita-2, 3, 4, 5 e 6), quatro da Romênia (Rom-1, 2, 4 e 5), quatro do Canadá (Can1, 3, 7 e 10), e uma da Alemanha (EIAVGER-1). O número de acesso para cada sequência está identificado entre parênteses. A árvore filogenética foi construída no programa

MEGA versão X (KUMAR *et al.*, 2018), baseada em um conjunto de dados de 222 posições nucleotídicas, utilizando o método Máxima verossimilhança, baseado no modelo Tamura Nei. Distribuição gamma discreta foi usada para modelar diferenças de taxas evolutivas entre os sítios (5 categorias (+G parâmetro=0.7336)). O modelo de taxa de variação permitiu que alguns sítios fossem evolutivamente invariáveis ([+], 19.37% sites). Os valores de bootstrap foram determinados baseados em 1000 replicatas. Somente valores de bootstrap acima de 50 estão representados. O clado das sequências Brasileiras está destacado em verde.

5.2.3. Sequenciamento e análise filogenética de DNA amplificado a partir de uma amostra de um cavalo do Pantanal brasileiro – POCONE-BR

5.2.3.1. Análise molecular empregando a sequência nucleotídica da região 5' LTR (nt 28) ao gene *gag* (nt 672) amplificada a partir da amostra POCONE-BR

Para a amostra POCONE-BR, que foi amplificada com as seguintes combinações de iniciadores: EIAV-LTR-28-F e EIAV-tat-405-R1, EIAV-LTR-28-F e *gag*-672-R, foi obtida uma sequência consenso de 599 pb a partir da sequência amplificada nas duas PCRs, a qual se estende da região 5' LTR ao gene *gag*. A sequência obtida para a amostra brasileira corresponde à posição nucleotídica no genoma 44 a 671 em relação à sequência Miyazaki, sendo que a região 5' LTR corresponde a posição 44 a 306 (correspondendo a 234 pb para a sequência POCONE-BR), a região não codificadora corresponde a posição nt 307 a 348 (42 pb), o exon 1 do gene *tat* corresponde à posição nt 349 a 444 (96 pb), a região não codificadora logo após a *tat* corresponde à posição nt 445 a 449 (5 pb), e o gene *gag* corresponde à posição nt 450 a 671 (222 pb) (Figura 47).

O fragmento de 234 pb para a região 5' LTR da sequência POCONE-BR apresentou similaridade nucleotídica de 81,9% com a sequência H3, 82,6% com Liaoning, 81,9% com Wyoming, e 74,6% com Miyazaki. O exon 1 do gene *tat* de 96 pb apresentou similaridade nucleotídica de 98,9% com H3, 96,8% com Liaoning, 94,4% com Wyoming, 93,3% com Miyazaki, e 98,9% com SA e DE. O fragmento de 222 pb para o gene *gag* apresentou similaridade nucleotídica de 77,7% com H3, 77,2% com Liaoning, 78,6% com Wyoming, 78,4% com Miyazaki, e 77,7% com SA e DE.

A figura 47 mostra o alinhamento da sequência POCONE-BR para a região 5' LTR ao gene *gag* em relação a quatro sequências de genoma completo do EIAV. A identificação dos domínios estruturais e funcionais da sequência nucleotídica da região 5' LTR para a sequência POCONE-BR foram preditos baseado nas sequências Wyoming, EIAV_{IRE} e Miyazaki previamente caracterizadas (CARVALHO & DERSE, 1993; DONG *et al.*, 2013, 2014, QUINLIVAN *et al.*, 2013). Para a sequência do Pantanal foi obtida uma sequência nucleotídica de 234 pb para a região 5' LTR, sendo que desse total 119 pb corresponde a região única 3' (U3), 78 pb a região repetida (R), e 37 pb a região única 5' (U5), as quais estão identificadas por setas na figura 47.

A sequência TATA Box (TATATAA) na posição 118-124 no alinhamento foi idêntica em todas as sequências. O sítio de iniciação da transcrição na posição 145-147, indicado na figura por +1, na borda da região U3-R corresponde à sequência de bases AGA para a sequência do Pantanal, diferente para as outras sequências do EIAV, que são GGG ou GGA. O sinal de adição de cauda poli-A (AATAAA) na posição 203-208 foi idêntico em todas as sequências (Figura 47).

Os motifs adicionais incluem um *methylated DNA-binding protein site* (MDBP), também denominado de EF-C ou EP, na posição 33-45 no alinhamento, que corresponde à sequência GTTGCTAGGCAAC, o qual foi conservado na sequência POCONE-BR em relação às outras sequências do EIAV. O *transactivation response element* (TAR), na posição 147-171, que corresponde à sequência ACACTCAGATTCTGCGGTC, foi conservado em relação às outras sequências do EIAV. Os três sítios de ligação PU.1 foram conservados em duas localizações da sequência nas posições nucleotídicas 66-70 e 79-83, enquanto que na terceira localização na posição nucleotídica 102-106 a sequência do Pantanal apresentou uma deleção nucleotídica na sequência inteira correspondente ao sítio PU.1. O sítio PEA1/AP-1 na posição nucleotídica 91-96 apresentou uma deleção nucleotídica na sequência inteira do Pantanal (Figura 47).

No alinhamento da sequência nucleotídica POCONE-BR para a região 5' LTR ao gene *gag* com as sequências H3, Liaoning, Wyoming e Miyazaki foram observadas regiões conservadas e variáveis. A partir da análise do alinhamento das cinco sequências foram consideradas substituições nucleotídicas apenas quando a sequência POCONE-BR foi diferente em relação a todas as sequências analisadas.

Para o fragmento de 234 pb da região 5' LTR foram observadas 19 substituições nucleotídicas: 10 substituições nucleotídicas na região U3, sendo duas transições (nas posições 140 e 143 no alinhamento), cinco transversões (nas posições 6, 78, 85, 117 e 129), três transições ou transversões (nas posições 18,84 e 114) dependendo em relação a qual sequência mundial do EIAV se compara. Foi observada também uma deleção de um nucleotídeo (na posição 21) e de 23 nucleotídeos (na posição 90 a 112). A região R apresentou seis substituições nucleotídicas, sendo três transições (nas posições 145, 195 e 198), e três transversões (nas posições 188, 196 e 202). A região U5 apresentou três substituições nucleotídicas, sendo três transversões (nas posições 233, 234 e 247), e duas deleções nas posições 251 e 252 (Figura 47).

A primeira região não codificadora (RNC) de 42 pb apresentou duas substituições nucleotídicas, sendo duas transições (nas posições 293 e 306), enquanto que a segunda RNC de 5 pb não apresentou nenhuma substituição nucleotídica. O exon 1 do gene *tat* de 96 pb não apresentou nenhuma substituição nucleotídica em relação às demais sequências analisadas. O fragmento de 222 pb para o gene *gag* apresentou 10 substituições nucleotídicas, sendo seis transições (nas posições 418, 467, 472, 526, 572 e 628), três transversões (nas posições 468, 528 e 543), e uma transição ou transversão (na posição 488) dependendo em relação a qual sequência mundial do EIAV se compara (Figura 47).

	5' LTR		MDBP				
H3_ (JX480634.1)	TAACCTCATG	TAACCTAAAA	GGCTAG-CTC	AGGTTGCTAG	GCAACTAAAC	TATAGTAACC	60
Liaoning_ (AF327877.1)	TAACCTTATG	TAACCCAAAA	GACTAG-CTC	ATGTTGCCAG	GCAACTAAAC	TGTGATAACC	
Wyoming_ (NC_001450.1)	TAACCTTGTA	TAACCCAAAG	GACTAG-CTC	ATGTTGCTAG	GCAACTAAAC	CGCAATAACC	
Miyazaki_ (JX003263.1)	TAACCTTGTA	TAACCCATAT	AACTAGGCAG	GCATTGCTAA	GCAACTGAAC	TAATATAACC	
POCONE-BR	TAACCCGCTG	TAACCTAGAA	G-CTAG-CTC	ATGTTGCTAG	GCAACTAAAC	TGTAATAACC	

	PU.1 (ets)	PU.1 (ets)	PEA1/AP.1	PU.1 (ets)	TATA box		
H3_ (JX480634.1)	TGTAAGTTC	TCATTATAGT	TCCGCTTTTG	TGACGCGTTA	AGTTCCTCAA	ATTACAATAT	120
Liaoning_ (AF327877.1)	-TTTGTTC	TCATTATAGT	TCCGCTTTTG	TGACGCGTTA	AGTTCCTGTT	TTTACAGTAT	
Wyoming_ (NC_001450.1)	-GC-ATTG	TGACGCGAGT	TCCCATTTGG	TGACGCGTTA	ACTTCCTGTT	TTTACAGTAT	
Miyazaki_ (JX003263.1)	TAT-AGTTC	CTATTTAAGT	TCCGCTTTTG	TGACGCGTTA	AGTTCCTGAT	TTTACAATAT	
POCONE-BR	TGTTAGTTC	TCATTATTGT	TCCGCTTTT-	-----	-----	--TACACTAT	

	TATA box	U3	R	TAR-stem-loop motif			
H3_ (JX480634.1)	ATAAGCACTT	GTATTCTGAC	ACTGGACAC	TCAGATTCTG	CGGTCTGAGT	CCCTTCTCTG	180
Liaoning_ (AF327877.1)	ATAAGTACTT	GTATTCTGAC	ATTGGACAC	TCAGATTCTG	CGGTCTGAGT	CCCTTCTCTG	
Wyoming_ (NC_001450.1)	ATAAGTGCTT	GTATTCTGAC	AATGGG-AC	TCAGATTCTG	CGGTCTGAGT	CCCTTCTCTG	
Miyazaki_ (JX003263.1)	ATAAGTGCTT	ATATTCTGTC	ATTGGGCAC	TCAGATTCTG	CGGTCTGAGT	CCCTTCTCTG	
POCONE-BR	ATAAGTACAT	GTATTCTGAT	AACAGACAC	TCAGATTCTG	CGGTCTGAGT	CCCTTCTCTG	

	Sinal de adiç3o de Poly (A)	R	U5				
H3_ (JX480634.1)	CTGGGCTAAA	AA--GCCTTC	TTAATAAATA	TA--ATTCTC	TACTCAGTTC	CTGTGTTCAA	240
Liaoning_ (AF327877.1)	CTGGGCTAAC	TCTAGCCTTG	GTAATAAATA	TA--ATTCTC	TGCTCAGTCC	CTGTCTTAG	
Wyoming_ (NC_001450.1)	CTGGGCTGAA	AA--GCCTTT	GTAATAAATA	TA--ATTCTC	TACTCAGTCC	CTGTCTCTAG	
Miyazaki_ (JX003263.1)	CTGGGCTAAA	TA--GCCTTG	ACAATAAATA	TATAATTCTC	TGTTCAGTCC	CTGTGTTCAA	
POCONE-BR	CTGGGCTTAA	TA--AGCCTT	GAAATAAATA	TA--ATTCTC	TACTCAGTCC	CTTGTCTCAA	

	Regi3o n3o codificadora (NCR)						
H3_ (JX480634.1)	CTTATCTCTT	GTTAA-GAT	CCTACAGTTG	GCGCCGAAAC	AGGGACCTGA	GAGGGCGCA	300
Liaoning_ (AF327877.1)	TCTGTCTTGT	TTTCAA-GGT	CTAACAGTTG	GCGCCGAAAC	AGGGACCTGA	G---GGCGCA	
Wyoming_ (NC_001450.1)	TTTGTCTG--	-TTCGA-GAT	CCTACAGTTG	GCGCCGAAAC	AGGGACCTGA	GAGGGCGCA	
Miyazaki_ (JX003263.1)	CTTGTCTTGC	TTACAGCAAC	CCTACAGTTG	GCGCCGAAAC	AGGGACCTGG	GAGGGCGCA	
POCONE-BR	CTTGTCTGTT	--TTAA-GAT	CCTACAGTTG	GCGCCGAAAC	AGGGACCTGA	GAAGGGCGCA	

	tat						
H3_ (JX480634.1)	GACCCTACCT	GCTGAACCTG	GCTGATCGTA	GGATCCCTAG	GACAGCAGAG	GAGAACTTAC	360
Liaoning_ (AF327877.1)	GACCCTGCCT	GCTGAACCTG	GCTGATCGTA	GGATCCCTAG	GACAGCAGAG	GAGAACTTAC	
Wyoming_ (NC_001450.1)	GACCCTACCT	GTTGAACCTG	GCTGATCGTA	GGATCCCGG	GACAGCAGAG	GAGAACTTAC	
Miyazaki_ (JX003263.1)	GACCCTACCT	GCTGAACCTG	GCTGATTGTA	GAATCCCTAG	GACAGCAGAG	GAGAACTTAC	
POCONE-BR	GACCCCGCCT	GCTGAACCTG	GCTGATCGTA	GGATCCCTAG	GACAGCAGAG	GAGAACTTAC	

	NCR	gag					
H3_ (JX480634.1)	AGACGTCTTC	TGGAGGTGTT	CCTGGCCAGA	GCACAGGAAG	ACACGTAACA	TGGGAGACCC	420
Liaoning_ (AF327877.1)	AGACGTCTTC	TGGAGGTGTT	CCTGGCCAGA	ACACAGGAAG	ACAGGTAAGA	TGGGAGACTC	
Wyoming_ (NC_001450.1)	AGAAGTCTTC	TGGAGGTGTT	CCTGGCCAGA	ACACAGGAGG	ACAGGTAAGA	TGGGAGACCC	
Miyazaki_ (JX003263.1)	AGAAGTCTTC	TGGAGGTGTT	CCCGCCAGA	ACACAGGAGG	ACAGGTAAGA	TGGGGGACTC	
POCONE-BR	AGAAGTCTTC	TGGAGGTGTT	CCTGGCCAGA	GCACAGGAAG	ACAGGTAAGA	TGGGAGATCC	

H3_ (JX480634.1)	AGTGACATGG	AGCAAAGCGC	TCAAGAAGTT	AGAGAAGGTG	ACGGTTCAGG	GGTCTCAAAA	480
Liaoning_ (AF327877.1)	TTTGACATGG	AGCAAAGCGC	TCAAGAAGTT	AGAGAAGGTG	ACGGTACAAG	GGTCTCAAAA	
Wyoming_ (NC_001450.1)	TTTGACATGG	AGCAAAGCGC	TCAAGAAGTT	AGAGAAGGTG	ACGGTACAAG	GGTCTCAGAA	
Miyazaki_ (JX003263.1)	ACTGAATGG	AGCAAAGCGC	TCAAGAAGCT	AGAGAAGGTG	ACGGTCCAGG	GGTCCAGAA	
POCONE-BR	AGTGACTTGG	AGCAAAGCGC	TCAAGAAGCT	AGAGAAGGTG	ACGGTTCGG	GATCTCAAAA	

```

H3_(JX480634.1)          ATTGAAAGCG AGTAATTGTC TGTGGGCGCT AAGTTTGGTG GACTTACTGC ATGACACCAA 540
Liaoning_(AF327877.1)   GCTAACTAAT GGTAACGTGA ATTGGGCGCT GAATTTGGTG AACTTATTCC ATGACACCAA
Wyoming_(NC_001450.1)   ATTAAC TACT GGTAACGTGA ATTGGGCGCT AAGTCTAGTA GACTTATTTC ATGATACCAA
Miyazaki_(JX003263.1)   ATTACAACCA GGAAATTGTA ACTGGGCGCT AAGTTTGGTG GATTTATTCC ATGACACCAA
POCONE-BR               ATTGAATFCA GGAAATTGTA ATTGGGCGCT AAGTTTGGTG GATTTGTATC ATGACACCAA

H3_(JX480634.1)          TTTTCAGTAAA GAAAAAGACT GGCAATTGAG AGATATTCTT CCATTGCTGG AAGATGTCTC 600
Liaoning_(AF327877.1)   TTTTGTAAA GAAAAAGACT GGCAATTAAG GGACGTCATT CCATTGTTGG AGGACGTTTC
Wyoming_(NC_001450.1)   CTTTGTAAA GAAAAGGACT GGCAGCTGAG GGATGTCATT CCATTGCTGG AAGATGTAAC
Miyazaki_(JX003263.1)   CTTTATGAAA GAGAAGGACT GGCAACTGAA GGACGTCATT CCATTGCTGG AAGACGTTGC
POCONE-BR               TTATTTGAAA GAAAAGGACT GGCAATTGAG GAATGTCATT CCATTGCTGG AGGACGTTAC

H3_(JX480634.1)          TCAAACCTTG ACAGGACAAG AAAAAGAGGC A 631
Liaoning_(AF327877.1)   CCAGACATTG TCAGGACAAG AGAGA--GGC A
Wyoming_(NC_001450.1)   TCAGACGCTG TCAGGACAAG AAAGAGAGGC C
Miyazaki_(JX003263.1)   CGAGACGTTG TCAGGACCGG AGAAAGAGGC A
POCONE-BR               TCAGACATTG TCAGGACAAG AAAGAGAAGC C

```

FIGURA 47: Alinhamento da sequência nucleotídica do EIAV POCONE-BR do Pantanal brasileiro para a região 5' LTR ao gene *gag* (posição nucleotídica 44 a 671) – Alinhamento de cinco sequências nucleotídicas do EIAV de 599 pb: uma sequência do Pantanal brasileiro - POCONE-BR com quatro sequências de genoma completo - H3, Liaoning, Wyoming e Miyazaki. O número de acesso para cada sequência está indicado entre parênteses. O alinhamento foi realizado no programa MEGA, versão 6.0, utilizando o Clustal W (TAMURA *et al.*, 2013). As regiões conservadas entre todas as sequências estão destacadas em cinza. Os domínios funcionais estão indicados por caixas, e os domínios estruturais por setas. Sítio de iniciação da transcrição (+1), 'methylated DNA-binding protein site' (MDBP).

No alinhamento das sequências de EIAV para a região 5' LTR foram observadas incoerências entre a sequência Wyoming depositada no GenBank (número de acesso NC_001450.1) com a sequência na figura do alinhamento para os artigos publicados da caracterização do genoma completo para a amostra Miyazaki em comparação com outras sequências de genoma completo e a sequência Wyoming. Tendo sido observado que na sequência depositada no GenBank após o 'motif' MDBP, a amostra Wyoming apresenta a sequência TAAACCGCAATAACCGGCAT até o primeiro sítio PU.1 (ets), enquanto que nas publicações de DONG *et al.*, (2013 e 2014), após o 'motif' MDBP a amostra Wyoming apresenta a sequência TAACCTIGCAATAACCTIGTA, o que causa uma alteração no alinhamento das sequências, e conseqüentemente na identificação dos sítios, uma vez que quando feito o alinhamento de acordo com o depósito do GenBank da sequência Wyoming, o primeiro sítio PU.1 (ets) não se mostra conservado na sequência Wyoming em relação as outras sequências de genoma completo do EIAV, apresentando a sequência ATTG, enquanto que nas publicações a sequência é GTTCC.

Foi feito também o alinhamento da sequência de 599 pb da região 5' LTR ao gene *gag* para a amostra POCONE-BR em relação a 16 sequências de genoma completo do EIAV: quatro isolados da Irlanda – H3, F4, F3 e F2; isolado da China – Liaoning e os clones gerados a partir desta amostra - DV35-20, FDDV-10, Vaccine, DLV18-8 e DV117; isolado dos Estados Unidos – Wyoming e os clones gerados a partir desta amostra - V26, WSU5, EIAVuk, V70; isolado do Japão – Miyazaki. A sequência obtida para a amostra brasileira corresponde à posição nucleotídica no genoma 44 a 671 em relação à sequência Miyazaki. Como pode ser observado a sequência EIAVUK (AF016316.1), a qual é uma amostra derivada da Wyoming, também apresentou a mesma variação nucleotídica no primeiro sítio PU.1 (ets). O alinhamento mostra que as demais sequências mundiais também apresentam variações (Figura 48).

	5' LTR				MDBP			
H3 (JX480634.1)	TAACCTCATG	TAACCTAAAA	GGC-----	-----	--TAGCTCAG	GTTGCTAGGC	AACTA	65
F4 (JX480633.1)	TAACCTCATG	TAACCTAAAA	GGC-----	-----	--TAGCTCAG	GTTGCTAGGC	AACTA	
F3 (JX480632.1)	TAACCTCATG	TAACCTAAAA	GGC-----	-----	--TAGCTCAG	GTTGCTAGGC	AACTA	
F2 (JX480631.1)	TAACCTCATG	TAACCTAAAA	GGC-----	-----	--TAGCTCAG	GTTGCTAGGC	AACTA	
Liaoning (AF327877.1)	TAACCTTATG	TAACCCAAAA	GAC-----	-----	--TAGCTCAT	GTTGCCAGGC	AACTA	
DV35-20 (HM141911.1)	TAACCTTATG	TAACCCAAAG	GAC-----	-----	--TAGCTCAT	GTTGCTAGGC	AACTA	
FDDV-10 (GU385360.1)	TAACCTCATG	TGACTCAAAT	GACTAGCTCC	----CTTATG	ACTAGCTCAT	GTTGC-----	AACTG	
Vaccine (AF327878.1)	--AGTTGCTG	ATGCTCTCAT	AACCTCATGT	GACTCAAAG	ACTAGCTCAT	GTTGCTAGGC	AACTG	
DLV18-8 (HM141923.1)	--AGTTGCTG	ATGCTCTCAT	AACCTTATG-	-----	ACTAGCTCAT	GTTGCCAGGC	AACTA	
DV117 (HM141912.1)	TAACCTTATG	TAACCCAAAG	GAC-----	-----	--TAGCTCAT	GTTGCCAGGC	AACTA	
Wyoming (NC_001450.1)	TAACCTTGTA	TAACCCAAAG	GAC-----	-----	--TAGCTCAT	GTTGCTAGGC	AACTA	
EIAVuk (AF016316.1)	TAACCTTGTA	TAACCCAAAG	GAC-----	-----	--TAGCTCAT	GTTGCTAGGC	AACTA	
WSU5 (AF247394.1)	TAACCTTGTA	TAACCCAAAG	GAT-----	-----	--TAGCTCAT	GTTGCTAGGC	AACTA	
V26 (AB008197.1)	TAACCTTGCA	TAACCCAGAG	GAC-----	-----	--TAGCTCAT	GTTCCCTCAA	ATAGT	
V70 (AB008196.1)	TAACCTTGTA	TAACCCAAAG	GAC-----	-----	--TAGCTCAT	GTTGCTAGGC	AACTA	
Miyazaki (JX003263.1)	TAACCTTGTA	TAACCCATAT	AACT-----	-----	--AGGCAGGC	GTTGCTAAGC	AACTG	
POCONE-BR	TAACCGCGTG	TAACCTAGAA	G-C-----	-----	--TAGCTCAT	GTTGCTAGGC	AACTA	

	PU.1 (ets)		PU.1 (ets)		PEA1/AP-1			
H3 (JX480634.1)	AACTATAGTA	ACCTGTAA--	-----G	TTCCATTA	TAGTTCCGCT	TTTG-----	FGAC	130
F4 (JX480633.1)	AACTATAGTA	ACCTGTAA--	-----G	TTCCATTA	TAGTTCCGCT	TTTG-----	FGAC	
F3 (JX480632.1)	AACTATAATA	ACCTGTAA--	-----G	TTCCATTA	TAGTTCCGCT	TTTG-----	FGAC	
F2 (JX480631.1)	AACTATAAGTA	ACCTGTAA--	-----G	TTCCATTA	TAGTTCCGCT	TTTG-----	FGAC	
Liaoning (AF327877.1)	AACTGTGATA	ACCTTTT---	-----G	TTCCATTA	TAGTTCCGCT	TTTG-----	FGAC	
DV35-20 (HM141911.1)	AACTGTGATA	ACCTTTT---	-----G	TTCCATTA	TAGTTCCGCT	TTTG-----	FGAC	
FDDV-10 (GU385360.1)	AACTGTAATA	ACCTTTT---	-----G	TTCCATTA	TAGTTCCGCT	TTTG-----	FGAC	
Vaccine (AF327878.1)	AACTGTGATA	ACCTTTT---	-----G	TTCCATTT	TAGTTCCGCT	TTTG-----	FGAC	
DLV18-8 (HM141923.1)	AACTATAATA	ACCTTTT---	-----G	TTCCATTTC	TAGTTCCGCT	TTTG-----	FGAC	
DV117 (HM141912.1)	AACTGTGATA	ACCTTTT---	-----G	TTCCATTA	TAGTTCCGCT	TTTG-----	FGAC	
Wyoming (NC_001450.1)	AACCGCAATA	ACCGC-----	-----A	TTTGTGACGC	GAGTTCCCCA	TTGG-----	FGAC	
EIAVuk (AF016316.1)	AACCGCAATA	ACCGC-----	-----A	TTTGTGACGC	GAGTTCCCCA	TTGG-----	FGAC	
WSU5 (AF247394.1)	AACCGCAATA	AACTGTAA--	-----G	TTTCTCAATA	TAGTTCCGCA	TTCCGCAATT	GTGAC	
V26 (AB008197.1)	TCTTGCA-TA	ACCCAGAGGA	C-TAGCTCATG	TTCCCAAAA	TAGTTCCGCA	TTTG-----	FGAC	
V70 (AB008196.1)	ACTTGCAATA	ACCTGTAA--	-----G	TTCCCAATA	TAGTTCCGCA	TTTG-----	FGAC	
Miyazaki (JX003263.1)	AACTAATATA	ACCTATA---	-----G	TTCCATATT	AAGTTCCGCT	TTTG-----	FGAC	
POCONE-BR	AACTGTAATA	ACCTGTAA--	-----G	TTCCATTA	TTTTCCTGT	TTT-----	----	

	PEA1/AP-1	PU.1 (ets)	TATA box			U3	R	TAR-stem-loop motif							
H3_ (JX480634.1)	GC	GTTAAGTT	CC	TCAAATTA	CA	TATATAAA	GC	ACTTGTAT	TCT	GACACTG	GG	CACTCAG	ATTCT	195	
F4_ (JX480633.1)	GC	GTTAAGTT	CC	TCAAATTA	CA	TATATAAA	GC	ACTTGTAT	TCT	GACACTG	GG	CACTCAG	ATTCT		
F3_ (JX480632.1)	GC	GTTAAGTT	CC	TCAAATTA	CA	TATATAAA	GC	ACTTGTAT	TCT	GACACTG	GG	CACTCAG	ATTCT		
F2_ (JX480631.1)	GC	GTTAAGTT	CC	TCAAATTA	CA	TATATAAA	GC	ACTTGTAT	TCT	GACACTG	GG	CACTCAG	ATTCT		
Liaoning_ (AF327877.1)	GC	GTTAAGTT	CC	TCAAATTA	CA	TATATAAA	GC	ACTTGTAT	TCT	GACACTG	GG	CACTCAG	ATTCT		
DV35-20_ (HM141911.1)	GC	GTTAAGTT	CC	TCAAATTA	CA	TATATAAA	GC	ACTTGTAT	TCT	GACACTG	GG	CACTCAG	ATTCT		
FDDV-10_ (GU385360.1)	GC	GTTAAGTT	CC	TCAAATTA	CA	TATATAAA	GC	ACTTGTAT	TCT	GACACTG	GG	CACTCAG	ATTCT		
Vaccine_ (AF327878.1)	GC	GTTAAGTT	CC	TCAAATTA	CA	TATATAAA	GC	ACTTGTAT	TCT	GACACTG	GG	CACTCAG	ATTCT		
DLV18-8_ (HM141923.1)	GC	GTTAAGTT	CC	TCAAATTA	CA	TATATAAA	GC	ACTTGTAT	TCT	GACACTG	GG	CACTCAG	ATTCT		
DV117_ (HM141912.1)	GC	GTTAAGTT	CC	TCAAATTA	CA	TATATAAA	GC	ACTTGTAT	TCT	GACACTG	GG	CACTCAG	ATTCT		
Wyoming_ (NC_001450.1)	GC	GTTAAGTT	CC	TCAAATTA	CA	TATATAAA	GC	ACTTGTAT	TCT	GACACTG	GG	CACTCAG	ATTCT		
EIAVuk_ (AF016316.1)	GC	GTTAAGTT	CC	TCAAATTA	CA	TATATAAA	GC	ACTTGTAT	TCT	GACACTG	GG	CACTCAG	ATTCT		
WSU5_ (AF247394.1)	GC	GTTAAGTT	CC	TCAAATTA	CA	TATATAAA	GC	ACTTGTAT	TCT	GACACTG	GG	CACTCAG	ATTCT		
V26_ (AB008197.1)	GC	GTTAAGTT	CC	TCAAATTA	CA	TATATAAA	GC	ACTTGTAT	TCT	GACACTG	GG	CACTCAG	ATTCT		
V70_ (AB008196.1)	GC	GTTAAGTT	CC	TCAAATTA	CA	TATATAAA	GC	ACTTGTAT	TCT	GACACTG	GG	CACTCAG	ATTCT		
Miyazaki_ (JX003263.1)	GC	GTTAAGTT	CC	TCAAATTA	CA	TATATAAA	GC	ACTTGTAT	TCT	GACACTG	GG	CACTCAG	ATTCT		
POCONE-BR	---	---	---	---	---	TA	CA	TATATAAA	GT	ACATGTAT	TCT	GATAACA	AG	CACTCAG	ATTCT

	TAR-stem-loop motif		Sinal de adiçao de Poly (A)												
H3_ (JX480634.1)	G	CGGTC	T	GCCTTCTCT	G	CTGGGCTAA	A	AA--G--CCT	T	CTTAATAAA	T	AATA--ATTC	T	CTAC	260
F4_ (JX480633.1)	G	CGGTC	T	GCCTTCTCT	G	CTGGGCTAA	A	AA--G--CCT	T	CTTAATAAA	T	AATA--ATTC	T	CTAC	
F3_ (JX480632.1)	G	CGGTC	T	GCCTTCTCT	G	CTGGGCTAA	A	AA--G--CCT	T	CTTAATAAA	T	AATA--ATTC	T	CTAC	
F2_ (JX480631.1)	G	CGGTC	T	GCCTTCTCT	G	CTGGGCTAA	A	AA--G--CCT	T	CTTAATAAA	T	AATA--ATTC	T	CTAC	
Liaoning_ (AF327877.1)	G	CGGTC	T	GCCTTCTCT	G	CTGGGCTA-	A	ACTCTAGCCT	T	GGTAATAAA	T	AATA--ATTC	T	CTGC	
DV35-20_ (HM141911.1)	G	CGGTC	T	GCCTTCTCT	G	CTGGGCTAG	A	ACTCTAGCCT	T	GGTAATAAA	T	AATA--ATTC	T	CTGC	
FDDV-10_ (GU385360.1)	G	CGGTC	T	GCCTTCTCT	G	CTGGGCTAG	A	ACTCTAGCCT	T	GGTAATAAA	T	AATA--ATTC	T	CTGC	
Vaccine_ (AF327878.1)	G	CGGTC	T	GCCTTCTCT	G	CTGGGCTAG	A	ACTCTAGCCT	T	GGTAATAAA	T	AATA--ATTC	T	CTGC	
DLV18-8_ (HM141923.1)	G	CGGTC	T	GCCTTCTCT	G	CTGGGCTAA	A	ACTCTAGCCT	T	GGTAATAAA	T	AATA--ATTC	T	CTGC	
DV117_ (HM141912.1)	G	CGGTC	T	GCCTTCTCT	G	CTGGGCTAG	A	ACTCTAGCCT	T	GGTAATAAA	T	AATA--ATTC	T	CTGC	
Wyoming_ (NC_001450.1)	G	CGGTC	T	GCCTTCTCT	G	CTGGGCTGA	A	AA--GGCCT	T	TTGTAATAAA	T	AATA--ATTC	T	CTAC	
EIAVuk_ (AF016316.1)	G	CGGTC	T	GCCTTCTCT	G	CTGGGCTGA	A	AA--GGCCT	T	TTGTAATAAA	T	AATA--ATTC	T	CTAC	
WSU5_ (AF247394.1)	G	CGGTC	T	GCCTTCTCT	G	CTGGGCTGA	A	AA--GGCCT	T	TTGTAATAAA	T	AATA--ATTC	T	CTAC	
V26_ (AB008197.1)	G	CGGTC	T	GCCTTCTCT	G	CTGGGCTGA	A	AA--GGCCT	T	TTGTAATAAA	T	AATA--ATTC	T	CTAC	
V70_ (AB008196.1)	G	CGGTC	T	GCCTTCTCT	G	CTGGGCTGA	A	AA--GGCCT	T	TTGTAATAAA	T	AATA--ATTC	T	CTAC	
Miyazaki_ (JX003263.1)	G	CGGTC	T	GCCTTCTCT	G	CTGGGCTAA	A	ATA--GCCT	T	TGACATAAA	T	AATA--ATTC	T	CTGT	
POCONE-BR	G	CGGTC	T	GCCTTCTCT	G	CTGGGCCTA	A	ATA--AGCCT	T	TGA--AATAAA	T	AATA--ATTC	T	CTAC	

		R	U5		Região não codificadora (NCR)									
H3_ (JX480634.1)	TC	AGTTC	CTG	TG	TCAACTT	AT	CTCTTGGT	TAA-GATCCT	AC	AGTGGCG	CC	GAAACAGG	GACCT	325
F4_ (JX480633.1)	TC	AGTTC	CTG	TG	TCAACTT	AT	CTCTTGGT	TAA-GATCCT	AC	AGTGGCG	CC	GAAACAGG	GACCT	
F3_ (JX480632.1)	TC	AGTTC	CTG	TG	TCAACTT	AT	CTCTTGGT	TAA-GATCCT	AC	AGTGGCG	CC	GAAACAGG	GACCT	
F2_ (JX480631.1)	TC	AGTTC	CTG	TG	TCAACTT	AT	CTCTTGGT	TAA-GATCCT	AC	AGTGGCG	CC	GAAACAGG	GACCT	
Liaoning_ (AF327877.1)	TC	AGTTC	CTG	TG	TCAACTT	AT	CTCTTGGT	TAA-GATCCT	AC	AGTGGCG	CC	GAAACAGG	GACCT	
DV35-20_ (HM141911.1)	TC	AGTTC	CTG	TG	TCAACTT	AT	CTCTTGGT	TAA-GATCCT	AC	AGTGGCG	CC	GAAACAGG	GACCT	
FDDV-10_ (GU385360.1)	TC	AGTTC	CTG	TG	TCAACTT	AT	CTCTTGGT	TAA-GATCCT	AC	AGTGGCG	CC	GAAACAGG	GACCT	
Vaccine_ (AF327878.1)	TC	AGTTC	CTG	TG	TCAACTT	AT	CTCTTGGT	TAA-GATCCT	AC	AGTGGCG	CC	GAAACAGG	GACCT	
DLV18-8_ (HM141923.1)	TC	AGTTC	CTG	TG	TCAACTT	AT	CTCTTGGT	TAA-GATCCT	AC	AGTGGCG	CC	GAAACAGG	GACCT	
DV117_ (HM141912.1)	TC	AGTTC	CTG	TG	TCAACTT	AT	CTCTTGGT	TAA-GATCCT	AC	AGTGGCG	CC	GAAACAGG	GACCT	
Wyoming_ (NC_001450.1)	TC	AGTTC	CTG	TG	TCAACTT	AT	CTCTTGGT	TAA-GATCCT	AC	AGTGGCG	CC	GAAACAGG	GACCT	
EIAVuk_ (AF016316.1)	TC	AGTTC	CTG	TG	TCAACTT	AT	CTCTTGGT	TAA-GATCCT	AC	AGTGGCG	CC	GAAACAGG	GACCT	
WSU5_ (AF247394.1)	TC	AGTTC	CTG	TG	TCAACTT	AT	CTCTTGGT	TAA-GATCCT	AC	AGTGGCG	CC	GAAACAGG	GACCT	
V26_ (AB008197.1)	TC	AGTTC	CTG	TG	TCAACTT	AT	CTCTTGGT	TAA-GATCCT	AC	AGTGGCG	CC	GAAACAGG	GACCT	
V70_ (AB008196.1)	TC	AGTTC	CTG	TG	TCAACTT	AT	CTCTTGGT	TAA-GATCCT	AC	AGTGGCG	CC	GAAACAGG	GACCT	
Miyazaki_ (JX003263.1)	TC	AGTTC	CTG	TG	TCAACTT	AT	CTCTTGGT	TAA-GATCCT	AC	AGTGGCG	CC	GAAACAGG	GACCT	
POCONE-BR	TC	AGTTC	CTG	TG	TCAACTT	AT	CTCTTGGT	TAA-GATCCT	AC	AGTGGCG	CC	GAAACAGG	GACCT	

H3_ (JX480634.1)	GAGAGGGGCG	CAGACCCTAC	CTGCTGAAC ^{fat} C	TGGCTGATCG	TAGGATCCCT	AGGACAGCAG	AGGAG	390
F4_ (JX480633.1)	GAGAGGGGCG	CAGACCCTAC	CTGCTGAACC	TGGCTGATCG	TAGGATCCCT	AGGACAGCAG	AGGAG	
F3_ (JX480632.1)	GAGAGGGGCG	CAGACCCTAC	CTGCTGAACC	TGGCTGATCG	TAGGATCCCT	AGGACAGCAG	AGGAG	
F2_ (JX480631.1)	GAGAGGGGCG	CAGACCCTAC	CTGCTGAACC	TGGCTGATCG	TAGGATCCCT	AGGACAGCAG	AGGAG	
Liaoning_ (AF327877.1)	GAG---GGCG	CAGACCCTGC	CTGCTGAACC	TGGCTGATCG	TAGGATCCCT	AGGACAGCAG	AGGAG	
DV35-20_ (HM141911.1)	GAG---GGCG	CAGACCCTGC	CTGCTGAACC	TGGCTGATCG	TAGGATCCCT	AGGACAGCAG	AGGAG	
FDDV-10_ (GU385360.1)	GAG---GGCG	CAGACCCTGC	CTGCTGAACC	TGGCTGATCA	TAGGATCCCT	AGGACAGCTG	AGGAG	
Vaccine_ (AF327878.1)	GAG---GGCG	CAGACCCTGC	CTGCTGAACC	TGGCTGATCA	TAGGATCCCT	AGGACAGCAG	AGGAG	
DLV18-8_ (HM141923.1)	GAG---GGCG	CAGACCCTGC	CTGCTGAACC	TGGCTGATCA	TAGGATCCCT	AGGACAGCAG	AGGAG	
DV117_ (HM141912.1)	GAG---GGCG	CAGACCCTGC	CTGCTGAACC	TGGCTGATCG	TAGAATCCCT	AGGACAGCAG	AGGAG	
Wyoming_ (NC_001450.1)	GAGAGGGGCG	CAGACCCTAC	CTGTTGAACC	TGGCTGATCG	TAGGATCCCC	GGGACAGCAG	AGGAG	
EIAVuk_ (AF016316.1)	GAGAGGGGCG	CAGACCCTAC	CTGTTGAACC	TGGCTGATCG	TAGGATCCCC	GGGACAGCAG	AGGAG	
WSU5_ (AF247394.1)	GAGAGGGGCG	CAGACCCTAC	CTGTTGAACC	TGGCTGATCG	TAGGATCCCC	GGGACAGCAG	AGGAG	
V26_ (AB008197.1)	GAGAGGGGCG	CAGACCCTAC	CTGTTGAACC	TGGCTGATCG	TAGGATCCCC	GGGACAGCAG	AGGAG	
V70_ (AB008196.1)	GAGAGGGGCG	CAGACCCTAC	CTGTTGAACC	TGGCTGATCG	TAGGATCCCC	GGGACAGCAG	AGGAG	
Miyazaki_ (JX003263.1)	GGGAGGGGCG	CAGACCCTAC	CTGCTGAACC	TGGCTGATTG	TAGAATCCCT	AGGACAGCAG	AGGAG	
POCONE-BR	GAGAAGGGCG	CAGACCCTGC	CTGCTGAACC	TGGCTGATCG	TAGGATCCCT	AGGACAGCAG	AGGAG	

H3_ (JX480634.1)	AACTTACAGA	CGTCTTCTGG	AGGTGTTCT	GGCCAGAGCA	CAGGAAGACA	GGTAAAGAT ^{NCR} ATGG ^{gag}	GAGAC	455
F4_ (JX480633.1)	AACTTACAGA	CGTCTTCTGG	AGGTGTTCT	GGCCAGAGCA	CAGGAAGACA	GGTAAAGATGG	GAGAC	
F3_ (JX480632.1)	AACTTACAGA	CGTCTTCTGG	AGGTGTTCT	GGCCAGAGCA	CAGGAAGACA	GGTAAAGATGG	GAGAC	
F2_ (JX480631.1)	AACTTACAGA	CGTCTTCTGG	AGGTGTTCT	GGCCAGAGCA	CAGGAAGACA	GGTAAAGATGG	GAGAC	
Liaoning_ (AF327877.1)	AACTTACAGA	CGTCTTCTGG	AGGTGTTCT	GGCCACAACA	CAGGAAGACA	GGTAAAGATGG	GAGAC	
DV35-20_ (HM141911.1)	AACTTACAGA	AGTCTTCTGG	AGGTGTTCT	GGCCACAACA	CAGGAAGACA	GGTAAAGATGG	GAGAC	
FDDV-10_ (GU385360.1)	AACTTACAGA	AGTCTTCTGG	AGGTGTTCT	GGCCACAACA	CAGGAAGACA	GGTAAAGATGG	GAGAC	
Vaccine_ (AF327878.1)	AACTTACAGA	AGTCTTCTGG	AGGTGTTCT	GGCCACAACA	CAGGAAGACA	GGTAAAGATGG	GAGAC	
DLV18-8_ (HM141923.1)	AACTTACAGA	AGTCTTCTGG	AGGTGTTCT	GGCCACAACA	CAGGAAGACA	GGTAAAGATGG	GAGAC	
DV117_ (HM141912.1)	AACTTACAGA	AGTCTTCTGG	AGGTGTTCT	GGCCACAACA	CAGGAAGACA	GGTAAAGATGG	GAGAC	
Wyoming_ (NC_001450.1)	AACTTACAGA	AGTCTTCTGG	AGGTGTTCT	GGCCAGAACA	CAGGAGGACA	GGTAAAGATGG	GAGAC	
EIAVuk_ (AF016316.1)	AACTTACAGA	AGTCTTCTGG	AGGTGTTCT	GGCCAGAACA	CAGGAGGACA	GGTAAAGATGG	GAGAC	
WSU5_ (AF247394.1)	AACTTACAGA	AGTCTTCTGG	AGGTGTTCT	GGCCAGAACA	CAGGAGGACA	GGTAAAGATGG	GAGAC	
V26_ (AB008197.1)	AACTTACAGA	AGTCTTCTGG	AGGTGTTCT	GGCCAGAACA	CAGGAGGACA	GGTAAAGATGG	GAGAC	
V70_ (AB008196.1)	AACTTACAGA	AGTCTTCTGG	AGGTGTTCT	GGCCAGAACA	CAGGAGGACA	GGTAAAGATGG	GAGAC	
Miyazaki_ (JX003263.1)	AACTTACAGA	AGTCTTCTGG	AGGTGTTCT	GGCCAGAACA	CAGGAGGACA	GGTAAAGATGG	GGGAC	
POCONE-BR	AACTTACAGA	AGTCTTCTGG	AGGTGTTCT	GGCCAGAGCA	CAGGAAGACA	GGTAAAGATGG	GAGAT	

H3_ (JX480634.1)	CCAGTGACAT	GGAGCAAAGC	GCTCAAGAAG	TTAGAGAAGG	TGACGGTTCA	GGGGTCTCAA	AAATT	520
F4_ (JX480633.1)	CCAGTGACAT	GGAGCAAAGC	GCTCAAGAAG	TTAGAGAAGG	TGACGGTTCA	GGGGTCTCAA	AAATT	
F3_ (JX480632.1)	CCAGTGACAT	GGAGCAAAGC	GCTCAAGAAG	TTAGAGAAGG	TGACGGTTCA	GGGGTCTCAA	AAATT	
F2_ (JX480631.1)	CCAGTGACAT	GGAGCAAAGC	GCTCAAGAAG	TTAGAGAAGG	TGACGGTTCA	GGGGTCTCAA	AAATT	
Liaoning_ (AF327877.1)	TCTTTGACAT	GGAGCAAAGC	GCTCAAGAAG	TTAGAGAAGG	TGACGGTTCA	AGGGTCTCAA	AAGCT	
DV35-20_ (HM141911.1)	TCTTTGACAT	GGAGCAAAGC	GCTCAAGAAG	TTAGAGAAGG	TGACGGTTCA	AGGGTCTCAA	AAGCT	
FDDV-10_ (GU385360.1)	TCTTTGACAT	GGAGCAAAGC	GCTCAAGAAG	TTAGAGAAGG	TGACGGTTCA	AGGGTCTCAA	AAGCT	
Vaccine_ (AF327878.1)	TCTTTGACAT	GGAGCAAAGC	GCTCAAGAAG	TTAGAGAAGG	TGACGGTTCA	AGGGTCTCAA	AAGCT	
DLV18-8_ (HM141923.1)	TCTTTGACAT	GGAGCAAAGC	GCTCAAGAAG	TTAGAGAAGG	TGACGGTTCA	AGGGTCTCAA	AAGCT	
DV117_ (HM141912.1)	TCTTTGACAT	GGAGCAAAGC	GCTCAAGAAG	TTAGAGAAGG	TGACGGTTCA	AGGGTCTCAA	AAGCT	
Wyoming_ (NC_001450.1)	CTTTTGACAT	GGAGCAAAGC	GCTCAAGAAG	TTAGAGAAGG	TGACGGTTCA	AGGGTCTCAA	AAATT	
EIAVuk_ (AF016316.1)	CTTTTGACAT	GGAGCAAAGC	GCTCAAGAAG	TTAGAGAAGG	TGACGGTTCA	AGGGTCTCAA	AAATT	
WSU5_ (AF247394.1)	CTTTTGACAT	GGAGCAAAGC	GCTCAAGAAG	TTAGAGAAGG	TGACGGTTCA	AGGGTCTCAA	AAATT	
V26_ (AB008197.1)	CTTTTGACAT	GGAGCAAAGC	GCTCAAGAAG	TTAGAGAAGG	TGACGGTTCA	AGGGTCTCAA	AAATT	
V70_ (AB008196.1)	CTTTTGACAT	GGAGCAAAGC	GCTCAAGAAG	TTAGAGAAGG	TGACGGTTCA	AGGGTCTCAA	AAATT	
Miyazaki_ (JX003263.1)	TCAGTGACAT	GGAGCAAAGC	GCTCAAGAAG	CTAGAGAAGG	TGACGGTTCA	GGGGTCTCAA	AAATT	
POCONE-BR	CCAGTGACTT	GGAGCAAAGC	GCTCAAGAAG	CTAGAGAAGG	TGACGGTTTC	GGGATCTCAA	AAATT	

```

H3_(JX480634.1)      GAAAGCGAGT AATTGTCTGT GGGCGCTAAG TTTGGTGGAC TTAGTGCATG ACACCAATTT CAGTA 585
F4_(JX480633.1)      GAAAGCGAGT AATTGTCTGT GGGCGCTAAG TTTGGTGGAC TTAGTGCATG ACACCAATTT CAGTA
F3_(JX480632.1)      GAAAGCGAGT AATTGTCTGT GGGCGCTAAG TTTGGTGGAC TTAGTGCATG ACACCAATTT CAGTA
F2_(JX480631.1)      GAAAGCGAGT AATTGTCTGT GGGCGCTAAG TTTGGTGGAC TTAGTGCATG ACACCAATTT CAGTA
Liaoning_(AF327877.1) AACTAATGGT AACTGTAATT GGGCGCTGAA TTTGGTGAAC TTATTCCATG ACACCAATTT TTGTA
DV35-20_(HM141911.1) AACTAGTGGT AACTGTAATT GGGCGCTGAA TTTGGTGGAC TTATTCCATG ACACCAATTT TTGTA
FDDV-10_(GU385360.1) AACTAGTGGT AACTGTAATT GGGCGCTGAA TTTGGTGGAC TTATTCCATG ACACCAATTT TTGTA
Vaccine_(AF327878.1) AACTAGTGGT AACTGTAATT GGGCGCTGAA TTTGGTGGAC TTATTCCATG ACACCAATTT T-GTA
DLV18-8_(HM141923.1) AACTAGTGGT AACTGTAATT GGGCGCTGAA TTTGGTGGAC TTATTCCATG ACACCAATTT TTGTA
DV117_(HM141912.1) AACTAGTGGT AACTGTAATT GGGCGCTGAA TTTGGTGGAC TTATTCCATG ACACCAATTT TTGTA
Wyoming_(NC_001450.1) AACTACTGGT AACTGTAATT GGGCGCTAAG TCTAGTAGAC TTATTTCATG ATACCAACTT TGTAA
EIAVuk_(AF016316.1) AACTACTGGT AACTGTAATT GGGCGCTAAG TCTAGTAGAC TTATTTCATG ATACCAACTT TGTAA
WSU5_(AF247394.1) AACTACTGGT AACTGTAATT GGGCGCTAAG TCTAGTAGAC TTATTTCATG ATACCAACTT TGTAA
V26_(AB008197.1) AACTACTGGT AACTGTAATT GGGCGCTAAG TCTAGTAGAC TTATTTCATG ATACCAACTT TGTAA
V70_(AB008196.1) AACTACTGGT AACTGTAATT GGGCGCTAAG TCTAGTAGAC TTATTTCATG ATACCAACTT TGTAA
Miyazaki_(JX003263.1) ACACCCAGGA AATTGTAACT GGGCGCTAAG TTTGGTGGAT TTATTCCATG ACACCAACTT TATGA
POCONE-BR           GAATTCAGGA AATTGTAATT GGGCGCTAAG TTTGGTGGAT TTGTATCATG ACACCAATTA TTTGA

```

```

H3_(JX480634.1)      AAGAAAAAGA CTGGCAATTG AGAGATATTC TTCCATTGCT GGAAGATGTC TCTC---AAA CCTTG 650
F4_(JX480633.1)      AAGAAAAAGA CTGGCAATTG AGAGATATTC TTCCATTGCT GGAAGATGTC TCTC---AAA CCTTG
F3_(JX480632.1)      AAGAAAAAGA CTGGCAATTG AGAGATATTC TTCCATTGCT GGAAGATGTC TCTC---AAA CCTTG
F2_(JX480631.1)      AAGAAAAAGA CTGGCAATTG AGAGATATTC TTCCATTGCT GGAAGATGTC TCTC---AAA CCTTG
Liaoning_(AF327877.1) AAGAAAAAGA CTGGCAATTA AGGACGCTCA TTCCATTGTT GGAGGACGTT TCCC---AGA CATTG
DV35-20_(HM141911.1) AAGAAAAAGA CTGGCAATTA AGGACGCTCA TTCCATTGTT GGAGGATGTT TACCGTCAGA CGTTG
FDDV-10_(GU385360.1) AAGAAAAGGA CTGGCAATTA AGGACGCTTA TTCCATTGTT GGAGGACGTT TCCC---AGA CGTTG
Vaccine_(AF327878.1) AAGAAAAAGA CTGGCAATTA AAGGATGTC A TTCCATTGTT AGAGGGCGTT TCCC---AGA CGTTG
DLV18-8_(HM141923.1) AAGAAAAAGA CTGGCAATTA AGGACGCTCA TTCCATTAT TTCCATTGTT GGAGGATGTT TCCC---AGA CGTTG
DV117_(HM141912.1) AAGAAAAAGA CTGGCAATTA AGGACGCTCA TTCCATTGTT GGAGGATGTT TCCC---AGA CGTTG
Wyoming_(NC_001450.1) AAGAAAAGGA CTGGCAGCTG AGGATGTC A TTCCATTGCT GGAAGATGTA ACTC---AGA CGCTG
EIAVuk_(AF016316.1) AAGAAAAGGA CTGGCAGCTG AGGATGTC A TTCCATTGCT GGAAGATGTA ACTC---AGA CGCTG
WSU5_(AF247394.1) AAGAAAAGGA CTGGCAGCTG AGGATGTC A TTCCATTGCT GGAAGATGTA ACTC---AGA CGCTG
V26_(AB008197.1) AAGAAAAGGA CTGGCAGCTG AGGATGTC A TTCCATTGCT GGAAGATGTA ACTC---AGA CGCTG
V70_(AB008196.1) AAGAAAAGGA CTGGCAGCTG AGGATGTC A TTCCATTGCT GGAAGATGTA ACTC---AGA CGCTG
Miyazaki_(JX003263.1) AAGAGAAGGA CTGGCAACTG AAGGACGTC A TTCCATTGCT GGAAGACGTT GCCG---AGA CGTTG
POCONE-BR           AAGAAAAGGA CTGGCAATTG AGGATGTC A TTCCATTGCT GGAGGACGTT ACTC---AGA CATTG

```

```

H3_(JX480634.1)      ACAGGACAAG AAAAAAGAGGC A 671
F4_(JX480633.1)      ACAGGACAAG AAAAAAGAGGC A
F3_(JX480632.1)      ACAGGACAAG AAAAAAGAGGC A
F2_(JX480631.1)      ACAGGACAAG AAAAAAGAGGC A
Liaoning_(AF327877.1) TCAGGACAAG AGAGA--GGC A
DV35-20_(HM141911.1) TCAGGACAAG AGAGAGAGGC A
FDDV-10_(GU385360.1) TCAGGACAAG AGAGAGAGGC A
Vaccine_(AF327878.1) TCAGGACAAG AGAGAGAGGC A
DLV18-8_(HM141923.1) TCAGGACAAG AGAGAGAGGC A
DV117_(HM141912.1) TCAGGACAAG AGAGAGAGGC A
Wyoming_(NC_001450.1) TCAGGACAAG AAAGAGAGGC C
EIAVuk_(AF016316.1) TCAGGACAAG AAAGAGAGGC C
WSU5_(AF247394.1) TCAGGACAAG AAAGAGAGGC C
V26_(AB008197.1) TCAGGACAAG AAAGAGAGGC C
V70_(AB008196.1) TCAGGAAAAG AAAGAGAGGC C
Miyazaki_(JX003263.1) TCAGGACCGG AGAAAAGAGGC A
POCONE-BR           TCAGGACAAG AAAGAGAGGC C

```

FIGURA 48: Alinhamento da sequência nucleotídica do EIAV POCONE-BR do Pantanal brasileiro para a região 5' LTR ao gene gag (posição nucleotídica 44 a 671) – Alinhamento de 17 sequências nucleotídicas do EIAV de 599 pb: uma sequência do Pantanal brasileiro - POCONE-BR com 16 sequências de genoma completo - H3, F4, F3, F2, Liaoning, DV35-20, FDDV-10, Vaccine, DLV18-8, DV117, Wyoming, V26, WSU5, EIAVuk, V70 e Miyazaki. O número de acesso para cada sequência está indicado entre parênteses. O alinhamento foi realizado no programa MEGA, versão 6.0, utilizando o Clustal W (TAMURA *et al.*, 2013). Os domínios funcionais estão indicados por caixas, e os domínios estruturais por setas. Sítio de iniciação da transcrição (+1), 'methylated DNA-binding protein site' (MDBP).

No alinhamento da sequência de 32 aminoácidos deduzidas de EIAV para a amostra POCONE-BR do Pantanal a partir de uma sequência nucleotídica de 96 pb para o exon 1 do gene *tat*, com mais seis sequências de aa deduzidas de sequências de EIAV mundiais: Liaoning, Wyoming, Miyazaki, H3, SA e DE. Foi observada uma mutação no aa 19 da sequência POCONE-BR, sendo uma mutação não-conservativa em relação às sequências H3, Liaoning, SA e DE. Porém a mesma troca de aa na mesma posição também foi observada nas sequências Wyoming e Miyazaki. Contudo, quando se analisa todas as sete sequências de aa no alinhamento em conjunto foram observadas seis mutações de aa, sendo que cinco foram mutações não-conservativas e apenas uma foi conservativa (Figura 49, Tabela 13).

```

H3_(JX480634.1)          LLNLADRRIP RTAEEINLQTS SGGVPGQSTG RQ
Liaoning_(AF327877.1)  .....HN...
Wyoming_(NC_001450.1)  .....G.....K.....N...G.
Miyazaki_(JX003263.1)  .....C.....K.....HN...G.
SA_(KM247555.2)       .....
DE_(KM247554.1)       .....
POCONE-BR              .....K.....

```

FIGURA 49: Alinhamento da sequência de aminoácidos do EIAV POCONE-BR do Pantanal brasileiro para o exon 1 do gene *tat* (posição nucleotídica 349 a 444) – Alinhamento de sete sequências do EIAV de 32 aminoácidos cada para o exon 1 do gene *tat*: uma sequência do Pantanal brasileiro - POCONE-BR, quatro sequências de genoma completo - H3, Liaoning, Wyoming, e Miyazaki, e duas sequências parciais - SA e DE. O alinhamento foi realizado no programa MEGA, versão 6.0 (TAMURA *et al.*, 2013). O número de acesso para cada sequência está identificado entre parênteses. Alanina (A), Cisteína (C), Ácido aspártico (D), Ácido glutâmico (E), Fenilalanina (F), Glicina (G), Histidina (H), Isoleucina (I), Lisina (K), Leucina (L), Metionina (M), Asparagina (N), Prolina (P), Glutamina (Q), Arginina (R), Serina (S), Treonina (T), Valina (V), Triptofano (W), Tirosina (Y).

TABELA 13: Locais de troca de aminoácidos entre seis sequências mundiais do EIAV e a sequência POCONE-BR do Pantanal brasileiro para o exon 1 do gene *tat*

Exon 1 <i>tat</i> – 32 aa		Sequências							
Troca de Aminoácido	Posição	H3	Lia	Wyo	Miy	SA	DE	POC	Tipo de alteração
Arginina (R) – Cisteína (C)	7	R	R	R	C	R	R	R	Não-conservativa
Arginina (R) – Glicina (G)	11	R	R	G	R	R	R	R	Não-conservativa
Treonina (T) – Lisina (K)	19	T	T	K	K	T	T	K	Não-conservativa
Glutamina (Q) – Histidina (H)	27	Q	H	Q	H	Q	Q	Q	Não-conservativa
Serina (S) – Asparagina (N)	28	S	N	N	N	S	S	S	Conservativa
Arginina (R) – Glicina (G)	31	R	R	G	G	R	R	R	Não-conservativa

Os locais em que as trocas de aminoácidos da sequência POCONE-BR foi diferente em relação às demais sequências estão destacados em cinza.

A análise filogenética da sequência POCONE-BR de 599 pb, amplificada com as combinações de iniciadores: EIAV-LTR-28-F e EIAV-tat-405-R1, e EIAV-LTR-28-F e gag-672-R, se estende da região 5' LTR ao gene *gag*, foi feita em comparação a mesma região de 16 sequências mundiais do EIAV disponíveis no GenBank. A árvore filogenética mostrou que a sequência de EIAV do Pantanal está em um ramo próximo às sequências da Irlanda. As sequências da China (Liaoning, Vaccine, DV117, DLV18-8, DV35-20, FDDV-10), Estados Unidos (Wyoming, EIAVuk, WSU5, V26, V70), Irlanda (H3, F4, F3, F2) e Japão (Miyazaki) formam quatro clados separados, apoiados por um elevado valor de bootstrap, corroborando os dados da literatura (Figura 50).

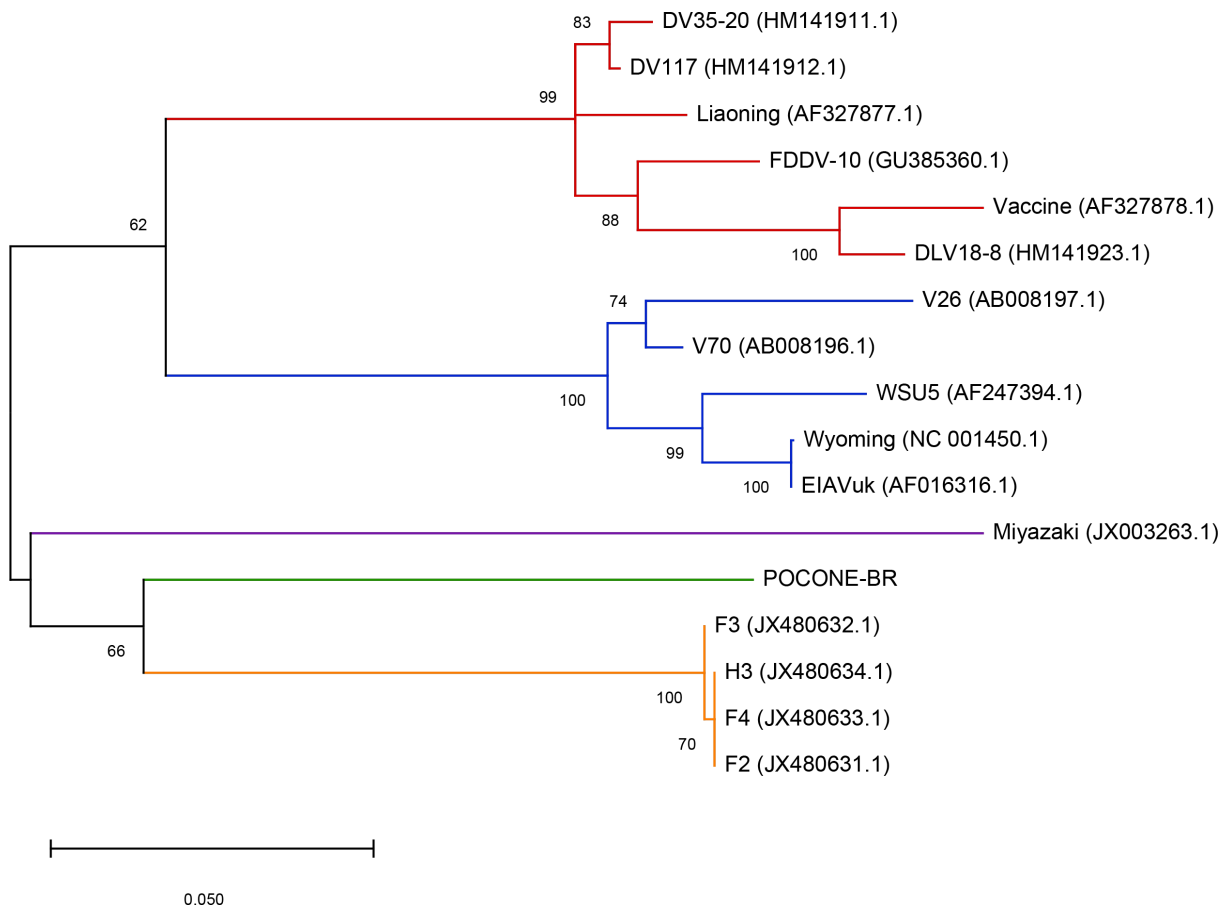


FIGURA 50: Análise filogenética de uma sequência nucleotídica do EIAV do Pantanal brasileiro para a região 5' LTR ao gene *gag* – Análise filogenética baseada em 17 sequências nucleotídicas do EIAV: uma sequência nucleotídica obtida a partir do DNA proviral de equídeo do Pantanal brasileiro – POCONE-BR, e 16 sequências mundiais do EIAV: H3, F4, F3, F2, Liaoning, Vaccine, DV117, DLV18-8, DV35-20, FDDV-10, Wyoming, EIAVuk, WSU5, V26, V70, e Miyazaki. O número de acesso para cada sequência está identificado entre parênteses. A árvore filogenética foi inferida no programa MEGA versão X (KUMAR *et al.*, 2018), através do método Máxima verossimilhança baseado no modelo Tamura Nei com distribuição Gamma (4 categorias (+G parameter = 0,5716)), baseado em um dataset final de 659 posições nucleotídicas. Os valores de bootstrap foram determinados baseados em 1000 replicatas.

5.2.3.2. Análise molecular empregando a sequência nucleotídica do gene *pol* (nt 4.325 – 4.841) amplificada a partir da amostra POCONE-BR

Para a amostra POCONE-BR que foi amplificada com as combinações de iniciadores EIAV-pol-4.325-F + EIAV-pol-4.817-R e EIAV-pol-4.325-F + EIAV-pol-4.841, foi obtida uma sequência consenso de 495 pb que corresponde a posição nucleotídica 4.346 a 4.840 em relação a sequência Miyazaki, correspondente a uma sequência parcial da enzima integrase do gene *pol*. O fragmento de 495 pb para a sequência POCONE-BR apresentou similaridade nucleotídica de 78,9% com a sequência H3, 77,7% com Liaoning, 78,4% com Wyoming, 79,8% com Miyazaki, 79,2% com SA, e 78,6% com DE.

O alinhamento da sequência nucleotídica de 495 pb da amostra POCONE-BR em relação as sequências de genoma completo – H3, Liaoning, Wyoming, Miyazaki, e duas sequências parciais – SA e DE apresentou regiões conservadas e variáveis, com 22 substituições nucleotídicas. Foram consideradas substituições nucleotídicas apenas quando a sequência brasileira POCONE-BR apresentou bases diferentes em relação as demais sequências analisadas no alinhamento. Sendo 12 transições (nas posições 6, 117, 138, 153, 225, 269, 318, 329, 348, 409, 414 e 448 no alinhamento), sete transversões (nas posições 25, 33, 183, 268, 316, 328 e 444), três transições ou transversões (nas posições 108, 207 e 408), dependendo em relação a qual sequência do EIAV se compara (Figura 51).

H3	TTA	GCA	AAA	AGA	TAT	GGG	CTA	CCG	TTA	GCG	GTA	GCA	AAG	CAG	ATA	ACC	CAG	GAG	TGC	CCA	CAT	63
Liaoning	TTG	GCA	AAA	AGA	TAT	GGG	TTA	CCA	TTG	ACG	GTA	GCT	AAA	CAG	ATA	ACT	CAA	GAA	TGC	CCT	CAT	
Wyoming	TTG	GCA	AGA	AAT	TAT	AAG	ATA	CCA	TTG	ACT	GTA	GCA	AAA	CAG	ATA	ACT	CAA	GAA	TGT	CCT	CAT	
Miyazaki	TTG	GCA	AAA	AAA	TAT	CGA	CTA	CCA	TTG	ACT	GTG	GCA	AAA	CAA	ATA	ACT	CAA	GAG	TGT	CCT	CAT	
SA	TTA	GCA	AAA	AGA	CAT	GGG	CTA	CCG	TTA	GCG	GTA	GCA	AAG	CAG	ATA	ACC	CAG	GAG	TGC	CCA	CAT	
DE	TTA	GCA	AAA	AGA	CAT	GGG	CTA	CCG	TTA	GCG	GTA	GCA	AAG	CAG	ATA	ACC	CAG	GAG	TGC	CCA	CAT	
POCONE-BR	TTA	GCG	AAA	AGA	TAT	GGG	TTA	CCA	ATA	GCG	GTT	GCA	AAA	CAN	ATA	ACT	CAA	GAA	TGT	CCT	CAT	
H3	TGT	ACT	AAA	CAA	GGA	TCT	GGG	CCT	GCA	GGC	TGT	GTA	GTA	AGA	TCT	CCT	AAT	CAT	TGG	CAA	GCG	126
Liaoning	TGT	ACT	AAG	CAA	GGA	CCT	GGA	CCA	GCA	GGT	TGT	GTA	ATG	AGA	TCC	CCT	AAT	CAT	TGG	CAG	GCT	
Wyoming	TGC	ACT	AAG	CAA	GGA	TCA	GGA	CCT	GCA	GGT	TGT	GTC	ATG	AGA	TCT	CCT	AAT	CAT	TGG	CAG	GCA	
Miyazaki	TGC	ACT	AAG	CAG	GGC	TCA	GGA	CCT	GCA	GGT	TGT	GTA	ATG	AGA	TCG	CCA	AAT	CAT	TGG	CAG	GCT	
SA	TGT	ACT	AAA	CAA	GGA	TCT	GGG	CCT	GCA	GGC	TGT	GTA	GTA	AGA	TCT	CCT	AAT	CAT	TGG	CAA	GCG	
DE	TGT	ACT	AAA	CAA	GGA	TCT	GGG	CCT	GCA	GGC	TGT	GTA	GTA	AGA	TCT	CCT	AAT	CAT	TGG	CAA	GCG	
POCONE-BR	TGC	ACT	AAA	CAG	GGA	TCT	GGA	CCT	GCA	GGT	TGT	GTA	ATG	AGA	TCA	CCT	AAT	CAC	TGG	CAG	GCT	
H3	GAT	TGC	ACA	CAT	TTA	GAC	AAT	AAA	ATA	ATA	TTG	ACA	TTT	GTG	GAG	TCA	AAC	TCA	GGG	TAC	ATA	189
Liaoning	GAT	TGT	ACA	CAT	TTA	GAA	AAC	AGG	ATA	ATA	ATG	ACA	TTT	GTA	GAG	TCT	AAT	TCA	GGA	TAC	ATT	
Wyoming	GAT	TGC	ACA	CAT	TTG	GAC	AAT	AAG	ATA	ATA	TTG	ACT	TTT	GTA	GAG	TCA	AAT	CAT	TGG	CAG	GCA	
Miyazaki	GAC	TGT	ACA	CGT	CTG	GAA	AAT	AAG	ATA	ATA	ATG	ACA	TTT	GTA	GAC	TCT	AAT	TCA	GGA	TAT	ATA	
SA	GAT	TGC	ACA	CAT	TTA	GAC	AAT	AAA	ATA	ATA	TTG	ACA	TTT	GTG	GAG	TCA	AAC	TCA	GGG	TAC	ATA	
DE	GAT	TGC	ACA	CAT	TTA	GAC	AAT	AAA	ATA	ATA	TTG	ACA	TTT	GTG	GAG	TCA	AAC	TCA	GGG	TAC	ATA	
POCONE-BR	GAC	TGC	ACA	CAC	ATA	GAA	AAT	AAG	GTG	ATA	TTG	ACA	TTT	GTA	GAG	TCA	AAT	TCA	GGC	TAT	ATA	
H3	CAT	GCT	ACG	CTA	TTG	GCA	AAA	GAG	AAT	GCA	TTA	TGT	ACT	TCA	TTA	GCC	ATC	CTA	GAA	TGG	GCA	252
Liaoning	CAT	GCT	ACT	CTA	TTG	TCC	AAA	GAA	AAT	GCC	TTG	TGT	ACT	TCA	TTG	GCT	ATT	TTG	GAA	TGG	GTG	
Wyoming	CAT	GCT	AGA	TTA	TTG	TCA	AAA	GAA	AAT	GCA	TTA	TGT	ACT	TCA	TTG	GCT	ATT	TTA	GAA	TGG	GCA	
Miyazaki	CAT	GCT	ACG	TTG	TTG	CCA	AAA	GAA	AAT	GCA	TTA	CAT	ACT	TCA	TTG	GCT	ATT	TTA	GAG	TGG	GTA	
SA	CAT	GCT	ACG	CTA	TTG	GGA	AAA	GAG	AAT	GCA	TTA	TGT	ACT	TCA	TTG	GCC	ATC	CTA	GAA	TGG	GCA	
DE	CAT	GCT	ACG	CTA	TTG	GCA	AAA	GAG	AAT	GCA	TTA	TGT	ACT	TCA	TTA	GCC	ATC	CTA	GAA	TGG	GCA	
POCONE-BR	CAT	GCT	ACT	TTA	TTG	TCT	AAA	GAA	AAT	GCA	TTG	TGC	ACC	TCA	TTG	GCT	ATT	CTA	GAA	TGG	GCA	
H3	AGA	CTA	TTT	TCT	CCA	AAA	TCA	TTG	CAT	ACA	GAT	AAT	GGT	ACT	AAT	TTT	GTG	GCT	GAC	ACA	GTA	315
Liaoning	AGG	TTA	TTT	TCT	CCT	AAA	TCT	TTA	CAT	ACA	GAC	AAT	GGT	ACT	AAT	TTT	GTA	GCA	GAG	TCA	GTA	
Wyoming	AGA	TTG	TTT	TCA	CCA	AAG	TCC	TTA	CAC	ACA	GAT	AAC	GGC	ACT	AAT	TTT	GTG	GCA	GAA	CCA	GTT	
Miyazaki	AGG	ATA	TTT	TCA	CCA	AAG	TCC	TTA	CAT	ACA	GAT	AAT	GGT	ACT	AAT	TTT	ACA	GCA	GAG	TCA	GTA	
SA	AGA	CTA	TTT	TCT	CCA	AAA	TCA	TTG	CAT	ACA	GAT	AAT	GGT	ACT	AAT	TTT	GTG	GCT	GAC	ACA	GTA	
DE	AGA	CTA	TTT	TCT	CCA	AAA	TCA	TTG	CAT	ACA	GAT	AAT	GGT	ACT	AAT	TTT	GTG	GCT	GAC	ACA	GTA	
POCONE-BR	AGA	CTA	TTT	TCT	CCA	CGA	TCA	TTG	CAC	ACA	GAT	AAT	GGC	ACT	AAT	TTT	ATA	GCT	GAC	ACA	GTA	
H3	GAA	AAT	TTA	TTA	AAA	TTT	TTA	CAA	GTG	AAA	CAT	ACC	ACA	GGG	ATA	CCC	TAC	CAT	CCA	GAA	AGT	378
Liaoning	GCA	AAT	CTG	TTG	AAA	TTC	CTG	AAG	GTG	ACA	CAT	ACT	ACA	GGA	ATA	CCT	TAT	CAC	CCA	GAG	AGC	
Wyoming	GTA	AAT	TTG	TTG	AAG	TTC	CTA	AAG	ATA	GCA	CAT	ACC	ACA	GGA	ATA	CCA	TAT	CAT	CCA	GAA	AGT	
Miyazaki	CAA	AAC	TTG	CTA	AAG	TTT	CTG	AAA	GTG	ACA	CAT	ACT	ACA	GGC	ATA	CCT	TAT	CAC	CCA	GAA	AGT	
SA	GAA	AAT	TTA	TTA	AAA	TTT	TTA	CAA	GTG	AAA	CAT	ACC	ACA	GGG	ATA	CCC	TAC	CAT	CCA	GAA	AGT	
DE	GAA	AAT	TTA	TTA	AAA	TTT	TTA	CAA	GTG	AAA	CAT	ACC	ACA	GGG	ATA	CCC	TAC	CAT	CCA	GAA	AGT	
POCONE-BR	CAG	AAT	TTG	TTA	CGG	TTC	CTA	AAG	ATA	ACA	CAC	ACA	ACA	GGG	ATA	CCT	TAT	CAC	CCA	GAA	AGT	
H3	CAG	GGT	ATT	ATA	GAA	AGA	GCC	AAT	AGG	ACA	TTG	AAA	GAA	AAA	ATT	CAA	AGT	CAT	AGA	GAT	AAT	441
Liaoning	CAA	GGC	ATT	GTG	GAA	AGG	GCA	AAC	AGG	ACA	TTA	AAA	GAA	AAA	ATT	AAA	AGT	CAT	AGA	GAA	AAT	
Wyoming	CAG	GGT	ATT	GTA	GAA	AGG	GCA	AAT	AGG	ACC	TTG	AAA	GAG	AAG	ATT	CAA	AGT	CAT	AGA	GAC	AAC	
Miyazaki	CAA	GGT	ATA	ATA	GAG	CGA	GCC	AAT	AGG	ACT	TTG	AAA	GAA	AAA	ATT	CAA	AGT	CAT	AGA	AGG	AAT	
SA	CAG	GGT	ATT	ATA	GAA	AGA	GCT	AAT	AGG	ACA	TTG	AAA	GAA	AAA	ATT	CAA	AGT	CAT	AGA	GAT	AAT	
DE	CAG	GGT	ATT	ATA	GAA	AGA	GCT	AAT	AGG	ACA	TTG	AAA	GAA	AAA	ATT	CAA	AGT	CAT	AGA	GAT	AAT	
POCONE-BR	CAA	GGT	ATA	ATA	GAG	AGA	GCT	AAT	AGG	ACG	CTA	AAG	GAA	AAA	ATT	CAA	AGT	CAT	AGA	GAC	AAT	
H3	ACT	CAG	ACA	TTG	GAA	GCG	GCC	CTA	CAA	CTT	GCT	CTC	ATT	ACT	TGT	AAC	AAA	GGG			495	
Liaoning	ACT	CAG	ACA	CTT	GAA	GCA	GCA	TTA	CAA	CTT	GCT	CTC	ATT	ACT	TGT	AAC	AAA	GGG				
Wyoming	ACT	CAA	ACA	CTG	GAG	GCA	GCT	TTA	CAA	CTT	GCT	CTC	ATT	ACT	TGT	AAC	AAA	GGG				
Miyazaki	ACC	CAG	ACG	TTA	GAA	GCA	GCA	TTG	CAA	CTT	GCT	CTC	ATC	ACT	TGT	AAC	AAA	GGG				
SA	ACT	CAG	ACA	TTG	GAA	GCG	GCC	CTA	CAA	CTT	GCT	CTC	ATT	ACT	TGT	AAC	AAA	GGG				
DE	ACT	CAG	ACA	TTG	GAA	GCG	GCC	CTA	GAA	CTT	GCT	CTC	ATT	ACT	TGT	AAC	AAA	GGG				
POCONE-BR	ACA	CAG	ACA	TTA	GAA	GCG	GCT	TTG	CAG	CTT	GCC	CTC	ATT	ACT	TGT	AAC	AAA	GGG				

FIGURA 51: Alinhamento da sequência nucleotídica do EIAV POCONE-BR do Pantanal brasileiro para o gene *pol* (posição nucleotídica 4.345 a 4.840) – Alinhamento de sete sequências nucleotídicas do EIAV de 495 pb: uma sequência do Pantanal brasileiro - POCONE-BR, quatro sequências de genoma completo - H3 (JX480634.1), Liaoning (AF327877.1), Wyoming (AF033820.1), e Miyazaki (JX003263.1), e duas sequências parciais – SA (KM247555.2) e DE (KM247554.1). O alinhamento foi realizado no programa MEGA, versão 6.0, utilizando o Clustal W (TAMURA *et al.*, 2013). As regiões conservadas entre todas as sequências estão destacadas em cinza, e as bases variáveis somente na sequência POCONE-BR em relação às demais sequências estão destacadas em vermelho.

No alinhamento da sequência deduzida de 165 aminoácidos de EIAV para a amostra POCONE-BR do Pantanal a partir de uma sequência nucleotídica de 495 pb para o gene *pol* com mais seis sequências de aa deduzidas de sequências de EIAV mundiais Liaoning, Wyoming, Miyazaki, H3, SA e DE foram observadas seis mutações de aa, sendo cinco conservativas nas posições 9, 47, 51, 90 e 110, enquanto que na posição 101 pode ser uma mutação tanto conservativa quanto não-conservativa, dependendo em relação a qual sequência do EIAV se compara. Foram consideradas como mutações apenas quando o aminoácido da sequência do Pantanal foi diferente em relação a todas as sequências mundiais do EIAV analisadas no alinhamento (figura 52, Tabela14).

Contudo, quando se analisa todas as sete sequências do alinhamento em conjunto foram observadas 33 mutações de aminoácidos entre as sequências, sendo 21 mutações conservativas, oito não-conservativas, e quatro que podem ser tanto conservativas quanto não-conservativas, dependendo em relação a qual sequência do EIAV se compara, uma vez que houve a troca de mais de um aa entre as sete sequências em determinadas posições no alinhamento (Figura 52, Tabela14).

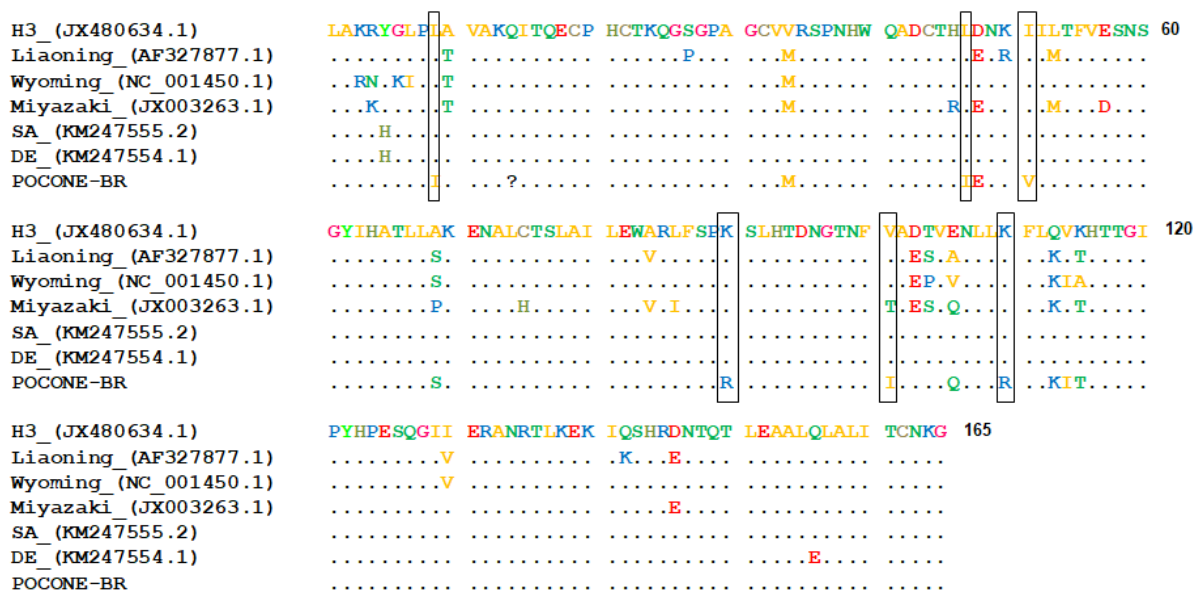


FIGURA 52: Alinhamento da sequência de aminoácidos do EIAV POCONE-BR do Pantanal brasileiro para o gene *pol* (posição nucleotídica 4.346 a 4.840) – Alinhamento de sete sequências do EIAV de 165 aminoácidos cada para o gene *pol*: uma sequência do Pantanal brasileiro - POCONE-BR, quatro sequências de genoma completo - H3, Liaoning, Wyoming, e Miyazaki, e duas sequências parciais - SA e DE. O alinhamento foi realizado no programa MEGA, versão 6.0, utilizando o Clustal W (TAMURA *et al.*, 2013). O número de acesso para cada sequência está identificado entre parênteses. Os locais em que não foi possível definir o aminoácido estão indicados pelo sinal ? no alinhamento. Regiões variáveis nas sequências Brasileiras em relação às demais sequências estão identificadas por retângulos pretos. Alanina (A), Cisteína (C), Ácido aspártico (D), Ácido glutâmico (E), Fenilalanina (F), Glicina (G), Histidina (H), Isoleucina (I), Lisina (K), Leucina (L), Metionina (M), Asparagina (N), Prolina (P), Glutamina (Q), Arginina (R), Serina (S), Treonina (T), Valina (V), Triptofano (W), Tirosina (Y).

TABELA 14: Locais de troca de aminoácidos entre seis sequências mundiais do EIAV e a sequência POCONE-BR do Pantanal brasileiro para o gene *pol* **

Gene <i>pol</i> – 165 aa		Sequências							
Troca de Aminoácido	Posição	H3	Lia	Wyo	Miy	SA	DE	POC	Tipo de alteração
Lisina (K) – Arginina (R)	3	K	K	R	K	K	K	K	Conservativa
Arginina(R) – Asparagina (N)	4*	<u>R</u>	<u>R</u>	<u>N</u>	K	<u>R</u>	<u>R</u>	<u>R</u>	Não-conservativa*
Arginina (R) – Lisina (K)	4*	<u>R</u>	<u>R</u>	N	<u>K</u>	<u>R</u>	<u>R</u>	<u>R</u>	Conservativa*
Asparagina (N) – Lisina (K)	4*	R	R	<u>N</u>	<u>K</u>	R	R	R	Não-conservativa*
Tirosina (Y) – Histidina (H)	5	Y	Y	Y	Y	H	H	Y	Não-conservativa
Glicina (G) – Lisina (K)	6	G	G	K	G	G	G	G	Não-conservativa
Leucina (L) – Isoleucina(I)	7	L	L	I	L	L	L	L	Conservativa
Leucina (L) – Isoleucina (I)	<u>9</u>	L	L	L	L	L	L	I	Conservativa
Alanina (A) – Treonina (T)	10	A	T	T	T	A	A	A	Não-conservativa
Serina (S) – Prolina (P)	27	S	P	S	S	S	S	S	Conservativa

TABELA 14: Locais de troca de aminoácidos entre seis sequências mundiais do EIAV e a sequência POCONE-BR do Pantanal brasileiro para o gene *pol* **

Gene <i>pol</i> – 165 aa		Sequências							
Troca de Aminoácido	Posição	H3	Lia	Wyo	Miy	SA	DE	POC	Tipo de alteração
Valina (V) – Metionina (M)	34	V	M	M	M	V	V	M	Conservativa
Histidina (H) – Arginina (R)	46	H	H	H	R	H	H	H	Conservativa
Leucina (L) – Isoleucina (I)	47	L	L	L	L	L	L	I	Conservativa
Ácido Aspártico (D) – Ácido Glutâmico (E)	48	D	E	D	E	D	D	E	Conservativa
Lisina (K) – Arginina (R)	50	K	R	K	K	K	K	K	Conservativa
Isoleucina (I) – Valina (V)	51	I	I	I	I	I	I	V	Conservativa
Leucina (L) – Metionina (M)	53	L	M	L	M	L	L	L	Conservativa
Ácido Glutâmico(E) – Ácido Aspártico (D)	57	E	E	E	D	E	E	E	Conservativa
Alanina (A) – Serina (S)	69*	<u>A</u>	<u>S</u>	<u>S</u>	P	<u>A</u>	<u>A</u>	<u>S</u>	Não-conservativa*
Alanina (A) – Prolina (P)	69*	<u>A</u>	S	S	<u>P</u>	<u>A</u>	<u>A</u>	S	Não-conservativa*
Serina (S) – Prolina (P)	69*	A	<u>S</u>	<u>S</u>	<u>P</u>	A	A	<u>S</u>	Conservativa*
Cisteína (C) – Histidina (H)	75	C	C	C	H	C	C	C	Não-conservativa
A (Alanina) – Valina (V)	84	A	V	A	V	A	A	A	Conservativa
Leucina (L) – Isoleucina (I)	86	L	L	L	I	L	L	L	Conservativa
Lisina (K) – Arginina (R)	90	K	K	K	K	K	K	R	Conservativa
Valina (V) – Treonina (T)	101*	<u>V</u>	<u>V</u>	<u>V</u>	<u>T</u>	<u>T</u>	<u>T</u>	I	Não-conservativa*
Valina (V) – Isoleucina (I)	101*	<u>V</u>	<u>V</u>	<u>V</u>	T	T	T	<u>I</u>	Conservativa*
Treonina (T) – Isoleucina (I)	101*	V	V	V	<u>T</u>	<u>T</u>	<u>T</u>	<u>I</u>	Não-conservativa*
Ácido Aspártico (D) – Ácido Glutâmico (E)	103	D	E	E	E	D	D	D	Conservativa
Treonina (T) – Serina (S)	104*	<u>T</u>	<u>S</u>	P	<u>S</u>	<u>T</u>	<u>T</u>	<u>T</u>	Conservativa*
Treonina (T) – Prolina (P)	104*	<u>T</u>	S	<u>P</u>	S	<u>T</u>	<u>T</u>	<u>T</u>	Conservativa*
Serina (S) – Prolina (P)	104*	T	<u>S</u>	<u>P</u>	<u>S</u>	T	T	T	Conservativa*
Ácido Glutâmico (E) – Alanina (A)	106*	<u>E</u>	<u>A</u>	V	Q	<u>E</u>	<u>E</u>	Q	Não-conservativa*
Ácido Glutâmico (E) – Valina (V)	106*	<u>E</u>	A	<u>V</u>	Q	<u>E</u>	<u>E</u>	Q	Não-conservativa*
Ácido Glutâmico (E) – Glutamina (Q)	106*	<u>E</u>	A	V	<u>Q</u>	E	E	<u>Q</u>	Não-conservativa*
Alanina (A) – Valina (V)	106*	E	<u>A</u>	<u>V</u>	Q	E	E	Q	Conservativa*
Alanina (A) – Glutamina (Q)	106*	E	<u>A</u>	V	<u>Q</u>	E	E	<u>Q</u>	Não-conservativa*
Valina (V) – Glutamina (Q)	106*	E	A	<u>V</u>	<u>Q</u>	E	E	<u>Q</u>	Não-conservativa*

TABELA 14: Locais de troca de aminoácidos entre seis sequências mundiais do EIAV e a sequência POCONE-BR do Pantanal brasileiro para o gene *pol* **

Gene <i>pol</i> – 165 aa		Sequências							
Troca de Aminoácido	Posição	H3	Lia	Wyo	Miy	SA	DE	POC	Tipo de alteração
Lisina (K) – Arginina (R)	110	K	K	K	K	K	K	R	Conservativa
Glutamina (Q) – Lisina (K)	113	Q	K	K	K	Q	Q	K	Não-conservativa
Valina (V) – Isoleucina (I)	114	V	V	I	V	V	V	I	Conservativa
Lisina (K) – Treonina (T)	115*	<u>K</u>	<u>I</u>	A	A	<u>K</u>	<u>K</u>	<u>I</u>	Não-conservativa*
Lisina (K) – Alanina (A)	115*	<u>K</u>	T	<u>A</u>	<u>A</u>	<u>K</u>	<u>K</u>	T	Não-conservativa*
Treonina (T) – Alanina (A)	115*	K	<u>I</u>	<u>A</u>	<u>A</u>	K	K	T	Não-conservativa*
Isoleucina (I) – Valina (V)	130	I	V	V	I	I	I	I	Conservativa
Glutamina (Q) – Lisina (K)	142	Q	K	Q	Q	Q	Q	Q	Não-conservativa
Ácido aspártico (D) – Ácido Glutâmico (E)	146	D	E	D	E	D	D	D	Conservativa
Glutamina (Q) – Ácido Glutâmico (E)	156	Q	Q	Q	Q	Q	E	Q	Não-conservativa

**Os * representam locais em que a troca por mais de um aminoácido diferente ocorreu em mais de uma sequência no alinhamento na mesma posição no alinhamento. Assim, a mutação pode ser conservativa ou não-conservativa dependendo entre qual sequência do EIAV está sendo feita a análise. Os locais em que as trocas de aminoácidos da sequência POCONE-BR foi diferente em relação às demais sequências estão destacados em cinza.

A análise filogenética da sequência POCONE-BR de 495 pb, amplificada com as combinações de iniciadores EIAV-pol-4.325-F + EIAV-pol-4.817-R e EIAV-pol-4.325-F + EIAV-pol-4.841, que corresponde a uma sequência parcial da enzima integrase do gene *pol*, foi feita em comparação com 18 sequências mundiais do EIAV. A árvore filogenética mostrou que a sequência do Pantanal está em um ramo próximo ao clado das sequências da Irlanda e da Itália, com um valor de bootstrap de 67. As sequências da China (Liaoning, Vaccine, DV117, DLV18-8, DV35-20, FDDV-10), Estados Unidos (Wyoming, EIAVuk, WSU5, V26, V70), Irlanda (H3, F4, F3, F2) e Japão (Miyazaki) formam quatro cladogramas separados, apoiados por um elevado valor de bootstrap, corroborando os dados da literatura (Figura 53).

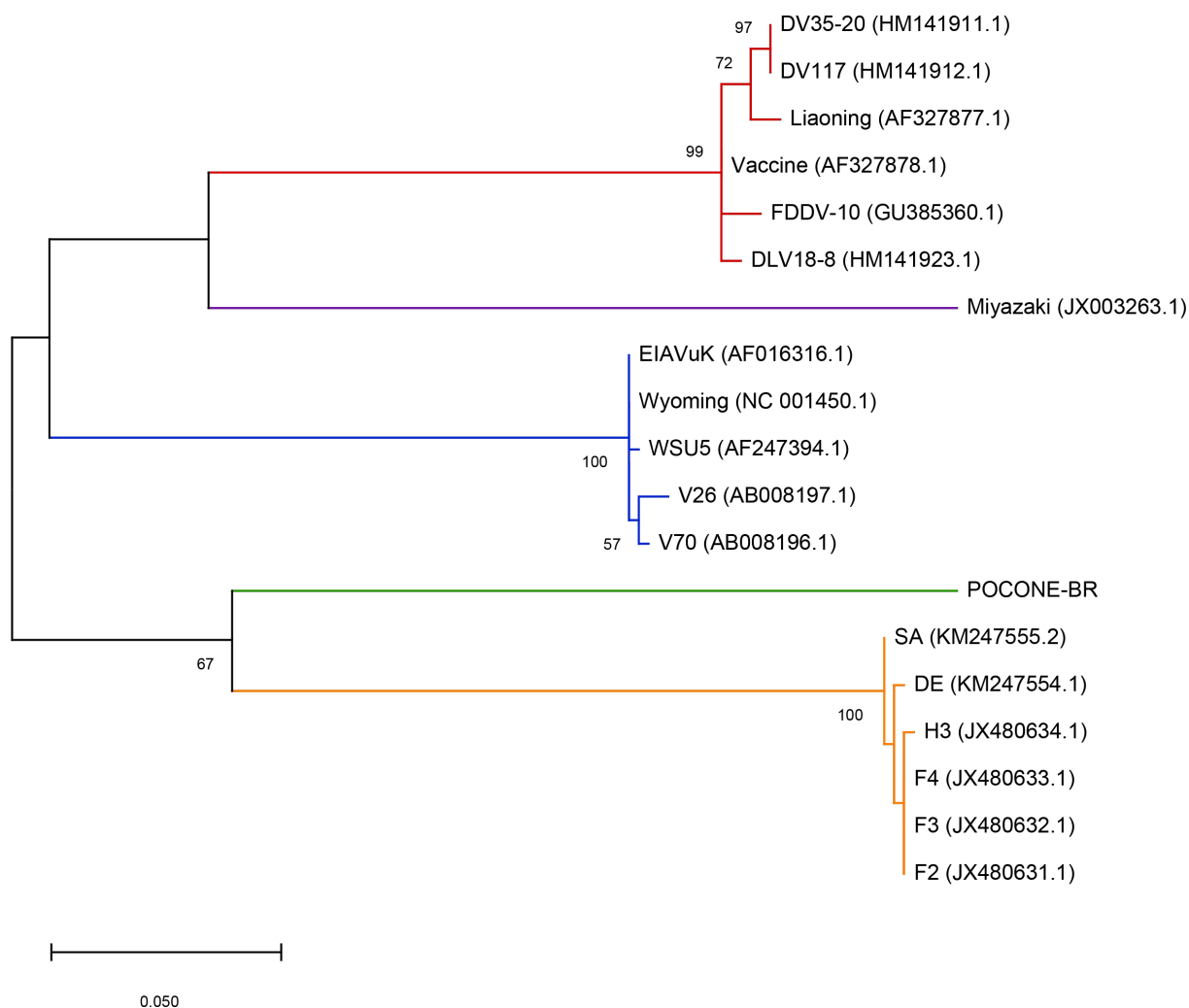


FIGURA 53: Análise filogenética de uma sequência nucleotídica do EIAV do Pantanal brasileiro para uma região parcial do gene *pol* – Análise filogenética baseada em 19 sequências nucleotídicas do EIAV: uma sequência nucleotídica obtida a partir do DNA proviral de equídeo do Pantanal brasileiro – POCONE-BR, e 19 sequências mundiais do EIAV: H3, F4, F3, F2, Liaoning, Vaccine, DV117, DLV18-8, DV35-20, FDDV-10, Wyoming, EIAVuK, WSU5, V26, V70, Miyazaki, SA e DE. O número de acesso para cada sequência está identificado entre parênteses. O número de acesso para cada sequência está entre parênteses no alinhamento. A árvore filogenética foi inferida no programa MEGA versão X (KUMAR *et al.*, 2018), através do método Máxima verossimilhança baseado no modelo Tamura Nei com distribuição Gamma (4 categorias(+G, parameter = 0,2950)), baseado em um dataset final de 492 posições nucleotídicas. Os valores de bootstrap foram determinados baseao em 1000 replicatas. Valores de bootstrap acima de 50 estão representados.

5.2.3.3. Análise molecular empregando a sequência nucleotídica do gene *pol* (nt 4.862) a ORF S2 (nt 5.274) amplificada a partir da amostra POCONE-BR

Para a amostra POCONE-BR, que foi amplificada com as combinações de iniciadores de EIAV-pol-4.841-F + EIAV-S2-5.275-R, foi obtida uma sequência consenso de 421 pb que corresponde a posição nucleotídica 4.862 a 5.274 em

relação a sequência Miyazaki. Sendo que do nucleotídeo 4.862 a 5.098 (237 pb) correspondente a uma sequência parcial da enzima integrase do gene *pol*. Desta forma do nucleotídeo 5.099 a 5.248 (correspondendo a 150 pb para a sequência Miyazaki e 156 pb para a sequência POCONE-BR) corresponde a o exon 2 do gene *tat*. Entre o exon 2 do gene *tat* e o a ORF S2 existe uma região não codificadora do nucleotídeo 5.249 a 5.258 (correspondendo a 10 pb para a sequência Miyazaki e 11 pb para a sequência POCONE-BR). Do nucleotídeo 5.259 a 5.274 corresponde a uma sequência parcial da ORF S2 (17 pb).

O fragmento de 238 pb da sequência POCONE-BR correspondente a uma sequência parcial da enzima integrase do gene *pol* apresentou similaridade nucleotídica de 80% com H3, 81,3% com Liaoning, 80,3% com Wyoming, 76,5% com Miyazaki, e 80,6% com SA e DE. O exon 2 do gene *tat* de 156 pb apresentou similaridade nucleotídica de 60,8% com H3, 70,7% com Liaoning, 72,5% com Wyoming, 64,1% com Miyazaki, e 60,8% com SA e DE.

O alinhamento da sequência nucleotídica de 421 pb da amostra POCONE-BR em relação as sequências de genoma completo – H3, Liaoning, Wyoming, Miyazaki, e duas sequências parciais – SA e DE apresentou regiões conservadas e variáveis, com 23 substituições nucleotídicas. Foram consideradas substituições nucleotídicas apenas quando a sequência brasileira POCONE-BR apresentou bases diferentes em relação a todas as sequências mundiais do EIAV analisadas no alinhamento. Para o fragmento de 237 pb do gene *pol* foram observadas 12 substituições nucleotídicas, sendo cinco transições (nas posições 24, 93, 112, 134 e 219 no alinhamento), cinco transversões (nas posições 70, 113, 159, 189 e 232), e duas transições ou transversões (nas posições 39 e 204) dependendo em relação a qual sequência do EIAV se compara. Para o fragmento de 146 pb para o exon 2 do gene *tat* foram observadas 10 substituições nucleotídicas, sendo quatro transições (nas posições 303, 341, 369 e 390), duas transversões (nas posições 254 e 362), e quatro transições ou transversões (nas posições 246, 297, 357 e 360). Para o fragmento de 17 pb correspondente a ORF S2 foi observada uma substituição nucleotídica, sendo uma transição (na posição 423) (Figura 54).

	<i>pol</i>																											
H3	ACT	CCA	TGG	GAA	GTG	TTT	ATC	ACT	AAT	CAA	GCA	CAA	GTT	ATA	CAT	GAT	GAA	TTA	CTA	ATA	CAA	CAA	66					
Liaoning	ACT	CCA	TGG	GAA	GTA	TTT	ATT	ACT	AAT	CAG	GCT	CAA	ACA	ATA	CAT	GAA	GAA	CTT	TTA	TTA	CAA	CAA						
Wyoming	ACA	CCA	TGG	GAA	GTA	TTT	ATC	ACT	AAT	CAA	GCA	CAA	GTA	ATA	CAT	GAG	AAA	CTT	TTA	CTA	CAG	CAA						
Miyazaki	ACA	CCA	TGG	GAA	GTA	TTT	GTC	ACT	AAT	CAA	GCT	CAA	ACA	ATA	CAT	GAA	GAA	CTT	TTA	TTA	CAG	CAA						
SA	ACT	CCA	TGG	GAA	GTG	TTT	ATT	ACT	AAT	CAA	GCA	CAA	GTT	ATA	CAT	GAT	GAA	TTA	CTA	ATA	CAA	CAA						
DE	ACT	CCA	TGG	GAA	GTG	TTT	ATT	ACT	AAT	CAA	GCA	CAA	GTT	ATA	CAT	GAT	GAA	TTA	CTA	ATA	CAA	CAA						
POCONE-BR	ACA	CCA	TGG	GAA	GTA	TTT	ATT	ACC	AAT	CAG	GCA	CAA	GTC	ATA	CAT	GAT	GAA	TTA	TTA	TTA	CAG	CAA						
H3	GCA	CAA	TCC	TCC	AAA	AAA	TTT	TGT	TTT	TAT	AAA	ATT	CCT	GGA	GAA	CAT	AAT	TGG	AAA	GGG	CCT	ACT	132					
Liaoning	GCA	CAA	TCT	TCT	AAA	AAA	TTT	TGT	TTT	TAT	AAA	ATT	CCT	GGA	GAG	CAT	AAT	TGG	AAG	GGG	CCC	ACC						
Wyoming	GCA	CAA	TCC	TCC	AAA	AAA	TTT	TGT	TTT	TAC	AAA	ATC	CCT	GGT	GAA	CAT	GAT	TGG	AAG	GGA	CCT	ACT						
Miyazaki	GCA	CAG	TCT	TCT	AAA	AAA	TTT	TGT	TTT	TAT	AAG	GTT	CCT	GGA	GAA	CAT	AAC	TGG	AAG	GGA	CCT	ACT						
SA	GCA	CAA	TCC	TCC	AAA	AAA	TTT	TGT	TTT	TAT	AAA	ATT	CCT	GGA	GAA	CAT	AAT	TGG	AAA	GGG	CCT	ACT						
DE	GCA	CAA	TCC	TCC	AAA	AAA	TTT	TGT	TTT	TAT	AAA	ATT	CCT	GGA	GAA	CAT	AAT	TGG	AAA	GGG	CCT	ACT						
POCONE-BR	GCA	AAA	TCT	TCT	AAA	AAA	TTT	TGT	TTC	TAT	AAA	ATC	CCT	GGT	GAG	TCT	GAC	TGG	AAA	GGA	CCC	ACT						
H3	AGG	GTA	TTG	TGG	AAA	GGT	GAT	GGT	GCA	GTG	GTG	GTC	AAT	GAT	GAA	GGT	AAA	GGA	ATA	ATT	GCC	ATA	198					
Liaoning	AGA	GTA	TTG	TGG	AAA	GGT	GAT	GGA	GCA	GTA	GTG	GTC	AAT	GAT	GAG	GAG	AAA	GGA	ATA	ATT	GCT	GTG						
Wyoming	AGG	GTG	CTG	TGG	AAG	GGT	GAT	GGT	GCA	GTA	GTA	GTT	AAT	GAT	GAA	GGA	AAG	GGA	ATA	ATT	GCT	GTA						
Miyazaki	AGG	GTG	CTA	TGG	AAA	GGT	GAT	GGT	GCA	GTA	GTA	GTT	AAT	GAT	GAA	GAA	AAA	GGG	ATA	ATT	GCA	ATA						
SA	AGG	GTA	TTG	TGG	AAA	GGT	GAT	GGT	GCA	GTG	GTG	GTC	AAT	GAT	GAA	GGT	AAA	GGA	ATA	ATT	GCC	ATA						
DE	AGG	GTA	TTG	TGG	AAA	GGT	GAT	GGT	GCA	GTG	GTG	GTC	AAT	GAT	GAA	GGT	AAA	GGA	ATA	ATT	GCC	ATA						
POCONE-BR	AAA	GTA	TTG	TGG	AAG	GGT	GAT	GGT	GCT	GTA	GTG	GTC	AAT	GAT	GAA	GGA	AAG	GGG	ATC	ATT	GCT	GTG						
H3	CCT	CTT	ACA	AGG	ACT	AAA	TTA	TTA	ATA	AGG	CCA	AAT	TGA	GTA	TTG	TTT	CAG	GAA	CCT	CCA	CCA	GTC	264					
Liaoning	CCT	TTA	ACC	AGG	ACT	AAA	TTA	TTA	ATA	AGA	CCA	AAT	TGA	GTG	TTG	TTT	CAG	GAA	TCA	CCA	CCA	GTC						
Wyoming	CCA	TTA	ACC	AGG	ACT	AAG	TTA	CTA	ATA	AAA	CCA	AAT	TGA	GTA	TTG	TTG	CAG	GAA	GCA	AGA	CC	---C						
Miyazaki	CCT	CTT	ACT	AGG	ACT	AAG	TTA	TTA	ATA	AAG	CCA	AAT	TGA	GTA	TTG	TTT	CAG	GAT	TTC	CCG	---	---						
SA	CCT	CTT	ACA	AGG	ACT	AAA	TTA	TTA	ATA	AGG	CCA	AAT	TGA	GTA	TTG	TTT	CAG	GAA	CCT	CCA	CCA	GTC						
DE	CCT	CTT	ACA	AGG	ACT	AAA	TTA	TTA	ATA	AGG	CCA	AAT	TGA	GTA	TTG	TTT	CAG	GAA	CCT	CCA	CCA	GTC						
POCONE-BR	CCT	CTG	ACC	AGG	ACT	AAA	TTG	TTA	ATA	AAG	CCA	CAT	TGA	GTA	TTG	TTT	CAG	GAA	GAG	CCA	CCA	GTC						
H3	AGT	TAC	CAT	TGT	CAA	CTG	TGC	TTC	TTG	AGA	TCT	TTG	GGA	ATT	GAC	TAC	TTG	GAT	CCC	TCA	CTG	AGA	330					
Liaoning	AGC	TAT	CAT	TGT	CAA	CTG	TGT	TTC	CTG	AGA	TCA	TTG	GGA	ATT	GAC	TAC	CTT	GAC	AGC	TCG	CTG	AAG						
Wyoming	AAC	TAC	CAT	TGT	CAG	CTG	TGT	TTC	CTG	AGG	TCT	CTA	GGA	ATT	GAT	TAC	CTC	GAT	GCT	TCA	TTA	AGG						
Miyazaki	GAC	TAT	CAT	TGT	CAC	CTG	TGT	TTC	CTG	CGG	TCT	CTG	GGA	ATT	GAT	TAT	CTT	GAT	CAC	TCC	CTG	AAG						
SA	AGT	TAC	CAT	TGT	CAA	CTG	TGC	TTC	TTG	AGA	TCT	TTG	GGA	ATT	GAC	TAC	TTG	GAT	CCC	TCA	CTG	AGA						
DE	AGT	TAC	CAT	TGT	CAA	CTG	TGC	TTC	TTG	AGA	TCT	TTG	GGA	ATT	GAC	TAC	TTG	GAT	CCC	TCA	CTG	AGA						
POCONE-BR	AAC	TTC	CAT	TGT	CAG	CTG	TGT	TTC	CTG	AGG	TCC	TTG	GGG	ATA	GAC	TAC	CTT	GAC	ACT	TCA	TTG	AAG						
H3	AAG	AAG	AAC	AAA	CAA	AGG	AAG	AAG	CAA	CTG	CAG	CGA	GGA	GAA	CAG	CCT	AAA	TAC	CTG	CTA	TAA	-GG	396					
Liaoning	AAG	AAG	AAT	AAA	CAA	AGA	CAG	AAG	GCC	ATC	AAG	GAG	GGA	AGA	CCA	CCT	CAG	TAT	CTG	TTA	TAA	-GG						
Wyoming	AAG	AAG	AAT	AAA	CAA	AGA	CTG	AAG	GCA	ATC	CAA	CAA	GGA	AGA	CAA	CCT	CAA	TAT	TTG	TTA	TAA	-GG						
Miyazaki	AAG	AAA	AAT	AAG	CAG	AGG	GCA	AAG	GAA	ATA	CAG	CGT	GGA	CGA	CAG	CCT	CGA	TAT	CTG	TTA	TAA	-GG						
SA	AAG	AAG	AAC	AAA	CAA	AGG	AAG	AAG	CAA	CTG	CAG	CGA	GGA	GAA	CAG	CCT	AAA	TAC	CTG	CTA	TAA	-GG						
DE	AAG	AAG	AAC	AAA	CAA	AGG	AAG	AAG	CAA	CTG	CAG	CGA	GGA	GAA	CAG	CCT	AAA	TAC	CTG	CTA	TAA	-GG						
POCONE-BR	AAG	AAG	AAT	AGA	CAG	AGG	CAA	AAG	GAG	ATT	CTA	CGG	GGG	AGA	CAA	CCT	CAG	TAC	TTG	TTG	TAA	AGG						
H3	TTT	GGT	ACA	GGG	GGT	TAA	TAT	ATG	GGA	TTG	TTT	GGT	AA	434														
Liaoning	TTT	GGT	GC	---	---	---	---	ATG	GGA	TTA	TTT	GGT	AA															
Wyoming	TTT	GAT	A--	---	---	---	--T	ATG	GGA	GTA	TTT	GGT	AA															
Miyazaki	TGT	AGT	A--	---	---	---	--T	ATG	GGA	GTA	TTG	GGA	AA															
SA	TTT	GGT	ACA	GGG	GGT	TAA	TAT	ATG	GGA	TTG	TTT	GGT	AA															
DE	TTT	GGT	ACA	GGG	GGT	TAA	TAT	ATG	GGA	TTG	TTT	GGT	AA															
POCONE-BR	TTT	GGT	A--	---	---	---	--T	ATG	GGC	TTA	TTT	GGA	AA															

FIGURA 54: Alinhamento da sequência nucleotídica do EIAV POCONE-BR do Pantanal brasileiro para o gene *pol* a ORF S2 (posição nucleotídica 4.862 a 5.274) – Alinhamento de sete sequências nucleotídicas do EIAV de 421 pb: uma sequência do Pantanal brasileiro - POCONE-BR, quatro sequências de genoma completo - H3 (JX480634.1), Liaoning (AF327877.1), Wyoming (AF033820.1), e Miyazaki (JX003263.1), e duas sequências parciais – SA (KM247555.2) e DE (KM247554.1). O alinhamento foi realizado no programa MEGA, versão 6.0, utilizando o Clustal W (TAMURA *et al.*, 2013). As regiões conservadas entre todas as sequências estão destacadas em cinza, e as bases variáveis somente na sequência POCONE-BR em relação às demais sequências estão destacadas em vermelho.

No alinhamento da sequência de 78 aminoácidos deduzidas de EIAV para a amostra POCONE-BR do Pantanal a partir de uma sequência nucleotídica de 237 pb para o gene *pol*, com mais seis sequências de aa deduzidas de sequências de EIAV mundiais, foram observadas quatro mutações de aa, sendo uma conservativa na posição 45, e três não-conservativas nas posições 24, 38 e 78. Foram consideradas como mutações apenas quando o aa da sequência do Pantanal foi diferente em relação a todas as sequências do EIAV analisadas no alinhamento. Contudo, quando se analisa todas as sete sequências do alinhamento em conjunto foram observadas 14 mutações de aminoácidos, sendo sete conservativas e sete não-conservativas (Figura 55, Tabela 15).

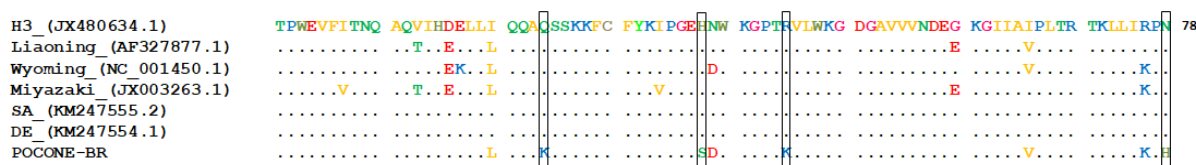


FIGURA 55: Alinhamento da sequência de aminoácidos do EIAV POCONE-BR do Pantanal brasileiro para o gene *pol* (posição nucleotídica 4.862 a 5.098) – Alinhamento de sete sequências do EIAV de 78 aminoácidos cada para o gene *pol*: uma sequência do Pantanal brasileiro - POCONE-BR, quatro sequências de genoma completo - H3, Liaoning, Wyoming, e Miyazaki, e duas sequências parciais - SA e DE. O alinhamento foi realizado no programa Mega, versão 6.0, utilizando o Clustal W (TAMURA *et al.*, 2013). O número de acesso para cada sequência está identificado entre parênteses. Regiões variáveis nas sequências Brasileiras em relação às demais sequências estão identificadas por retângulos pretos. Alanina (A), Cisteína (C), Ácido aspártico (D), Ácido glutâmico (E), Fenilalanina (F), Glicina (G), Histidina (H), Isoleucina (I), Lisina (K), Leucina (L), Metionina (M), Asparagina (N), Prolina (P), Glutamina (Q), Arginina (R), Serina (S), Treonina (T), Valina (V), Triptofano (W), Tirosina (Y).

TABELA 15: Locais de troca de aminoácidos entre seis sequências mundiais do EIAV e a sequência POCONE-BR do Pantanal brasileiro para o gene *pol*

Gene <i>pol</i> – 78 aa		Sequências							
Troca de Aminoácido	Posição	H3	Lia	Wyo	Miy	SA	DE	POC	Tipo de alteração
Isoleucina (I) – Valina (V)	7	I	I	I	V	I	I	I	Conservativa
Valina (V) – Treonina (T)	13	V	T	V	T	V	V	V	Não-conservativa
Ácido aspártico (D) – Ácido Glutâmico (E)	16	D	E	E	E	D	D	D	Conservativa
Ácido Glutâmico (E) – Lisina (K)	17	E	E	K	E	E	E	E	Não-conservativa
Isoleucina (I) – Leucina (L)	20	I	L	L	L	I	I	L	Conservativa
Glutamina (Q) – Lisina (K)	24	Q	Q	Q	Q	Q	Q	K	Não-conservativa

TABELA 15: Locais de troca de aminoácidos entre seis sequências mundiais do EIAV e a sequência POCONE-BR do Pantanal brasileiro para o gene *pol*

Gene <i>pol</i> – 78 aa		Sequências							
Troca de Aminoácido	Posição	H3	Lia	Wyo	Miy	SA	DE	POC	Tipo de alteração
Isoleucina (I) – Valina (V)	34	I	I	I	V	I	I	I	Conservativa
Histidina (H) – Serina (S)	38	H	H	H	H	H	H	S	Não-conservativa
Asparagina (N) – Ácido aspártico (D)	39	N	N	D	N	N	N	D	Não-conservativa
Arginina (R) – Lisina (K)	45	R	R	R	R	R	R	K	Conservativa
Glicina (G) – Ácido Glutâmico (E)	60	G	E	G	E	G	G	G	Não-conservativa
Isoleucina (I) – Valina (V)	66	I	V	V	I	I	I	V	Conservativa
Arginina (R) – Lisina (K)	76	R	R	K	K	R	R	K	Conservativa
Asparagina (N) – Histidina (H)	78	N	N	N	N	N	N	H	Não-conservativa

Os locais em que as trocas de aminoácidos da sequência POCONE-BR foram diferentes em relação às demais sequências estão destacados em cinza.

No alinhamento da sequência deduzida de 51 aminoácidos de EIAV para a amostra POCONE-BR do Pantanal a partir de uma sequência nucleotídica de 156 pb para o exon 2 do gene *tat*, com mais seis sequências de aa deduzidas de sequências de EIAV mundiais, estão identificadas as regiões *amino terminus*, *core region*, *basic region* e *carboxy terminus* previamente caracterizadas para sequências de genoma completo do EIAV (DONG *et al.*, 2014) (Figura 56).

No alinhamento foram observadas cinco mutações de aa, sendo duas conservativas nas posições 11 e 35, duas não-conservativas nas posições 6 e 42, e uma pode ser tanto conservativa quanto não-conservativa dependendo em relação a qual sequência do EIAV se compara. Foram consideradas como mutações apenas quando o aa da sequência do Pantanal foi diferente em relação a todas as sequências mundiais do EIAV analisadas no alinhamento. Contudo, quando se analisa todas as sete sequências do alinhamento em conjunto foram observadas 18 mutações de aa, sendo seis conservativas e sete não-conservativas. Enquanto que cinco mutações podendo ser tanto conservativas quanto não-conservativas dependendo em relação a qual sequência do EIAV se compara (Figura 56, Tabela 16).

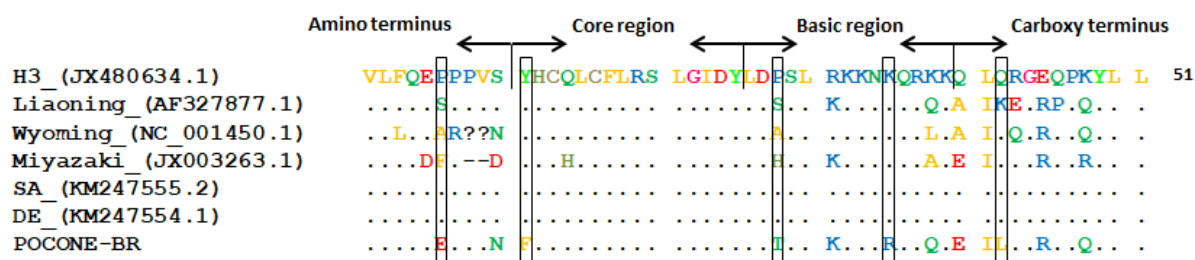


FIGURA 56: Alinhamento da sequência de aminoácidos do EIAV POCONE-BR do Pantanal brasileiro para o exon 2 do gene *tat* (posição nucleotídica 5.099 a 5.248) – Alinhamento de sete sequências do EIAV de 51 aminoácidos cada para o exon 2 do gene *tat*: uma sequência do Pantanal brasileiro - POCONE-BR, quatro sequências de genoma completo - H3, Liaoning, Wyoming, e Miyazaki, e duas sequências parciais - SA e DE. O alinhamento foi realizado no programa Mega, versão 6.0 (TAMURA *et al.*, 2013). O número de acesso para cada sequência está identificado entre parênteses. Os locais em que não foi possível definir o aminoácido estão indicados pelo sinal ? no alinhamento. Regiões variáveis nas sequências Brasileiras em relação às demais sequências estão identificadas por retângulos pretos. Alanina (A), Cisteína (C), Ácido aspártico (D), Ácido glutâmico (E), Fenilalanina (F), Glicina (G), Histidina (H), Isoleucina (I), Lisina (K), Leucina (L), Metionina (M), Asparagina (N), Prolina (P), Glutamina (Q), Arginina (R), Serina (S), Treonina (T), Valina (V), Triptofano (W), Tirosina (Y).

TABELA 16: Locais de troca de aminoácidos entre seis sequências mundiais do EIAV e a sequência POCONE-BR do Pantanal brasileiro para o exon 2 do gene *tat*

Exon 2 <i>tat</i> – 51 aa		Sequências							
Troca de Aminoácido	Posição	H3	Lia	Wyo	Miy	SA	DE	POC	Tipo de alteração
Fenilalanina (F) – Leucina (L)	3	F	F	L	F	F	F	F	Não-conservativa
Ácido Glutâmico (E) – Ácido aspártico (D)	5	E	E	E	D	E	E	E	Conservativa
Prolina (P) – Serina (S)	6*	<u>P</u>	<u>S</u>	A	F	<u>P</u>	<u>P</u>	E	Conservativa*
Prolina (P) – Alanina (A)	6*	<u>P</u>	S	<u>A</u>	F	<u>P</u>	<u>P</u>	E	Não-conservativa*
Prolina (P) – Fenilalanina (F)	6*	<u>P</u>	S	A	<u>F</u>	P	P	E	Não-conservativa*
Prolina (P) – Ácido Glutâmico (E)	6*	<u>P</u>	S	A	F	P	P	<u>E</u>	Não-conservativa*
Serina (S) – Alanina (A)	6*	P	<u>S</u>	<u>A</u>	F	P	P	E	Não-conservativa*
Serina (S) – Fenilalanina (F)	6*	P	<u>S</u>	A	<u>F</u>	P	P	E	Não-conservativa*
Serina (S) – Ácido Glutâmico (E)	6*	P	<u>S</u>	A	F	P	P	<u>E</u>	Não-conservativa*
Alanina (A) – Fenilalanina (F)	6*	P	S	<u>A</u>	<u>F</u>	P	P	E	Não-conservativa*
Alanina (A) – Ácido Glutâmico (E)	6*	P	S	<u>A</u>	F	P	P	<u>E</u>	Não-conservativa*
Fenilalanina (F) – Ácido Glutâmico (E)	6*	P	S	A	<u>F</u>	P	P	<u>E</u>	Não-conservativa*
Prolina (P) – R (Arginina)	7	P	P	R	P	P	P	P	Não-conservativa
Serina (S) – Asparagina (N)	10*	<u>S</u>	<u>S</u>	<u>N</u>	D	<u>S</u>	<u>S</u>	<u>N</u>	Conservativa*
Serina (S) – Ácido aspártico (D)	10*	<u>S</u>	<u>S</u>	N	<u>D</u>	<u>S</u>	<u>S</u>	N	Não-conservativa*

TABELA 16: Locais de troca de aminoácidos entre seis sequências mundiais do EIAV e a sequência POCONE-BR do Pantanal brasileiro para o exon 2 do gene *tat*

Exon 2 <i>tat</i> – 51 aa		Sequências							
Troca de Aminoácido	Posição	H3	Lia	Wyo	Miy	SA	DE	POC	Tipo de alteração
Asparagina (N) – Ácido aspártico (D)	10*	S	S	<u>N</u>	<u>D</u>	S	S	N	Não-conservativa*
Tirosina (Y) – Fenilalanina (F)	11	Y	Y	Y	Y	Y	Y	F	Conservativa
Glutamina (Q) – Histidina (H)	14	Q	Q	Q	H	Q	Q	Q	Não-conservativa
Prolina (P) – Serina (S)	28*	<u>P</u>	<u>S</u>	A	H	<u>P</u>	<u>P</u>	I	Conservativa*
Prolina (P) – Alanina (A)	28*	<u>P</u>	S	<u>A</u>	H	<u>P</u>	<u>P</u>	I	Não-conservativa*
Prolina (P) – Histidina (H)	28*	<u>P</u>	S	A	<u>H</u>	<u>P</u>	<u>P</u>	I	Não-conservativa*
Prolina (P) – Isoleucina (I)	28*	<u>P</u>	S	A	H	<u>P</u>	<u>P</u>	<u>I</u>	Não-conservativa*
Serina (S) – Alanina (A)	28*	P	<u>S</u>	<u>A</u>	H	P	P	I	Não-conservativa*
Serina (S) – Histidina (H)	28*	P	<u>S</u>	A	<u>H</u>	P	P	I	Não-conservativa*
Serina (S) – Isoleucina (I)	28*	P	<u>S</u>	A	H	P	P	<u>I</u>	Não-conservativa*
Alanina (A) – Histidina (H)	28*	P	S	<u>A</u>	<u>H</u>	P	P	I	Não-conservativa*
Alanina (A) – Isoleucina (I)	28*	P	S	<u>A</u>	H	P	P	<u>I</u>	Conservativa*
Isoleucina (I) – Histidina (H)	28*	P	S	A	<u>H</u>	P	P	<u>I</u>	Não-conservativa*
Arginina (R) – Lisina (K)	31	R	K	R	K	R	R	K	Conservativa
Lisina (K) – Arginina (R)	35	K	K	K	K	K	K	R	Conservativa
Lisina (K) – Glutamina (Q)	38*	<u>K</u>	Q	L	A	<u>K</u>	<u>K</u>	<u>Q</u>	Não-conservativa*
Lisina (K) – Leucina (L)	38*	<u>K</u>	Q	<u>L</u>	A	K	K	Q	Não-conservativa*
Lisina (K) – Alanina (A)	38*	<u>K</u>	Q	L	<u>A</u>	K	K	Q	Não-conservativa*
Glutamina (Q) – Leucina (L)	38*	K	<u>Q</u>	<u>L</u>	A	K	K	Q	Não-conservativa*
Glutamina (Q) – Alanina (A)	38*	K	<u>Q</u>	L	<u>A</u>	K	K	Q	Não-conservativa*
Leucina (L) – Alanina (A)	38*	K	Q	<u>L</u>	<u>A</u>	K	K	Q	Conservativa*
Glutamina (Q) – Alanina (A)	40*	<u>Q</u>	<u>A</u>	<u>A</u>	E	<u>Q</u>	<u>Q</u>	E	Não-conservativa*
Glutamina (Q) – Ácido Glutâmico (E)	40*	<u>Q</u>	A	A	<u>E</u>	<u>Q</u>	<u>Q</u>	E	Não-conservativa*
Alanina (A) – Ácido Glutâmico (E)	40*	Q	<u>A</u>	A	<u>E</u>	Q	Q	<u>E</u>	Não-conservativa*
Leucina (L) – Isoleucina (I)	41	L	I	I	I	L	L	I	Conservativa
Glutamina (Q) – Lisina (K)	42*	<u>Q</u>	<u>K</u>	<u>Q</u>	<u>Q</u>	<u>Q</u>	<u>Q</u>	L	Não-conservativa*
Glutamina (Q) – Leucina (L)	42*	<u>Q</u>	K	<u>Q</u>	<u>Q</u>	<u>Q</u>	<u>Q</u>	<u>L</u>	Não-conservativa*
Lisina (K) – Leucina (L)	42*	Q	<u>K</u>	Q	Q	Q	Q	<u>L</u>	Não-conservativa*
Arginina (R) – Ácido Glutâmico (E)	43*	<u>R</u>	<u>E</u>	Q	<u>R</u>	<u>R</u>	<u>R</u>	<u>R</u>	Não-conservativa*
Arginina (R) – Glutamina (Q)	43*	<u>R</u>	E	<u>Q</u>	<u>R</u>	<u>R</u>	<u>R</u>	<u>R</u>	Não-conservativa*
Ácido Glutâmico (E) – Glutamina (Q)	43*	R	<u>E</u>	<u>Q</u>	R	R	R	R	Não-conservativa*

TABELA 16: Locais de troca de aminoácidos entre seis sequências mundiais do EIAV e a sequência POCONE-BR do Pantanal brasileiro para o exon 2 do gene *tat*

Exon 2 <i>tat</i> – 51 aa		Sequências							
Troca de Aminoácido	Posição	H3	Lia	Wyo	Miy	SA	DE	POC	Tipo de alteração
Ácido Glutâmico (E) – Arginina (R)	45	E	R	R	R	E	E	R	Não-conservativa
Glutamina (Q) – Prolina (P)	46	Q	P	Q	Q	Q	Q	Q	Conservativa
Lisina (K) – Glutamina (Q)	48*	K	Q	Q	R	K	K	Q	Não-conservativa*
Lisina (K) – Arginina (R)	48*	K	Q	Q	R	K	K	Q	Conservativa*
Glutamina (Q) – Arginina (R)	48*	K	Q	Q	R	K	K	Q	Não-conservativa*

Os * representam locais em que a troca por mais de um aminoácido diferente ocorreu em mais de uma sequência no alinhamento na mesma posição no alinhamento. Assim, a mutação pode ser conservativa ou não-conservativa dependendo entre qual sequência do EIAV está sendo feita a análise. Os locais em que as trocas de aminoácidos da sequência POCONE-BR foram diferentes em relação às demais sequências estão destacados em cinza.

A análise filogenética da sequência POCONE-BR de 421 pb, amplificada com os iniciadores EIAV-pol-4.841-F + EIAV-S2-5.275-R, que corresponde a uma sequência parcial da enzima integrase do gene *pol*, o exon 2 do gene *tat* e ORF S2 foi feita em comparação com 18 sequências mundiais do EIAV. A árvore filogenética mostrou que a sequência do Pantanal – POCONE-BR está em um ramo próximo às sequências dos Estados Unidos, com um valor de bootstrap de 48. As sequências da China (Liaoning, Vaccine, DV117, DLV18-8, DV35-20, FDDV-10), Estados Unidos (Wyoming, EIAVuk, WSU5, V26, V70), Irlanda (H3, F4, F3, F2) e Japão (Miyazaki) formam quatro clados separados, apoiados por um elevado valor de bootstrap, corroborando os dados da literatura (Figura 57).

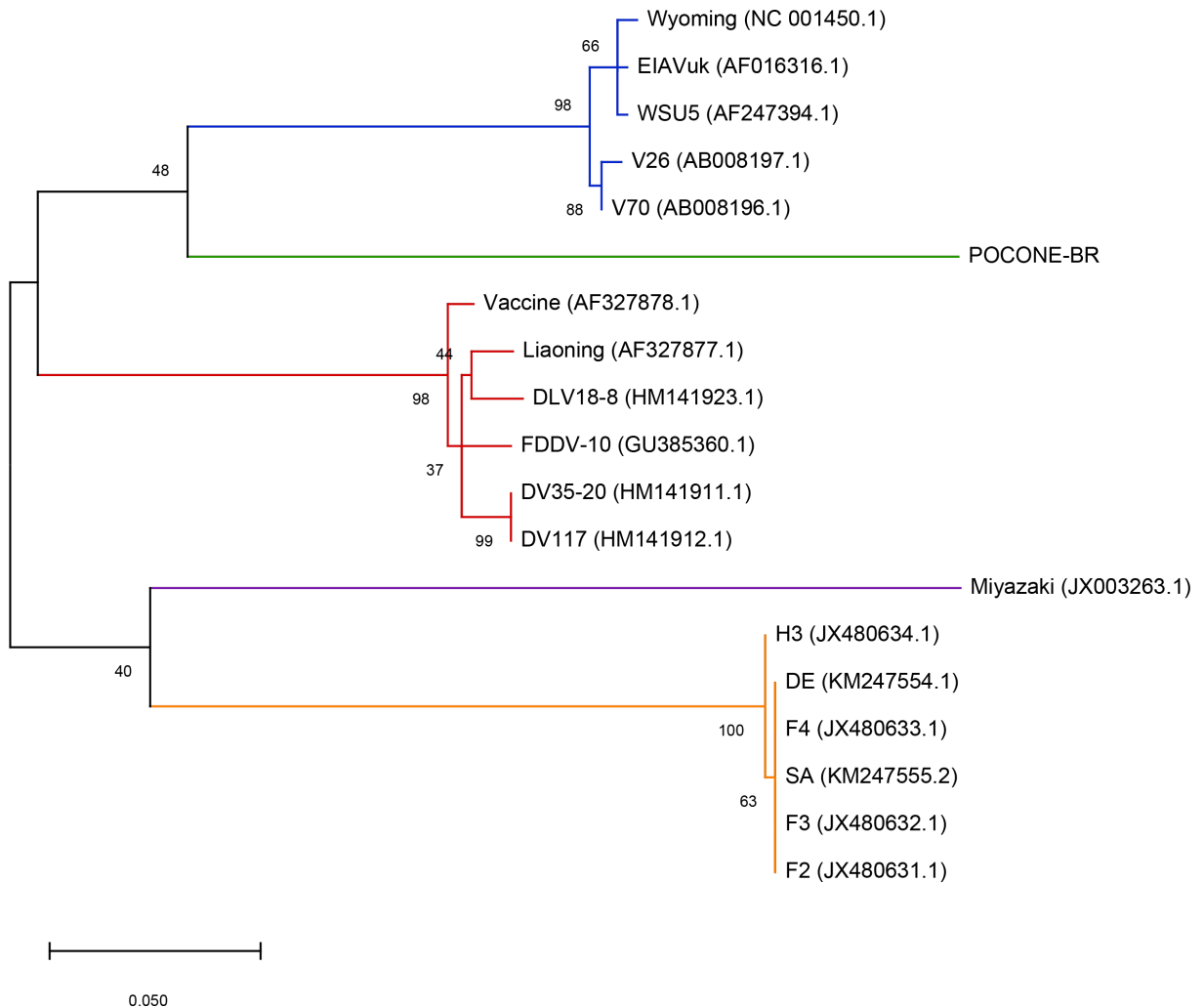


FIGURA 57: Análise filogenética de uma sequência nucleotídica do EIAV POCONE-BR do Pantanal brasileiro para uma região parcial do gene *pol* a ORF S2 – Análise filogenética baseada em 19 sequências nucleotídicas do EIAV: uma sequência nucleotídica obtida a partir do DNA proviral de equídeo do Pantanal brasileiro – POCONE-BR, e 19 sequências mundiais do EIAV: H3, F4, F3, F2, Liaoning, Vaccine, DV117, DLV18-8, DV35-20, FDDV-10, Wyoming, EIAVuk, WSU5, V26, V70, Miyazaki, SA e DE. O número de acesso para cada sequência está identificado entre parênteses. O número de acesso para cada sequência está entre parênteses no alinhamento. A árvore filogenética foi inferida no programa MEGA versão X (KUMAR *et al.*, 2018), através do método Máxima verossimilhança baseado no modelo Tamura Nei com distribuição Gamma (4 categories (+G, parameter = 0.3557)), baseado em um conjunto de dados final de 434 posições nucleotídicas. Os valores de bootstrap foram determinados baseados em 1000 replicatas. Valores de bootstrap acima de 50 estão representados.

5.2.3.4. Análise molecular empregando a sequência nucleotídica do gene *env* (nt 6.698 - 7.143) amplificada a partir da amostra POCONE-BR

A amostra POCONE-BR, que foi amplificada com os iniciadores EIAV-env-6.674-F + EIAV-env-7145-R, foi obtida uma sequência consenso de 446 pb que corresponde a posição nucleotídica 6.698 a 7.143 em relação a sequência Miyazaki, correspondente a uma sequência parcial da enzima gp45 do gene *env*. A sequência POCONE-BR apresentou similaridade nucleotídica variável com as sequências de genoma completo do EIAV – 70,3% com H3, 72,2% com Liaoning, 66,5% com Wyoming, 72,9% com Miyazaki, 68,8% com SA e 70% com DE.

O alinhamento da sequência nucleotídica de 446 pb da amostra POCONE-BR em relação as sequências de genoma completo – H3, Liaoning, Wyoming, Miyazaki, e duas sequências parciais – SA e DE apresentou regiões conservadas e variáveis, com 30 substituições nucleotídicas. Foram consideradas substituições nucleotídicas apenas quando a sequência brasileira POCONE-BR apresentou bases diferentes em relação a todas as sequências mundiais do EIAV analisadas no alinhamento. Sendo 12 transições (nas posições 36, 54, 79, 144, 166, 210, 219, 234, 237, 276, 304, 422 no alinhamento), 12 transversões (posições 33, 84, 90, 93, 207, 216, 252, 289, 328,329, 345, 441), e sete transições e/ou transversões (posições 147, 273, 282, 324, 330, 348, 294), dependendo em relação a qual sequência mundial do EIAV se compara (Figura 58).

H3	ACT ACC ATG TCT TAC ATT GCT TTG ACT GAA GCT AGC AAA ATA CAA GAT GTA GTA AAT CAT ACG TTA	66
Liaoning	GCT ACT ATG TCT TAT ATC GCT TTG ACA GAA GTC AAC AAA TTA GAT AGT GTA CAA AAT CAT ACT TTT	
Wyoming	GCT ACT ATG TCT TAT GTT GCT CTA ACT GAG GTT AAC AAA ATA ATG GAA GTA CAA AAT CAT ACT TTT	
Miyazaki	GCA ACG ATG TCC TAT ATT GCC TTA ACA CAG ACT AAC CAC CTT ATG GAT GTT ACA AAT CAT ACA TTT	
SA	ACT ACC ATG TCT TAC ATT GCT TTG ACT GAA GCT AGC AAA ATA CAA GAT GTA GTA AAT CAT ACG TTA	
DE	ACT ACC ATG TCT TAC ATT GCT TTG ACT GAA GCT AGC AAA ATA CAA GAT GTA GTA AAT CAT ACG TTA	
POCONE-BR	GCT ACT ATG TCT TAT ATT GCC TTA ACT GAA GCA AAT AAA ATA NAT AAT GTA ATG AAT CAT ACA TTT	
H3	AAT GTG GAA AAC AAT ACT CTC AGT GCT ACA GAA ATG ATA GAA AAA CAA GTC AGT ATA CTA TAT GCT	132
Liaoning	GAA GTA GAG AAC AAT ACT ATC AAT GGC TTG GAG TTG GTA GAA GAG CAA ATT CAT ATA TTA TAT GCT	
Wyoming	GAG GTA GAA AAT AGT ACT CTA AAT GGT ATG GAT TTA ATA GAA CGA CAA ATA AAG ATA TTA TAT GCT	
Miyazaki	GAG GTA GAA AAT AAC ACC ATT AGT GGT ATG GAA TTA ATA GAA AAA CAG ATA CAT ATG TTA TAT GCT	
SA	AAT GTG GAA AAC AAT ACT CTC AGT GCT ACA GAA ATG ATA GAA AGA CAA GTC AGT ATA CTA TAT GCT	
DE	AAT GTG GAA AAC AAT ACT CTC AGT GCT ACA GAA ATG ATG GAA AAA CAA ATC AGT ATA CTA TAT GCT	
POCONE-BR	GAA GTG GAA AAT GAT ACA ATC AGA GCA ACC GAA ATG ATA GAA AAA CAG ATA CAT ATA TTA TAT GCA	
H3	ATG ATT CTT CAA ACA CAT GCA GAT GTC CAG TTA TTA AAA GAA AAA CAA CAA GTA GAA GAA ACA TTT	198
Liaoning	ATG GTT CTC CAA ACA CAT GCA GAT GTT CAA TCG TTA AAA GAA CAA CAA AAG ATT GAG GAA ACA TTT	
Wyoming	ATG ATT CTT CAA ACA CAT GCA GAT GTT CAA CTG TTA AAG GAA AGA CAA CAG GTA GAG GAG ACA TTT	
Miyazaki	ATG ATT CTA CAA ACT CAT GCA GAT GTC CAA CTG TTA AAA GAA CAA CAA AAA ATA GAA GAA ACA TTT	
SA	ATG ATT CTT CAA ACA CAT GCA GAT GTC CAG TTA TTA AAA GAA AAA CAA AAA GTA GAA GAA ACA TTT	
DE	ATG ATT CTT CAA ACA CAT GCA GAT GTC CAG TTA TTA AAA GAA AAA CAA CAA GTA GAA GAA ACA TTT	
POCONE-BR	ATG GTT CTT CAG ACC CAT GCA GAT GTC CAG TTA CTA AAA GAA AGA CAA AAA ATA GAG GAA ACA TTT	
H3	AAT CTA ATT GGA TGT ATA GAA AAA ACC CAC ACA TTT TGT CAT ACG GGA CAT CCC TGG AAT AAT TCA	264
Liaoning	AAT TTG ATT GGA TGT ATA GAA AGA TCA CAT ACA TTT TGT CAT ACT GGG CAT CCC TGG AAT GAA TCA	
Wyoming	AAT TTA ATT GGA TGT ATA GAA AGA ACA CAT GTA TTT TGT CAT ACT GGT CAT CCC TGG AAT ATG TCA	
Miyazaki	AAT ATG ATT GGA TGT GCA GAA AGG TCA CAT ATA TTT TGT CAT ACT GGT CAC CCC TGG AAT GAG ACT	
SA	AAT CTA ATT GGA TGT ATA GAA AGA ACC CAC ACA TTT TGT CAT ACG GGA CAT CCC TGG AAT AAT TCA	
DE	AAT CTA ATT GGA TGT ATA GAA AGA ACC CAC ACA TTT TGT CAT ACG GGA CAT CCC TGG AAT AAT TCA	
POCONE-BR	AAT TTG ATA GGG TGT GTT GAG AGG TCA CAT ACA TTC TGC CAT ACT GGA CAT CCA TGG AAT GAA TCT	
H3	TGG GGA CTT CTA AAT GAC ACA ACA CAA TGG GAT ACA TGG GTA GGT GAA ATG GAA AAG TAC AAT CAA	330
Liaoning	TGG GGT CAG CTA AAT GAT TCT ACA CAG TGG GAT GAC TGG GTA GAT AAG ATG GAA AAT TTA AAT CAT	
Wyoming	TGG GGA CAT TTA AAT GAG TCA ACA CAA TGG GAT GAC TGG GTA AGC AAA ATG GAA GAT TTA AAT CAA	
Miyazaki	TGG GGG AGT CTA AAT GAC AGT ACA CAA TGG GAT GAT TGG GTT ACA CGT ATG AAT GGG CTA GAG CAC	
SA	TGG GGA TTT CTA AAT GAC TCA ACA CAA TGG GAT ACA TGG GTA GGA GAA ATG GAA AAG TAC AAT CAA	
DE	TGG GGA CTT CTA AAT GAC TCA ACA CAA TGG GAT ACA TGG GTA GGT GAA ATG GAA AAG TAC AAT CAA	
POCONE-BR	TGG GGG CAA TTG AAT GAA ACA ACA GAA TGG GAT GAT TGG ATA ACT AAA ATG AAT AAG CTT GAA ACG	
H3	GAC ATA TTA ACA ACG CTA CAT GTT GCC AGA AAC AAT TTA GAA CAG GCC ATG ATA ACC TTC AAT ACA	396
Liaoning	GAT ATA TTA ACA ACA CTT CAT ACT GCT AGA AAT AAT CTA GAA CAA TCT ATG ATA ACT TTT AAT ACA	
Wyoming	GAG ATA CTA ACT ACA CTT CAT GGA GCC AGG AAC AAT TTG GCA CAA TCC ATG ATA ACA TTC AAT ACA	
Miyazaki	GAG GTA CTG ACT ACA CTT CAT GCT GCT AGA AAT AAT TTA GAA CAA TCT ATG ATA ACG TTT AAT ACA	
SA	GAC ATA TTA ACA ACG CTA CAT ATT GCC AGA AAC AAT TTA GAA CAG GCC ATG ATA ACC TTC AAT ACA	
DE	GAC ATA TTA ACA ACG CTA CAT ATT GCC AGA AAC AAT TTA GAA CAG GCC ATG ATA ACC TTC AAT ACA	
POCONE-BR	GAG ATA TTG ACT ACT CTG CAT GCA GCT AAA AAT AAT TTA GAA CAA GCG ATG ATT ACT TTT AAT ACA	
H3	CCT GAT AGT ATA GCG CAA TTT GGA AAA AAT ATA TGG GAT CAT ATT GCA AA	446
Liaoning	CCT GAC AGT ATA GCA CAA TTT GGA AAA AAT ATT TGG AGT CAT ATT GCA AA	
Wyoming	CCA GAT ACT ATA GCT CAA TTT GGA AAA GAC CTT TGG AGT CAT ATT GGA AA	
Miyazaki	CCT GAT ACT ATA GCA CAA TTT GGA AAA AAT ATT TGG AGT CAT GTT GCA AA	
SA	CCT GAT AGT ATA GCG CAA TTT GGA AAA AAT ATA TGG GAT CAT ATT GCA AA	
DE	CCT GAT AGT ATA GCG CAA TTT GGA AAA AAT ATA TGG GAT CAT ATT GCA AA	
POCONE-BR	CCT GAT AGT ATA GCT CAA TTT GGA AGA AAT ATT TGG AAT CAT ATA GCA AA	

FIGURA 58: Alinhamento da sequência nucleotídica do EIAV POCONE-BR do Pantanal brasileiro para o gene env (posição nucleotídica 6.697 a 7.143) – Alinhamento de sete sequências nucleotídicas do EIAV de 446 pb: uma sequência do Pantanal brasileiro - POCONE-BR, quatro sequências de genoma completo - H3 (JX480634.1), Liaoning (AF327877.1), Wyoming (AF033820.1), e Miyazaki (JX003263.1), e duas sequências parciais – SA (KM247555.2) e DE (KM247554.1). O alinhamento foi realizado no programa MEGA, versão 6.0, utilizando o Clustal W (TAMURA *et al.*, 2013). As regiões conservadas entre todas as sequências estão destacadas em cinza, e as bases variáveis somente na sequência POCONE-BR em relação às demais sequências estão destacadas em vermelho.

No alinhamento da sequência de 148 aminoácidos deduzidas de EIAV para a amostra POCONE-BR do Pantanal a partir de uma sequência nucleotídica 446 pb para o gene *env*, com mais seis sequências de aa deduzidas de sequências de EIAV mundiais, foram observadas 11 mutações de aminoácidos, sendo quatro conservativas nas posições 102, 120 e 141 no alinhamento, quatro não-conservativas nas posições 27, 30, 72 e 97, e quatro podem ser tanto conservativas quanto não-conservativas dependendo em relação a qual sequência do EIAV se compara nas posições 16, 18, 110 e 145. Foram consideradas como mutações apenas quando o aminoácido da sequência do Pantanal foi diferente em relação a todas as sequências mundiais do EIAV analisadas no alinhamento (Figura 59, Tabela 17).

Contudo, quando se analisa todas as sete sequências em conjunto foram observadas 62 mutações, sendo 29 conservativas e 17 não-conservativas. Enquanto que 16 podem ser tanto conservativas quanto não-conservativas dependendo em relação a qual sequência do EIAV se compara. No alinhamento estão identificados quatro potenciais sítios de glicosilação *N-linked*, previamente caracterizados para sequências de genoma completo do EIAV (DONG *et al.*, 2014). Na posição 19-21 este sítio foi conservado em todas as sequências analisadas. No segundo sítio na posição 26-28 ocorreu uma mutação conservativa na posição 27 entre as seis sequências de EIAV mundiais, e não-conservativa na sequência POCONE-BR em relação as demais sequências. No terceiro sítio, na posição 86-88, ocorreu uma mutação na-conservativa na posição 87 e conservativa na posição 88. No quarto sítio na posição 93-95 ocorreu uma mutação conservativa nas posições 94 e 95 (Figura 59, Tabela 17).



FIGURA 59: Alinhamento da sequência de aminoácidos do EIAV POCONE-BR do Pantanal brasileiro para o gene *env* – Alinhamento de sete sequências do EIAV de 148 aminoácidos cada para o gene *env*: uma sequência do Pantanal brasileiro - POCONE-BR, quatro sequências de genoma completo - H3, Liaoning, Wyoming, e Miyazaki, e duas sequências parciais - SA e DE. O alinhamento foi realizado no programa Mega, versão 6.0, utilizando o Clustal W (TAMURA *et al.*, 2013). O número de acesso para cada sequência está identificado entre parênteses. Os locais em que não foi possível definir o aminoácido estão indicados pelo sinal ? no alinhamento. Regiões variáveis nas sequências Brasileiras em relação às demais sequências estão identificadas por retângulos pretos. Alanina (A), Cisteína (C), Ácido aspártico (D), Ácido glutâmico (E), Fenilalanina (F), Glicina (G), Histidina (H), Isoleucina (I), Lisina (K), Leucina (L), Metionina (M), Asparagina (N), Prolina (P), Glutamina (Q), Arginina (R), Serina (S), Treonina (T), Valina (V), Triptofano (W), Tirosina (Y).

TABELA 17: Locais de troca de aminoácidos entre seis sequências mundiais do EIAV e a sequência POCONE-BR do Pantanal brasileiro para o gene *env*

Gene <i>env</i> – 148 aa	Troca de Aminoácido	Posição	Sequências						Tipo de alteração	
			H3	Lia	Wyo	Miy	SA	DE		POC
Treonina (T) – Alanina (A)		1	T	A	A	A	T	T	A	Não-conservativa
Isoleucina (I) – Valina (V)		6	I	I	V	I	I	I	I	Conservativa
Ácido glutâmico (E) – Glutamina (Q)		10	E	E	E	Q	E	E	E	Não-conservativa
Alanina (A) – Valina (V)		11*	<u>A</u>	<u>V</u>	<u>V</u>	T	<u>A</u>	<u>A</u>	<u>A</u>	Conservativa*
Alanina (A) – Treonina (T)		11*	<u>A</u>	V	V	<u>T</u>	<u>A</u>	<u>A</u>	<u>A</u>	Não-conservativa*
Valina (V) – Treonina (T)		11*	A	<u>V</u>	<u>V</u>	<u>T</u>	A	A	A	Não-conservativa*
Serina (S) – Asparagina (N)		12	S	N	N	N	S	S	N	Conservativa
Lisina (K) – Histidina (H)		13	K	K	K	H	K	K	K	Conservativa
Leucina (L) – Isoleucina (I)		14	I	L	I	L	I	I	I	Conservativa
Glutamina (Q) – Ácido aspártico (D)		15*	<u>Q</u>	<u>D</u>	M	M	<u>Q</u>	<u>Q</u>	?	Não-conservativa*
Glutamina (Q) – Metionina (M)		15*	<u>Q</u>	D	<u>M</u>	<u>M</u>	<u>Q</u>	<u>Q</u>	?	Não-conservativa*
Ácido aspártico (D) – Metionina (M)		15*	Q	<u>D</u>	<u>M</u>	<u>M</u>	Q	Q	?	Não-conservativa*
Ácido aspártico (D) – Serina (S)		16*	<u>D</u>	<u>S</u>	E	<u>D</u>	<u>D</u>	<u>D</u>	N	Não-conservativa*
Ácido aspártico (D) – Asparagina (N)		16*	<u>D</u>	S	E	<u>D</u>	<u>D</u>	<u>D</u>	<u>N</u>	Não-conservativa*
Ácido aspártico (D) – Ácido glutâmico (E)		16*	<u>D</u>	S	<u>E</u>	<u>D</u>	<u>D</u>	<u>D</u>	N	Conservativa*

TABELA 17: Locais de troca de aminoácidos entre seis sequências mundiais do EIAV e a sequência POCONE-BR do Pantanal brasileiro para o gene *env*

Gene <i>env</i> – 148 aa		Sequências							
Troca de Aminoácido	Posição	H3	Lia	Wyo	Miy	SA	DE	POC	Tipo de alteração
Serina (S) – Asparagina (N)	16*	D	<u>S</u>	E	D	D	D	<u>N</u>	Conservativa*
Serina (S) – Ácido glutâmico (E)	16*	D	<u>S</u>	<u>E</u>	D	D	D	N	Não-conservativa*
Asparagina (N) – Ácido glutâmico (E)	16*	D	S	<u>E</u>	D	D	D	<u>N</u>	Não-conservativa*
Valina (V) – Glutamina (Q)	18*	<u>V</u>	<u>Q</u>	<u>Q</u>	T	V	V	M	Não-conservativa*
Valina (V) – Treonina (T)	18*	<u>V</u>	Q	Q	<u>T</u>	V	V	M	Não-conservativa*
Valina (V) – Metionina (M)	18*	<u>V</u>	Q	Q	T	<u>V</u>	<u>V</u>	<u>M</u>	Conservativa*
Glutamina (Q) – Treonina (T)	18*	V	<u>Q</u>	<u>Q</u>	<u>T</u>	V	V	M	Conservativa*
Glutamina (Q) – Metionina (M)	18*	V	<u>Q</u>	<u>Q</u>	T	V	V	<u>M</u>	Não-conservativa*
Treonina (T) – Metionina (M)	18*	V	Q	Q	<u>T</u>	V	V	<u>M</u>	Não-conservativa*
Leucina (L) – Fenilalanina (F)	22	L	F	F	F	L	L	F	Não-conservativa
Asparagina (N) – Ácido Glutâmico (E)	23	N	E	E	E	N	N	E	Não-conservativa
Asparagina (N) – Serina (S)	27*	<u>N</u>	<u>N</u>	<u>S</u>	<u>N</u>	<u>N</u>	<u>N</u>	D	Conservativa*
Asparagina (N) – Ácido aspártico (D)	27*	<u>N</u>	<u>N</u>	S	<u>N</u>	<u>N</u>	<u>N</u>	<u>D</u>	Não-conservativa*
Serina (S) – Ácido aspártico (D)	27*	N	N	<u>S</u>	N	N	N	<u>D</u>	Não-conservativa*
Serina (S) – Asparagina (N)	30*	<u>S</u>	<u>N</u>	<u>N</u>	<u>S</u>	<u>S</u>	<u>S</u>	R	Conservativa*
Serina (S) – Arginina (R)	30*	<u>S</u>	N	N	<u>S</u>	<u>S</u>	<u>S</u>	<u>R</u>	Não-conservativa*
Asparagina (N) – Arginina (R)	30*	S	<u>N</u>	<u>N</u>	S	S	S	<u>R</u>	Não-conservativa*
Alanina (A) – Glicina (G)	31	A	G	G	G	A	A	A	Conservativa
Treonina (T) – Leucina (L)	32*	T	<u>L</u>	M	M	<u>T</u>	<u>T</u>	<u>T</u>	Não-conservativa*
Treonina (T) – Metionina (M)	32*	<u>T</u>	L	<u>M</u>	<u>M</u>	<u>T</u>	<u>T</u>	<u>T</u>	Não-conservativa*
Leucina (L) – Metionina (M)	32*	T	<u>L</u>	<u>M</u>	<u>M</u>	T	T	T	Conservativa*
Ácido Glutâmico (E) – Ácido aspártico (D)	33	E	E	D	E	E	E	E	Conservativa
Metionina (M) – Leucina (L)	34	M	L	L	L	M	M	M	Conservativa
Isoleucina (I) – Valina (V)	35*	I	V	I	I	I	M	I	Conservativa*
Isoleucina (I) – Metionina (M)	35*	I	V	I	I	I	M	I	Conservativa*
Valina (V) – Metionina (M)	35*	I	V	I	I	I	M	I	Conservativa*
Lisina (K) – Ácido Glutâmico (E)	37*	K	E	R	K	R	K	K	Não-conservativa*
Lisina (K) – Arginina (R)	37*	K	E	R	K	R	K	K	Conservativa*
Ácido Glutâmico (E) – Arginina (R)	37*	K	E	R	K	R	K	K	Não-conservativa*
Valina (V) – Isoleucina (I)	39	V	I	I	I	V	I	I	Conservativa

TABELA 17: Locais de troca de aminoácidos entre seis sequências mundiais do EIAV e a sequência POCONE-BR do Pantanal brasileiro para o gene *env*

Gene <i>env</i> – 148 aa		Sequências							
Troca de Aminoácido	Posição	H3	Lia	Wyo	Miy	SA	DE	POC	Tipo de alteração
Serina (S) – Histidina (H)	40*	<u>S</u>	<u>H</u>	K	<u>H</u>	<u>S</u>	<u>S</u>	<u>H</u>	Não-conservativa*
Serina (S) – Lisina (K)	40*	<u>S</u>	H	<u>K</u>	H	<u>S</u>	<u>S</u>	H	Não-conservativa*
Histidina (H) – Lisina (K)	40*	S	<u>H</u>	<u>K</u>	<u>H</u>	S	S	<u>H</u>	Conservativa*
Isoleucina (I) – Metionina (M)	41	I	I	I	M	I	I	I	Conservativa
Isoleucina (I) – Valina (V)	46	I	V	I	I	I	I	V	Conservativa
Leucina (L) – Serina (S)	55	L	S	L	L	L	L	L	Não-conservativa
Lisina (K) – Glutamina (Q)	59*	<u>K</u>	<u>Q</u>	R	<u>Q</u>	<u>K</u>	<u>K</u>	R	Não-conservativa*
Lisina (K) – Arginina (R)	59*	<u>K</u>	Q	<u>R</u>	Q	<u>K</u>	<u>K</u>	<u>R</u>	Conservativa*
Glutamina (Q) – Arginina (R)	59*	K	<u>Q</u>	<u>R</u>	<u>Q</u>	K	K	<u>R</u>	Não-conservativa*
Glutamina (Q) – Lisina (K)	61	Q	K	Q	K	Q	Q	K	Não-conservativa
Valina (V) – Isoleucina (I)	62	V	I	V	I	V	V	I	Conservativa
Leucina (L) – Metionina (M)	68	L	L	L	M	L	L	L	Conservativa
Isoleucina (I) – Alanina (A)	72*	<u>I</u>	<u>I</u>	<u>I</u>	<u>A</u>	<u>I</u>	<u>I</u>	V	Conservativa*
Isoleucina (I) – Valina (V)	72*	<u>I</u>	<u>I</u>	<u>I</u>	A	<u>I</u>	<u>I</u>	<u>V</u>	Conservativa*
Alanina (A) – Valina (V)	72*	I	I	I	<u>A</u>	I	I	<u>V</u>	Conservativa*
Lisina (K) – Arginina (R)	74	K	R	R	R	R	R	R	Conservativa
Treonina (T) - Serina (S)	75	T	S	T	S	T	T	S	Conservativa
Treonina (T) – Valina (V)	77*	<u>T</u>	<u>T</u>	<u>V</u>	I	<u>T</u>	<u>T</u>	<u>T</u>	Não-conservativa*
Treonina (T) – Isoleucina (I)	77*	<u>T</u>	<u>T</u>	V	<u>I</u>	<u>T</u>	<u>T</u>	<u>T</u>	Não-conservativa*
Valina (V) – Isoleucina (I)	77*	T	T	<u>V</u>	<u>I</u>	T	T	T	Conservativa*
Asparagina (N) – Ácido Glutâmico (E)	87*	<u>N</u>	<u>E</u>	M	<u>E</u>	<u>N</u>	<u>N</u>	<u>E</u>	Não-conservativa*
Asparagina (N) – Metionina (M)	87*	<u>N</u>	E	<u>M</u>	E	<u>N</u>	<u>N</u>	E	Não-conservativa*
Ácido Glutâmico (E) – Metionina (M)	87*	N	<u>E</u>	<u>M</u>	<u>E</u>	N	N	<u>E</u>	Não-conservativa*
Serina (S) – Treonina (T)	88	S	S	S	T	S	S	S	Conservativa
Leucina (L) – Glutamina (Q)	91*	L	Q	H	S	F	L	Q	Não-conservativa*
Leucina (L) – Histidina (H)	91*	L	Q	H	S	F	L	Q	Não-conservativa*
Leucina (L) – Serina (S)	91*	L	Q	H	S	F	L	Q	Não-conservativa*
Leucina (L) – Fenilalanina (F)	91*	L	Q	H	S	F	L	Q	Não-conservativa*
Glutamina (Q) – Histidina (H)	91*	L	Q	H	S	F	L	Q	Não-conservativa*
Glutamina (Q) – Serina (S)	91*	L	Q	H	S	F	L	Q	Conservativa*
Glutamina (Q) – Fenilalanina (F)	91*	L	Q	H	S	F	L	Q	Não-conservativa*

TABELA 17: Locais de troca de aminoácidos entre seis sequências mundiais do EIAV e a sequência POCONE-BR do Pantanal brasileiro para o gene *env*

Gene <i>env</i> – 148 aa		Sequências							
Troca de Aminoácido	Posição	H3	Lia	Wyo	Miy	SA	DE	POC	Tipo de alteração
Histidina (H) – Serina (S)	91*	L	Q	H	S	F	L	Q	Não-conservativa*
Histidina (H) – Fenilalanina (F)	91*	L	Q	H	S	F	L	Q	Não-conservativa*
Serina (S) – Fenilalanina (F)	91*	L	Q	H	S	F	L	Q	Não-conservativa*
Ácido aspártico (D) – Ácido Glutâmico (E)	94	D	D	E	D	D	D	E	Conservativa
Treonina (T) – Serina (S)	95	T	S	S	S	S	S	T	Conservativa
Glutamina (Q) – Ácido Glutâmico (E)	97	Q	Q	Q	Q	Q	Q	E	Não-conservativa
Treonina (T) – Ácido aspártico (D)	100	T	D	D	D	T	T	D	Não-conservativa
Valina (V) – Isoleucina (I)	102	V	V	V	V	V	V	I	Conservativa
Glicina (G) – Ácido aspártico (D)	103*	<u>G</u>	<u>D</u>	S	T	<u>G</u>	<u>G</u>	T	Não-conservativa*
Glicina (G) – Serina (S)	103*	<u>G</u>	D	<u>S</u>	T	<u>G</u>	<u>G</u>	T	Não-conservativa*
Glicina (G) – Treonina (T)	103*	<u>G</u>	D	S	<u>T</u>	<u>G</u>	<u>G</u>	<u>T</u>	Não-conservativa*
Ácido aspártico (D) – Serina (S)	103*	G	<u>D</u>	<u>S</u>	T	G	G	T	Não-conservativa*
Ácido aspártico (D) – Treonina (T)	103*	G	<u>D</u>	S	<u>T</u>	G	G	<u>T</u>	Não-conservativa*
Serina (S) – Treonina (T)	103*	G	D	<u>S</u>	<u>T</u>	G	G	<u>T</u>	Conservativa*
Ácido Glutâmico (E) – Lisina (K)	104*	<u>E</u>	<u>K</u>	<u>K</u>	R	<u>E</u>	<u>E</u>	<u>K</u>	Não-conservativa*
Ácido Glutâmico (E) – Arginina (R)	104*	<u>E</u>	K	K	<u>R</u>	<u>E</u>	<u>E</u>	K	Não-conservativa*
Lisina (K) – Arginina (R)	104*	E	<u>K</u>	<u>K</u>	<u>R</u>	E	E	<u>K</u>	Conservativa*
Ácido Glutâmico (E) – Asparagina (N)	106	E	E	E	N	E	E	N	Não-conservativa
Lisina (K) – Asparagina (N)	107*	K	N	D	G	K	K	K	Não-conservativa*
Lisina (K) – Ácido aspártico (D)	107*	K	N	D	G	K	K	K	Não-conservativa*
Lisina (K) – Glicina (G)	107*	K	N	D	G	K	K	K	Não-conservativa*
Asparagina (N) – Ácido aspártico (D)	107*	K	N	D	G	K	K	K	Não-conservativa*
Asparagina (N) – Glicina (G)	107*	K	N	D	G	K	K	K	Não-conservativa*
Ácido aspártico (D) – Glicina (G)	107*	K	N	D	G	K	K	K	Não-conservativa*
Tirosina (Y) – Leucina (L)	108	Y	L	L	L	Y	Y	L	Não-conservativa
Asparagina (N) – Ácido glutâmico (E)	109	N	N	N	E	N	N	E	Não-conservativa
Glutamina (Q) – Histidina (H)	110*	<u>Q</u>	<u>H</u>	<u>Q</u>	<u>H</u>	<u>Q</u>	<u>Q</u>	T	Não-conservativa*
Glutamina (Q) – Treonina (T)	110*	<u>Q</u>	H	<u>Q</u>	H	<u>Q</u>	<u>Q</u>	<u>T</u>	Conservativa*
Histidina (H) – Treonina (T)	110*	Q	<u>H</u>	Q	<u>H</u>	Q	Q	<u>T</u>	Não-conservativa*
Alanina (A) – Glicina (G)	148	A	A	G	A	A	A	A	Conservativa

Os * representam locais em que a troca por mais de um aminoácido diferente ocorreu em mais de uma sequência no alinhamento na mesma posição no alinhamento. Assim, a mutação pode ser conservativa ou não-conservativa dependendo entre qual sequência do EIAV está sendo feita a análise. Os locais em que as trocas de aminoácidos da sequência POCONE-BR foram diferentes em relação às demais sequências estão destacados em cinza.

A análise filogenética da sequência POCONE-BR de 446 pb, amplificada com os iniciadores: EIAV-env-6.674-F + EIAV-env-7145-R, que corresponde a uma sequência parcial da proteína gp45 do gene *env*, foi feita em comparação com 18 sequências mundiais do EIAV. A árvore filogenética mostrou que a sequência do Pantanal – POCONE-BR agrupa no mesmo clado que a sequência do Japão – Miyazaki, com um valor de bootstrap de 76. As sequências da China (Liaoning, Vaccine, DV117, DLV18-8, DV35-20, FDDV-10), Estados Unidos (Wyoming, EIAVuk, WSU5, V26, V70) e Irlanda (H3, F4, F3, F2) formam três cladros separados, apoiados por um elevado valor de bootstrap, corroborando os dados da literatura (Figura 60).

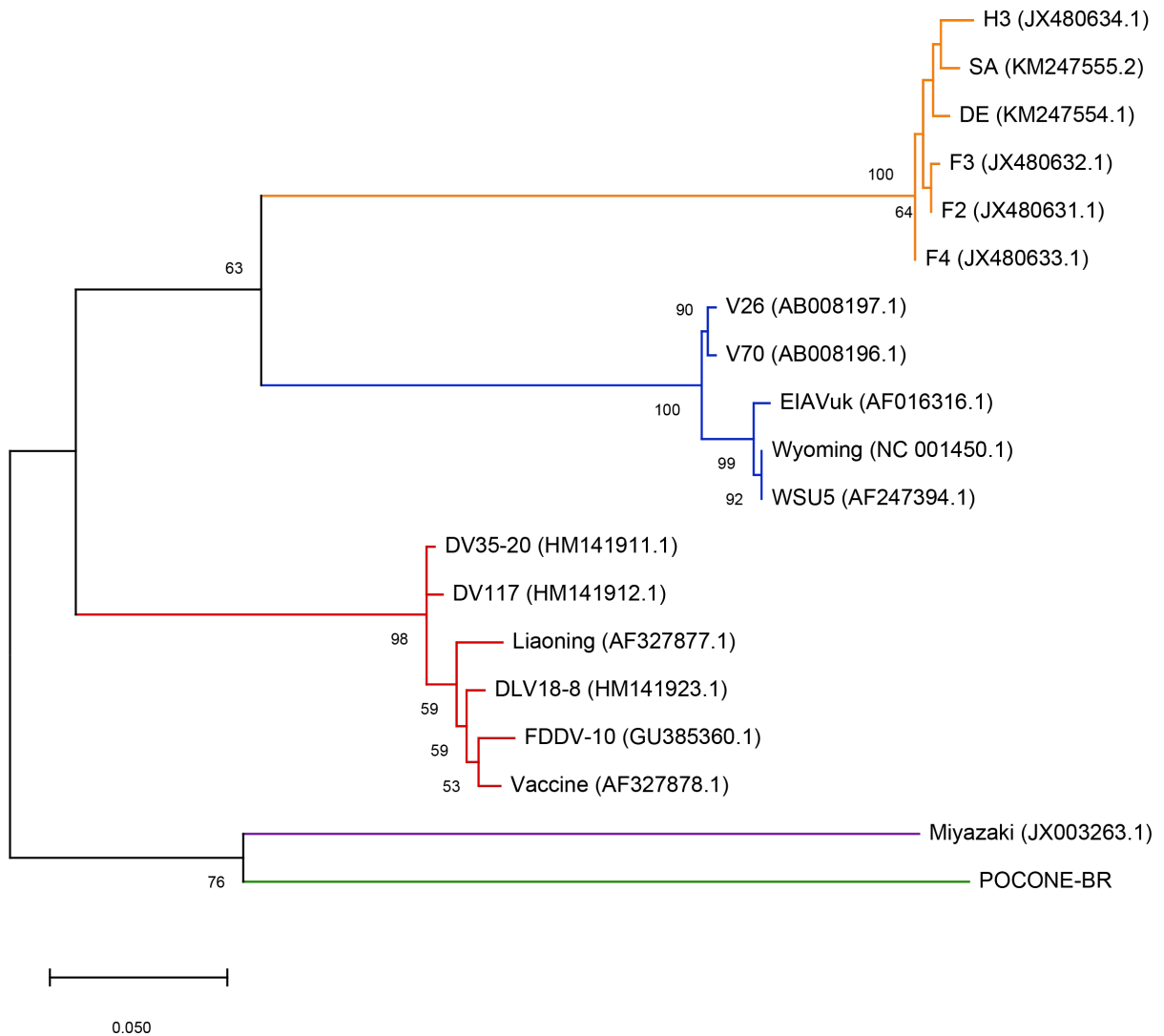


FIGURA 60: Análise filogenética de uma sequência nucleotídica do EIAV do Pantanal brasileiro para uma região parcial do gene *env* – Análise filogenética baseada em 19 sequências nucleotídicas do EIAV: uma sequência nucleotídica obtida a partir do DNA proviral de equídeo do Pantanal brasileiro – POCONE-BR, e 19 sequências mundiais do EIAV: H3, F4, F3, F2, Liaoning, Vaccine, DV117, DLV18-8, DV35-20, FDDV-10, Wyoming, EIAVuk, WSU5, V26, V70, Miyazaki, SA e DE. O número de acesso para cada sequência está identificado entre parênteses. A árvore filogenética foi inferida no programa MEGA versão X (KUMAR *et al.*, 2018), através do método Máxima verossimilhança baseado no modelo Tamura Nei com distribuição Gamma (4 categorias (+G, parameter = 0,5221)), baseado em um dataset final de 443 posições nucleotídicas. Os valores de bootstrap foram determinados baseao em 1000 replicatas. Valores de bootstrap acima de 50 estão representados.

5.2.4. Análise filogenética de 15 sequências amplificadas na snPCR LTR-tat e PCR tat-gag e da sequência POCONE-BR para regiões parciais do genoma do EIAV

Foi feita a reconstrução filogenética 15 sequências nucleotídicas do Pantanal que amplificaram tanto na snPCR LTR-tat quanto na PCR tat-gag: PAN-BR-02, PANBR-03, PAN-BR-04, PAN-BR-05, PAN-BR-06, PAN-BR-07, PAN-BR-09, PAN-BR-11, PAN-BR-14, PAN-BR-15, PAN-BR-18, PAN-BR-19, PAN-BR-20 e PAN-BR-21. Para isso as sequências foram concatenadas, tendo sido obtidas sequências de 413 a 417 pb a qual compreende sequências parciais da região 5' LTR, exon 1 do gene *tat* e gene *gag*. A análise filogenéticas das 15 sequências mostrou que estas agrupam separadas das demais sequências de EIAV mundiais, com um valor de bootstrap de 84, e as sequências da Irlanda (H3, F4, F3, F2), Estados Unidos (Wyoming, EIAVuk, WSU5, V26, V70), China (Liaoning, Vaccine, DV117, DLV18-8, DV35-20, FDDV-10) e Japão (Miyazaki) formam quatro clados separados (Figura 61).

Foi feita também a reconstrução filogenética da sequência POCONE-BR amplificada nas PCRs para diferentes regiões do genoma. Para isso as sequências foram concatenadas, ao final foi obtida uma sequência de 1953 pb, a qual compreende a regiões parciais da região 5' LTR, exon 1 da *tat*, gene *gag*, gene *pol*, ORF S2, exon 2 do gene *tat* e gene *env*. A análise filogenética da sequência POCONE-BR mostrou que esta agrupa em um ramo próximo ao clado das sequências da Irlanda (H3, F4, F3, F2) com um valor de bootstrap de 65, enquanto que as demais sequências mundiais do EIAV: Irlanda (H3, F4, F3, F2), Estados Unidos (Wyoming, EIAVuk, WSU5, V26, V70), China (Liaoning, Vaccine, DV117, DLV18-8, DV35-20, FDDV-10) e Japão (Miyazaki) agrupam em quatro clados separados (Figura 62).

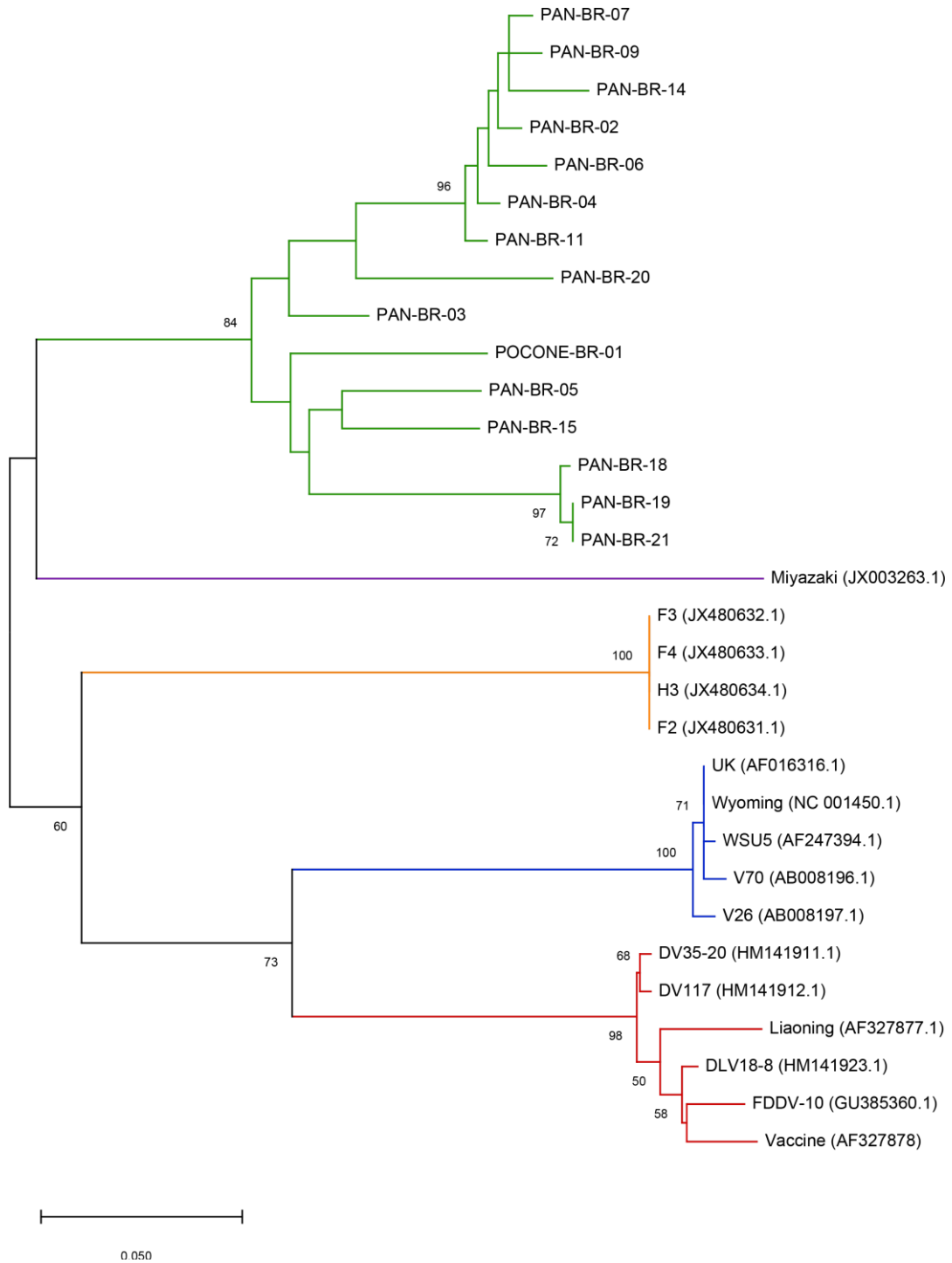


FIGURA 61: Análise filogenética de 15 seqüências nucleotídicas concatenadas do EIAV do Pantanal brasileiro para a região 5' LTR, exon 1 do gene *tat* e gene *gag* – Análise filogenética baseada em 31 seqüências nucleotídicas do EIAV: 15 seqüências nucleotídica obtida a partir do DNA proviral de equídeos do Pantanal brasileiro amplificadas na snPCR LTR-*tat*, e 16 seqüências mundiais do EIAV: H3, F4, F3, F2, Liaoning, Vaccine, DV117, DLV18-8, DV35-20, FDDV-10, Wyoming, EIAVuk, WSU5, V26, V70, Miyazaki. O número de acesso para cada seqüência está identificado entre parênteses. A árvore filogenética foi inferida no programa MEGA versão X (KUMAR *et al.*, 2018), através do método Máxima verossimilhança baseado no modelo Tamura Nei com distribuição Gamma (4 categorias (+G, parameter = 0,3125)), baseado em um dataset final de 425 posições nucleotídicas. Os valores de bootstrap foram determinados baseao em 1000 replicatas. Valores de bootstrap acima de 50 estão representados.

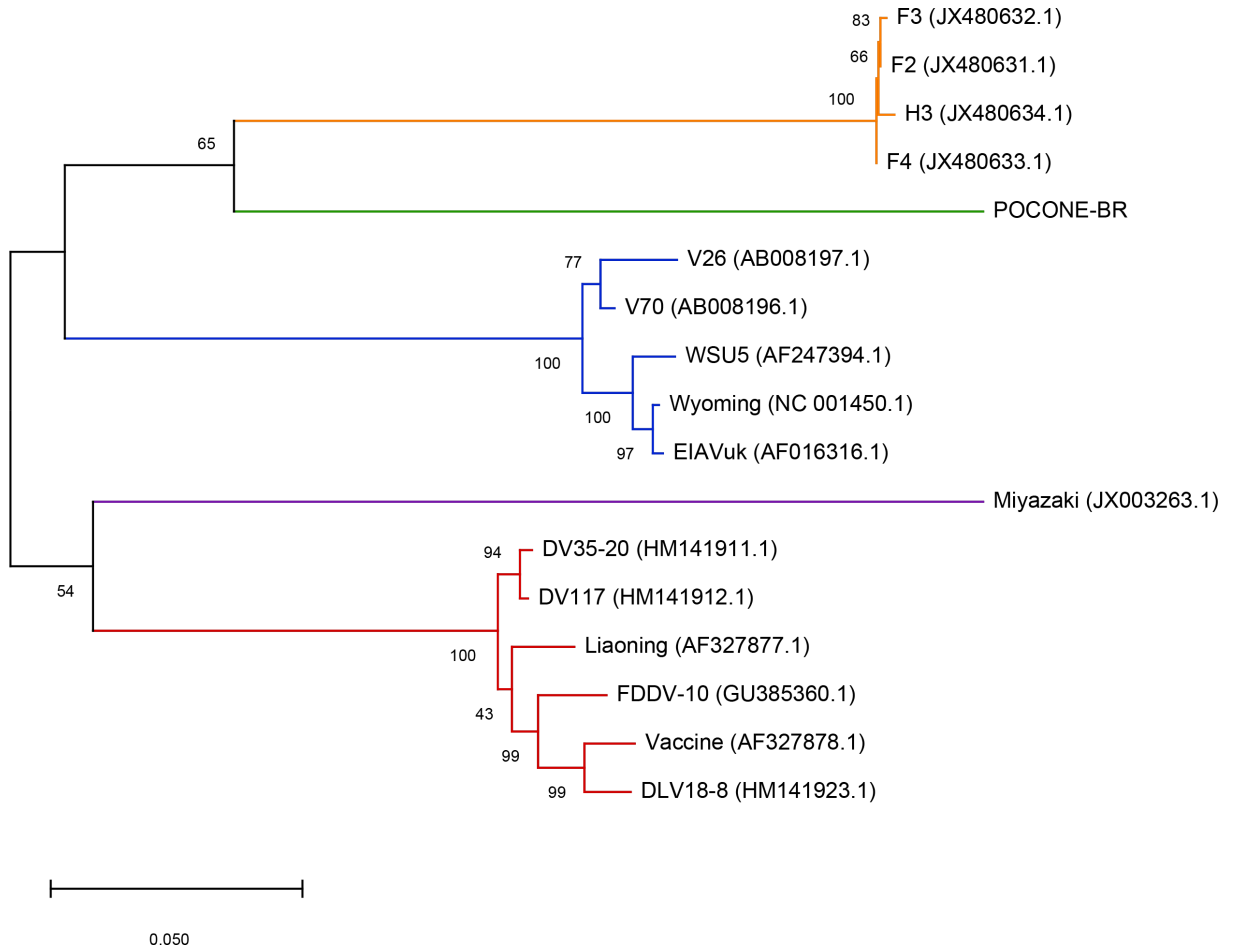


FIGURA 62: Análise filogenética de uma sequência nucleotídica concatenada do EIAV do Pantanal brasileiro para a região 5' LTR, exon 1 do gene *tat* e gene *gag*, gene *pol*, ORF S2, exon 2 do gene *tat* e gene *env* – Análise filogenética baseada em 17 sequências nucleotídicas do EIAV: uma sequências nucleotídica obtida a partir do DNA proviral de equídeos do Pantanal brasileiro amplificadas em diferentes PCRs , e 16 sequências mundiais do EIAV: H3, F4, F3, F2, Liaoning, Vaccine, DV117, DLV18-8, DV35-20, FDDV-10, Wyoming, EIAVuk, WSU5, V26, V70, Miyazaki. O número de acesso para cada sequência está identificado entre parênteses. A árvore filogenética foi inferida no programa MEGA versão X (KUMAR *et al.*, 2018), através do método Máxima verossimilhança baseado no modelo Tamura Nei com distribuição Gamma (4 categorias (+G, parameter = 0,4380)), baseado em um conjunto de dados final de 2028 posições nucleotídicas. Os valores de bootstrap foram determinados baseao em 1000 replicatas. Valores de bootstrap acima de 50 estão representados.

5.2.5. Status sorológico dos equídeos do Pantanal brasileiro

As amostras foram testadas com o IDGA (Bruch, Brasil) no Laboratório do Pantanal (Embrapa Pantanal, Corumbá/MS) e os dois testes ELISA gp90 (Biostream do Brasil, Brasil) e p26 (Viriontech do Brasil, Brasil), foram realizados na empresa Viriontech do Brasil Indústria de Insumos e Serviços em Biotecnologia (Belo Horizonte/MG, Brasil).

Para as amostras do Pantanal, do total de 133 amostras testadas, 89 foram positivas, oito indeterminadas e 36 negativas no IDGA. No ELISA gp90, 113 foram positivas e 20 negativas. No ELISA p26, 102 foram positivas, uma indeterminada e 30 negativas. Existiu concordância entre os três testes sorológicos para 85 das amostras testadas, sendo que 76 amostras foram positivas nos três testes e nove amostras foram negativas nos três testes. Existiu concordância entre o ELISA gp90 e ELISA p26 para 104 amostras, sendo que 93 amostras foram positivas e 11 negativas. Destas, 35 amostras que foram negativas ou indeterminadas no IDGA foram positivas em pelo menos um dos testes ELISA gp90 e/ou ELISA p26. Apenas duas amostras que foram fracamente positivas no IDGA (PAN-BR-28 e PAN-BR-44) foram negativas nos dois testes ELISA gp90 e ELISA p26 ao mesmo tempo (Tabela 18).

TABELA 18: Resultado dos testes moleculares e sorológicos para EIAV: PCR tat-gag, snPCR LTR-tat, IDGA, ELISA gp90 e ELISA p26 para as amostras clínicas de cavalos (*Equus caballus*) do Pantanal brasileiro

Amostras	PCR tat-gag	snPCR LTR-tat	IDGA	ELISA gp90	ELISA p26
POCONE-BR-01	P	P	P	P	P
PAN-BR-01	N	P	P	P	P
PAN-BR-02	P	P	P	P	N
PAN-BR-03	P	P	P	P	P
PAN-BR-04	P	P	P	P	P
PAN-BR-05	P	P	P	P	P
PAN-BR-06	P	P	P	P	P
PAN-BR-07	P	P	P	P	P
PAN-BR-08	N	P	P	P	P
PAN-BR-09	P	P	P	P	P

TABELA 18: Resultado dos testes moleculares e sorológicos para EIAV: PCR tat-gag, snPCR LTR-tat, IDGA, ELISA gp90 e ELISA p26 para as amostras clínicas de cavalos (*Equus caballus*) do Pantanal brasileiro

Amostras	PCR tat-gag	snPCR LTR-tat	IDGA	ELISA gp90	ELISA p26
PAN-BR-10	N	P	N	P	ID
PAN-BR-11	P	P	P	P	P
PAN-BR-12	N	P	ID	P	P
PAN-BR-13	P	P	P	P	P
PAN-BR-14	P	P	P	N	P
PAN-BR-15	P	P	P	P	P
PAN-BR-16	N	P	P	P	P
PAN-BR-17	N	P	P	P	P
PAN-BR-18	P	P	P	P	P
PAN-BR-19	P	P	P	N	P
PAN-BR-20	P	P	P	P	P
PAN-BR-21	P	P	P	P	P
PAN-BR-22	N	P	P	P	P
PAN-BR-23	P	N	P	P	P
PAN-BR-24	P	P	P	P	P
PAN-BR-25	P	P	P	P	P
PAN-BR-26	P	P	P	P	P
PAN-BR-27	P	N	P	P	P
PAN-BR-28	P	N	P	N	N
PAN-BR-29	P	N	N	P	P
PAN-BR-30	N	N	N	N	N
PAN-BR-31	N	N	P	P	P
PAN-BR-32	N	N	P	P	P
PAN-BR-33	N	N	P	P	P
PAN-BR-34	N	N	P	N	P
PAN-BR-35	N	N	ID	N	P
PAN-BR-36	N	N	P	P	P
PAN-BR-37	N	N	ID	P	N
PAN-BR-38	N	N	ID	P	P
PAN-BR-39	N	N	ID	P	P
PAN-BR-40	N	N	P	P	P
PAN-BR-41	N	N	P	P	P
PAN-BR-42	N	N	P	P	P
PAN-BR-43	N	N	P	P	P
PAN-BR-44	N	N	P	N	N
PAN-BR-45	N	N	P	P	P
PAN-BR-46	N	N	N	N	N
PAN-BR-47	N	N	ID	P	P

TABELA 18: Resultado dos testes moleculares e sorológicos para EIAV: PCR tat-gag, snPCR LTR-tat, IDGA, ELISA gp90 e ELISA p26 para as amostras clínicas de cavalos (*Equus caballus*) do Pantanal brasileiro

Amostras	PCR tat-gag	snPCR LTR-tat	IDGA	ELISA gp90	ELISA p26
PAN-BR-48	N	N	N	P	N
PAN-BR-49	N	N	P	P	P
PAN-BR-50	N	N	P	P	N
PAN-BR-51	N	N	P	P	P
PAN-BR-52	N	N	P	P	N
PAN-BR-53	N	N	N	N	N
PAN-BR-54	N	N	N	N	P
PAN-BR-55	N	N	P	P	P
PAN-BR-56	N	N	N	N	N
PAN-BR-57	N	N	ID	P	P
PAN-BR-58	P	N	P	P	N
PAN-BR-59	N	N	N	N	P
PAN-BR-7528	N	N	N	P	P
PAN-BR-7537	N	N	P	P	P
PAN-BR-7538	N	N	P	P	P
PAN-BR-7540	P	P	P	P	P
PAN-BR-7541	N	N	P	P	P
PAN-BR-7542	N	N	P	P	P
PAN-BR-7543	P	N	P	P	P
PAN-BR-7544	P	N	P	P	P
PAN-BR-7548	P	N	P	P	P
PAN-BR-7562	N	N	N	P	P
PAN-BR-7570	N	P	P	P	P
PAN-BR-7572	N	N	P	P	P
PAN-BR-7573	N	N	N	P	P
PAN-BR-7575	P	N	P	P	P
PAN-BR-7584	N	N	P	P	P
PAN-BR-7598	P	N	P	P	P
PAN-BR-7612	P	N	P	P	P
PAN-BR-7617	N	N	N	P	N
PAN-BR-7683	N	P	P	P	P
PAN-BR-7693	N	N	N	P	N
PAN-BR-7697	P	N	P	P	P
PAN-BR-7704	P	N	P	P	P
PAN-BR-7716	N	N	N	P	N
PAN-BR-7718	N	N	P	P	P
PAN-BR-7719	N	N	N	N	N
PAN-BR-7721	P	N	P	N	P

TABELA 18: Resultado dos testes moleculares e sorológicos para EIAV: PCR tat-gag, snPCR LTR-tat, IDGA, ELISA gp90 e ELISA p26 para as amostras clínicas de cavalos (*Equus caballus*) do Pantanal brasileiro

Amostras	PCR tat-gag	snPCR LTR-tat	IDGA	ELISA gp90	ELISA p26
PAN-BR-7725	N	N	ID	P	N
PAN-BR-7731	N	N	N	N	N
PAN-BR-7734	P	N	N	P	N
PAN-BR-7738	P	N	N	N	P
PAN-BR-7740	P	N	P	P	P
PAN-BR-7960	P	N	N	N	N
PAN-BR-7961	P	N	P	P	P
PAN-BR-7962	N	N	P	P	P
PAN-BR-7963	P	N	P	P	P
PAN-BR-7968	N	N	P	P	P
PAN-BR-7972	N	N	N	P	N
PAN-BR-7984	P	N	P	N	P
PAN-BR-7991	N	N	N	N	N
PAN-BR-7994	N	N	N	P	N
PAN-BR-8001	N	P	P	P	P
PAN-BR-8002	P	P	P	P	P
PAN-BR-8003	P	N	P	P	P
PAN-BR-8005	N	N	P	P	P
PAN-BR-8013	N	N	P	P	P
PAN-BR-8014	N	N	N	P	N
PAN-BR-8016	P	N	P	P	P
PAN-BR-8017	N	N	N	P	P
PAN-BR-8019	N	N	N	P	P
PAN-BR-8028	N	P	P	P	P
PAN-BR-8052	N	N	N	N	N
PAN-BR-8054	P	N	P	P	P
PAN-BR-8063	N	N	N	P	P
PAN-BR-8065	N	N	P	P	N
PAN-BR-8083	P	N	N	P	N
PAN-BR-8084	P	N	P	P	P
PAN-BR-8086	P	N	N	P	N
PAN-BR-8087	P	N	N	P	N
PAN-BR-8088	P	N	N	P	P
PAN-BR-8095	N	P	N	P	N
PAN-BR-8098	P	P	P	P	P
PAN-BR-8101	N	N	P	P	P
PAN-BR-8103	P	P	P	P	P
PAN-BR-8110	N	N	N	P	P

TABELA 18: Resultado dos testes moleculares e sorológicos para EIAV: PCR tat-gag, snPCR LTR-tat, IDGA, ELISA gp90 e ELISA p26 para as amostras clínicas de cavalos (*Equus caballus*) do Pantanal brasileiro

Amostras	PCR tat-gag	snPCR LTR-tat	IDGA	ELISA gp90	ELISA p26
PAN-BR-8117	P	N	P	P	P
PAN-BR-8135	P	P	P	P	P
PAN-BR-8142	N	N	P	P	P
PAN-BR-8145	P	N	P	P	P
PAN-BR-8147	P	N	N	P	P
PAN-BR-8151	N	N	P	P	P
PAN-BR-8152	N	N	P	P	P
PAN-BR-8156	P	N	P	P	P
PAN-BR-8159	P	N	N	P	P

(P) indica amostra positiva, (N) indica amostra negativa, (ID) indica resultado indeterminado. Os resultados positivos estão destacados em cinza.

Comparando os testes sorológicos e a PCR tat-gag, 41 amostras foram positivas e oito negativas em todos os testes ao mesmo tempo (IDGA, ELISA gp90, ELISA p26 e PCR tat-gag). Uma amostra negativa em todos os testes sorológicos foi positiva na PCR tat-gag (PAN-BR-7960). Comparado somente ao IDGA, 10 amostras negativas no IDGA foram positivas na PCR tat-gag (Figura 63 e Tabela 18).

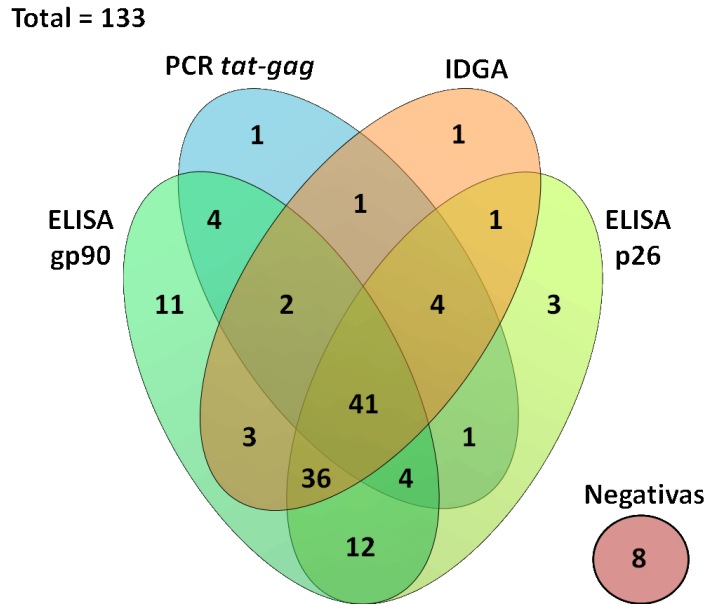


FIGURA 63: Diagrama do número de amostras clínicas de equídeos do Pantanal brasileiro positivas nos testes sorológicos - IDGA, ELISA gp90 e ELISA p26, e na PCR *tat-gag* – As interseções no diagrama representam o número de amostras positivas entre os testes.

Comparando os testes sorológicos e a snPCR LTR-*tat*, 30 amostras foram positivas e nove negativas em todos os testes ao mesmo tempo (IDGA, ELISA gp90, ELISA p26 e snPCR LTR-*tat*). Comparado somente ao IDGA, duas amostras negativas e uma indeterminada no IDGA foram positivas na snPCR LTR-*tat* (Figura 64 e Tabela 19).

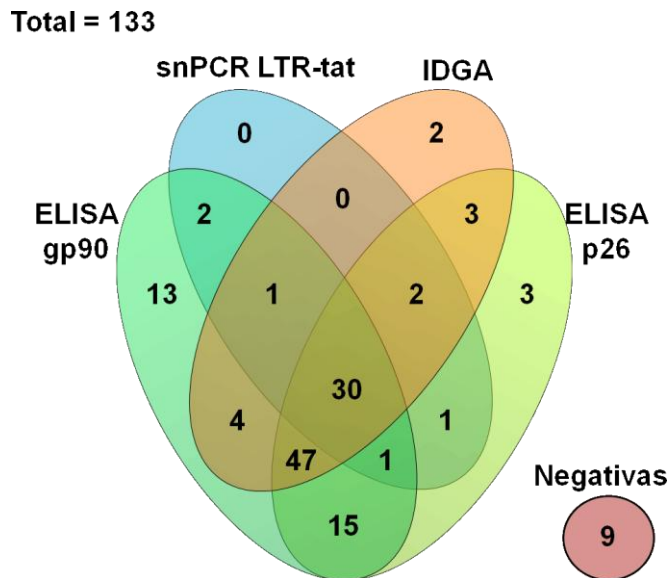


FIGURA 64: Diagrama mostrando o número de amostras clínicas de equídeos do Pantanal brasileiro positivas nos testes sorológicos - IDGA, ELISA gp90 e ELISA p26, e na snPCR LTR-*tat* – As interseções no diagrama representam o número de amostras positivas entre os testes.

5.3. Análise molecular e sorológica para identificação de casos de anemia infecciosa equina (AIE) em equídeos do Ceará

5.3.1. Amplificação de DNA proviral do EIAV em amostras clínicas

Para a análise molecular de AIE foi feita a detecção do DNA proviral em amostras de PBMC e em órgão de equídeos do Ceará. Para a detecção do DNA proviral foi utilizada a PCR *tat-gag* (iniciadores EIAV-*tat*-380-F e *gag*-672-R) para o exon 1 do gene *tat* ao gene *gag*, que amplifica um fragmento de aproximadamente 312 pb. De um total de 207 amostras testadas, em 21 amostras foi identificada a amplificação de DNA proviral. Das 21 amostras positivas, 15 foram de PBMC e seis de órgãos de cavalos sacrificados. Das 15 amostras de PBMC, três são de cavalo, 11 de jumentos e uma de mula. Também houve a amplificação de DNA de uma amostra de PBMC de cavalo - CEARA-C-14 com a combinação de iniciadores EIAV-LTR-28-F e EIAV-TAT-405-R, e foi obtida uma sequência de 347 pb da região 5' LTR ao exon 1 do gene *tat*.

5.3.2. Sequenciamento e análise filogenética de DNA amplificado de amostras de equídeos do Ceará

5.3.2.1. Análise molecular empregando as sequências nucleotídicas do exon 1 do gene *tat* (nt 380) ao gene *gag* (nt 672)

Do total de 21 amostras clínicas de equídeos do Ceará positivas para AIE por amplificação de DNA proviral a partir de amostras de PBMC empregando os iniciadores EIAV-*tat*-380-F e EIAV-*gag*-672-R2 para o exon 1 do gene *tat* ao gene *gag*, foram obtidas 12 sequências nucleotídicas de 272 pb. As sequências nucleotídicas foram obtidas de uma amostra de cavalo (CEARA-C-179-127), uma de mula (CEARA-M-138-5), e 10 de jumentos (CEARA-J-272-10-AZ, CEARA-J-421-123, CEARA-J-488-AM, CEARA-J-497-AM, CEARA-J-507-BR, CEARA-J-518-20-AZ, CEARA-J-554-AZ, CEARA-J-585-18-BR, CEARA-J-588-AZ, CEARA-J-821-49).

O alinhamento das 12 sequências nucleotídicas de amostras clínicas de equídeos do Ceará foi feito comparando com 49 sequências nucleotídicas obtidas de equídeos do Pantanal brasileiro, sete sequências mundiais do EIAV, sendo quatro sequências de genoma completo: Liaoning (China), Wyoming (Estados Unidos), Miyazaki (Japão) e H3 (Irlanda), e três sequências parciais da Itália (Ita-1, SA e DE). A identificação do exon 1 do gene *tat* e do gene *gag* no alinhamento das sequências nucleotídicas foi baseada na numeração da sequência da amostra Miyazaki previamente caracterizada (DONG *et al.*, 2013). As sequências nucleotídicas obtidas correspondem à posição no genoma 400 a 671 em relação à sequência Miyazaki, sendo que o exon 1 do gene *tat* corresponde a posição 400 a 444 (45 pb), região não codificadora (NCR) corresponde a posição 445 a 449 (5 pb), o gene *gag* corresponde a posição 450 a 671 (222 pb), correspondendo a proteína p15. O N nas sequências do Ceará significa locais em que não foi possível inferir a base após sequenciamento (Figura 65).

No alinhamento foram observadas regiões conservadas e variáveis entre as sequências analisadas. As sequências nucleotídicas do EIAV de equídeos do Ceará e do Pantanal foram conservadas entre si. Foram consideradas substituições nucleotídicas apenas quando a troca de base foi exclusiva da sequência do Ceará. O fragmento de 50 pb para o exon 1 do gene *tat* apresentou apenas uma substituição nucleotídica, sendo uma transição (na posição 31 no alinhamento) – apenas na sequência CEARA-M-138-5 (Figura 65).

No fragmento de 222 pb para o gene *gag* foram observadas quatro substituições nucleotídicas, três transições – duas na posição 104 e 154 (na sequência CEARA-M-138-5), outra na posição 206 (na sequência CEARA-J-588-AZ) e uma transversão – na posição 61 (na sequência CEARA-C-179-127). Na posição 126 a sequência CEARA-M-138-5 apresentou uma transição ou transversão dependendo em relação a qual sequência mundial do EIAV é comparada. As demais substituições nucleotídicas encontradas foram comuns às sequências nucleotídicas de EIAV de equídeos do Pantanal brasileiro (Figura 65).

Quando se analisa somente as 12 sequências de equídeos do Ceará foram observadas 64 substituições nucleotídicas, sendo 41 transições e 23 transversões. A maior parte das substituições nucleotídicas foram entre as sequências de cavalo (CEARA-C-179-127), mula (CEARA-M-138-5) e de um jumento (CEARA-J-821-49). As outras nove sequências de jumentos foram conservadas entre si. Seguem nos parágrafos abaixo os locais de substituições nucleotídicas entre as 12 sequências de equídeos do Ceará no alinhamento com o local em que ocorreu a substituição e entre parênteses em qual sequência foi encontrada a substituição (Figura 65).

Foram encontradas 41 transições - posição 22 (cavalo), 31 (mula), 32 (cavalo e mula), 40 (mula), 59 (mula e jumento-CEARA-J-821-49), 63 (CEARA-J-821-49), 65 (mula e CEARA-J-821-49), 85 (três sequências de jumentos), 104 (mula), 110 (cavalo), 113 (cavalo, mula e CEARA-J-821-49), 119 (uma sequência de jumento), 122 (mula e CEARA-J-821-49), 125 (CEARA-J-821-49), 129 (mula, cavalo e CEARA-J-821-49), 142 (CEARA-J-821-49), 154 (mula), 161 (mula), 167 (três sequência de jumentos), 170 (mula), 176 (mula), 186 (cavalo, mula e CEARA-J-821-49), 191 (CEARA-J-821-49), 194 (mula e cavalo), 197 (mula e cavalo), 206 (uma sequência de jumento), 207 (mula, cavalo e CEARA-J-821-49), 209 (mula, cavalo e CEARA-J-821-49), 210 (cavalo), 213 (cavalo, mula e CEARA-J-821-49), 216 (mula), 218 (cavalo), 230 (CEARA-J-821-49), 233 (cavalo e CEARA-J-821-49), 236 (mula e CEARA-J-821-49), 242 (mula, cavalo e CEARA-J-821-49), 260 (CEARA-J-821-49), 263 (cavalo), 265 (mula, cavalo e CEARA-J-821-49), 266 (cavalo e mula), 272 (mula).

Foram encontradas 23 transversões - posição 61 (cavalo), 63 (cavalo e mula), 107 (cavalo), 126 (mula), 127 (mula), 129 (CEARA-J-821-49 e demais jumentos), 131 (CEARA-J-821-49), 132 (mula), 133 (mula), 143 (CEARA-J-821-49), 169 (mula e cavalo), 182 (mula), 184 (mula, cavalo e CEARA-J-821-49), 185 (CEARA-J-821-49), 186 (CEARA-J-821-49), 221 (mula), 233 (mula, cavalo e CEARA-J-821-49), 240 (mula e CEARA-J-821-49), 248 (cavalo, mula e CEARA-J-821-49), 257 (CEARA-J-821-49), 259 (mula), 269 (cavalo e mula), 272 (mula e CEARA-J-821-49).

	tat										NCR		gag													
	C	A	G	A	C	G	T	C	T	T	G	A	A	T	G	G	A	G	A	C	C	A	G	A	T	G
H3 (JX480634.1)	C	A	G	A	C	G	T	C	T	T	G	A	A	T	G	G	A	G	A	C	C	A	G	A	T	G
Liaoning (AF327877.1)																										
Wyoming (NC_001450.1)	A																									
Miyazaki (JX003263.1)	A																									
SA (KM247555.2)																										
DE (KM247554.1)																										
Ita-1 (EU240733.1)																										
PAN-BR-02																										
PAN-BR-03																										
PAN-BR-04																										
PAN-BR-05																										
PAN-BR-06																										
PAN-BR-07																										
PAN-BR-09																										
PAN-BR-11																										
PAN-BR-14																										
PAN-BR-15																										
PAN-BR-18																										
PAN-BR-19																										
PAN-BR-20																										
PAN-BR-21																										
PAN-BR-23																										
PAN-BR-24																										
PAN-BR-25																										
PAN-BR-26																										
PAN-BR-27																										
PAN-BR-28																										
PAN-BR-29																										
PAN-BR-7540																										
PAN-BR-7544																										
PAN-BR-7575																										
PAN-BR-7612																										
PAN-BR-7697																										
PAN-BR-7704																										
PAN-BR-7738																										
PAN-BR-7740																										
PAN-BR-7961																										
PAN-BR-7963																										
PAN-BR-7984																										
PAN-BR-8002																										
PAN-BR-8003																										
PAN-BR-8016																										
PAN-BR-8054																										
PAN-BR-8083																										
PAN-BR-8084																										
PAN-BR-8086																										
PAN-BR-8087																										
PAN-BR-8098																										
PAN-BR-8103																										
PAN-BR-8117																										
PAN-BR-8135																										
PAN-BR-8145																										
PAN-BR-8147																										
PAN-BR-8156																										
PAN-BR-8159																										
POCONE-BR-01																										
CEARA-C-179-127																										
CEARA-M-138-5																										
CEARA-J-272-10-AZ																										
CEARA-J-421-123																										
CEARA-J-488-AM																										
CEARA-J-497-AM																										
CEARA-J-507-BR																										
CEARA-J-518-20AZ																										
CEARA-J-554-AZ																										
CEARA-J-585-18-BR																										
CEARA-J-588-AZ																										
CEARA-J-821-49																										

10 20 30 40 50 60 70

H3 (JX480634.1)	CTGTGGGGCC	TAACTTTTGT	GGACTTACTG	CATGACACCA	ATTTCAGTAA	AGAAAAAGAC	TGGCAATTGA
Liaoning (AF327877.1)	AAT	G.A	A	T.C		TT	A
Wyoming (NC_001450.1)	AAT	C.A	A	T.T	T	C.TGTA	G.GC
Miyazaki (JX003263.1)	AAC		T	T.C		C.T.TG	G.C
SA (KM247555.2)							
DE (KM247554.1)							
Ita-1 (EU240733.1)							
PAN-BR-02	AAA		T	GTAT	G	G	.GGTG.G.G.C.A
PAN-BR-03	AAT		A	GT.T			.TGTG.G.G.A
PAN-BR-04	AAC		T	GTAT			.GGTG.G.G.C.A
PAN-BR-05	AAC		T	GTAT			.ATG.G.G.A
PAN-BR-06	AAA		T	GTAT			.GGTG.G.G.C.A
PAN-BR-07	AAA		T	GTAT			.GGTG.G.G.C.A
PAN-BR-09	.AA		T	GTAT			.GGTG.G.G.C.A
PAN-BR-11	AAC		T	GTAT			.GGTG.G.G.C.A
PAN-BR-14	AGA		T	GTAT			.GGTG.G.G.C.A
PAN-BR-15	AAT		T	GTAT	TG	C	.T.TG.C.G.A
PAN-BR-18	AAT		C	T	TAT		.TGTA.G.G.A
PAN-BR-19	AAT		C	T	GTAT		.TGTA.G.G.A
PAN-BR-20	AAC	T	C	T	GT.T		.TGTG.G.G.C
PAN-BR-21	AAT		C	T	GTAT		.TGTA.G.G.A
PAN-BR-23	AAC		T	GTAT			.ATG.G.G.A
PAN-BR-24	.AA	G	T	GTAT			.G.TG.G.G.C.A
PAN-BR-25	AAT		T	GT.T		C	.TGTG.G.G.A
PAN-BR-26	AAT		T	GTAT		G	C.T.TG.C.G.A
PAN-BR-27	AAA		T	GTAT			.GGTG.G.G.C.A
PAN-BR-28	AAA	A	T	GTAT		G	.GGTG.G.G.C.A
PAN-BR-29	AAT		A	T	GT.T	T	.ATGTG.G.G.C.A
PAN-BR-7540	AAT		T	GT.T			.ATGTG.G.G.A
PAN-BR-7544	AAT		T	G.T			.ATGTA.G.G.A
PAN-BR-7575	AAT		T	GT.T			.TG.G.G.A
PAN-BR-7612	AAT		A	T	GT.T		.T.TG.G.A
PAN-BR-7697	AAT		T	TAT		G	.GG.CG.G.C
PAN-BR-7704	AAT		A	T	GT.T		.T.TG.G.G.A
PAN-BR-7738	AAT		C	T	GTAT		.TGTA.G.G.A
PAN-BR-7740	AAT		T	GT.T			.TG.G.G.G.A
PAN-BR-7961	AAA		T	GTAT			.GGTG.G.G.C.A
PAN-BR-7963	AAT		A	T	GT.T		.T.TG.G.G.A
PAN-BR-7984	AAT		A	T	GT.T		.T.TG.G.G.A
PAN-BR-8002	AAT		T	GT.T			.TGTG.G.G.A
PAN-BR-8003	AAT		T	GT.T			.ATGTG.T.G.A
PAN-BR-8016	AAT		A	T	G.T		.T.TG.G.G.A
PAN-BR-8054	AAT		T	GTAT			.ATTTG.G.G.A
PAN-BR-8083	AAT		C	T	GTAT		.TGTA.G.G.A
PAN-BR-8084	AAA		T	TAT			.GGTG.G.G.C.A
PAN-BR-8086	AAA		T	GTAT			.GGTG.G.G.C.A
PAN-BR-8087	AAA		T	GTAT			.GGTG.G.G.C.A
PAN-BR-8098	AAC		T	GT.T			.AT.TG.G.G.C.A
PAN-BR-8103	AAT		T	T.T			.ATCAG.G.G.C.A
PAN-BR-8117	AAT		A	T	T.T		.TGTG.G.G.C.A
PAN-BR-8135	AAT		A	TG	G.T		.G.T.TG.G.G.A
PAN-BR-8145	AAT		T	T.T			.TGTG.G.G.C.A
PAN-BR-8147	AAT		C	T	GTAT		.TGTA.G.G.A
PAN-BR-8156	AAT	T	T	TAT			.ATGTG.G.G.C.A
PAN-BR-8159	AAT		C	T	GTAT		.TGTA.G.G.A
POCONE-BR-01	AAT		T	GTAT			.ATTTG.G.G.A
CEARA-C-179-127	AAT		T	GT.T			.T.TG.G.C.AG
CEARA-M-138-5	AAT		A	T	GT.C	T	.G.T.TG.G.C.A
CEARA-J-272-10-AZ	AAT		T	GTAT			.ATTTG.G.G.A
CEARA-J-421-123	AAT		T	GTAT			.ATTTG.G.G.A
CEARA-J-488-AM	AAT		T	TAT			.ATTTG.G.G.A
CEARA-J-497-AM	AAT		T	GTAT			.ATTTG.G.G.A
CEARA-J-507-BR	AAT		T	GTAT			.ATTTG.G.G.A
CEARA-J-518-20AZ	AAT		T	GTAT			.ATTTG.G.G.A
CEARA-J-554-AZ	AAT		T	GTAT			.ATTTG.G.G.A
CEARA-J-585-18-BR	AAT		T	GTAT			.ATTTG.N.G.A
CEARA-J-588-AZ	AAT		T	TAT			.ATTTG.G.G.A
CEARA-J-821-49	AGA		T	GTAT			.GGTG.G.G.C.A

150 160 170 180 190 200 210

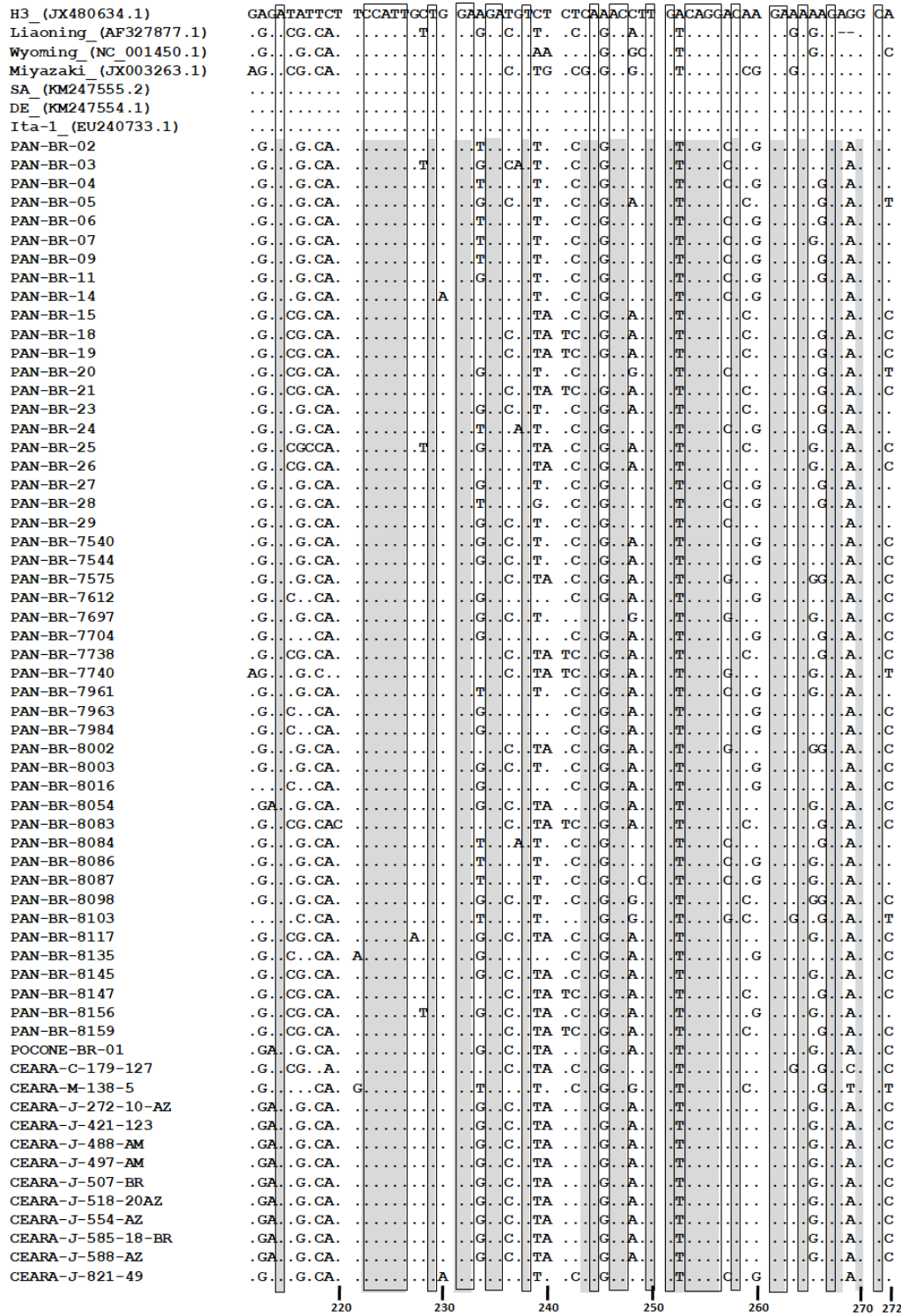


FIGURA 65: Alinhamento das seqüências nucleotídicas do EIAV de eqüídeos do Ceará para o exon 1 do gene *tat* ao gene *gag* – Alinhamento de 68 seqüências nucleotídicas de 272 pb do EIAV: 12 seqüências obtidas a partir de amplificação por PCR de DNA proviral de eqüídeos do Ceará, 49 seqüências de EIAV de eqüídeos do Pantano brasileiro e sete seqüências mundiais do EIAV, sendo quatro seqüências de genoma completo: H3 (JX480634.1), Liaoning (AF327877.1), Wyoming (AF033820.1), e Miyazaki (JX003263.1); e três seqüências parciais: Ita1 (EU240733.1), SA (KM247555.2) e DE (KM247554.1). O alinhamento foi feito no programa Mega, versão 6.0, utilizando

o Clustal W (TAMURA *et al.*, 2013). Regiões conservadas em todas as sequências estão identificadas por retângulos pretos, e regiões conservadas somente nas sequências de EIAV do Ceará e Pantanal estão destacadas em cinza. O início e fim do exon 1 do gene *tat* e início do gene *gag* estão destacados no topo da figura, e o número de nucleotídeos da sequência estão identificados na base da figura.

Na análise da similaridade nucleotídica somente entre as sequências de equídeos do Ceará foi observado que as sequências de cavalo (CEARA-C-179-127) e mula (CEARA-M-138) apresentaram similaridade entre si de 85,5%, entre a sequência de mula e as 10 sequências de jumentos a similaridade foi de 81,3% a 83,8%, entre a sequência de cavalo e as 10 sequências de jumentos a similaridade foi de 85,9% a 88%, entre as 10 sequências de jumentos a similaridade foi de 87,9% a 100% (Tabela 19).

Enquanto que a similaridade nucleotídica entre a sequência de cavalo (CEARA-C-179-127) e as 49 sequências de cavalos do Pantanal foi de 84,5% a 92,1%. A similaridade entre a sequência de mula (CEARA-M-138) e as 49 sequências de cavalos do Pantanal foi de 82,3% a 89,4%. A similaridade entre as 10 sequências de jumentos e as 49 sequências de cavalos do Pantanal foi de 86% a 100% (Tabela 19).

As sequências de equídeos do Ceará quando comparadas com as sequências de EIAV mundiais apresentaram valores variáveis de similaridade nucleotídica. A sequência de cavalo (CEARA-C-179-127) teve similaridade de 78,7% com Ita-1, 79,2% com H3, SA e DE, 80,4% com Wyoming, 81,1% com Liaoning e 84% com Miyazaki. A sequência de mula (CEARA-M-138-5) teve similaridade de 76,1% com H3, SA, DE e Ita-1, 78% com Liaoning, 79,7% com Wyoming e 80,3% com Miyazaki. As 10 sequências de jumentos tiveram similaridade de 78,5% a 81,3% com Liaoning, 79,7% a 82,9% com Wyoming, 80,6% a 81,5% com Miyazaki, 80,9% a 81,6% com Ita-1, 81,4% a 82,% com H3, SA e DE (Tabela 19).

Tabela 19: Similaridade nucleotídica de 68 seqüências nucleotídicas do EIAV para o exon 1 do gene *tat* ao gene *gag*: 12 seqüências de equídeos do Ceará, e 49 do Pantanal brasileiro com sete seqüências mundiais*

	H3	Liaoning	Wyoming	Miyazaki	SA	DE	Ita-1	POCONE-BR-01	PAN-BR-23	PAN-BR-02	PAN-BR-03	PAN-BR-04	PAN-BR-05	PAN-BR-06	PAN-BR-24	PAN-BR-07	PAN-BR-09	PAN-BR-27	PAN-BR-11	PAN-BR-25	PAN-BR-26	PAN-BR-14	PAN-BR-15		
H3																									
Liaoning	80,1																								
Wyoming	79,9	84,2																							
Miyazaki	76,2	79,1	78,9																						
SA	100,0	80,1	79,9	76,2																					
DE	100,0	80,1	79,9	76,2	100,0																				
Ita-1	99,6	79,6	79,3	76,2	99,6	99,6																			
POCONE-BR-01	81,6	80,7	82,4	80,6	81,6	81,6	81,0																		
PAN-BR-23	81,5	82,9	79,6	82,9	81,5	81,5	81,0	91,7																	
PAN-BR-02	80,9	78,5	79,2	80,9	80,9	80,9	80,3	89,0	89,9																
PAN-BR-03	81,9	84,5	82,3	81,3	81,9	81,9	81,4	92,2	93,1	92,6															
PAN-BR-04	81,0	79,5	80,2	81,5	81,0	81,0	80,5	89,0	91,3	98,0	92,6														
PAN-BR-05	82,0	82,8	79,5	82,4	82,0	82,0	81,5	91,7	98,8	89,5	92,6	90,9													
PAN-BR-06	81,5	79,1	79,7	81,5	81,5	81,5	80,9	89,4	91,3	98,8	93,0	99,2	90,9												
PAN-BR-24	81,4	78,5	78,6	81,5	81,4	81,4	80,8	88,0	90,4	96,3	92,1	96,8	90,0	97,6											
PAN-BR-07	81,0	80,7	81,4	81,0	81,0	81,0	80,4	89,9	89,9	98,4	92,6	98,8	89,5	98,8	96,3										
PAN-BR-09	81,4	78,0	79,8	81,5	81,4	81,4	80,8	88,5	91,3	98,0	92,1	98,4	90,9	99,2	98,4	98,0									
PAN-BR-27	81,4	79,6	79,7	81,5	81,4	81,4	80,9	89,9	91,7	98,4	93,4	98,8	91,3	99,6	97,2	98,4	98,8								
PAN-BR-11	81,5	79,5	79,6	82,0	81,5	81,5	80,9	89,9	92,2	98,0	93,4	99,2	91,7	99,2	96,8	98,0	98,4	99,6							
PAN-BR-25	76,7	84,8	83,3	82,2	76,7	76,7	76,2	89,7	88,7	86,0	90,3	86,9	88,6	86,5	84,5	87,9	85,6	87,0	86,9						
PAN-BR-26	78,7	81,9	83,4	82,4	78,7	78,7	78,2	91,6	90,3	89,4	91,3	88,5	90,3	88,9	89,0	89,5	89,0	88,9	88,9	91,3					
PAN-BR-14	81,4	78,5	79,7	81,5	81,4	81,4	80,9	88,4	89,9	96,7	92,0	96,4	89,5	97,2	95,5	96,8	96,3	97,1	96,7	86,0	88,4				
PAN-BR-15	79,8	80,8	82,9	83,4	79,8	79,8	79,3	90,7	91,2	89,9	91,3	89,0	91,2	89,4	89,4	89,0	89,4	89,4	90,7	97,6	88,9	88,9			
PAN-BR-28	79,2	77,4	78,4	78,8	79,2	79,2	78,6	88,1	89,0	97,6	90,7	98,0	88,6	98,0	95,5	97,6	97,2	97,6	97,2	85,0	87,5	95,0	88,0		
PAN-BR-29	81,4	82,8	84,0	81,9	81,4	81,4	80,9	92,6	93,4	93,0	97,2	93,9	93,0	93,5	91,7	93,9	92,6	93,9	93,9	89,7	90,3	92,5	90,4		
PAN-BR-18	80,4	81,9	82,7	82,3	80,4	80,4	79,8	89,8	91,2	89,0	89,9	89,9	91,2	90,4	88,6	89,0	89,5	90,4	90,4	88,8	89,8	89,8	91,6		
PAN-BR-19	79,3	81,8	82,7	81,2	79,3	79,3	78,8	89,9	91,2	89,0	89,9	90,8	91,2	90,4	88,6	89,9	89,5	90,4	90,4	89,7	89,8	89,8	91,6		
PAN-BR-20	80,9	80,1	82,8	82,5	80,9	80,9	80,4	88,9	89,4	89,4	90,8	91,7	89,8	90,8	89,4	90,3	89,9	91,3	91,7	87,7	87,5	89,4	87,5		
PAN-BR-21	79,3	81,8	82,7	81,2	79,3	79,3	78,8	89,9	91,2	89,0	89,9	90,8	91,2	90,4	88,6	89,9	89,5	90,4	90,4	89,7	89,8	89,8	91,6		
PAN-BR-7540	81,2	82,9	82,3	82,3	82,1	82,1	81,5	93,9	93,1	91,3	94,3	92,2	93,0	91,7	89,9	92,2	90,8	92,2	92,2	91,6	90,7	90,8	91,7		
PAN-BR-7544	82,6	82,4	81,7	81,1	82,6	82,6	82,0	93,0	92,1	90,4	93,5	90,8	92,1	90,8	89,0	90,9	89,9	91,3	91,3	91,1	90,7	89,9	90,7		
PAN-BR-7575	80,3	83,9	83,2	81,6	80,3	80,3	79,7	91,1	93,0	87,9	92,1	89,4	93,0	89,4	88,5	89,5	89,5	89,4	89,4	89,7	92,6	88,4	91,6		
PAN-BR-7612	83,6	82,3	80,4	80,1	83,6	83,6	83,1	90,2	89,9	90,2	93,0	90,3	89,8	90,7	89,8	90,3	89,8	89,8	91,1	91,1	90,2	91,1	89,6	91,6	
PAN-BR-7697	82,6	80,6	83,0	80,9	82,6	82,6	82,1	91,7	88,9	87,4	89,4	88,0	89,8	87,9	86,9	89,0	86,9	88,4	88,4	87,8	87,9	86,8	86,9		
PAN-BR-7704	83,1	82,2	82,1	81,2	83,1	83,1	82,5	90,3	90,8	88,4	92,1	89,4	90,8	89,9	88,9	88,4	88,9	90,3	90,3	90,7	91,1	87,8	90,2		
PAN-BR-7738	79,3	81,8	82,7	81,2	79,3	79,3	78,8	89,9	91,2	89,0	89,9	90,8	91,2	90,4	88,6	89,9	89,5	90,4	90,4	89,7	89,8	89,8	91,6		
PAN-BR-7740	79,7	82,3	82,1	82,3	79,7	79,7	79,1	90,7	92,2	88,0	92,6	88,0	92,6	88,5	87,5	89,0	88,5	88,4	88,4	88,8	93,0	88,4	92,1		
PAN-BR-7961	79,9	81,2	81,3	80,9	79,9	79,9	79,3	89,9	90,4	97,6	91,7	98,0	89,9	98,0	95,5	99,2	97,2	97,6	97,2	88,4	89,4	96,8	88,9		
PAN-BR-7963	83,6	82,3	80,4	80,1	83,6	83,6	83,1	90,2	89,9	90,2	93,0	90,3	89,8	90,7	89,8	90,3	89,8	91,1	91,1	90,2	91,1	89,6	91,6		
PAN-BR-7984	83,1	82,3	80,4	79,5	83,1	83,1	82,5	89,8	89,4	89,7	92,5	90,3	89,4	90,2	89,2	90,3	89,2	90,6	90,6	90,2	90,6	89,1	91,1		
PAN-BR-8002	80,4	84,4	84,7	82,8	80,4	80,4	79,9	92,5	93,5	89,4	93,4	91,3	93,5	90,8	89,9	91,3	90,8	90,8	90,8	91,6	93,9	89,8	93,0		
PAN-BR-8003	82,1	82,9	82,3	82,3	82,1	82,1	81,5	93,9	93,1	91,3	94,3	92,2	93,0	91,7	89,9	92,2	90,8	92,2	92,2	91,6	90,7	90,8	91,7		
PAN-BR-8016	84,1	80,5	78,6	79,5	84,1	84,1	83,6	88,8	88,4	88,8	91,6	88,8	88,4	89,3	88,4	88,8	88,4	89,8	89,8	89,7	89,8	88,2	90,2		
PAN-BR-8054	81,6	80,7	82,4	80,6	81,6	81,6	81,0	100,0	91,7	89,0	92,2	89,0	91,7	89,4	88,0	89,9	88,5	89,9	89,7	91,6	88,4	90,7			
PAN-BR-8083	78,2	80,7	81,6	80,1	78,2	78,2	77,6	88,9	90,3	88,1	89,0	89,9	90,3	89,5	87,6	89,0	88,5	89,5	89,4	88,8	88,9	88,5	90,7		
PAN-BR-8084	82,0	79,6	80,3	80,9	82,0	82,0	81,5	89,0	89,9	97,6	93,5	98,0	90,4	98,8	97,2	97,6	98,0	98,4	98,0	86,0	88,4	95,9	88,9		
PAN-BR-8086	80,4	80,1	80,8	80,4	80,4	80,4	79,8	89,5	89,5	98,0	92,1	98,4	89,0	98,4	95,9	99,6	97,6	98,0	97,6	87,5	89,0	96,3	88,5		
PAN-BR-8087	80,4	80,1	82,0	80,4	80,4	80,4	79,9	89,5	89,5	98,0	92,1	98,4	89,0	98,4	95,9	99,6	97,6	98,0	97,6	87,4	89,0	96,4	88,5		
PAN-BR-8098	78,2	81,3	82,4	83,0	78,2	78,2	77,6	90,3	92,6	87,4	91,3	89,4	92,6	88,9	89,0	89,0	89,0	89,4	89,8	87,4	92,1	86,8	91,2		
PAN-BR-8103	81,1	80,6	82,5	82,5	81,1	81,1	80,5	88,9	91,2	88,4	90,4	90,3	91,7	89,9	89,4	89,3	89,9	89,4	89,4	86,4	89,0	87,4	89,9		
PAN-BR-8117	78,4	84,5	84,2	80,4	78,4	78,4	77,9	89,3	88,8	86,4	90,7	86,4	88,8	86,9	85,9	87,5	87,0	87,4	87,4	87,4	91,6	86,3	90,7		
PAN-BR-8135	82,7	80,1	78,9	78,5	82,7	82,7	82,1	88,4	88,0	88,4	91,3	88,5	88,0	88,9	88,0	88,5	88,0	89,4	89,4	88,9	89,8	87,8	90,3		
PAN-BR-8145	79,7	87,0	85,8	82,7	79,7	79,7	79,1	91,2	90,7	88,4	91,7	89,0	90,7	88,9	88,0	89,9	89,0	89,4	89,4	91,5	93,4	88,4	92,5		
PAN-BR-8147	79,3	81,8	82,7	81,2	79,3	79,3	78,8	89,9	91,2	89,0	89,9	90,8	91,2	90,4	88,6	89,9	89,5	90,4	90,4	89,7	89,8	89,5	91,6		
PAN-BR-8156	76,8	86,5	83,3	82,8	76,8	76,8	76,2	90,7	91,1	88,5	91,3	89,4	90,6	89,0	88,0	90,4	89,0	89,4	89,4	89,2	91,2	88,4	90,3		
PAN-BR-8159	79,3	81,8	82,7	81,2	79,3	79,3	78,8	89,9	91,2	89,0	89,9	90,8	91,2	90,4	88,6	89,9	89,5	90,4	90,4	89,7	89,8	89,5	91,6		
CEARA-C-179-127	79,2	81,1	80,4	84,0	79,2	79,2	78,7	88,0	87,5	85,4	88,9	86,6	87,5	87,0	86,0	85,5	86,0	87,0	87,0	88,2	88,9	85,9	88,9		
CEARA-M-138-5	76,1	78,0	79,7	80,3	76,1	76,1	76,1	82,4	86,1	84,3	86,6	86,5	86,6	86,0	86,1	85,4	86,1	85,5	85,5	82,8	85,6	83,8	86,5		
CEARA-J-272-10-AZ	81,6	80,7	82,4	80,6	81,6	81,6	81,0	100																	

	PAN-BR-26	PAN-BR-29	PAN-BR-18	PAN-BR-19	PAN-BR-20	PAN-BR-21	PAN-BR-7540	PAN-BR-7544	PAN-BR-7575	PAN-BR-7612	PAN-BR-7697	PAN-BR-7704	PAN-BR-7738	PAN-BR-7740	PAN-BR-7961	PAN-BR-7963	PAN-BR-7984	PAN-BR-8002	PAN-BR-8003	PAN-BR-8016	PAN-BR-8054	PAN-BR-8083	PAN-BR-8084
H3																							
Liaoning																							
Wyoming																							
Miyazaki																							
SA																							
DE																							
Ita-1																							
POCONE-BR-01																							
PAN-BR-23																							
PAN-BR-02																							
PAN-BR-03																							
PAN-BR-04																							
PAN-BR-05																							
PAN-BR-06																							
PAN-BR-24																							
PAN-BR-07																							
PAN-BR-09																							
PAN-BR-27																							
PAN-BR-11																							
PAN-BR-25																							
PAN-BR-26																							
PAN-BR-14																							
PAN-BR-15																							
PAN-BR-28																							
PAN-BR-29	92,1																						
PAN-BR-18	88,1	89,5																					
PAN-BR-19	89,0	90,4	99,2																				
PAN-BR-20	89,4	92,1	89,4	90,3																			
PAN-BR-21	89,0	90,4	99,2	100,0	90,3																		
PAN-BR-7540	90,3	95,6	90,8	91,7	90,7	91,7																	
PAN-BR-7544	89,0	94,3	90,8	91,3	89,3	91,3	98,0																
PAN-BR-7575	87,5	92,2	90,6	91,2	89,8	91,2	92,0	91,6															
PAN-BR-7612	88,7	92,6	88,7	88,8	88,3	88,8	93,4	92,5	90,1														
PAN-BR-7697	85,9	90,8	85,4	85,0	88,4	85,0	90,3	89,8	88,9	86,8													
PAN-BR-7704	87,9	91,7	87,4	87,4	88,8	87,4	93,0	92,9	91,1	95,1	89,7												
PAN-BR-7738	89,0	90,4	99,2	100,0	90,3	100,0	91,7	91,3	91,2	88,8	85,0	87,4											
PAN-BR-7740	86,0	91,7	90,1	90,2	87,9	90,2	91,1	90,2	96,4	88,7	87,5	88,7	90,2										
PAN-BR-7961	96,8	93,0	89,5	90,4	90,3	90,4	92,2	90,8	89,9	90,2	88,4	88,4	90,4	89,5									
PAN-BR-7963	88,7	92,6	88,7	88,8	88,3	88,8	93,4	92,5	90,1	0,0	86,8	88,8	88,7	90,2									
PAN-BR-7984	88,7	92,6	88,2	88,8	88,3	88,8	93,4	93,0	90,6	99,6	87,4	94,7	88,8	88,1	90,2	99,6							
PAN-BR-8002	89,4	93,9	92,1	92,9	90,7	92,9	93,7	92,5	98,4	91,5	89,4	92,5	92,9	96,0	91,7	91,5	91,5						
PAN-BR-8003	90,3	95,6	90,8	91,7	90,7	91,7	100,0	98,0	92,0	93,4	90,3	93,0	91,7	91,1	92,2	93,4	93,4	93,7					
PAN-BR-8016	87,3	91,2	87,3	87,4	86,8	87,4	92,1	92,0	88,7	98,8	85,3	93,8	87,4	87,2	88,8	98,8	98,4	90,1	92,1				
PAN-BR-8054	88,1	92,6	89,8	89,9	88,9	89,9	93,9	93,0	91,1	90,2	91,7	90,3	89,9	90,7	89,9	90,2	89,8	92,5	93,9	88,8			
PAN-BR-8083	88,1	89,5	98,4	99,2	89,4	99,2	90,8	90,4	90,3	87,9	84,0	86,4	99,2	89,3	89,5	87,9	87,9	92,1	90,8	86,4	88,9		
PAN-BR-8084	96,8	93,0	90,8	89,9	90,4	89,9	90,3	89,4	88,9	89,2	88,4	88,4	89,9	88,0	96,8	89,2	88,7	90,3	90,3	87,8	89,0	89,0	
PAN-BR-8086	97,2	93,4	88,6	89,5	89,9	89,5	91,7	90,4	89,0	89,8	88,5	87,9	89,5	88,5	98,8	89,8	89,8	90,8	91,7	88,4	89,5	88,5	97,2
PAN-BR-8087	97,2	93,5	88,5	89,5	89,9	89,5	91,7	90,4	89,0	89,8	88,5	88,0	89,5	88,5	98,8	89,8	89,8	90,8	91,7	88,4	89,5	88,5	97,2
PAN-BR-8098	87,0	92,6	89,3	89,8	89,5	89,8	91,6	91,2	92,2	88,8	89,4	89,8	89,8	90,8	88,4	88,8	89,3	93,1	91,6	87,4	90,3	88,9	88,4
PAN-BR-8103	88,4	92,6	87,5	87,5	89,9	87,5	90,7	89,3	91,3	88,3	89,4	89,4	87,5	90,3	88,8	88,3	88,3	92,6	90,7	87,9	88,9	86,5	90,4
PAN-BR-8117	84,3	91,2	89,2	88,3	87,2	88,3	90,7	90,6	92,0	90,6	86,4	90,1	88,3	90,6	88,0	90,6	90,1	93,4	90,7	89,2	89,3	87,3	87,4
PAN-BR-8135	86,9	90,8	86,9	87,0	86,4	87,0	91,7	91,7	88,3	98,4	85,9	93,5	87,0	86,8	88,4	98,4	98,0	89,8	91,7	98,0	88,4	86,0	87,4
PAN-BR-8145	87,0	92,6	91,1	90,7	89,8	90,7	93,0	93,4	94,7	91,6	89,4	91,1	90,7	92,5	90,4	91,6	92,0	95,5	93,0	90,2	91,2	89,8	89,4
PAN-BR-8147	89,0	90,4	99,2	100,0	90,3	100,0	91,7	91,3	91,2	88,8	85,0	87,4	100,0	90,2	90,4	88,8	88,8	92,9	91,7	87,4	89,9	99,2	89,9
PAN-BR-8156	87,4	92,6	88,8	88,8	88,4	88,8	92,1	90,7	92,1	89,8	87,9	88,8	88,8	90,7	90,8	89,8	89,8	93,8	92,1	88,4	90,7	87,8	88,5
PAN-BR-8159	89,0	90,4	99,2	100,0	90,3	100,0	91,7	91,3	91,2	88,8	85,0	87,4	100,0	90,2	90,4	88,8	88,8	92,9	91,7	87,4	89,9	99,2	89,9
CEARA-C-179-127	84,5	89,4	87,9	87,9	87,4	87,9	88,9	87,9	90,7	88,3	87,0	91,1	87,9	88,3	85,0	88,3	87,8	92,1	88,9	86,9	88,0	87,0	86,5
CEARA-M-138-5	84,3	88,9	82,3	83,4	85,9	83,4	85,3	83,9	87,0	87,0	82,4	88,0	83,4	84,9	85,3	87,0	87,0	88,9	85,3	85,5	82,4	82,3	85,4
CEARA-J-272-10-AZ	88,1	92,6	89,8	89,9	88,9	89,9	93,9	93,0	91,1	90,2	91,7	90,3	89,9	90,7	89,9	90,2	89,8	92,5	93,9	88,8	100,0	88,9	89,0
CEARA-J-421-123	88,1	92,6	89,8	89,9	88,9	89,9	93,9	93,0	91,1	90,2	91,7	90,3	89,9	90,7	89,9	90,2	89,8	92,5	93,9	88,8	100,0	88,9	89,0
CEARA-J-488-AM	87,6	92,2	90,3	89,4	88,4	89,4	93,4	92,6	90,6	89,8	92,2	89,8	89,4	90,3	89,4	89,8	89,3	92,0	93,4	88,3	99,6	88,4	89,4
CEARA-J-497-AM	88,1	92,6	89,8	89,9	88,9	89,9	93,9	93,0	91,1	90,2	91,7	90,3	89,9	90,7	89,9	90,2	89,8	92,5	93,9	88,8	100,0	88,9	89,0
CEARA-J-507-BR	88,1	92,6	89,8	89,9	88,9	89,9	93,9	93,0	91,1	90,2	91,7	90,3	89,9	90,7	89,9	90,2	89,8	92,5	93,9	88,8	100,0	88,9	89,0
CEARA-J-518-20AZ	88,1	92,6	89,8	89,9	88,9	89,9	93,9	93,0	91,1	90,2	91,7	90,3	89,9	90,7	89,9	90,2	89,8	92,5	93,9	88,8	100,0	88,9	89,0
CEARA-J-554-AZ	88,1	92,6	89,8	89,9	88,9	89,9	93,9	93,0	91,1	90,2	91,7	90,3	89,9	90,7	89,9	90,2	89,8	92,5	93,9	88,8	100,0	88,9	89,0
CEARA-J-585-18-BR	88,1	92,6	89,8	89,9	88,9	89,9	93,9	93,0	91,1	90,2	91,7	90,3	89,9	90,7	89,9	90,2	89,8	92,5	93,9	88,8	100,0	88,9	89,0
CEARA-J-588-AZ	87,0	91,7	89,8	88,9	87,9	88,9	93,0	92,1	90,1	89,3	91,7	89,3	88,9	89,8	89,0	89,3	88,7	91,6	93,0	87,8	99,2	87,9	89,0
CEARA-J-821-49	95,0	92,5	89,5	89,5	89,4	89,5	90,8	89,9	88,4	89,6	86,8	87,8	89,5	88,4	96,8	89,6	89,1	89,8	90,8	88,2	88,4	88,5	95,9

	PAN-BR-8086	PAN-BR-8087	PAN-BR-8098	PAN-BR-8103	PAN-BR-8117	PAN-BR-8135	PAN-BR-8145	PAN-BR-8147	PAN-BR-8156	PAN-BR-8159	CEARA-C-179-127	CEARA-M-138-5	CEARA-J-272-10-AZ	CEARA-J-421-123	CEARA-J-488-AM	CEARA-J-497-AM	CEARA-J-507-BR	CEARA-J-518-20AZ	CEARA-J-554-AZ	CEARA-J-585-18-BR	CEARA-J-588-AZ	CEARA-J-821-49
H3																						
Liaoning																						
Wyoming																						
Miyazaki																						
SA																						
DE																						
Ita-1																						
POCONE-BR-01																						
PAN-BR-23																						
PAN-BR-02																						
PAN-BR-03																						
PAN-BR-04																						
PAN-BR-05																						
PAN-BR-06																						
PAN-BR-24																						
PAN-BR-07																						
PAN-BR-09																						
PAN-BR-27																						
PAN-BR-11																						
PAN-BR-25																						
PAN-BR-26																						
PAN-BR-14																						
PAN-BR-15																						
PAN-BR-28																						
PAN-BR-29																						
PAN-BR-18																						
PAN-BR-19																						
PAN-BR-20																						
PAN-BR-21																						
PAN-BR-7540																						
PAN-BR-7544																						
PAN-BR-7575																						
PAN-BR-7612																						
PAN-BR-7697																						
PAN-BR-7704																						
PAN-BR-7738																						
PAN-BR-7740																						
PAN-BR-7961																						
PAN-BR-7963																						
PAN-BR-7984																						
PAN-BR-8002																						
PAN-BR-8003																						
PAN-BR-8016																						
PAN-BR-8054																						
PAN-BR-8083																						
PAN-BR-8084																						
PAN-BR-8086																						
PAN-BR-8087	99,2																					
PAN-BR-8098	88,5	88,5																				
PAN-BR-8103	88,8	88,9	92,2																			
PAN-BR-8117	87,0	87,0	89,4	88,0																		
PAN-BR-8135	88,0	88,0	87,0	86,5	88,8																	
PAN-BR-8145	89,4	89,5	92,2	90,4	97,6	89,8																
PAN-BR-8147	89,5	89,5	89,8	87,5	88,3	87,0	90,7															
PAN-BR-8156	89,9	89,9	90,4	89,9	93,9	88,0	96,0	88,8														
PAN-BR-8159	89,5	89,5	89,8	87,5	88,3	87,0	90,7	100,0	88,8													
CEARA-C-179-127	85,0	85,0	88,0	87,6	89,1	87,0	90,2	87,9	87,9	87,9												
CEARA-M-138-5	84,8	84,9	87,6	89,4	86,5	86,5	87,0	83,4	85,5	83,4	85,5											
CEARA-J-272-10-AZ	89,5	89,5	90,3	88,9	89,3	88,4	91,2	89,9	90,7	89,9	88,0	82,4										
CEARA-J-421-123	89,5	89,5	90,3	88,9	89,3	88,4	91,2	89,9	90,7	89,9	88,0	82,4	100,0									
CEARA-J-488-AM	89,0	89,0	89,9	89,4	89,8	87,9	91,6	89,4	91,2	89,4	87,5	81,8	99,6	99,6								
CEARA-J-497-AM	89,5	89,5	90,3	88,9	89,3	88,4	91,2	89,9	90,7	89,9	88,0	82,4	100,0	100,0	99,6							
CEARA-J-507-BR	89,5	89,5	90,3	88,9	89,3	88,4	91,2	89,9	90,7	89,9	88,0	82,4	100,0	100,0	99,6	100,0						
CEARA-J-518-20AZ	89,5	89,5	90,3	88,9	89,3	88,4	91,2	89,9	90,7	89,9	88,0	82,4	100,0	100,0	99,6	100,0	100,0					
CEARA-J-554-AZ	89,5	89,5	90,3	88,9	89,3	88,4	91,2	89,9	90,7	89,9	88,0	82,4	100,0	100,0	99,6	100,0	100,0	100,0				
CEARA-J-585-18-BR	89,5	89,5	90,3	88,9	89,3	88,4	91,2	89,9	90,7	89,9	88,0	82,4	100,0	100,0	99,6	100,0	100,0	100,0	100,0			
CEARA-J-588-AZ	88,5	88,5	89,4	88,9	89,3	87,4	91,2	88,9	90,7	88,9	86,9	81,3	99,2	99,2	99,6	99,2	99,2	99,2	99,2	99,2		
CEARA-J-821-49	96,3	96,4	86,8	87,4	86,3	87,8	88,4	89,5	88,4	89,5	85,9	83,8	88,4	88,4	87,9	88,4	88,4	88,4	88,4	88,4	87,4	

*Estimativa da similaridade nucleotídica entre 68 sequências nucleotídicas de 272 pb do EIIV: 12 sequências nucleotídicas de EIIV de equídeos do Ceará e 49 de equídeos do Pantanal brasileiro com sete sequências mundiais do EIIV, sendo quatro sequências de genoma completo H3 (JX480634.1), Liaoning (AF327877.1), Wyoming (AF033820.1), e Miyazaki (JX003263.1); e três sequências parciais: Ita1 (EU240733.1), SA (KM247555.2) e DE (KM247554.1). A estimativa da similaridade nucleotídica entre as sequências foi feita pelo cálculo da estimativa da divergência evolutiva entre as sequências no programa MEGA X (KUMAR *et al.*, 2018), empregando o modelo Tamura-Nei, a taxa de variação entre os sítios foi modelada com uma distribuição gamma (shape parameter = 4). Baseado em um conjunto de dados final de 260 posições nucleotídicas (Os códons

na sequência que apresentavam N nas sequências do Ceará foram retirados, assim como o códon correspondente em todas as sequências analisadas no alinhamento).

O alinhamento da sequência de 15 aminoácidos para o fragmento de 50 pb do exon 1 do gene *tat* para as 12 sequências de aa deduzidas de EIAV de equídeos do Ceará, foi feito com 49 sequências de aa deduzidas de EIAV de equídeos do Pantanal com mais sete sequências de aa deduzidas de EIAV mundiais, sendo quatro sequências de genoma completo: Liaoning, Wyoming, Miyazaki e H3, e três sequências parciais: Ita-1, SA e DE (Figura 66).

A análise somente das sequências brasileiras mostrou que estas foram conservadas entre si. Foram observadas três mutações de aa entre as sequências de equídeos do Ceará, sendo uma conservativa e duas não-conservativas, as quais foram encontradas apenas nas sequências de mula (CEARA-M-138) e cavalo (CEARA-C-179-127) em relação às demais sequências analisadas no alinhamento. Enquanto que as sequências de jumentos foram iguais entre si, com apenas uma sequência (CEARA-J-421-123) com um aa indefinido devido a presença de um N na sequência nucleotídica (Figura 66).

Foram consideradas mutações de aa apenas quando a troca de base foi exclusiva da sequência do Ceará. Na posição 11 no alinhamento ocorreu a troca de serina (S), asparagina (N) e isoleucina (I) por ácido aspártico (D) na sequência CEARA-M-138-5, sendo uma mutação não-conservativa. Duas outras mutações foram comuns entre as sequências brasileiras: na posição 8 no alinhamento troca de prolina (P) por serina (S) encontrada nas sequências CEARA-C-179-127 e PAN-BR-8117, sendo uma mutação conservativa. A outra mutação na posição 14 troca de arginina (R) por glicina (G) encontrada na sequência CEARA-M-138-5 e em 14 sequências do Pantanal, sendo uma mutação não-conservativa (Figura 66).

Quando se analisa todas as 68 sequências de 15 aminoácidos no alinhamento para o exon 1 do gene *tat*, foram observadas quatro mutações de aminoácidos entre as sequências. Na posição 2 ocorreu a troca de treonina (T) (para as sequências H3, Liaoning, SA, DE, Ita-1, PAN-BR-05, PAN-BR-7697) por lisina (K) (para as demais

sequências), sendo uma mutação não-conservativa. Na posição 10 houve a troca de histidina (H) (para as sequências Liaoning e Miyazaki) por glutamina (Q) para as demais sequências – mutação não-conservativa. Na posição 13 a troca de arginina (R) (para quatro sequências do Pantanal) por glicina (G) (para as demais sequências – mutação não-conservativa. E na posição 14 a troca de arginina (R) por glicina (G) entre as sequências mundiais do EIAV e as sequências brasileiras – mutação não-conservativa (Figura 66).

H3_(JX480634.1)	QTSSGGV	EGQ	STGRQ
Liaoning_(AF327877.1)H	N.....
Wyoming_(NC_001450.1)	.K.....	N..G.
Miyazaki_(JX003263.1)	.K.....	.H	N..G.
SA_(KM247555.2)
DE_(KM247554.1)
Ita-1_(EU240733.1)
PAN-BR-02	.K.....
PAN-BR-03	.K.....
PAN-BR-04	.K.....
PAN-BR-05G.
PAN-BR-06	.K.....
PAN-BR-07	.K.....
PAN-BR-09	.K.....G.
PAN-BR-11	.K.....
PAN-BR-14	.K.....
PAN-BR-15	.K.....	N..G.
PAN-BR-18	.K.....
PAN-BR-19	.K.....
PAN-BR-20	.K.....	I.....
PAN-BR-21	.K.....
PAN-BR-23	.K.....G.
PAN-BR-24	.K.....G.
PAN-BR-25	.K.....
PAN-BR-26	.K.....	N..G.
PAN-BR-27	.K.....
PAN-BR-28	.K.....
PAN-BR-29	.K.....
PAN-BR-7540	.K.....
PAN-BR-7544	.K.....
PAN-BR-7575	.K.....	N..G.
PAN-BR-7612	.K.....R..
PAN-BR-7697
PAN-BR-7704	.K.....	N.....
PAN-BR-7738	.K.....
PAN-BR-7740	.K.....	N..G.
PAN-BR-7961	.K.....
PAN-BR-7963	.K.....R..
PAN-BR-7984	.K.....R..
PAN-BR-8002	.K.....	N..G.
PAN-BR-8003	.K.....
PAN-BR-8016	.K.....R..
PAN-BR-8054	.K.....
PAN-BR-8083	.K.....
PAN-BR-8084	.K.....
PAN-BR-8086	.K.....
PAN-BR-8087	.K.....
PAN-BR-8098	.K.....	N..G.
PAN-BR-8103	.K.....	N..G.
PAN-BR-8117	.K.....	S.....	N..G.
PAN-BR-8135	.K.....R..
PAN-BR-8145	.K.....	N..G.
PAN-BR-8147	.K.....
PAN-BR-8156	.K.....	N..G.
PAN-BR-8159	.K.....
POCONE-BR-01	.K.....
CEARA-C-179-127	.K.....	S.....	N.....
CEARA-M-138-5	.K.....	D..G.
CEARA-J-272-10-AZ	.K.....
CEARA-J-421-123	.K.....	?
CEARA-J-488-AM	.K.....
CEARA-J-497-AM	.K.....
CEARA-J-507-BR	.K.....
CEARA-J-518-20AZ	.K.....
CEARA-J-554-AZ	.K.....
CEARA-J-585-18-BR	.K.....
CEARA-J-588-AZ	.K.....
CEARA-J-821-49	.K.....

FIGURA 66: Alinhamento das sequências de aminoácidos do EIAV de equídeos do Ceará para o exon 1 do gene *tat* – Alinhamento de 68 sequências de 15 aminoácidos cada para o exon 1 do gene *tat*: 12 sequências de aminoácidos deduzidas a partir de DNA proviral de EIAV equídeos do Ceará, 49 de equídeos do Pantanal brasileiro e sete sequências mundiais do EIAV, sendo quatro sequências de genoma completo: H3, Liaoning, Wyoming, e Miyazaki; e três sequências parciais: Ita1, SA e DE. O número de acesso para cada sequência está identificado entre parênteses. O alinhamento foi realizado no programa MEGA versão 6, utilizando o Clustal W (TAMURA *et al.*, 2013). Alanina (A), Cisteína (C), Ácido aspártico (D), Ácido glutâmico (E), Fenilalanina (F), Glicina (G), Histidina (H), Isoleucina (I), Lisina (K), Leucina (L), Metionina (M), Asparagina (N), Prolina (P), Glutamina (Q), Arginina (R), Serina (S), Treonina (T), Valina (V), Triptofano (W), Tirosina (Y). Regiões variáveis nas sequências brasileiras em relação às demais sequências estão identificadas por retângulos pretos.

Foi feita a estimativa de similaridade para as sequências de nucleotídeos para o fragmento de 213 pb do gene *gag* das 12 sequências de EIAV de equídeos do Ceará, 49 de equídeos do Pantanal brasileiro com 66 sequências mundiais do EIAV, sendo quatro de genoma completo e 62 sequências parciais. A similaridade nucleotídica entre as sequências mundiais e as sequências brasileiras foi variável. As sequências do Pantanal e Ceará apresentaram valores variáveis de similaridade nucleotídica entre si variando de 78,4% a 100% (Tabela 20).

A análise da similaridade somente entre as sequências de equídeos do Ceará foi variável, entre as sequências de cavalo (CEARA-C-179-127) e mula (CEARA-M-138-5) a similaridade foi de 83,7%, entre a sequência de mula e as 10 sequências de jumentos a similaridade foi de 78,4% a 79,9%, entre a sequência de cavalo e as 10 sequências de jumentos a similaridade foi de 84,2% a 86,1%, enquanto que entre as 10 sequências de jumentos a similaridade foi de 99,5% a 100% (Tabela 20).

As sequências do Ceará quando comparadas as sequências de EIAV mundiais apresentaram valores variáveis de similaridade nucleotídica de 70,6% a 86,9%, 72,3% a 77,9% com H3 (Irlanda); 72,3% a 77,7% com SA e DE (Itália); 75,2% a 78,1% com Liaoning (China); 76,3% a 80,2% com Wyoming (Estados Unidos); 77,7% a 83,1% com Miyazaki (Japão); 78,2% a 84,4% com Tokyo548V e Goshum482V (Japão); 70,6% a 82,6% com Warsage clone2, Warsage clone1 e Assebroek clone1 (Bélgica); 75,8% a 83,3% com Gag-EIAV-FR-1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 11, 12, 13, 14 (França); 70,8% a 86,9% com SLO-1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 11, 12, 13, 14, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 26, 27, 28, 29, 30 e 31 (Eslovênia); 71,6%

a 85,1% com Ita-1, 2, 3, 4, 5 e 6 (Itália); 70,6% a 83,1% com Rom-1, 2, 4 e 5 (Romênia); 75,6% a 83,6% com Can-1, 3, 7 e 10 (Canadá); 70,7% a 72,2% com EIAVGER-1 (Alemanha) (Tabela 20).

Tabela 20: Similaridade nucleotídica de 127 sequências nucleotídicas do EIAV para o gene *gag**

	H3	Lioning	Wyoming	Miyazaki	SA	DE	POKONE-BR01	PAN-BR-23	PAN-BR02	PAN-BR03	PAN-BR04	PAN-BR05	PAN-BR06	PAN-BR-24	PAN-BR07	PAN-BR09	PAN-BR-27	PAN-BR-11	PAN-BR-25	PAN-BR-26	PAN-BR-14	PAN-BR-15	PAN-BR-28	PAN-BR-29	PAN-BR-18	PAN-BR-19
H3																										
Lioning	75.9																									
Wyoming	76.5	81.7																								
Miyazaki	73.6	76.2	75.1																							
SA	100.0	75.9	76.5	73.6																						
DE	100.0	75.9	76.5	73.6	100.0																					
POKONE-BR01	77.2	77.4	78.9	78.7	77.2	77.2																				
PAN-BR-23	77.9	80.8	74.5	81.0	77.9	77.9	90.3																			
PAN-BR-02	76.3	74.5	74.8	79.3	76.3	76.3	86.2	88.0																		
PAN-BR-03	77.7	82.3	78.8	79.7	77.7	77.7	90.3	91.9	90.8																	
PAN-BR-04	76.5	75.8	76.2	80.0	76.5	76.5	86.2	89.8	97.6	88.0																
PAN-BR-05	77.9	80.1	75.0	81.0	77.9	77.9	90.8	99.1	88.0	91.9	89.8															
PAN-BR-06	77.1	75.2	75.6	80.0	77.1	77.1	86.8	89.8	98.5	91.3	99.1	89.9														
PAN-BR-24	77.7	75.2	73.4	79.3	77.7	77.7	85.6	88.1	96.0	90.8	96.6	88.1	97.6													
PAN-BR-07	76.4	77.3	77.7	79.3	76.4	76.4	87.5	88.1	98.1	90.8	98.6	88.1	98.6	96.0												
PAN-BR-09	77.7	74.5	74.9	79.3	77.7	77.7	86.2	89.2	98.1	90.8	98.6	89.2	99.5	98.0	98.1											
PAN-BR-11	77.1	75.7	75.4	80.5	77.1	77.1	87.4	90.9	97.6	91.9	99.1	90.9	99.1	96.6	97.6	98.6	99.5									
PAN-BR-25	71.5	83.4	80.8	80.2	71.5	71.5	87.0	87.0	83.1	88.6	84.2	87.4	83.7	81.8	85.5	83.1	84.3	84.2								
PAN-BR-26	74.9	78.9	78.9	79.7	74.9	74.9	90.7	88.5	88.0	90.3	88.8	89.0	87.4	86.8	88.0	86.8	87.3	90.8								
PAN-BR-14	77.7	75.2	76.3	80.6	77.7	77.7	86.1	88.6	96.5	90.7	96.1	88.6	97.0	95.5	96.6	96.6	97.0	96.5	83.7	87.3						
PAN-BR-15	76.3	77.4	78.2	80.9	76.3	76.3	89.6	89.6	88.6	90.3	87.4	90.1	88.0	87.4	88.0	87.4	88.0	87.9	90.2	97.1	88.0					
PAN-BR-18	74.1	73.0	73.8	76.5	74.1	74.1	85.0	86.9	97.1	88.4	97.6	86.9	97.6	95.0	97.0	97.1	97.1	96.6	81.8	85.6	94.4	86.3				
PAN-BR-29	75.9	80.1	81.1	80.5	76.9	76.9	90.8	92.4	91.3	96.6	92.4	91.9	90.2	92.4	91.4	92.4	92.4	92.4	87.7	89.1	91.3	89.1	90.2			
PAN-BR-18	75.6	78.9	79.4	80.9	75.6	75.6	87.3	89.7	86.3	87.4	87.4	90.1	88.0	86.3	86.3	87.5	88.0	88.0	86.6	88.4	87.4	90.7	85.1	86.9		
PAN-BR-19	74.2	78.8	79.3	79.6	74.2	74.2	87.3	89.7	86.3	87.4	88.6	90.2	88.0	86.3	87.5	87.5	88.0	88.0	87.8	88.5	87.5	90.8	86.3	88.0	99.1	
PAN-BR-20	77.0	76.5	79.5	81.1	77.0	77.0	86.6	87.8	87.3	89.0	90.3	89.0	89.2	88.0	86.5	88.6	89.7	90.3	85.8	85.5	87.9	85.5	87.3	90.7	87.3	88.5
PAN-BR-21	74.2	78.9	79.3	79.6	74.2	74.2	87.3	89.7	86.3	87.4	88.6	90.2	88.0	86.3	87.5	87.5	88.0	88.0	87.8	88.5	87.5	90.8	86.3	88.0	99.1	100.0
PAN-BR-7540	77.9	80.3	78.8	81.0	77.9	77.9	92.4	92.0	89.2	93.0	90.3	92.5	89.8	88.0	90.3	89.2	90.3	90.1	89.7	89.1	90.8	88.0	94.6	88.5	89.7	
PAN-BR-7544	78.5	79.5	77.9	79.5	78.5	78.5	91.3	90.8	88.0	91.9	88.6	91.3	88.6	86.8	88.0	89.2	89.1	89.6	89.6	88.0	89.6	86.3	89.0	84.6	88.5	89.2
PAN-BR-7575	77.0	81.5	78.6	78.6	77.0	77.0	90.2	91.9	86.1	91.3	88.0	92.4	88.0	86.2	88.1	87.4	88.0	88.0	88.9	90.8	87.3	89.6	85.6	91.4	89.6	90.2
PAN-BR-7612	81.2	80.7	77.9	79.6	81.2	81.2	89.0	89.1	89.0	92.4	89.1	89.6	89.6	89.1	89.1	89.1	90.2	90.2	89.6	91.3	88.9	91.9	87.1	91.9	87.2	87.3
PAN-BR-7697	78.0	76.5	80.4	79.9	78.0	78.0	90.2	87.3	84.7	87.4	85.5	87.8	85.4	84.8	86.8	84.8	86.0	86.0	85.9	86.7	84.6	85.4	82.8	89.1	82.2	81.6
PAN-BR-7704	74.2	78.8	79.3	79.6	74.2	74.2	87.3	89.7	86.3	87.4	88.6	90.2	88.0	86.3	87.5	87.5	88.0	88.0	87.8	88.5	87.5	90.8	86.3	88.0	99.1	100.0
PAN-BR-7738	74.2	78.8	79.3	79.6	74.2	74.2	87.3	89.7	86.3	87.4	88.6	90.2	88.0	86.3	87.5	87.5	88.0	88.0	87.8	88.5	87.5	90.8	86.3	88.0	99.1	100.0
PAN-BR-7740	76.2	79.4	77.0	79.5	76.2	76.2	89.7	88.0	86.2	91.9	86.2	91.9	86.8	85.0	87.5	86.2	86.8	86.8	87.7	91.3	87.4	90.2	83.7	90.3	88.9	89.0
PAN-BR-7961	75.0	77.9	77.7	79.3	75.0	75.0	87.4	88.6	97.1	89.7	97.6	88.6	97.6	95.0	99.1	97.1	97.1	96.6	86.1	88.0	96.6	87.4	96.0	91.3	86.9	88.0
PAN-BR-7963	81.2	80.7	77.9	79.6	81.2	81.2	89.0	89.1	89.0	92.4	89.1	89.6	89.6	89.1	89.1	89.1	90.2	90.2	89.6	91.3	88.9	91.9	87.1	91.9	87.2	87.3
PAN-BR-7986	80.6	80.7	77.9	78.9	80.6	80.6	88.4	88.5	88.4	91.9	89.1	89.0	89.0	88.4	89.1	88.4	89.5	89.5	89.6	90.7	88.3	91.3	87.1	91.9	86.5	87.3
PAN-BR-8002	77.2	74.1	80.8	80.1	77.2	77.2	91.9	92.5	87.9	93.0	90.3	93.0	89.8	88.0	90.3	86.2	89.7	89.7	91.2	92.4	89.1	91.3	87.9	93.5	91.3	84.2
PAN-BR-8003	77.3	80.3	78.8	81.0	77.9	77.9	92.4	92.0	89.2	93.0	90.3	92.5	89.8	88.0	90.3	89.2	90.3	90.3	90.1	89.7	89.1	90.8	88.0	94.6	88.5	89.7
PAN-BR-8016	82.6	79.3	76.4	78.1	82.6	82.6	87.8	87.9	87.8	91.3	87.9	88.4	88.4	87.9	87.9	87.9	89.0	89.0	88.4	90.2	87.7	90.7	85.9	90.8	85.9	86.0
PAN-BR-8054	77.2	77.4	78.9	78.7	77.2	77.2	100.0	90.3	86.2	90.3	86.2	90.8	86.8	85.6	87.5	86.2	87.4	87.7	90.7	86.1	89.6	85.0	90.8	87.3	89.3	
PAN-BR-8083	77.2	77.4	77.9	78.3	77.2	77.2	86.1	88.5	85.1	86.3	87.4	89.0	86.8	85.1	86.3	86.3	86.8	86.8	86.6	87.3	86.3	89.6	85.1	86.8	96.1	97.0
PAN-BR-8094	77.8	75.9	76.4	79.3	77.8	77.8	86.2	89.2	97.0	91.9	87.6	89.2	86.5	85.0	87.0	90.4	91.1	91.1	97.6	80.1	86.8	85.4	87.4	96.0	87.5	87.3
PAN-BR-8095	75.7	76.6	77.0	78.6	75.7	75.7	86.9	87.5	97.6	90.2	98.1	95.5	98.1	95.5	99.5	97.6	97.6	97.6	84.9	87.4	96.0	86.8	96.5	91.9	85.7	86.9
PAN-BR-8098	75.7	76.4	78.5	78.6	75.7	75.7	86.9	87.5	97.6	90.2	98.1	95.5	98.1	95.5	99.5	97.6	97.6	97.6	84.9	87.4	96.0	86.8	96.5	91.9	85.7	86.9
PAN-BR-8098	74.3	78.2	77.7	80.5	74.3	74.3	89.2	91.4	85.5	90.3	88.0	91.9	87.4	86.8	87.5	86.8	88.0	88.6	86.0	90.2	85.4	89.1	85.0	92.0	87.6	88.5
PAN-BR-8103	78.0	77.1	77.8	79.8	78.0	78.0	87.3	89.7	86.7	89.2	89.2	90.8	88.6	87.4	87.9	88.0	88.0	88.0	84.8	86.2	86.1	87.4	86.7	92.0	85.8	85.6
PAN-BR-8117	75.3	82.9	80.7	77.7	75.3	75.3	88.4	87.2	84.8	90.2	84.9	87.7	85.5	83.5	86.2	84.9	86.0	86.0	88.9	90.1	85.4	88.9	82.2	90.8	88.3	87.1
PAN-BR-8135	76.0	85																								

	PAN-BR-8117	PAN-BR-8156	PAN-BR-8159	CEARA-C-179-127	CEARA-M-138-5	CEARA-I-272-10-AZ	CEARA-I-421-123	CEARA-I-488-AM	CEARA-I-497-AM	CEARA-I-500-BR	CEARA-I-518-20AZ	CEARA-I-554-AZ	CEARA-I-585-18-BR	CEARA-I-588-AZ	CEARA-I-821-49	Tokyo_548V	Goshun_482Z	Warsage_dome_2	Warsage_dome_1	Assebrook_dome_1	Gag-ElAV-FR-1	Gag-ElAV-FR-2	Gag-ElAV-FR-4	Gag-ElAV-FR-5	Gag-ElAV-FR-6		
H3																											
Lioning																											
Wyoming																											
Miyazaki																											
SA																											
DE																											
POCONE-BR-01																											
PAN-BR-23																											
PAN-BR-02																											
PAN-BR-03																											
PAN-BR-04																											
PAN-BR-05																											
PAN-BR-06																											
PAN-BR-24																											
PAN-BR-07																											
PAN-BR-09																											
PAN-BR-27																											
PAN-BR-11																											
PAN-BR-25																											
PAN-BR-26																											
PAN-BR-14																											
PAN-BR-15																											
PAN-BR-28																											
PAN-BR-29																											
PAN-BR-18																											
PAN-BR-19																											
PAN-BR-20																											
PAN-BR-21																											
PAN-BR-7540																											
PAN-BR-7544																											
PAN-BR-7575																											
PAN-BR-7612																											
PAN-BR-7697																											
PAN-BR-7704																											
PAN-BR-7738																											
PAN-BR-7740																											
PAN-BR-7961																											
PAN-BR-7963																											
PAN-BR-7984																											
PAN-BR-8002																											
PAN-BR-8003																											
PAN-BR-8016																											
PAN-BR-8054																											
PAN-BR-8083																											
PAN-BR-8084																											
PAN-BR-8086																											
PAN-BR-8087																											
PAN-BR-8098																											
PAN-BR-8103																											
PAN-BR-8117																											
PAN-BR-8135																											
PAN-BR-8145																											
PAN-BR-8147																											
PAN-BR-8156	87,8																										
PAN-BR-8159	100,0	87,8																									
CEARA-C-179-127	86,1	86,7	86,1																								
CEARA-M-138-5	81,0	83,1	81,0	83,7																							
CEARA-I-272-10-AZ	87,3	90,1	87,3	86,1	79,9																						
CEARA-I-421-123	87,3	90,1	87,3	86,1	79,9	100,0																					
CEARA-I-488-AM	86,7	90,7	86,7	85,5	79,1	99,5	99,5																				
CEARA-I-497-AM	87,3	90,1	87,3	86,1	79,9	100,0	100,0	99,5																			
CEARA-I-500-BR	87,3	90,1	87,3	86,1	79,9	100,0	100,0	99,5	100,0	100,0																	
CEARA-I-518-20AZ	87,3	90,1	87,3	86,1	79,9	100,0	100,0	99,5	100,0	100,0	100,0																
CEARA-I-554-AZ	87,3	90,1	87,3	86,1	79,9	100,0	100,0	99,5	100,0	100,0	100,0																
CEARA-I-585-18-BR	87,3	90,1	87,3	86,1	79,9	100,0	100,0	99,5	100,0	100,0	100,0	100,0															
CEARA-I-588-AZ	86,0	90,1	86,0	84,9	78,4	99,0	99,0	99,5	99,0	99,0	99,0	99,0	99,0														
CEARA-I-821-49	87,5	88,0	87,5	84,2	82,4	86,1	86,1	85,5	86,1	86,1	86,1	86,1	86,1	84,8													
Tokyo_548V	87,3	90,1	87,3	86,1	79,9	100,0	100,0	99,5																			
Goshun_482Z	87,4	85,6	87,4	81,9	79,1	83,7	83,7	84,4	83,7	83,7	83,7	83,7	83,7	85,7	79,8	81,0											
Warsage_dome_2	83,3	84,4	83,3	82,0	74,6	81,9	81,9	82,6	81,9	81,9	81,9	81,9	81,9	81,9	81,9	79,9	83,2	88,1									
Warsage_dome_1	82,6	83,8	82,6	81,4	73,8	81,3	81,3	81,9	81,3	81,3	81,3	81,3	81,3	81,3	81,3	79,2	82,5	87,5	99,5								
Assebrook_dome_1	77,4	76,7	77,4	71,5	70,6	73,2	73,2	74,0	73,2	73,2	73,2	73,2	73,2	74,0	73,9	80,8	76,0	80,8	80,1								
Gag-ElAV-FR-1	81,3	83,1	81,3	82,6	75,9	80,7	80,7	81,3	80,7	80,7	80,7	80,7	80,7	80,7	79,3	81,9	85,7	93,0	92,5	78,6							
Gag-ElAV-FR-2	81,2	83,1	81,2	82,6	75,8	80,7	80,7	81,3	80,7	80,7	80,7	80,7	80,7	80,7	79,2	81,9	85,7	93,0	92,4	79,2	99,1						
Gag-ElAV-FR-4	81,9	83,8	81,9	83,3	76,6	81,4	81,4	82,0	81,4	81,4	81,4	81,4	81,4	81,4	79,9	82,6	86,3	93,5	93,0	79,2	99,5	98,6					
Gag-ElAV-FR-5	81,2	83,1	81,2	83,3	75,8	82,0	82,0	82,6	82,0	82,0	82,0	82,0	82,0	82,0	79,2	83,1	86,9	93,0	92,5	80,0	98,6	97,6	99,1				
Gag-ElAV-FR-6	81,2	83,1	81,2	82,6	75,8	80,7	80,7	81,3	80,7	80,7	80,7	80,7	80,7	80,7	79,2	81,9	85,7	93,0	92,4	79,2	99,1	100,0	98,6	97,6			
Gag-ElAV-FR-7	81,9	83,7	81,9	83,2	76,5	81,3	81,3	82,0	81,3	81,3	81,3	81,3	81,3	81,3	79,9	82,5	86,3	93,5	93,0	79,2	99,5	99,5	99,0	98,1	99,5		
Gag-ElAV-FR-8	81,3	83,1	81,3	82,6	75,9	80,7	80,7	81,3	80,7	80,7	80,7	80,7	80,7	80,7	79,3	81,9	85,7	93,0	92,5	78,6	100,0	99,1	99,5	98,6	99,1		
Gag-ElAV-FR-9	81,9	83,7	81,9	83,2	76,5	81,3	81,3	82,0	81,3	81,3	81,3	81,3	81,3	81,3	79,9	82,5	86,3	93,5	93,0	79,2	99,5	99,5	99,0	98,1	99,5		
Gag-ElAV-FR-10																											

***Foram utilizadas 12 sequências de equídeos do Ceará, 49 de equídeos do Pantanal brasileiro e 66 sequências mundiais:** quatro sequências de genoma completo: H3 (JX480634.1), Liaoning (AF327877.1), Wyoming (NC_001450.1), Miyazaki (JX003263.1); e 61 sequências parciais: duas do Japão - Tokyo 548V (AB675094.1) e Goshun 482V (AB675093.1), três da Bélgica - Warsage clone 2 (JX193072.1), Warsage clone 1 (JX193071.1) e Assebroek clone 1 (JX193070.1), 12 da França - Gag-EIAV-FR-1 (KT764943.1), 2 (KT764944.1), 4 (KT764946.1), 5 (KT764947.1), 6 (KT764948.1), 7 (KT764949.1), 8 (KT764950.1), 9 (KT764951.1), 11 (KT764953.1), 12 (KT764954.1), 13 (KT764955.1) e 14 (KT764956.1), 28 da Eslovênia - SLO-1 (KF977807.1), 2 (KF977808.1), 3 (KF977809.1), 4 (KF977800.1), 5 (KF977813.1), 6 (KF977811.1), 7 (KF977815.1), 8 (KF977816.1), 9 (KF977798.1), 11 (KF977817.1), 12 (KF977801.1), 13 (KF977814.1), 14 (KF977810.1), 16 (KF977812.1), 17 (KF977803.1), 18 (KF977799.1), 19 (KF977820.1), 20 (KF977818.1), 21 (KF977802.1), 22 (KF977819.1), 23 (KF977805.1), 24 (KF977806.1), 26 (KF977804.1), 27 (KF977821.1), 28 (KF977822.1), 29 (KF977823.1), 30 (KF977824.1) e 31 (KF977825.1), oito da Itália - SA (KM247555.2), DE (KM247554.1), Ita-1 (EU240733.1), 2 (EU375543.1), 3 (EU375544.1), 4 (EU741609.1), 5 (GQ265785.1) e 6 (GU060664.1), quatro da Romênia - Rom-1 (GQ229581.1), 2 (GQ923952.1), 4 (GU060662.1) e 5 (GU060663.1), quatro do Canadá - Can1 (EF418582.1), 3 (EF418583.1), 7 (EF418584.1) e 10 (EF418585.1), e uma da Alemanha - EIAVGER-1 (KF878275.1). A estimativa da similaridade nucleotídica entre as sequências foi feita pelo cálculo da estimativa da divergência evolutiva entre as sequências no programa MEGA X (KUMAR *et al.*, 2018), empregando o modelo Tamura-Nei, a taxa de variação entre os sítios foi modelada com uma distribuição gamma (shape parameter = 4). Baseado em um conjunto de dados final de 213 posições nucleotídicas (Os códons na sequência que apresentavam N nas sequências do Ceará foram retirados, assim como o códon correspondente em todas as sequências analisadas no alinhamento).

O alinhamento para a sequência de 73 aminoácidos deduzidas do gene *gag* correspondente à proteína p15 das 12 sequências de aa de EIAV de equídeos do Ceará, foi feito com 49 sequências de equídeos do Pantanal brasileiro e 66 sequências mundiais do EIAV sendo quatro de genoma completo e 62 sequências parciais. A análise somente das sequências brasileiras mostrou que estas foram conservadas entre si, tendo sido observadas três mutações de aa, sendo duas conservativas e uma não-conservativa entre as sequências de equídeos do Ceará em relação as demais sequências analisadas no alinhamento. Essas mutações foram encontradas apenas nas sequências de mula (CEARA-M-138) e cavalo (CEARA-C-179-127). Enquanto que as sequências de jumentos foram iguais entre si, com duas sequências CEARA-J-497-AM e CEARA-J-585-18-BR com dois e um aa indefinidos, respectivamente, devido à presença de N na sequência nucleotídica (Figura 67).

Foram consideradas mutações de aminoácidos apenas quando a troca de base foi exclusiva da sequência do Ceará em relação às demais sequências analisadas no alinhamento. Na posição 4 ocorreu a troca de prolina (P) e serina (S) por glutamina (Q) na sequência CEARA-C-179-127, sendo uma mutação conservativa. Na posição

54 ocorreu a troca de arginina (R), lisina (K), serina (S), glutamina (Q) por glicina (G) na sequência CEARA-C-179-127, sendo uma mutação não-conservativa. Na posição 57 houve a troca de leucina (L), isoleucina (I) e valina (V) por metionina (M) na sequência CEARA-M-138-5, sendo uma mutação conservativa (Figura 67).

As demais mutações de aminoácidos encontradas foram comuns entre as sequências do Ceará e do Pantanal. Quando se analisa somente as 12 sequências de equídeos do Ceará foram observadas 16 mutações, sendo 11 conservativas, três não-conservativas, e duas podem ser tanto conservativas quanto não-conservativas dependendo entre qual sequência a comparação é feita. A maior parte das mutações observadas foram nas sequências de cavalo, mula e uma sequência de jumento (CEARA-J-821-49), enquanto que as demais sequências de jumento foram conservadas entre si, conforme descrito no parágrafo seguinte (Figura 67, Tabela 21).

TABELA 21: Locais de troca de aminoácidos entre as 12 sequências de equídeos do Ceará para o gene *gag*

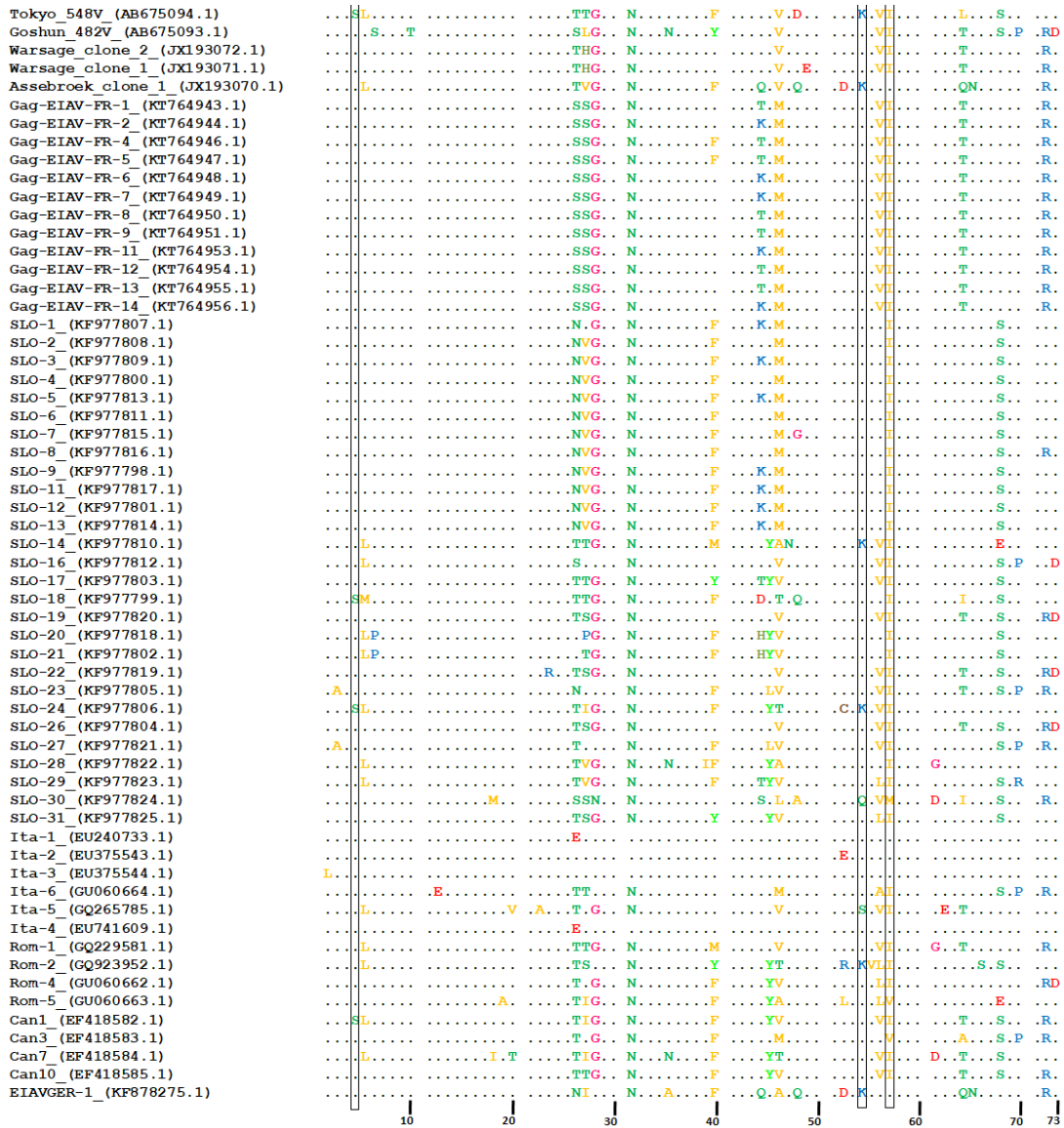


FIGURA 67: Alinhamento das seqüências de aminoácidos do EIAV de equídeos do Ceará para o gene gag – Alinhamento de 127 seqüências do EIAV de 73 aminoácidos cada correspondente à proteína p15 do gene gag: 12 seqüências obtidas a partir de DNA proviral de equídeos do Pantanal brasileiro, 49 de equídeos do Pantanal brasileiro com 66 seqüências mundiais do EIAV, sendo quatro seqüências de genoma completo: H3, Liaoning, Wyoming, Miyazaki; e 62 seqüências parciais: duas do Japão (Tokyo 548V e Goshun 482V), três da Bélgica (Warsage clone 2, Warsage clone 1 e Assebroek clone 1), 12 da França (Gag-EIAV-FR-1, 2, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 11, 12, 13 e 14), 28 da Eslovenia (SLO-1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 11, 12, 13, 14, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 26, 27, 28, 29, 30 e 31), oito da Itália (SA, DE, Ita-1, 2, 3, 4, 5 e 6), quatro da Romênia (Rom-1, 2, 4 e 5), quatro do Canadá (Can1, 3, 7 e 10), e uma da Alemanha (EIAVGER-1). O número de acesso para cada seqüência está entre parênteses no alinhamento. O alinhamento foi feito no programa Mega, versão 6.0, utilizando o Clustal W (TAMURA *et al.*, 2013). Regiões variáveis nas seqüências brasileiras em relação às demais seqüências estão identificadas por retângulos pretos. O alinhamento das 127 seqüências foi dividido entre duas páginas.

A análise filogenética empregando as 12 sequências nucleotídicas do Ceará para o exon 1 do gene *tat* ao gene *gag* comparada a mesma região de 19 sequências mundiais do EIAV disponíveis no GenBank mostrou que as 10 sequências de jumentos agrupam em um clado separado, apoiado por um valor de bootstrap de 51, enquanto que dentro deste clado 11 das sequências agrupam em um mesmo clado, apoiadas por um valor de bootstrap de 99, e separadas da sequência de jumento CEARA-J-821-49. As sequências de cavalo (CEARA-C-179-127) e da mula (CEARA-M-138-5) estão agrupadas no mesmo clado, porém o valor de bootstrap não é significativo. Assim como o valor de bootstrap no clado de todas as 12 sequências do Ceará também não foi significativo. As 12 sequências do Ceará agrupam próximas do clado da sequência do Japão – Miyazaki, com um valor de bootstrap de 64. As sequências da China (Liaoning, Vaccine, DV117, DLV18-8, DV35-20, FDDV-10), Estados Unidos (Wyoming, EIAVuk, WSU5, V26, V70), Japão (Miyazaki), Irlanda (H3, F4, F3, F2) junto com três sequências da Itália (SA, DE, Ita-1), formam quatro cladogramas separados, apoiados por um elevado valor de bootstrap, corroborando os dados da literatura para as sete sequências de genoma completo e os clones derivados a partir de duas dessas sequências – Liaoning e Wyoming, e as duas sequências da Itália (SA e DE) (Figura 68).

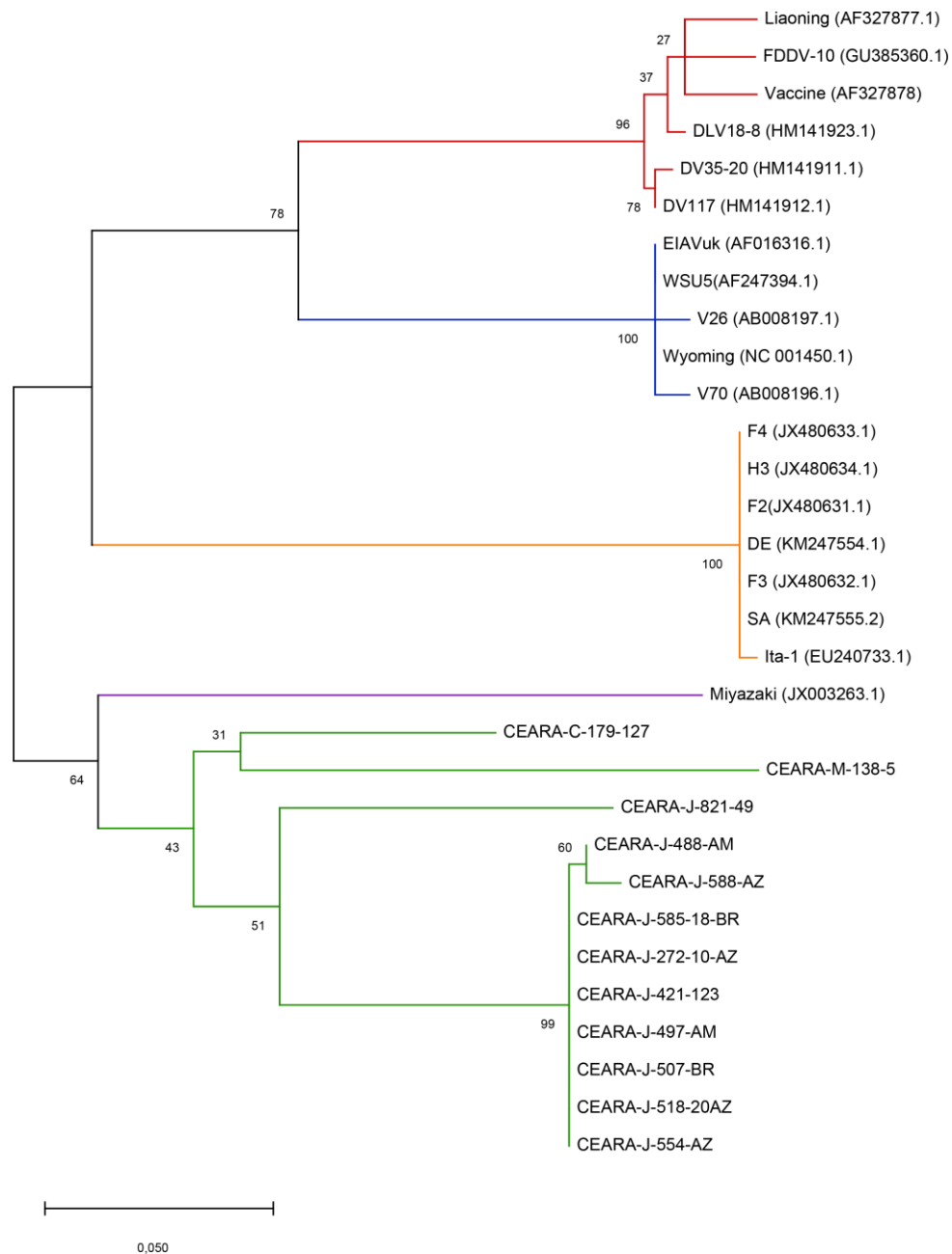


FIGURA 68: Análise filogenética de 12 sequências nucleotídicas do EIAV de equídeos do Ceará com sequências mundiais do EIAV para o exon 1 do gene *tat* ao gene *gag* – Análise filogenética baseada em 80 sequências nucleotídicas do EIAV: 12 sequências nucleotídicas obtidas a partir do DNA proviral de equídeos do Ceará – CEARA-C-179-127, CEARA-M-138-5, CEARA-J-272-10-AZ, CEARA-J-421-123, CEARA-J-488-AM, CEARA-J-497-AM, CEARA-J-507-BR, CEARA-J-518-20-AZ, CEARA-J-554-AZ, CEARA-J-585-18-BR, CEARA-J-588-AZ, CEARA-J-821-49. E 19 sequências mundiais: 16 sequências de genoma completo - H3, F4, F3, F2, Liaoning, Vaccine, DV117, DLV18-8, DV35-20, FDDV-10, Wyoming, EIAVuk, WSU5, V26, V70, e Miyazaki, e três sequências parciais - Ita-1, SA e DE. O número de acesso para cada sequência está identificado entre parênteses. A árvore filogenética foi inferida no programa MEGA versão X (KUMAR *et al.*, 2018), através do método Máxima verossimilhança baseado no modelo Tamura Nei com distribuição Gamma (4 categorias (+G, parameter = 0.3222)), baseado em um *dataset final* de 268 posições nucleotídicas. Os valores de bootstrap foram determinados baseao em 1000 replicatas. Os cinco clados na árvore estão destacados por cores: sequências brasileiras em verde, da China em vermelho, dos Estados Unidos em azul, da Irlanda e Itália em laranja, e do Japão em roxo.

A análise filogenética empregando as 12 sequências nucleotídicas do Ceará para o exon 1 do gene *tat* ao gene *gag*, com as 49 sequências de equídeos do Pantanal comparada à mesma região de 19 sequências mundiais do EIAV disponíveis no GenBank, mostrou que as sequências brasileiras, incluindo as sequências do Ceará e do Pantanal agrupam em um clado separado das demais sequências mundiais, com um valor de bootstrap de 55. A sequência do Japão (Miyazaki) agrupou em um clado próximo ao clado das sequências brasileiras, porém o valor de bootstrap não foi significativo. Enquanto que as sequências da China (Liaoning, Vaccine, DV117, DLV18-8, DV35-20, FDDV-10), Estados Unidos (Wyoming, EIAVuk, WSU5, V26, V70), Japão (Miyazaki), Irlanda (H3, F4, F3, F2) junto com três sequências da Itália (SA, DE, Ita-1), formam quatro cladogramas separados, apoiados por um elevado valor de bootstrap (Figura 69).

A análise dos subclados dentro do clado das sequências brasileiras mostrou que as nove sequências de jumentos do Ceará (CEARA-J-272-10-AZ, CEARA-J-421-123, CEARA-J-488-AM, CEARA-J-497-AM, CEARA-J-507-BR, CEARA-518-20-AZ, CEARA-J-554-AZ, CEARA-J-585-18-BR, CEARA-J-588-AZ) continuam agrupando juntas, conforme a reconstrução filogenética feita anteriormente para as 12 sequências do Ceará (Figura 68), com um elevado valor de bootstrap, e junto com duas sequências do Pantanal (POCONE-BR-01 e PAN-BR-8054), as quais também agrupam juntas na reconstrução filogenética feita somente para as 49 sequências do Pantanal (Figura 69). A outra sequência de jumento (CEARA-J-821-49) agrupa junto com uma sequência do Pantanal (PAN-BR-14), com um elevado valor de bootstrap. A sequência de mula (CEARA-M-138-5) agrupa no mesmo clado que uma sequência do Pantanal (PAN-BR-8103), com um valor de bootstrap de 58. A sequência de cavalo (CEARA-C-179-127) está em um ramo separado dentro do clado das demais sequências brasileiras. Também foi observado que as 49 sequências do Pantanal mantêm o mesmo perfil de agrupamento observado anteriormente para a análise somente dessas sequências, com vários cladogramas e com valores de bootstrap significativos (Figura 69).

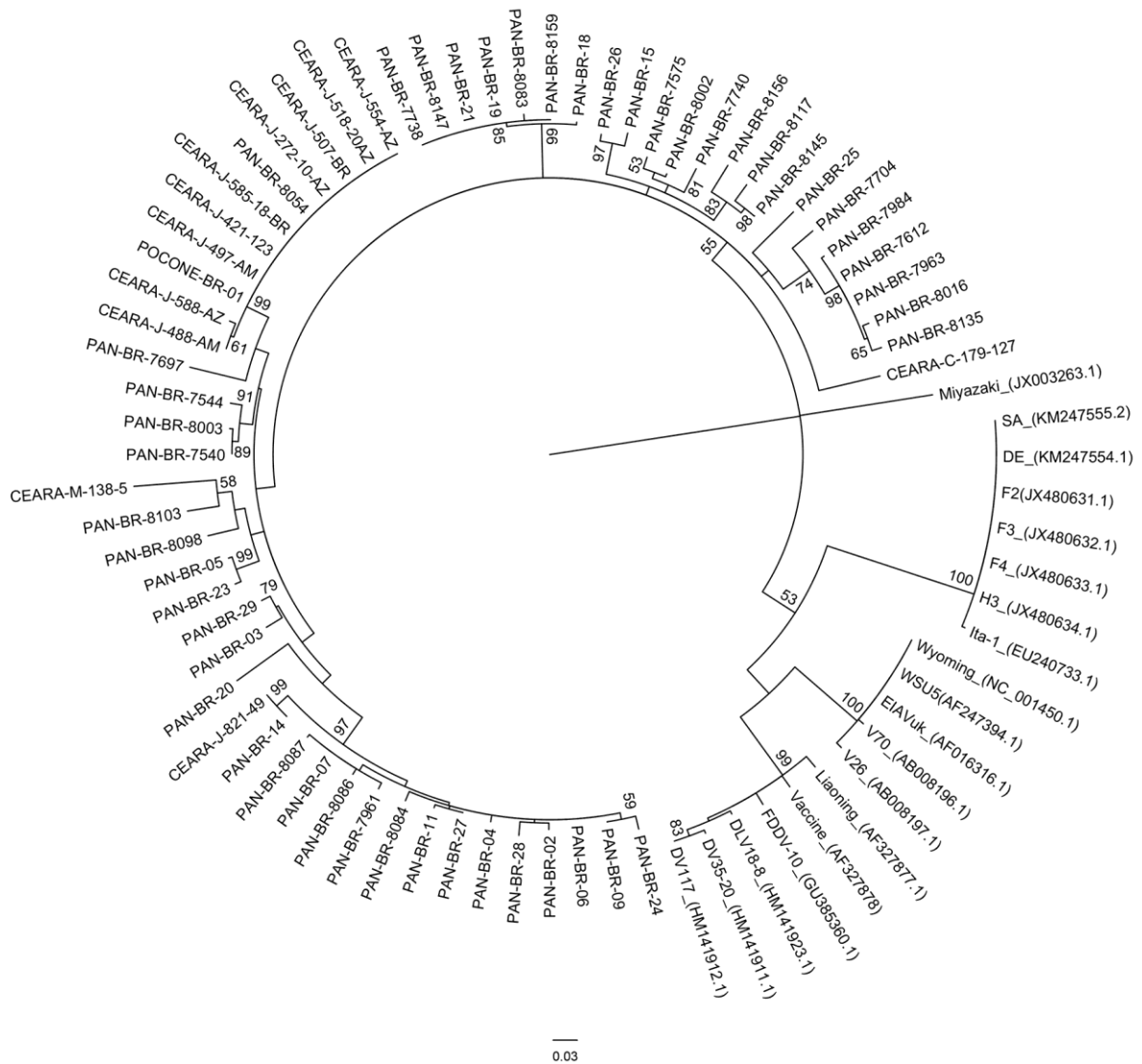


FIGURA 69: Análise filogenética de 12 sequências nucleotídicas do EIAV de equídeos do Ceará, com 49 sequências do Pantanal brasileiro e sequências mundiais do EIAV para o exon 1 do gene *tat* ao gene *gag* – Análise filogenética baseada em 80 sequências nucleotídicas do EIAV: 12 sequências nucleotídicas obtidas a partir do DNA proviral de equídeos do Ceará: CEARA-C-179-127, CEARA-M-138-5, CEARA-J-272-10-AZ, CEARA-J-421-123, CEARA-J-488-AM, CEARA-J-497-AM, CEARA-J-507-BR, CEARA-518-20-AZ, CEARA-J-554-AZ, CEARA-J-585-18-BR, CEARA-J-588-AZ, CEARA-J-821-49. 49 sequências de equídeos do Pantanal: POCONE-BR-01, PAN-BR-02, 03, 04, 05, 06, 07, 09, 11, 14, 15, 18, 19, 20, 21, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 7540, 7544, 7575, 7612, 7697, 7704, 7738, 7740, 7961, 7963, 7984, 8002, 8003, 8016, 8054, 8083, 8084, 8086, 8087, 8098, 8103, 8117, 8135, 8145, 8147, 8156, 8159. E 19 sequências mundiais: 16 sequências de genoma completo - H3, F4, F3, F2, Liaoning, Vaccine, DV117, DLV18-8, DV35-20, FDDV-10, Wyoming, EIAVuk, WSU5, V26, V70, e Miyazaki, e três sequências parciais - Ita-1, SA e DE..O número de acesso para cada sequência está identificado entre parênteses. A árvore filogenética foi inferida no programa MEGA versão X (KUMAR et al., 2018), baseado em um conjunto de dados final de 272 posições nucleotídicas, através do método de Máxima verossimilhança, baseado no modelo Tamura Nei. Distribuição Gamma discreta foi usada para modelar diferenças de taxas evolutivas entre os sítios (5 categorias (+G, parameter = 0.7699)). O modelo de taxa de variação permitiu que alguns sítios fossem evolutivamente invariáveis ([+I], 39.73% sites). Os valores de bootstrap foram determinados baseado em 1000 replicatas. Somente valores de bootstrap acima de 50 estão representados.

5.3.2.2. Análise molecular empregando a sequência nucleotídica da região 5' LTR (nt 28) ao exon 1 do gene *tat* (nt 405)

Foi obtida uma sequência nucleotídica de 347 pb (posição nucleotídica 44 a 409 em relação a sequência Miyazaki) para a região 5' LTR ao exon 1 do gene de *tat* de uma amostra de cavalo (CEARA-C-14) amplificada com os iniciadores EIAV-LTR-28-F e EIAV-TAT-405-R. Das 347 bp, 230 pb correspondem a região 5' LTR (posição nucleotídica 44 a 306), 56 pb correspondem a região não codificadora (posição nucleotídica 307 a 348), e 61 pb correspondem a ao exon 1 do gene de *tat* (posição nucleotídica 349 a 409).

O fragmento de 230 pb para a região 5' LTR da sequência CEARA-C-14 apresentou similaridade nucleotídica de 90,9% com a sequência POCONE-BR, 75% com H3, 75,6% com Liaoning, 62,6% com Wyoming, e 68,5% com Miyazaki. O fragmento de 61 pb para o exon 1 do gene de *tat* apresentou similaridade nucleotídica de 98,3% com a sequência POCONE-BR, 92,9% com Wyoming, 94,8% com Miyazaki, e 100% com H3, Liaoning, SA e DE.

A figura 70 mostra o alinhamento da sequência CEARA-C-14 para a região 5' LTR ao exon 1 do gene de *tat* em relação a sequência de EIAV de cavalo do Pantanal POCONE-BR e quatro sequências de genoma completo do EIAV. A identificação dos domínios estruturais e funcionais da sequência nucleotídica da região 5' LTR para a sequência CEARA-C-14 foram preditos baseado nas sequências Wyoming, EIAV_{I_{RE}} e Miyazaki previamente caracterizadas (CARVALHO & DERSE, 1993; DONG *et al.*, 2013, 2014, QUINLIVAN *et al.*, 2013).

Para a sequência do Ceará foi obtida uma sequência nucleotídica de 230 pb para a região 5' LTR, sendo que desse total 119 pb corresponde a região única 3' (U3), 79 pb a região repetida (R), e 33 pb a região única 5' (U5), as quais estão identificadas por setas na figura 70. Em comparação a sequência POCONE-R, a sequência CEARA-C-14 apresentou o mesmo tamanho para a região U3, uma base a mais na região R, e quatro bases a menos na região U5.

A sequência TATA Box (TATATAA) na posição 118-124 no alinhamento foi idêntica em todas as sequências. O sítio de iniciação da transcrição na posição 145-147, indicado na figura por +1, na borda da região U3-R, corresponde à sequência de bases AGA para a sequência CEARA-C-14 e POCONE-BR, diferente para as outras sequências do EIAV, que são GGG ou GGA. O sinal de adição de cauda poli-A (AATAAA) na posição 203-208 foi diferente para a sequência CEARA-C-14 (ATAAAA) em relação às demais sequências (Figura 70).

O motif MDBP (GTTGCTAGGCAAC), na posição nucleotídica 33-45 no alinhamento apresentou uma base diferente para a sequência CEARA-C-14 em relação à sequência POCONE-BR na posição 40, sendo igual à sequência Miyazaki. O elemento TAR (ACACTCAGATTCTGCGGTC) na posição 147-171 foi igual nas sequências POCONE-BR e CEARA-C-14. Os três sítios de ligação PU.1 foram conservados em duas localizações das sequências POCONE-BR e CEARA-C-14, nas posições 66-70 e 79-83 enquanto que na terceira localização na posição 102-106 as sequências POCONE-BR e CEARA-C-14 apresentaram uma deleção nucleotídica na sequência inteira correspondente ao sítio PU.1. O sítio PEA1/AP-1 na posição nucleotídica 91-96 também apresentou uma deleção nucleotídica na sequência inteira do Pantanal e Ceará (Figura 70).

Para o fragmento de 230 e 240 pb para a região 5' LTR das sequências CEARA-C-14 e POCONE-BR, respectivamente, foram observadas 21 substituições nucleotídicas. Na região U3 foram observadas 10 substituições nucleotídicas, sendo cinco transições (nas posições 7, 23, 40, 65 e 133 no alinhamento), cinco transversões (nas posições 4, 62, 129, 138 e 139), também foram observados dois locais de deleções, de uma base (na posição 21) para a sequência POCONE-BR, e de 23 bases para as sequências POCONE-BR e CEARA-C-14. Para a região R foram observadas três substituições nucleotídicas, sendo uma transição (na posição 191), e duas transversões (nas posições 204 e 205), também foi observada uma inserção na posição 201 para a sequência CEARA-C-14. Para a região U5 foram observadas seis substituições nucleotídicas, sendo quatro transições (nas posições

229, 231, 232 e 258), e duas transversões (nas posições 247 e 248), também foi observada uma deleção de duas bases (nas posições 249 e 250) para a sequência POCONE-BR, e uma deleção de seis bases (na posição 250 a 255) para a sequência CEARA-C-14. Para a região não codificadora foram observadas duas transições (nas posições 277 e 320), também foi observada uma inserção de 14 nucleotídeos para a sequência CEARA-C-14 (na posição 287 a 300). Para o fragmento de 61 pb do gene *tat* foi observada uma transversão (na posição 378) entre as sequências do Ceará e Pantanal (Figura 70).

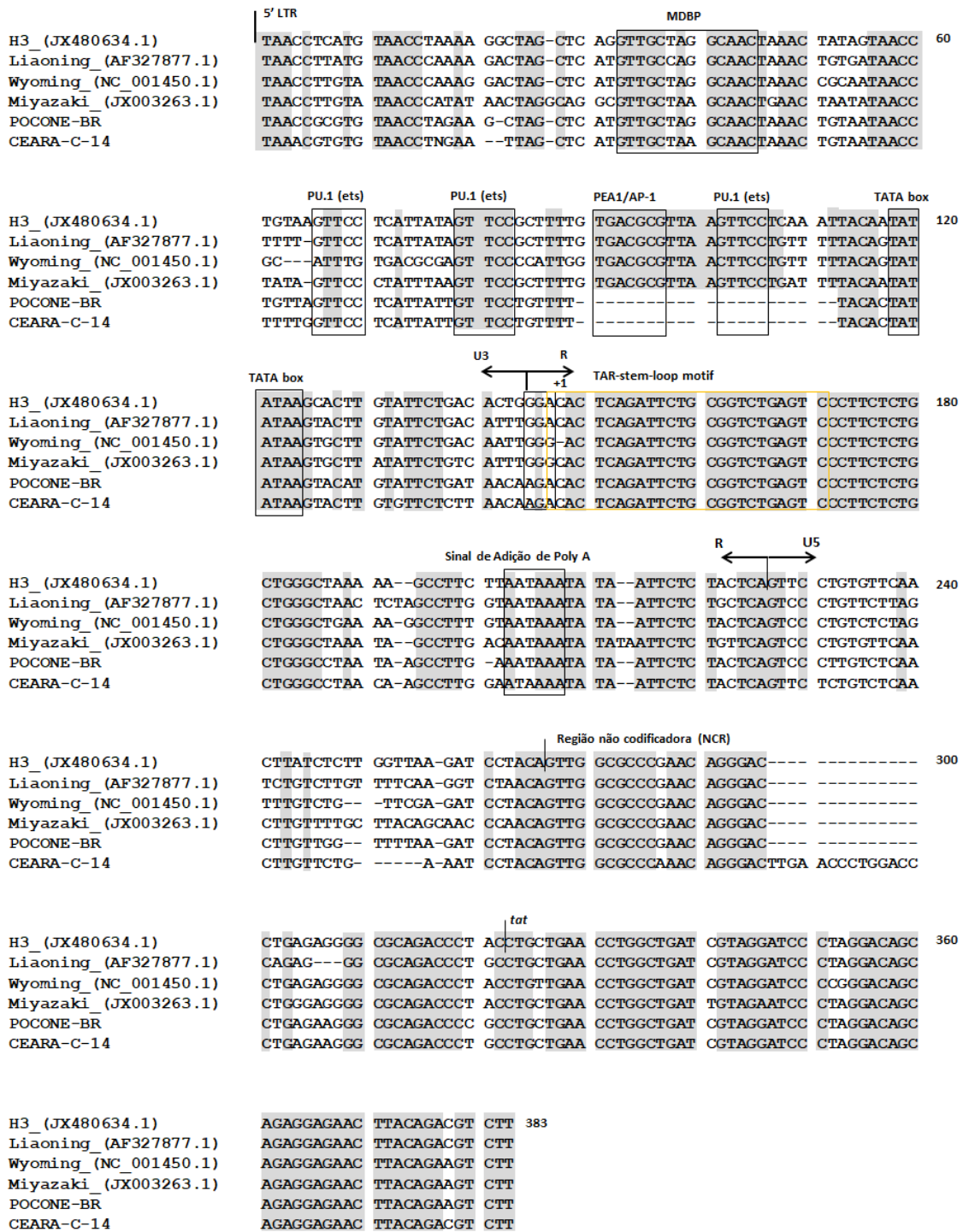


FIGURA 70: Alinhamento da sequência nucleotídica do EIAV CEARA-C-14 do Ceará para a região 5' LTR ao exon 1 do gene *tat* (posição nucleotídica 44 a 409) – Alinhamento de seis sequências nucleotídicas do EIAV: uma sequência de equídeo do Ceara – CEARA-C-14, uma de equídeo do Pantanal brasileiro - POCONE-BR com quatro sequências de genoma completo - H3, Liaoning, Wyoming e Miyazaki. O número de acesso para cada sequência está indicado entre parênteses. O alinhamento foi feito no programa MEGA, versão 6.0, utilizando o Clustal W (TAMURA *et al.*, 2013). As regiões conservadas entre todas as sequências estão destacadas em cinza. Os domínios funcionais estão indicados por caixas, e os domínios estruturais por setas. Sítio de iniciação da transcrição (+1), 'methylated DNA-binding protein site' (MDBP).

O alinhamento da sequência de 20 aminoácidos para o fragmento de 61 pb do exon 1 do gene *tat* para a sequência de aminoácidos deduzida de EIAV a partir de uma amostra de cavalo do Ceará – CEARA-C-14, com mais sete sequências de aminoácidos deduzidas de EIAV mundiais, mostrou que o exon do gene *tat* foi conservado entre as sequências analisadas no alinhamento. A sequência CEARA-C-14 apresentou uma troca do aminoácido lisina (K) por treonina (T), na posição 19 no alinhamento em relação à sequência POCONE-BR, sendo uma mutação não-conservativa (Figura 71).

Quando se analisa todas as oito sequências no alinhamento em conjunto, ocorrem três mutações de aminoácidos, todas mutações não-conservativas. Na posição 7 ocorreu a troca de arginina (R) (para as sequências H3, Liaoning, Wyoming, SA, DE, POCONE-BR e CEARA-C-14) por cisteína (C) (para a sequência Miyazaki), na posição 11 a troca de arginina (R) (para as sequências H3, Liaoning, Miyazaki, SA, DE, POCONE-BR e CEARA-C-14) por glicina (G) (para a sequência Wyoming) e na posição 19 a troca de treonina (T) (para as sequências H3, Liaoning, AS, DE e CEARA-C-14) por lisina (K) (para as sequências Wyoming, Miyazaki e POCONE-BR) (Figura 71).

H3_ (JX480634.1)	LLNLADRRIP RTAEENLQTS
Liaoning_ (AF327877.1)
Wyoming_ (NC_001450.1) G.....K.
Miyazaki_ (JX003263.1)C.....K.
SA_ (KM247555.2)
DE_ (KM247554.1)
POCONE-BRK.
CEARA-C-14

FIGURA 71: Alinhamento da sequência de aminoácidos de EIAV do equídeo CEARA-C-14 para o exon 1 do gene *tat* – Alinhamento de oito sequências do EIAV de 20 aminoácidos do exon 1 do gene *tat*: uma sequência de EIAV de equídeo do Ceará – CEARA-C-14, uma de equídeo do Pantanal brasileiro - POCONE-BR, quatro sequências de genoma completo - H3, Liaoning, Wyoming, e Miyazaki, e duas sequências parciais - SA e DE. O alinhamento foi feito no programa MEGA, versão 6.0, utilizando o Clustal W (TAMURA *et al.*, 2013). O número de acesso para cada sequência está identificado entre parênteses. Alanina (A), Cisteína (C), Ácido aspártico (D), Ácido glutâmico (E), Fenilalanina (F), Glicina (G), Histidina (H), Isoleucina (I), Lisina (K), Leucina (L), Metionina (M), Asparagina (N), Prolina (P), Glutamina (Q), Arginina (R), Serina (S), Treonina (T), Valina (V), Triptofano (W), Tirosina (Y).

A análise filogenética empregando a sequência nucleotídica de EIAV do equídeo CEARA-C-14 de 345 pb, amplificada com os iniciadores EIAV-LTR-28-F e EIAV-tat-405-R1 para a região 5' LTR ao exon 1 do gene *tat*, foi feita empregando a sequência de EIAV de equídeo do Pantanal POCONE-BR e 16 sequências mundiais do EIAV disponíveis no GenBank. A árvore filogenética mostrou que as sequências do Ceará e do Pantanal agrupam em um clado separado, apoiadas por um valor de bootstrap de 100. As sequências da China, Estados Unidos, Irlanda e Japão formam quatro clados separados, apoiados por um elevado valor de bootstrap, corroborando os dados da literatura (Figura 72).

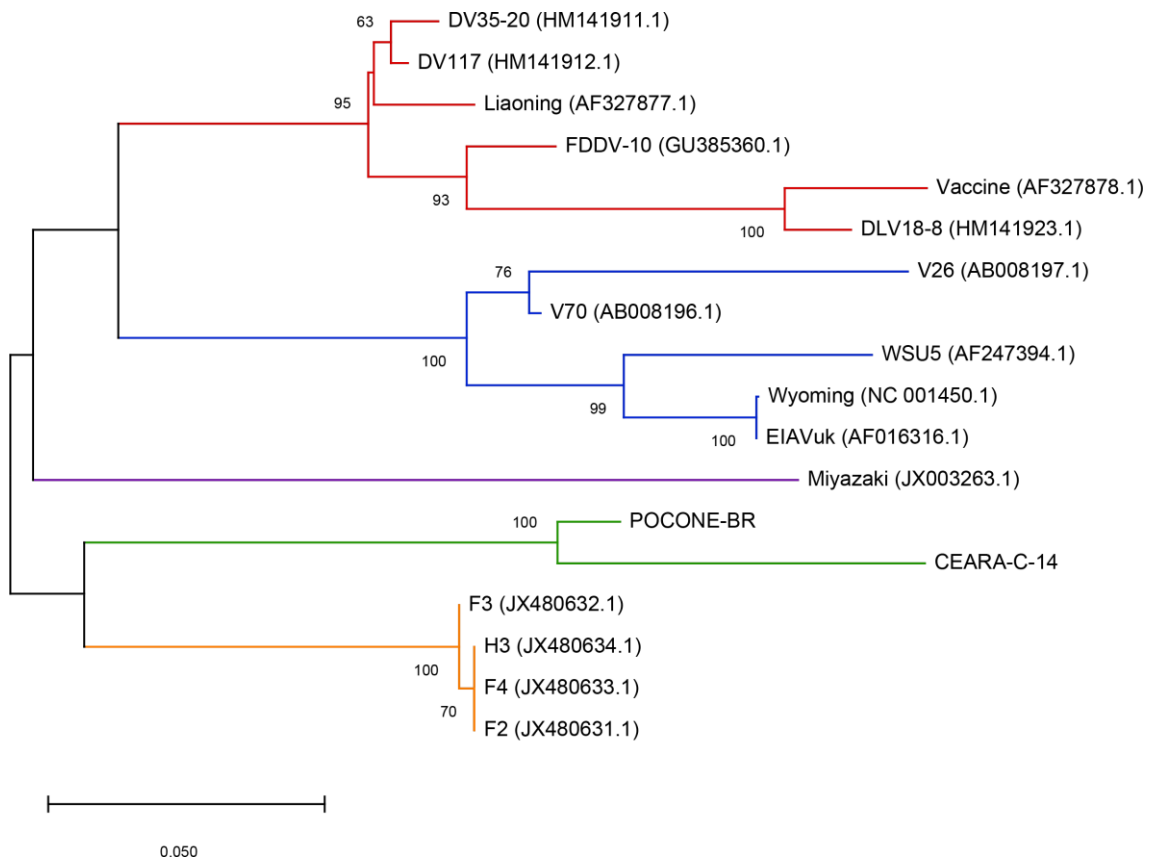


FIGURA 72: Análise filogenética da sequência nucleotídica de EIAV do equídeo CEARA-C-14 empregando a sequência nucleotídica da região 5' LTR ao exon 1 do gene *tat* – A Análise filogenética foi feita baseada em 18 sequências nucleotídicas do EIAV: uma sequência nucleotídica obtida a partir do DNA proviral de equídeo do Ceará – CEARA-C-14, uma sequência de equídeo do Pantanal – POCONE-BR, e 16 sequências mundiais do EIAV: H3, F4, F3, F2, Liaoning, Vaccine, DV117, DLV18-8, DV35-20, FDDV-10, Wyoming, EIAVuk, WSU5, V26, V70, e Miyazaki. O número de acesso para cada sequência está identificado entre parênteses. A árvore filogenética foi inferida no programa MEGA versão X (KUMAR *et al.*, 2018), através do método Máxima verossimilhança baseado no modelo Tamura Nei com distribuição Gamma (4 categorias (+G, parameter = 0,7167)), baseado em um dataset final de 441 posições nucleotídicas. Os valores de bootstrap foram determinados baseados em 1000 replicatas.

5.3.3. Status sorológico dos equídeos do Ceará

Para avaliar o *status* sorológico dos animais foi feito o IDGA (Bruch, Brasil) no Núcleo de Bioprospecção e Experimentação Molecular Aplicada (NUBEM) do Centro Universitário INTA (UNINTA), com autorização prévia do MAPA. Os dois testes de ELISA gp90 (Biostream do Brasil, Brasil) e p26 (Viriontech do Brasil, Brasil) foram feitos na empresa Viriontech do Brasil Indústria de Insumos e Serviços em Biotecnologia (Belo Horizonte/MG, Brasil).

Foram analisadas 30 amostras de soro de cavalos sendo que destas amostras seis foram positivas e 24 negativas no teste IDGA. No ELISA gp90, 10 foram positivas, duas indeterminadas e dezoito negativas. No ELISA p26, 14 foram positivas, seis indeterminadas e dez negativas. Existiu concordância entre os três testes sorológicos para 12 das amostras testadas, sendo que cinco amostras foram positivas nos três testes e sete amostras foram negativas nos três testes sorológicos. Ao todo 10 amostras que foram negativas no teste IDGA foram positivas em pelo menos um dos testes ELISA gp90 e/ou ELISA p26 (Tabela 22, Figura 73).

TABELA 22: Resultado da PCR e dos testes sorológicos para AIE de 30 amostras de cavalos (*Equus caballus*) do Ceará

Identificação amostras	PCR tat-gag	IDGA	ELISA gp90	ELISA p26
CEARÁ-C-01	N	N	N	ID
CEARÁ-C-02	N	P	N	P
CEARÁ-C-03	N	N	N	N
CEARÁ-C-04	N	N	P	N
CEARÁ-C-05	N	N	N	ID
CEARÁ-C-06	N	N	N	N
CEARÁ-C-07	P	P*	P	P
CEARÁ-C-08	N	N	N	ID
CEARÁ-C-09	N	N	N	ID
CEARÁ-C-10	N	N	N	ID
CEARÁ-C-11	N	N	N	N
CEARÁ-C-12	N	N	P	P
CEARÁ-C-13	N	N	P	P
CEARÁ-C-14	P	P	P	P
CEARÁ-C-15	N	N	N	P

TABELA 22: Resultado da PCR e dos testes sorológicos para AIE de 30 amostras de cavalos (*Equus caballus*) do Ceará

Identificação amostras	PCR tat-gag	IDGA	ELISA gp90	ELISA p26
CEARÁ-C-16	N	N	N	P
CEARÁ-C-17	N	N	N	N
CEARÁ-C-18	N	N	ID	P
CEARÁ-C-19	N	N	N	N
CEARÁ-C-20	N	N	N	P
CEARÁ-C-21	N	N	N	P
CEARÁ-C-22	N	N	N	N
CEARÁ-C-23	N	N	N	N
CEARÁ-C-24	N	N	P	P
CEARÁ-C-25	N	N	N	ID
CEARÁ-C-26	N	N	ID	N
CEARÁ-C-27	N	N	P	N
CEARÁ-C-179-127	P	P	P	P
CEARÁ-C-268-128	N	P	P	P
CEARÁ-C-549-126-AZ	N	P	P	P

(P) positiva, (N) negativa, (ID) indeterminado. Os resultados positivos estão destacados em cinza.
*indica equídeo que foi sacrificado.

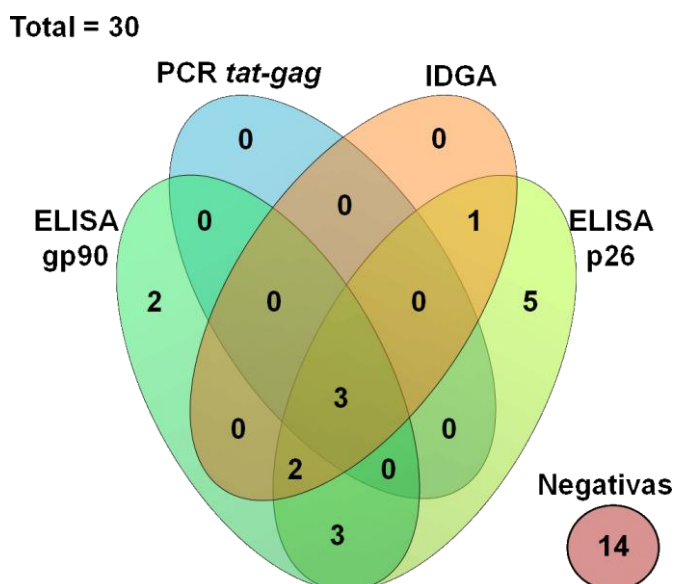


FIGURA 73: Diagrama representativo das amostras positivas nos testes sorológicos - IDGA, ELISA gp90 e ELISA p26, e na PCR tat-gag de 30 cavalos (*Equus caballus*) do Ceará – As interseções no diagrama representam o número de amostras positivas entre os testes.

Do total de 160 amostras de jumentos, apenas uma amostra foi positiva no IDGA. No ELISA gp90, 36 foram positivas, nove indeterminadas e 115 negativas. No ELISA p26, 28 foram positivas, 15 indeterminadas e 117 negativas (Tabela 23, Figura 74). Das 160 amostras de soro, 53 amostras de soro que foram negativas no IDGA foram positivas em pelo menos um dos testes ELISA gp90 e/ou ELISA p26.

TABELA 23: Resultado da PCR e dos testes sorológicos para AIE para as 160 amostras de jumentos (*Equus asinus*) do Ceará

Identificação amostras	PCR tat-gag	IDGA	ELISA gp90	ELISA p26
CEARÁ-J-01	N	N	P	N
CEARÁ-J-04	N	N	N	N
CEARÁ-J-05	N	N	P	P
CEARÁ-J-06	N	N	N	N
CEARÁ-J-07	N	N	N	N
CEARÁ-J-08	N	N	ID	ID
CEARÁ-J-09	N	N	N	ID
CEARÁ-J-10	N	N	ID	N
CEARÁ-J-11	N	N	N	P
CEARÁ-J-12	N	N	P	P
CEARÁ-J-13	N	N	N	P
CEARÁ-J-14	N	N	N	N
CEARÁ-J-15	N	N	N	N
CEARÁ-J-16	N	N	N	N
CEARÁ-J-17	N	N	P	ID
CEARÁ-J-18	N	N	N	P
CEARÁ-J-138	N	N	P	N
CEARÁ-J-40	N	N	N	ID
CEARÁ-J-423	N	N	N	N
CEARÁ-J-295	N	N	ID	P
CEARÁ-J-426	N	N	N	P
CEARÁ-J-294	N	N	P	P
CEARÁ-J-404	N	N	N	P
CEARÁ-J-570	P	N	N	N
CEARÁ-J-508	N	N	N	N
CEARÁ-J-336	N	N	P	N
CEARÁ-J-144	N	N	ID	N
CEARÁ-J-462	N	N	N	N
CEARÁ-J-369	N	N	N	N
CEARÁ-J-184	N	N	N	P
CEARÁ-J-140	N	N	N	P

TABELA 23: Resultado da PCR e dos testes sorológicos para AIE para as 160 amostras de jumentos (*Equus asinus*) do Ceará

Identificação amostras	PCR tat-gag	IDGA	ELISA gp90	ELISA p26
CEARÁ-J-318	N	N	P	N
CEARÁ-J-600	N	N	N	P
CEARÁ-J-448	N	N	P	P
CEARÁ-J-292	N	N	N	P
CEARÁ-J-314	N	N	N	P
CEARÁ-J-11-38A-AZ	N	N	N	N
CEARÁ-J-29-AZ	N	N	N	N
CEARÁ-J-39	N	N	N	N
CEARÁ-J-48-32-VE	N	N	N	N
CEARÁ-J-62-AM	N	N	N	N
CEARÁ-J-80-55-VD	N	N	P	P
CEARÁ-J-101-AZ	N	N	N	N
CEARÁ-J-103-VM	N	N	P	N
CEARÁ-J-105-AZ	N	N	N	N
CEARÁ-J-107-AM	N	N	N	ID
CEARÁ-J-121-AM	N	N	N	N
CEARÁ-J-121-F	N	N	N	N
CEARÁ-J-132-AZ	N	N	N	N
CEARÁ-J-133-47	N	N	P	ID
CEARÁ-J-137	N	N	P	N
CEARÁ-J-137-30-AZ	N	N	ID	N
CEARÁ-J-141-VD	N	N	N	N
CEARÁ-J-144-135-AM	N	N	P	N
CEARÁ-J-158-AZ	N	N	N	N
CEARÁ-J-170-VE	N	N	ID	N
CEARÁ-J-175-1-AZ	N	N	P	P
CEARÁ-J-175-AM	N	N	N	N
CEARÁ-J-177-AM	N	N	N	N
CEARÁ-J-181-AM	N	N	P	N
CEARÁ-J-183-AZ	N	N	ID	ID
CEARÁ-J-184-VD	N	N	N	N
CEARÁ-J-194-VD	N	N	P	ID
CEARÁ-J-202-AZ	N	N	N	N
CEARÁ-J-213-AZ	N	N	ID	N
CEARÁ-J-218	N	N	N	N
CEARÁ-J-226-AZ	N	N	P	N
CEARÁ-J-229-AM	N	N	N	N
CEARÁ-J-229-AZ	N	N	N	N
CEARÁ-J-238	N	N	P	N

TABELA 23: Resultado da PCR e dos testes sorológicos para AIE para as 160 amostras de jumentos (*Equus asinus*) do Ceará

Identificação amostras	PCR tat-gag	IDGA	ELISA gp90	ELISA p26
CEARÁ-J-249-41-AZ	N	N	N	ID
CEARÁ-J-261-AZ	N	N	N	N
CEARÁ-J-267-AZ	N	N	N	P
CEARÁ-J-272-10-AZ	P	N	N	N
CEARÁ-J-280-AZ	N	N	N	N
CEARÁ-J-283-12-AZ	N	N	N	N
CEARÁ-J-284-112-AZ	N	N	N	ID
CEARÁ-J-284-24-AZ	N	N	N	N
CEARÁ-J-285-AM	N	N	N	N
CEARÁ-J-287-AZ	N	N	N	N
CEARÁ-J-292-39-AZ	N	N	N	N
CEARÁ-J-292-130-AZ	N	N	P	P
CEARÁ-J-292-136-AM	N	N	N	N
CEARÁ-J-294-137-AZ	N	N	N	N
CEARÁ-J-294-AZ	N	N	N	N
CEARÁ-J-300-35-AZ	N	N	N	N
CEARÁ-J-301-AM	N	N	P	ID
CEARÁ-J-319-AM	N	N	N	N
CEARÁ-J-336-132	N	N	P	N
CEARÁ-J-337-34-AZ	N	N	N	ID
CEARÁ-J-382-AM	N	N	N	N
CEARÁ-J-393-AM	N	N	N	N
CEARÁ-J-398-AM	N	N	N	N
CEARÁ-J-421-123	P	N	N	P
CEARÁ-J-424-VD	N	N	N	N
CEARÁ-J-426-129-AM	N	N	N	N
CEARÁ-J-429-VD	N	N	N	N
CEARÁ-J-447-AZ	N	N	N	N
CEARÁ-J-449-VD	N	N	P	N
CEARÁ-J-461-VD	N	N	P	N
CEARÁ-J-471-VD	N	N	N	N
CEARÁ-J-471-74	N	N	N	N
CEARÁ-J-472-VE	N	N	N	N
CEARÁ-J-476-60	N	N	N	ID
CEARÁ-J-476	N	N	N	N
CEARÁ-J-477-VE	N	N	P	N
CEARÁ-J-478	N	N	P	N
CEARÁ-J-479	N	N	N	N
CEARÁ-J-484-VD	N	N	N	N

TABELA 23: Resultado da PCR e dos testes sorológicos para AIE para as 160 amostras de jumentos (*Equus asinus*) do Ceará

Identificação amostras	PCR tat-gag	IDGA	ELISA gp90	ELISA p26
CEARÁ-J-488-AM	P	N	P	N
CEARÁ-J-42-VM	N	N	N	N
CEARÁ-J-492-AM	N	N	N	N
CEARÁ-J-497-AM	P	N	N	N
CEARÁ-J-507-97-AZ	N	N	N	N
CEARÁ-J-507-BR	P	N	N	N
CEARÁ-J-508-AZ	N	N	N	N
CEARÁ-J-509-BR	N	N	N	N
CEARÁ-J-510-14-AZ	N	N	N	N
CEARÁ-J-511-BR	N	N	N	N
CEARÁ-J-514-AZ	N	N	P	P
CEARÁ-J-514-46	N	N	N	ID
CEARÁ-J-514-43	N	N	P	N
CEARÁ-J-515-AZ	N	N	N	N
CEARÁ-J-517-BR	N	N	P	P
CEARÁ-J-518-20-AZ	P	N	P	N
CEARÁ-J-520-AZ	N	N	N	N
CEARÁ-J-529-AZ	N	N	N	N
CEARÁ-J-531-50-AZ	N	N	N	P
CEARÁ-J-532-AZ	N	N	N	N
CEARÁ-J-537-16-AZ	N	N	N	P
CEARÁ-J-537-71-AZ	N	N	P	P
CEARÁ-J-538-BR	N	N	N	N
CEARÁ-J-542-AZ	N	N	N	N
CEARÁ-J-547	N	N	N	N
CEARÁ-J-549	N	N	N	N
CEARÁ-J-554-AZ	P	N	N	N
CEARÁ-J-556-AZ	N	N	N	P
CEARÁ-J-571-VD	N	N	P	N
CEARÁ-J-573-22-BR	N	N	N	N
CEARÁ-J-574-BR	N	N	N	P
CEARÁ-J-576-BR	N	N	N	N
CEARÁ-J-580-BR	N	N	N	N
CEARÁ-J-581-63-AZ	N	N	P	N
CEARÁ-J-583-BR	N	N	N	N
CEARÁ-J-583-AZ	N	N	N	N
CEARÁ-J-584-AZ	N	N	P	ID
CEARÁ-J-585	N	N	N	N
CEARÁ-J-585-18-BR	P	N	N	N

TABELA 23: Resultado da PCR e dos testes sorológicos para AIE para as 160 amostras de jumentos (*Equus asinus*) do Ceará

Identificação amostras	PCR tat-gag	IDGA	ELISA gp90	ELISA p26
CEARÁ-J-588-AZ	P	N	N	N
CEARÁ-J-596-VD	N	N	N	N
CEARÁ-J-600-133-AM	N	N	N	N
CEARÁ-J-622-AM	N	N	N	N
CEARÁ-J-624-AM	N	N	N	N
CEARÁ-J-719-AM	N	N	N	N
CEARÁ-J-723	N	N	ID	N
CEARÁ-J-738	N	N	N	N
CEARÁ-J-765-54-AM	N	N	ID	P
CEARÁ-J-768-78-AM	N	N	N	N
CEARÁ-J-821-49	P	N	N	N
CEARÁ-J-269-26	N	P	P	N

(P) positiva, (N) negativa, (ID) indeterminado. Os resultados positivos estão destacados em cinza.

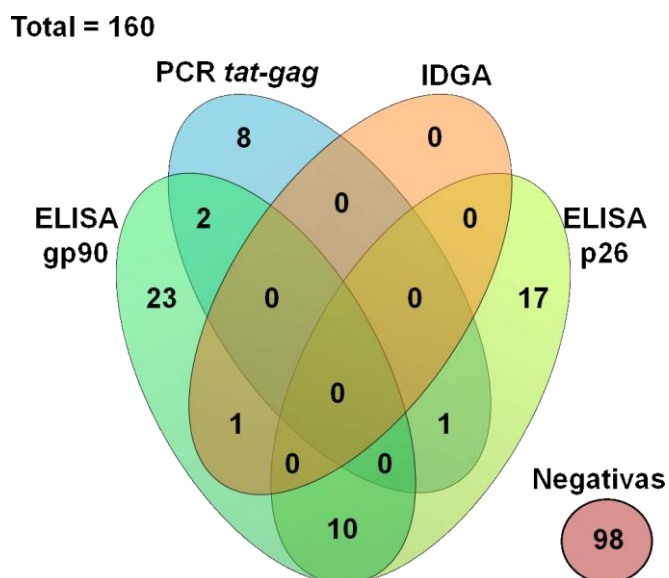


FIGURA 74: Diagrama representativo das amostras positivas nos testes sorológicos - IDGA, ELISA gp90 e ELISA p26, e na PCR tat-gag de 160 jumentos (*Equus asinus*) do Ceará – As interseções no diagrama representam o número de amostras positivas entre os testes.

Das três amostras de mula, nenhuma foi positiva no IDGA, e uma amostra foi positiva nos dois testes ELISA gp90 e ELISA p26 (Tabela 24).

TABELA 24: Resultado da PCR e dos testes sorológicos para AIE para as três amostras de mula (*Equus asinus* x *Equus caballus*) do Ceará

Identificação amostras	PCR tat-gag	IDGA	ELISA gp90	ELISA p26
CEARÁ-M-01	N	N	N	N
CEARÁ-M-138-5	P	N	P	P
CEARÁ-M-298-6-AZ	N	N	N	N

(P) positiva, (N) negativa, (ID) indeterminado. Os resultados positivos estão destacados em cinza.

Todas as seis amostras de órgãos positivas na PCR tat-gag provenientes de um cavalo (CEARÁ-C-7) foram positivas nos três testes sorológicos IDGA, ELISA gp90 e ELISA p26. Quatro amostras de órgãos, negativas na PCR tat-gag, provenientes de um jumento (CEARÁ-J-18) foram positivas no ELISA p26. As quatro amostras de órgãos, negativas na PCR tat-gag, provenientes de dois jumentos (CEARÁ-J-08 e CEARÁ-J-09) foram indeterminadas no ELISA gp90 e/ou ELISA p26 (Tabela 25).

TABELA 25: Resultado da PCR e dos testes sorológicos para AIE para as 14 amostras de órgão de equídeos do Ceará

Identificação Amostras de órgãos	Referente à amostra de PBMC e soro	PCR tat-gag	IDGA	ELISA gp90	ELISA p26
CEARÁ-C-07-Fígado	CEARÁ-C-07	P	P*	P	P
CEARÁ-C-07-Pulmão	CEARÁ-C-07	P	-	-	-
CEARÁ-C-07-Útero	CEARÁ-C-07	P	-	-	-
CEARÁ-C-07-Ovário	CEARÁ-C-07	P	-	-	-
CEARÁ-C-07-Rim	CEARÁ-C-07	P	-	-	-
CEARÁ-C-07-Baço	CEARÁ-C-07	P	-	-	-
CEARÁ-J-18-Baço	CEARÁ-J-18	N	N	N	P
CEARÁ-J-18-Fígado	CEARÁ-J-18	N	-	-	-
CEARÁ-J-18-Pulmão	CEARÁ-J-18	N	-	-	-
CEARÁ-J-18-Linfonodo	CEARÁ-J-18	N	-	-	-
CEARÁ-J-08-Pulmão	CEARÁ-J-08	N	N	ID	ID
CEARÁ-J-08-Cérebro	CEARÁ-J-08	N	-	-	-
CEARÁ-J-09-Baço	CEARÁ-J-09	N	N	N	ID
CEARÁ-J-09-Pulmão	CEARÁ-J-09	N	-	-	-

(P) positiva, (N) negativa, (ID) indeterminado. Os resultados positivos estão destacados em cinza. * indica equídeo que foi sacrificado.

Comparando os testes sorológicos e a PCR tat-gag foi observado que das três amostras de cavalo positivas na PCR tat-gag, todas foram positivas no IDGA, ELISA gp90 e ELISA p26. Das 11 amostras de jumento positivas na PCR tat-gag, apenas três amostras também foram positivas em pelo menos um dos testes ELISA. A única amostra de mula positiva na PCR tat-gag também foi positiva no ELISA gp90 e ELISA p26.

6. DISCUSSÃO

6.1. O impacto da sn-PCR LTR-tat

A modificação da reação de sn-PCR LTR-tat, a partir da n-PCR desenvolvida por DONG *et al.*, (2012), para amplificação de um fragmento de 185 pb da região 5' LTR ao exon 1 do gene *tat* permitiu detectar o DNA proviral em 36 amostras de equídeos do Pantanal brasileiro. A partir destas amostras foram obtidas 23 sequências nucleotídicas de 141 a 145 pb. Sendo as primeiras sequências brasileiras para esta região do genoma do EIAV, as quais apresentaram elevada similaridade nucleotídica entre si de 93,5% a 100%. Quando comparadas as sequências de EIAV de outras regiões mundiais apresentaram similaridade nucleotídica variando de 82,4% a 90,7%. A análise filogenética das 23 sequências para a região 5' LTR ao exon 1 do gene *tat* mostrou que as sequências brasileiras agrupam em um clado separado das demais sequências mundiais, apoiadas por um elevado valor de bootstrap (Figura 40).

Além das 36 amostras que amplificaram na snPCR LTR-tat e confirmaram por sequenciamento corresponder ao genoma do EIAV, outras 33 amostras também amplificaram na snPCR LTR-tat. Porém, após sequenciamento as sequências nucleotídicas obtidas apresentaram identidade com sequências de equídeos, após pesquisa no BLASTn. Então essas amostras não foram consideradas como positivas, uma vez que elas não confirmaram por sequenciamento corresponder ao genoma do EIAV. Além disso, as amostras de equídeos do Ceará, incluindo cavalos e jumentos, testadas com snPCR LTR-tat que amplificaram, após sequenciamento também tiveram identidade com sequências de equídeos em pesquisa no BLASTn.

Assim, a partir desses resultados pode-se concluir que as amostras amplificadas através desta snPCR LTR-tat sempre devem ser confirmadas por sequenciamento, o que impede que amostras sejam consideradas positivas apenas através do resultado da amplificação correspondente a banda obtida em PAGE. A partir disso pode-se inferir que a região LTR do genoma do EIAV não é uma região adequada

para o diagnóstico da doença, uma vez que através da snPCR LTR-tat utilizando os iniciadores descritos neste trabalho foram obtidas sequências que apresentam similaridade com sequências de equídeos no BLASTn.

Uma hipótese para esses resultados poderia ser que as sequências de equídeos depositadas no GenBank apresentam sequências do EIAV no seu genoma, uma vez que a região LTR dos retrovirus é uma região de inserção do genoma viral no genoma do hospedeiro, formando o DNA proviral (GOFF *et al.*, 2013). Em um estudo foi feita a caracterização dos sítios de integração do EIAV no genoma do cavalo, avaliando se a integração do EIAV exhibe preferências por elementos repetitivos no genoma do cavalo, as quais constituem aproximadamente metade do genoma do cavalo (49,5%), foi observado que o EIAV tem uma significativa preferência por integrar em LINEs-retrotransposons (*long interspersed elements*) e DNA transposons no genoma do cavalo, e em regiões ricas em AT (LIU *et al.*, 2015). Contudo é uma hipótese gerada a partir dos resultados obtidos na snPCR LTR-tat para as amostras de equídeos brasileiros nesse estudo. Porém são necessários estudos do genoma do EIAV, assim como do genoma de equídeos para estabelecer hipóteses e conclusões sobre essa questão.

6.2. PCR tat-gag e a aplicabilidade da reação

A PCR tat-gag desenvolvida neste estudo para amplificação de um fragmento de 312 pb do exon 1 do gene *tat* ao gene *gag* permitiu detectar o DNA proviral em 72 amostras de equídeos brasileiros, sendo 58 amostras do Pantanal brasileiro e 14 do estado do Ceará. A partir destas amostras foram obtidas 49 sequências nucleotídicas de 272 pb de EIAV de cavalos do Pantanal e 12 sequências de EIAV de amostras de equídeos do Ceará, as quais apresentaram similaridade nucleotídica variável entre si e com as outras sequências mundiais do EIAV.

A análise da similaridade nucleotídica somente das sequências de 272 pb das amostras do Pantanal brasileiro entre si variou de 84,3% a 100%. Quando comparadas às sequências de EIAV mundiais apresentaram valores de 77,1% (entre

as sequências PAN-BR-25, H3, SA e DE) a 86,5% (entre as sequências PAN-BR-8145 e Liaoning).

Quando se compara somente as sequências mundiais entre si para a sequência de 272 pb para o exon 1 do gene *tat* ao gene *gag*, a similaridade nucleotídica também foi variável: de 77,1% da sequência Miyazaki com H3, SA e DE; a 85% entre as sequências Wyoming e Liaoning. As sequências SA, DE e H3 apresentaram similaridade de 100% entre si. Conforme já demonstrado por CAPPELLI *et al.* (2017) foi observada uma elevada similaridade nucleotídica de 99,1% e 99,2% entre F2 (isolada do mesmo surto que a amostra H3) e SA e DE, respectivamente, para a análise de 95% do genoma do EIAV, exceto para a região LTR. Esses isolados foram obtidos a partir de um surto que ocorreu em 2006, simultaneamente na Itália e Irlanda, o qual tem sido atribuído à transmissão iatrogênica, através da infusão de produtos de plasma de cavalo contaminado em potros recém-nascidos. Este trabalho demonstrou que os cavalos infectados com as amostras SA, DE e F2 foram infectadas com vírus semelhantes, provavelmente derivados da mesma fonte, apesar de isolados de localizações geográficas diferentes.

No alinhamento das sequências de 15 aminoácidos deduzidas de EIAV das 49 amostras do Pantanal para o exon 1 do gene *tat* foram observadas três mutações de aa nas sequências do Pantanal em relação às demais sequências analisadas no alinhamento, todas não conservativas (Figura 42). No alinhamento das sequências de 74 aminoácidos para o gene *gag* correspondente à proteína p15, a qual compõe a matriz (MA) da partícula viral, localizada entre o capsídeo e o envelope viral, foram observadas 15 mutações de aa nas sequências do Pantanal em relação as demais sequências analisadas no alinhamento, sendo quatro não conservativas (Figura 44). No alinhamento está destacado um *motif* que corresponde a um potencial sinal de exportação nuclear *leucine-rich-type*. Este *motif* apresentou uma mutação conservativa em duas posições no alinhamento para 15 sequências de EIAV do Pantanal (Figura 44). Embora a função desse *motif* seja desconhecida, estudo da estrutura da proteína matriz sugere que esta proteína seja importante durante o ciclo de multiplicação do EIAV (HATANAKA *et al.*, 2002, DONG *et al.*, 2014).

A análise filogenética das 49 sequências do Pantanal brasileiro para exon 1 do gene *tat* ao gene *gag* mostrou que as sequências de EIAV do Pantanal agrupam em um clado separado, apoiadas por um valor de bootstrap de 52 (Figura 45). Estão separadas das demais sequências mundiais, dos Estados Unidos, China, Irlanda e Itália, e Japão, as quais formam quatro clados, conforme já demonstrado para a análise do genoma completo do EIAV das sequências dos Estados Unidos, China, Irlanda e Japão, provavelmente constituindo grupos monofiléticos separados (DONG *et al.*, 2013, QUINLIVAN *et al.*, 2013). A análise filogenética de 15 sequências do Pantanal concatenadas, que amplificaram tanto na snPCR LTR-*tat* quanto na PCR *tat-gag* mostrou que as sequências brasileiras agruparam separadamente das demais sequências mundiais (Figura 61).

As diferenças nucleotídicas observadas entre as 49 sequências de EIAV do Pantanal brasileiro mostra a diversidade do genoma do EIAV nessas amostras de cavalos analisadas para uma região parcial do exon 1 do gene *tat* ao gene *gag*. Muitas sequências de amostras de cavalos da mesma sub-região do Pantanal foram agrupadas no mesmo clado, apoiadas por elevados valores de bootstrap, como pode ser observado pela representação das letras na árvore filogenética correspondes às sub-regiões do Pantanal no mapa do Brasil em que as amostras de cavalos foram coletadas (Figura 45). Os clados representados pelas letras (a) e (o) agrupam duas sequências cada, todas da sub-região de Nabileque. Enquanto que os clados representados pelas letras (f) agrupa três sequências, (g) agrupa seis sequências, (l) agrupa três sequências, todas da sub-região de Paiaguás (Figura 45).

Entretanto, também foi observado que sequências provenientes de amostras de cavalos de sub-regiões diferentes do Pantanal agrupam no mesmo clado. Como por exemplo, o clado representado pela letra (d) em que agrupa uma sequência da sub-região de Poconé (POCONE-BR-01) e outra de Paiaguás (PAN-BR-8054), as duas coletadas no ano de 2015. O clado representado pela letra (p) agrupa sete sequências, sendo três de Nhecolândia e quatro de Paiaguás, todas coletadas em

2015 (Figura 45). Interessantemente, as sequências que agruparam nos cladogramas (d) e (p) foram obtidas a partir de amostras de cavalos coletadas nos anos de 2015 de duas sub-regiões diferentes Poconé / Paiaguás e Paiaguás / Nhecolândia, respectivamente. Estas sub-regiões estão próximas geograficamente e fazem fronteira entre si. Enquanto que o cladograma representado pela letra (k) agrupa 14 sequências de sub-regiões geograficamente distantes e coletadas em diferentes anos, sendo 10 de Nabileque, coletadas em 2008, e quatro de Paiaguás, coletadas em 2015 (Figura 45).

Os cavalos do Pantanal normalmente transitam entre áreas alagadas e secas de acordo com o período climático do ano. Essas observações preliminares podem indicar que algumas das variações encontradas no nosso estudo entre as sequências de EIAV podem indicar rotas hipotéticas de vias de circulação traçadas pelo EIAV no complexo do Pantanal, representadas pelas linhas pontilhadas no mapa, surgindo novas questões para futuros trabalhos (Figura 45). Devido a ampla variedade encontrada nas sequências nucleotídicas brasileiras caracterizadas não foi possível especular sobre a possível origem das sequências brasileiras de EIAV. Embora a sequência Miyazaki do Japão esteja mais correlacionada com as sequências do Pantanal brasileiro esta relação não é apoiada por um valor de bootstrap significativo.

A análise filogenética de 49 sequências do Pantanal brasileiro com mais 89 sequências mundiais do EIAV correspondente ao fragmento de 222 pb do gene *gag* mostrou que as sequências brasileiras agrupam em um clado separado das demais sequências, o valor de bootstrap no clado que separa as sequências brasileiras não foi significativo, porém dentro do clado das sequências brasileiras, existem ramos que agrupam sequências com elevados valores de bootstrap. A sequência do Japão (Goshun 482V) agrupa no mesmo clado que as sequências brasileiras, porém o valor de bootstrap não foi significativo (Figura 46). A reconstrução filogenética para esta sequência parcial do gene *gag*, mostrou que 12 das sequências do Japão (Miyazaki, Miy 5, 25, 29, 35, 47, 53, 56, 65, 67, 69, 75, Tokyo 548V), Estados Unidos (Wyoming, WSU5, EIAVuk, V26 e V70), China (Liaoning, Vaccine, DV117, DLV18-8,

DV35-20, FDDV-10) e França (Gag-EIAV-FR-1, 2, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 11, 12, 13 e 14) agrupam em clados separados (Figura 46).

Enquanto que a sequências da Irlanda (H3, F4, F3, F2) agrupam em um clado junto com seis sequências da Itália (SA, DE, Ita-1, Ita-2, Ita-3 e Ita-4), com um valor de bootstrap de 99. As outras duas sequências da Itália (Ita-5, Ita-6) agrupam em ramos separados, e próximas a sequências da Eslovênia, porém o valor de bootstrap não foi significativo. As quatro sequências do Canadá (Can1, Can3, Can7, Can10) agrupam em ramos separados, e próximas a sequências de outros países, porém o valor de bootstrap não foi significativo (Figura 46). Duas das sequências da Bélgica (Warsage clone 1 e Warsage clone 2) agrupam no mesmo clado e próximas ao clado das sequências da França, com valor de bootstrap de 99. A outra sequência da Bélgica (Assebroek clone 1) agrupa junto com uma sequência da Alemanha (EIAVGER-1), com um valor de bootstrap de 99. Duas sequências da Romênia (Rom-4 e Rom-5) agrupam juntas com um valor de bootstrap de 59, e a outra sequência (Rom-1) agrupa em um ramo separado, próximo à duas sequências da Bélgica e às sequências do Canadá, com um valor de bootstrap de 69. Enquanto que as 28 sequências da Eslovênia agrupam em quatro clados separados com elevados valores de bootstraps, enquanto que as demais sequências da Eslovênia agrupam em cinco clados separados e próximas à outras sequências mundiais, porém os valores de bootstraps não foram significativos (Figura 46).

Estudo de KUHAR & MALOVRH (2016) da análise filogenética de 28 sequências nucleotídicas da Eslovênia a partir de um fragmento maior de 363 pb correspondente a proteína p15 do gene *gag* mostrou que as sequências da Eslovênia agrupam em nove ramos na árvore filogenética. Tendo sido observado um perfil de agrupamento próximo ao observado para a reconstrução filogenética feita para as 49 sequências do Pantanal brasileiro em comparação a outras sequências mundiais do EIAV, incluindo estas sequências da Eslovênia. Também foi observado que assim como para a análise filogenética das 49 sequências brasileiras, no estudo das sequências da Eslovênia foram observados baixos valores de bootstrap em

alguns clados que separam as sequências, uma vez que foram demonstrados apenas valores de bootstrap acima de 65 neste estudo (Figura 46).

Estudo de GAUDAIRE *et al.* (2017) da análise filogenética de um fragmento de 1400 nucleotídeos do gene *gag* para 14 sequências da França, mostrou que estas sequências agrupam em um clado separado das demais sequências mundiais analisadas e com um elevado valor de bootstrap. Assim como foi observado para a análise das 49 sequências brasileiras, em que a análise de um fragmento menor de 222 pb de 12 destas sequências da França, mostrou que estas sequências também agrupam separadamente das demais sequências analisadas (Figura 46).

Embora a AIE apresente distribuição mundial e esteja amplamente disseminada no Pantanal brasileiro, pouco é conhecido sobre o genoma do EIAV circulante nessa população de equídeos. Assim, a partir das 23 sequências de 141 a 145 pb para a região 5' LTR ao exon 1 do gene *tat*, e as 49 sequências de 272 pb do exon 1 do gene *tat* ao gene *gag* foi possível conhecer regiões parciais do genoma do EIAV circulante em cavalos do Pantanal brasileiro, o que demonstra a elevada diversidade genética do EIAV, muitas vezes subestimada devido a diferentes fatores que tornam difícil o trabalho com o EIAV.

Os estudos de EIAV têm sido dificultados devido, principalmente, à escassez de informações disponíveis sobre o genoma do EIAV, o que dificulta a construção de iniciadores que sejam amplamente reativos para todas as amostras de EIAV circulantes mundialmente, uma vez que até o momento estão disponíveis no GenBank poucas sequências de genoma completo do EIAV. Some-se a este fator a elevada variabilidade genética característica dos retrovírus (COOK *et al.*, 2013), atualmente subestimada para o EIAV. Outro fator adicional da dificuldade do trabalho ocorre devido à baixa estabilidade do RNA viral prejudicando o uso de metodologias de extração e de PCRs baseadas na detecção do RNA viral. Este fato é relevante quando amostras são coletadas em regiões como o Pantanal, em que condições técnicas e climáticas, como longas distâncias e altas temperaturas, limitam a utilização do RNA viral para métodos de detecção por PCR.

O isolamento viral, uma técnica padrão ouro utilizada na virologia, também é prejudicada em amostras de equídeos infectados naturalmente, devido à baixa estabilidade do vírus e a escassez de conhecimento sobre o cultivo celular para o EIAV. O isolamento do vírus permitiria obter uma maior quantidade de vírus e contribuiria para o desenvolvimento e padronização de testes moleculares para o diagnóstico da doença.

Para as sequências obtidas a partir de equídeos do estado do Ceará, amplificadas na PCR *tat-gag*, os valores de similaridade nucleotídica foram variáveis, sendo que os menores valores encontrados foram entre a sequência de mula e as 10 sequências de jumentos (81,3% a 83,8%). Valor um pouco maior foi encontrado entre a sequência de mula e a de cavalo (85,5%), e valores um pouco maiores entre a sequência de cavalo e as 10 sequências de jumentos (85,9% a 88%), e valores maiores ainda entre as 10 sequências de jumentos (87,9% a 100%).

A similaridade entre a sequência de mula e as 49 sequências de cavalos do Pantanal foi de 82,3% a 89,4%, e valores um pouco maiores foram encontrados entre a sequência de cavalo e as 49 sequências de cavalos do Pantanal (84,5% a 92,1%), e valores ainda maiores foram encontrados entre as 10 sequências de jumentos e as 49 sequências do Pantanal (86% a 100%).

A partir da análise da sequência de 15 aminoácidos para o exon 1 do gene *tat* deduzidas a partir das sequências de equídeos do Ceará foram observadas três mutações de aminoácidos, encontradas apenas nas sequências de cavalo e mula (Figura 66). Enquanto que na análise de 73 aminoácidos para o gene *gag* foram observadas 16 mutações, encontradas nas sequências de cavalo, mula e uma sequência de jumento (CEARA-J-821-49), enquanto que as demais sequências de jumentos foram conservadas entre si (Figura 67).

As sequências de equídeos do Ceará, quando comparadas às sequências de EIAV mundiais, apresentaram valores variáveis de similaridade nucleotídica, próximos aos

valores encontrados para as sequências do Pantanal em comparação com as sequências de EIAV mundiais. O menor valor encontrado foi entre a sequência de mula (CEARA-M-138-5) do Ceará e as sequências H3, SA, DE e Ita-1 (76,1%), e o maior valor entre a sequência de cavalo (CEARA-C-179-127) do Ceará e a sequência Miyazaki (84%).

Essas diferenças observadas para as sequências de mula, cavalo e para as 10 sequências de jumentos do Ceará podem também ser observadas na reconstrução filogenética feita para esta região do genoma, mostrando as nove sequências de jumentos que são mais próximas agrupam no mesmo clado, enquanto a sequência de jumento (CEARA-J-821-49) que foi mais diversa das demais, e as sequências de cavalo (CEARA-C-179-127) e mula (CEARA-M-138-5) agrupam separadamente (Figura 68 e Figura 69).

Assim, esses resultados preliminares mostram que, a partir desta região parcial do genoma analisada, as sequências de jumentos do Ceará foram mais próximas das sequências de cavalo do Pantanal do que a sequência de cavalo e mula analisadas. Contudo, é necessário o estudo de um número maior de amostras de cavalos, mula e jumentos e de outras regiões do genoma do EIAV para confirmar essas hipóteses.

6.3. Caracterização molecular e filogenia do EIAV das amostras de equídeos brasileiros

Com o DNA proviral amplificado nas reações de PCR foi possível fazer a caracterização molecular de diferentes regiões parciais do genoma do EIAV para uma amostra de cavalo do Pantanal – POCONE-BR. Foram obtidas sequências nucleotídicas parciais a partir dessa amostra: para a região 5' LTR, o gene *gag*, o gene *pol*, a ORF S2, e o gene *env*, e uma sequência completa para os exons 1 e 2 do gene *tat*, compreendendo no total 1953 pb. Para uma amostra de cavalo do Ceará, CEARA-C-14, foi possível fazer a caracterização molecular de uma sequência parcial de 230 pb para a região 5' LTR, e uma sequência parcial de 61 pb para o exon 1 do gene *tat*. Foram encontradas mutações de aminoácidos nas

sequências de aa deduzidas a partir destas sequências nucleotídicas quando comparadas a outras sequências de EIAV de outros países, sendo mutações conservativas e não conservativas. Porém, são necessários mais estudos de outras regiões do genoma e ensaios biológicos para inferir se essas mutações encontradas alteram a função da proteína predita para cada gene.

O fragmento de 234 pb para a região 5' LTR obtida a partir da amostra POCONE-BR apresentou similaridade nucleotídica variável com as sequências mundiais do EIAV, de 74,6% (com Miyazaki) a 81,9% (com H3 e Wyoming). Quando foi feita a comparação com as sequências mundiais do EIAV a similaridade nucleotídica também foi variável, de 77,8% (entre as sequências Miyazaki e Wyoming) a 83,8% (entre as sequências Liaoning e H3).

Os três sítios de ligação PU.1 foram conservados em duas localizações da sequência POCONE-BR, enquanto que no terceiro sítio a sequência apresentou uma deleção nucleotídica. O sítio PEA1/AP-1 também apresentou uma deleção nucleotídica na sequência POCONE-BR. Estudos *in vitro* e *in vivo* são necessários para avaliar se essas variações nucleotídicas encontradas em *motifs* da região LTR para a amostra POCONE-BR causam alterações nas funções da LTR e consequentemente na multiplicação viral.

Estudos de isolados de culturas de tecidos e de isolados de campo do EIAV mostraram que a região *enhancer* U3 da LTR é uma das regiões mais variáveis do genoma do EIAV. Em um estudo em que foram analisados sete isolados *in vivo* foi demonstrado que 45% das posições nucleotídicas dentro da região *enhancer* da LTR variou entre os isolados, enquanto que nenhuma variação foi encontrada no restante da LTR (MAURY *et al.*, 1997).

Outro estudo *in vitro* também demonstrou altas taxas de variação nucleotídica na região U3 da LTR, medidas através da diversidade nucleotídica e divergência, em amostras de EIAV monitoradas durante a passagem em macrófagos primários, células endoteliais e fibroblastos (MAURY *et al.*, 2005). Estes estudos mostraram

que as alterações observadas na região LTR aumentavam a capacidade de transcrição em fibroblastos, fornecendo evidências que as regiões *enhancer* da LTR evoluem em paralelo com mudanças no tropismo celular. No entanto, neste mesmo estudo análises *in vivo* de uma infecção experimental monitorada por três anos, mostrou que a sequência consenso da região U3 da LTR não alterou ao longo do tempo, sugerindo que a rápida evolução da LTR de amostras virulentas do EIAV não ocorrem *in vivo* (MAURY *et al.*, 2005).

O exon 1 do gene *tat* de 96 pb obtido da amplificação de DNA da amostra POCONE-BR apresentou elevada similaridade nucleotídica com as sequências mundiais de EIAV, de 93,3% (com Miyazaki) a 98,9% com (H3, SA e DE). A sequência completa de 32 aminoácidos para o exon 1 da *tat* da amostra POCONE-BR foi conservada em relação às sequências analisadas no alinhamento – H3, Liaoning, Wyoming, Miyazaki, SA e DE.

A sequência parcial de 20 aa de EIAV para o exon 1 do gene *tat* obtida a partir da amostra CEARA-C-14 foi conservada em relação às sequências POCONE-BR, H3, Liaoning, Wyoming, Miyazaki, SA e DE. Porém a sequência CEARA-C-14 apresentou uma mutação não-conservativa em relação a sequência POCONE-BR.

Apesar das mutações de aminoácidos encontradas no exon 1 do gene *tat* para as sequências H3, Liaoning, Wyoming, Miyazaki, SA, DE e POCONE-BR, o exon 1 do gene *tat* mostrou ser uma região adequada para o desenho de iniciadores para amplificação do EIAV, por ser uma região relativamente conservada entre isolados distintos geograficamente. Utilizando os iniciadores desenhados a partir da sequência de isolados de genoma completo da Irlanda, Estados Unidos, Japão e Irlanda foi possível amplificar o DNA proviral do EIAV em amostras de equídeos infectados naturalmente do Pantanal brasileiro e do Ceará, empregando a snPCR LTR-tat, PCR tat-gag e PCR para a região 5' LTR ao exon 1 do gene *tat*, as quais utilizaram iniciadores baseados no exon 1 do gene *tat*.

A sequência completa do exon 2 do gene *tat* de 156 pb, obtida da amostra POCONE-BR apresentou variável similaridade nucleotídica com as sequências mundiais do EIAV, de 60,8% (com H3, SA e DE) a 72,5% (com Wyoming). Quando foi analisada a similaridade nucleotídica para o exon 2 do gene *tat* entre as sequências mundiais do EIAV, entre as sequências SA, DE e H3 a similaridade foi de 100%. Enquanto que entre as demais sequências a similaridade foi variável, de 61% (entre H3, SA e DE e Miyazaki) a 73,4% (entre Wyoming e Liaoning). Demonstrando que valores próximos de similaridade para o exon 2 do gene *tat* encontrados entre a sequência do POCONE-BR e as demais sequências analisadas, também foram observados entre as sequências mundiais do EIAV.

A sequência completa de 51 aa para o exon 2 do gene *tat*, obtida a partir da amostra POCONE-BR apresentou cinco mutações de aminoácidos, sendo duas conservativas, e duas não-conservativas em relação às sequências H3, Liaoning, Wyoming, Miyazaki, SA e DE. Enquanto que a outra mutação pode ser tanto conservativa quanto não conservativa dependendo em relação a qual sequência do EIAV se compara.

As duas sequências parciais de 165 aa e 78 aa para o gene *pol*, que corresponde a uma sequência parcial da enzima integrase, obtida a partir da amostra POCONE-BR apresentaram 10 mutações de aminoácidos em relação às sequências H3, Liaoning, Wyoming, Miyazaki, SA e DE, sendo que oito foram mutações conservativas, uma não conservativa, e outra que pode ser tanto conservativa quanto não conservativa dependendo em relação a qual sequência do EIAV se compara.

A sequência parcial de 148 aa para o gene *env*, obtida a partir da amostra POCONE-BR apresentou 11 mutações em relação às sequências H3, Liaoning, Wyoming, Miyazaki, SA e DE, sendo quatro conservativas e três não conservativas. Enquanto que as demais podem ser tanto conservativas quanto não conservativas dependendo em relação a qual sequência do EIAV se compara. A análise de 1/3 da sequência de aminoácidos para a amostra POCONE-BR correspondente a proteína gp45 do gene *env* demonstra a elevada diversidade dessa região do genoma do

EIAV, já demonstrada para a análise da sequência completa de 445 aa da gp45 (DONG *et al.*, 2014).

As reconstruções filogenéticas feitas a partir das sequências nucleotídicas parciais para as diferentes regiões do genoma obtidas a partir da amostra POCONE-BR mostram que a sequência do Pantanal agrupa separada das demais sequências mundiais do EIAV. Foi observado para a análise de uma sequência parcial do gene *env* que a sequência brasileira agrupa no mesmo clado que a sequência Miyazaki do Japão, com um valor de bootstrap de 76 (Figura 60). A análise filogenética da região 5' LTR ao exon 1 do gene *gag* mostrou que a sequência brasileira está próxima ao clado das sequências da Irlanda, com um valor de bootstrap de 66 (Figura 50). A análise filogenética do gene *pol* mostrou que a sequência brasileira está próxima ao clado das sequências da Irlanda e da Itália, com um valor de bootstrap de 67 (Figura 53). A análise filogenética do gene *pol*, o exon 2 do gene *tat* e a ORF S2 mostrou que a sequência brasileira está próxima ao clado das sequências dos Estados Unidos, com um valor de bootstrap de 48 (Figura 57).

A análise filogenética de todas as sequências concatenadas obtidas para a amostra POCONE-BR mostrou que a sequência brasileira agrupa em um ramo próximo ao clado das sequências da Irlanda com um valor de bootstrap de 65 (Figura 62). A análise filogenética das sequências parciais obtidas para a amostra POCONE-BR para diferentes regiões do genoma em comparação com as sequências mundiais do EIAV mostrou que as sequências dos Estados Unidos, da China, e Japão sempre formam quatro cladogramas separados, conforme já demonstrado para a análise do genoma completo dessas sequências (DONG *et al.*, 2013, QUINLIVAN *et al.*, 2013).

Estudos da análise filogenética de sequências de EIAV sugerem um agrupamento das sequências baseado na localização geográfica, como demonstrado pela análise filogenética das sequências de genoma completo dos Estados Unidos, China, Japão e Irlanda, as quais formam cladogramas separados, provavelmente constituindo grupos monofiléticos separados (DONG *et al.*, 2013; QUINLIVAN *et al.*, 2013). Padrão similar de agrupamento baseado na localização geográfica foi demonstrado também

por CAPOMACCIO *et al.*, (2012) para a análise filogenética de sequências do gene *gag* de amostras oriundas da Europa, Ásia e América. A análise filogenética de 22 sequências parciais de 222 nucleotídeos da Eslovênia para a região 5' LTR ao gene *gag* mostrou o agrupamento das sequências em um mesmo clado que outras sequências da Europa, e separadas das sequências da China e Estados Unidos (KUHAR *et al.*, 2013). A análise filogenética de 14 sequências da França de 1400 nucleotídeos para o gene *gag*, mostrou que estas agrupam separadamente das sequências da China, Japão, América do Norte, e de outras sequências europeias (GAUDAIRE *et al.*, 2017).

De acordo com CAPOMACCIO *et al.* (2012) esse padrão de agrupamento observado para as sequências de EIAV é diferente do que se observa para o HIV, uma vez que os fatores que determinam a variação desses dois vírus são fundamentalmente diferentes. A distribuição geográfica mais heterogênea das variantes do HIV-1 se deve a diferentes fatores, como as redes de contato pessoal, transferência à longa distância, múltiplos efeitos fundadores independentes e a frequente recombinação inter-subtipo. Para o EIAV, é observado predominantemente um isolamento geográfico, o que pode ser reflexo de uma menor mobilidade das populações de cavalos, embora sejam transportados por longas distâncias. Além disso, pode ter impacto a forma de transmissão do EIAV através da picada de insetos hematófagos, sendo o único entre os lentivirus em que o vírus é transmitido por vetores. Isto facilitaria as transmissões de curta a longas distâncias, o que reforça ainda mais a estruturação geográfica das sequências de EIAV.

6.4. Testes sorológicos para identificação de animais positivos para AIE

Quando se analisa o resultado dos testes sorológicos para as 133 amostras de equídeos do Pantanal, os dois testes ELISA empregados neste estudo foram capazes de detectar amostras negativas no IDGA, uma vez que 35 amostras que foram negativas ou indeterminadas no IDGA foram positivas em pelo menos um dos testes ELISA gp90 e/ou ELISA p26. Resultados similares também foram observados

para as amostras de equídeos do Ceará, uma vez que do total de 30 amostras de cavalos, 10 amostras que foram negativas no IDGA foram positivas em pelo menos um dos testes ELISA gp90 e/ou ELISA p26. Do total de 160 amostras de jumentos analisadas, foram encontrados números ainda maiores, 53 amostras que foram negativas no IDGA foram positivas em pelo menos um dos testes ELISA gp90 e/ou ELISA p26. Amostras de três mulas foram analisadas e nenhuma foi positiva no IDGA, e uma foi positiva nos dois testes ELISA gp90 e ELISA p26.

A maior sensibilidade do ELISA em relação ao IDGA já foi demonstrada em outros estudos, como por exemplo, para um grupo de 59 amostras de cavalos da Irlanda testadas pelos IDGA; quatro ELISAs aprovados pelo Departamento de Agricultura dos Estados Unidos (USDA): Vira-CHEK (Synbiotics), SA-ELISA (Centaur), VMRD ELISA (VMRD) e CELISA (IDEXX); e um imunoblot para as proteínas p26, gp45 e gp90 (CULLINANE *et al.*, 2007). Neste estudo 32 amostras foram positivas em pelo menos um ou mais dos testes sorológicos utilizados, 12 amostras negativas ou inconclusivas no IDGA foram positivas em pelo menos um dos ELISAs e no imunoblot, e várias amostras apresentaram resultados conflitantes nos diferentes ELISAs. Tendo sido observado que a sensibilidade dos diferentes ELISAs, o imunoblot e o IDGA variou entre as amostras testadas, e nenhum teste foi o mais sensível em todos os casos. Entretanto, os ELISAs e o imunoblot foram mais sensíveis que o IDGA em 12 dos 32 casos (CULLINANE *et al.*, 2007).

Em outro estudo foi demonstrado também uma maior sensibilidade do ELISA no caso de infecção recente, em que um animal foi positivo no ELISA, para a proteína gp90 (ELISA rgp90), sete dias após inoculação com a amostra EIAV Wyoming, o que coincide com a multiplicação viral associado ao aumento da temperatura (REIS *et al.*, 2012). Esta maior sensibilidade do ELISA comparada ao IDGA já foi demonstrada também para outras espécies de equídeos, em um estudo com 859 amostras de soro de 474 cavalos, 206 mulas e 179 jumentos, do total de amostras 143 foram positivas e 716 negativas no teste IDGA. Essas amostras foram testadas através de um ELISA baseado na proteína gp45 (ELISA ppg45). Tendo sido observado uma concordância de 96,1% entre o IDGA e o ELISA ppg45, dos 33

resultados discordantes 31 (3,6%) foram positivos no ELISA pgp45, e o restante foi IDGA positivo e ELISA pgp45 negativo (NAVES *et al.*, 2019).

Dados sobre a prevalência da AIE em jumentos são escassos e em um estudo recente da soroprevalência da AIE em jumentos do município de Mossoró/Rio Grande do Norte/Brasil, amostras de 367 jumentos foram testadas por IDGA e ELISA para as proteínas p26 e gp90, demonstrando que somente 1,6% (6/367) das amostras foram positivas no IDGA, 3,3% (12/367) no cELISA enquanto que 14,4% (53/367) foram positivas no ELISA rgp90 (OLIVEIRA *et al.* 2017).

Este estudo demonstrou que a soroprevalência da AIE em jumentos no município do Mossoró é significativamente mais baixa do que em outras regiões do Brasil, como por exemplo, o Pantanal. Sendo necessários mais estudos para identificar os fatores que contribuem para esta baixa incidência da doença nessa região. A ausência ou baixa taxa de detecção da AIE no IDGA, observada para as amostras de jumentos do Ceará e de Mossoró, descritas no estudo, indicam que o IDGA pode gerar reações falso negativas, uma vez que amostras negativas no IDGA foram positivas nos diferentes ELISAs para diferentes proteínas. Este fato gera uma preocupação sobre o uso do IDGA, como teste diagnóstico exclusivo para o controle da AIE (OLIVEIRA *et al.* 2017).

Em um estudo para avaliar a resposta clínica e sorológica de jumentos à infecção pelo EIAV, pôneis, cavalos e jumentos foram infectados com duas amostras conhecidas do EIAV – EIAV_{PV} e EIAV_{Wyoming}, patogênicas em cavalos e pôneis (COOK *et al.*, 2001). Para a análise da resposta imune, através de testes sorológicos, foi observado que os jumentos foram susceptíveis a infecção com as duas amostras virais, uma vez que eles produziram anticorpos para todas as proteínas virais. Porém foram observadas diferentes respostas aos testes sorológicos entre os animais. Para os animais infectados com a amostra EIAV_{PV}, no CELISA, para detecção da proteína p26, todos os pôneis se tornaram positivos entre o 21^o e 28^o dias após infecção (dpi), enquanto que os jumentos não foram positivos até o 42^o dpi. No IDGA, os pôneis foram positivos entre os dias 21 e 23 pós-

infecção, enquanto que os jumentos apresentaram uma fraca reação positiva entre os dias 42 e 49 pós-infecção. No SA-ELISA, para detecção da proteína gp45, os pôneis se tornaram positivos até o 21º dpi, enquanto que os jumentos não apresentaram anticorpos detectáveis até o 63º dpi. Para os animais infectados com a amostra EIAV_{Wyoming}, no CELISA e SA-ELISA os cavalos apresentaram anticorpos no 14 dpi, e para os jumentos no 18º, dpi. Entretanto, os níveis de anticorpos no cavalo foram cinco vezes maiores no CELISA, e foram observadas reações de menor intensidade no SA-ELISA. Quanto à análise da resposta clínica dos animais a infecção pelo EIAV, foi observado que os cavalos e pôneis apresentaram sinais clínicos da AIE, a qual em alguns animais foi grave, enquanto que os jumentos permaneceram assintomáticos durante os 365 dias correspondentes ao período de observação, tendo sido observada apenas uma leve redução transiente na contagem de plaquetas. Foi observado que as amostras virais adaptadas a cavalos, utilizadas nesse estudo, foram incapazes de produzir doença nos jumentos testados (COOK *et al.*, 2001).

A análise da taxa de multiplicação do EIAV por RT-PCR, para a detecção do RNA viral associado ao plasma, indicou que a multiplicação inicial das amostras EIAV_{PV} e EIAV_{Wyoming} foi menor em jumentos quando comparada a cavalos e pôneis, uma vez que, os níveis de RNA viral no plasma de pôneis infectados por EIAV_{PV} e EIAV_{Wyoming} foram até 100.000 e 100 vezes maior, respectivamente, do que em jumentos durante os primeiros 20 dpi. Isso demonstra que jumentos infectados com essas amostras virais apresentaram quantidades mais baixas de ácido nucleico viral associado ao plasma do que os cavalos ou pôneis, durante os primeiros estágios após a infecção (COOK *et al.*, 2001).

A partir do trabalho de COOK *et al.*, (2001) e dos resultados de sorologia aqui demonstrados para as amostras de jumentos do Ceará podemos concluir que são necessários mais estudos para avaliar se a doença causada pelo EIAV nos jumentos tem as mesmas características da AIE em cavalos. Além disso, estudos sobre a resposta imune ao vírus em jumentos infectados pelo EIAV, e se essa resposta de

anticorpos gerada pelo sistema imune do jumento é capaz de ser detectada pelo IDGA, teste recomendado para o diagnóstico da AIE.

6.5. Comparação da eficiência de detecção de EIAV por métodos moleculares em comparação aos testes sorológicos

Quando se compara os métodos moleculares desenvolvidos neste trabalho com os testes sorológicos, para o grupo de amostras de equídeos do Pantanal brasileiro verifica-se que foi possível detectar o vírus em amostras negativas no IDGA, uma vez que 10 amostras negativas no IDGA foram positivas na PCR tat-gag, enquanto que duas amostras negativas e uma indeterminada no IDGA foram positivas na snPCR LTR-tat. Dentre essas amostras, uma amostra negativa nos três testes sorológicos foi positiva na PCR tat-gag (PAN-BR-7960) (Figura 63, Figura 64).

Quando se compara os métodos moleculares desenvolvidos neste trabalho com os testes sorológicos para o grupo de amostras de equídeos do Ceará, das 30 amostras de cavalos, as três amostras positivas na PCR tat-gag foram positivas nos três testes sorológicos (Figura 73). Enquanto que para as 160 amostras de jumentos, a PCR tat-gag foi capaz de detectar oito amostras positivas, as quais foram negativas nos três testes sorológicos, enquanto que as outras três amostras positivas na PCR tat-gag foram positivas em pelo menos um dos testes ELISAs (Figura 74). A única amostra de mula positiva na PCR tat-gag foi positiva também nos dois testes ELISAs. Desta forma podemos confirmar que a PCR tat-gag foi capaz de amplificar o EIAV em amostras de jumentos.

Resultados semelhantes em que foi possível detectar o EIAV em amostras de equídeos negativas em testes sorológicos já foram demonstrados por CULLINANE *et al.*, (2007) em amostras de cavalos da Irlanda. Assim, os testes moleculares ao detectarem a presença do ácido nucleico viral, independente da resposta imune do hospedeiro tem o potencial para detectar a infecção pelo EIAV em casos em que não é possível nos testes sorológicos, como por exemplo, em casos de infecção recente em que o sistema imune do hospedeiro não produziu uma resposta de

anticorpos ainda. Como já demonstrado por CAPPELLI *et al.* (2011), em amostras positivas em PCR e negativas no IDGA, após soroconversão se tornaram positivas no IDGA, o que demonstra que os testes baseados em PCR têm a eficácia para detectar equídeos recentemente infectados pelo EIAV.

Essa diferença na taxa de positividade encontrada para as amostras de equídeos do Pantanal e do Ceará para os testes sorológicos IDGA, ELISA gp90, ELISA p26 e a PCR tat-gag, pode ser explicada por diferentes fatores. Dentre estes fatores podemos citar a ocorrência de *mismatches* entre o iniciador e a sequência alvo, uma vez que até o momento não se conhece o genoma do EIAV de amostras brasileiras para a região alvo amplificada nas PCRs. A extensa variabilidade genética do EIAV a partir de isolados virais distintos geograficamente pode favorecer a ocorrência de *mismatch* entre o iniciador e a sequência alvo, tornando difícil a obtenção de uma combinação de iniciadores que possa ser adequado para a detecção do EIAV circulante em diferentes países, sendo este o principal obstáculo para a implementação na rotina dos métodos de diagnóstico baseados em PCR (DONG *et al.*, 2012, COOK *et al.*, 2013). Embora, os métodos moleculares representem uma alternativa potencial altamente sensível para a detecção do EIAV, essas técnicas requerem uma extensiva informação da sequência nucleotídica. Assim, existe uma necessidade urgente para a caracterização molecular do genoma do EIAV a partir de isolados de diferentes regiões mundiais (CAPPELLI *et al.*, 2011, 2017).

Outro fator seria a estabilidade das amostras, que pode ser afetada durante o transporte e armazenamento, podendo alterar a eficiência da PCR. A eficácia de detecção do EIAV por métodos moleculares também pode ser afetada pelo estágio da doença em que o animal se encontra. A baixa carga viral no plasma e nos tecidos alvos durante os diferentes estágios da doença, especialmente quando o animal atinge o estágio de portador inaparente, pode influenciar a detecção do ácido nucleico em amostras para ensaios moleculares. Este fato foi demonstrado por HARROLD *et al.* (2000) em um estudo com equídeos infectados experimentalmente, mostrando que a fase aguda da doença está associada a elevados níveis de RNA

viral no plasma, ao contrário da fase assintomática, a qual está associada a níveis muito baixos ou indetectáveis de RNA viral no plasma, medidos através de RT-PCR.

CAPELLI *et al.* (2011), em um estudo de detecção molecular em amostras de cavalos infectados naturalmente, sugere que a amplificação de DNA proviral a partir de amostra de sangue total por n-PCR mostrou ser um indicador mais sensível da infecção do EIAV do que a detecção do RNA viral no plasma por RT-PCR. Também foi demonstrada a amplificação de DNA proviral a partir de amostras de PBMC de cavalos infectados naturalmente que não apresentavam nenhum sinal clínico da AIE no momento em que as amostras foram coletadas, indicando que a maioria, se não todos os cavalos, já tinham entrado no estágio de portador inaparente (DONG *et al.*, 2012).

Como em nosso estudo não foram obtidos dados sobre o estágio da doença em que o animal se encontrava no momento da coleta das amostras estudadas do Pantanal e Ceará, não foi possível avaliar se a fase doença pode ter interferido na taxa de detecção do EIAV por testes moleculares.

Embora a AIE seja rotineiramente diagnosticada pelo IDGA, este apresenta limitações para a detecção da doença. O sorodiagnóstico avalia a presença de anticorpos, o que é dependente da resposta imune do hospedeiro. Resultados falso negativos podem ocorrer devido a infecções recentes, uma vez que neste estágio da doença os níveis de anticorpos podem ser muito baixos ou indetectáveis para este diagnóstico de baixa sensibilidade. Entretanto, como esses animais podem servir como potenciais fontes de transmissão do EIAV (ISSEL & COOK, 1993; LANGEMEIER *et al.*, 1996; COOK *et al.*, 2013), é essencial que os métodos de detecção da AIE sejam mais sensíveis. Os ensaios moleculares para detectar RNA viral ou DNA proviral podem ser usados no caso de equídeos infectados recentemente, e também para confirmar a infecção em equídeos com resultados discordantes nos testes sorológicos (LANGEMEIER *et al.*, 1996; CULLINANE *et al.*, 2007).

7. CONCLUSÃO

Empregando a PCR *tat-gag* desenvolvida neste estudo foi possível amplificar o DNA proviral do EIAV em 43,6% das amostras do Pantanal analisadas, e destas 84,5% foram confirmadas por sequenciamento. A análise das 49 sequências de aminoácidos de EIAV das amostras do Pantanal brasileiro, mostra a conservação do exon 1 do gene *tat* e variabilidade do gene *gag* do EIAV nessa população de equídeos.

Utilizando a PCR *tat-gag* também foi possível amplificar o DNA proviral em amostras de PBMC e órgãos de diferentes espécies de equídeos do estado do Ceará. Através do sequenciamento foi confirmada a infecção pelo EIAV nessa população de equídeos do Ceará. As 10 sequências de EIAV de amostras de jumentos e uma de mula são as primeiras sequências de EIAV brasileiras para estas duas espécies de equídeos.

As 84 sequências nucleotídicas, amplificadas de regiões parciais do genoma do EIAV, a partir de amostras de campo brasileiras, assim como o sequenciamento de 1.953 pb de uma amostra de um cavalo do Pantanal brasileiro demonstram a diversidade do genoma do EIAV. Contribuindo significativamente com novas informações sobre o genoma do EIAV circulante nessa população de equídeos, durante muito tempo subestimada. Reforçando a necessidade de estudos de caracterização molecular do genoma completo do EIAV.

A análise filogenética das sequências nucleotídicas de diferentes regiões parciais do genoma do EIAV para uma amostra de um cavalo do Pantanal brasileiro (POCONE-BR), a sequência de um cavalo do Ceará (CEARA-C-14), as 72 sequências de equídeos do Pantanal e as 12 sequências de equídeos do Ceará caracterizadas neste trabalho, em conjunto com as sequências de EIAV mundiais de EIAV analisadas refletem a variabilidade do genoma do EIAV, e indicam um agrupamento das sequências baseado na localização geográfica.

Esse padrão de agrupamento das sequências de EIAV baseado na localização geográfica, observado para as sequências parciais de EIAV brasileiras obtidas neste trabalho, assim como já observado para sequências de genoma completo e parciais de outras localizações geográficas mundiais, requer mais estudos de caracterização molecular do vírus e filogenia para confirmar esta hipótese. Uma vez que, existem poucas sequências de EIAV o que pode influenciar nas análises filogenéticas, além da elevada variabilidade genética, característica dos retrovírus.

Para o total de 326 amostras de equídeos do Pantanal e Ceará, foi possível detectar o EIAV em 7% das amostras negativas no teste IDGA, empregando a PCR tat-gag, demonstrando a sensibilidade dos métodos moleculares em comparação ao teste IDGA. Enquanto que 30% das amostras negativas no teste IDGA foram positivas em pelo menos um dos testes ELISA empregados neste estudo. Esses resultados demonstram a sensibilidade do ELISA em comparação ao teste IDGA e reforçam a necessidade do emprego destes testes sorológicos mais sensíveis para o diagnóstico da AIE.

A implicação prática desses resultados é que muitas vezes equídeos diagnosticados como negativos no teste oficial para o diagnóstico da doença – IDGA e positivos em outros testes como ELISA e PCR podem servir como potenciais fontes de transmissão do EIAV. Os resultados discordantes nos diferentes testes sorológicos e moleculares indicam que múltiplos testes em intervalos de tempo de infecção diferentes podem ser necessários para o diagnóstico da AIE, assim como é preconizado para o diagnóstico do HIV (HURT *et al.*, 2017)..

A detecção da AIE por métodos mais sensíveis pode contribuir para dados da incidência da doença, que podem ser subestimados em regiões onde a AIE é endêmica, assim como para a detecção de novos surtos da doença para que medidas de controle sejam tomadas e a dispersão do EIAV seja evitada. A caracterização molecular do EIAV a partir de isolados de diferentes regiões do mundo irá permitir o conhecimento do genoma do vírus, o que poderá contribuir para o desenvolvimento de métodos moleculares para a amplificação de diferentes

regiões do genoma consequentemente contribuindo para o desenvolvimento de métodos de diagnóstico moleculares.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALMEIDA V.M.A, GONÇALVES V.S.P., MARTINS M.F., HADDAD J.P.A., DIAS R.A., LEITE R.C., REIS J.K.P. Anemia infecciosa eqüina: prevalência em eqüídeos de serviço em Minas Gerais. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.58, n.2, p.141-148, 2006.

ALTSCHUL S.F., GISH W., MILLER W., MYERS E.W., LIPMAN D.J. Basic local Alignment Search Tool. **Journal of Molecular Biology**, v.215, p.403-410, 1990.

ASSEGED B.D., HABTEMARIAM T., TAMERU B., NGANWA D. The risk of introduction of equine infectious anemia virus into USA via cloned horse embryos imported from Canada. **Theriogenology**, v.77, p.445–458, 2012.

BAKHANASHVILI M., HIZI A. Fidelity of DNA Synthesis Exhibited in Vitro by the Reverse Transcriptase of the Lentivirus Equine Infectious Anemia Virus? **Biochemistry**, v.32, p.7559-7567, 1993.

BALDACCHINO F., DESQUESNES M., MIHOK S., FOIL L.D., DUVALLET G., JITTAPALONG S. Tabanids: Neglected subjects of research, but important vector of disease agents. **Infection, Genetics and Evolution**, v.28, p.596-615, 2014.

BARROS A.T.M. Seasonality and relative abundance of Tabanidae (Diptera) captured on horses in the Pantanal, Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro**, v.96, p.917-923, 2001.

BAZZO J.C., DE FREITA D.A.F., SILVA M.L.N., CARDOSO E.L., SANTOS S.A. Aspectos Geofísicos e Ambientais do Pantanal da Nhecolândia. **Revista de Geografia (UFPE)**, v.29, n°1, p.141-161, 2012.

BELSHAN M., PARK G.S., BILODEAU P., STOLTZFUS M., CARPENTER S. Binding of equine infectious anemia virus rev to an exon splicing enhancer mediates alternative splicing and nuclear export of viral mRNAs. **Molecular and Cellular Biology**, v.20, n°10, p.3550-3557, 2000.

BORGES A.M.C.M., SILVA L.G., NOGUEIRA M.F., OLIVEIRA A.C.S., SEGRI N.J., FERREIRA F., WITTER R., AGUIAR D.M. Prevalence and risk factors for Equine Infectious Anemia in Poconé municipality, northern Brazilian Pantanal. **Research in Veterinary Science**, v.95, p.76-81, 2013.

BRINDLEY M.A., MAURY W. Endocytosis and a low-pH step are required for productive entry of equine infectious anemia virus. **Journal of virology**, v.79, p.14482–14488, 2005.

CAIJ A.B., TIGNON M. Epidemiology and Genetic Characterization of Equine Infectious Anaemia Virus Strains Isolated in Belgium in 2010. **Transboundary and emerging diseases**, v.61, p.464-468, 2014.

CAPOMACCIO S., CAPPELLI K., COOK R.F., NARDI F., GIFFORD R., MARENZONI M.L., PASSAMONTI F. Geographic structuring of global EIAV isolates: A single origin for New World strains? **Virus Research**, v.163, p.656-659, 2012.

CAPOMACCIO S., WILLAND Z.A., COOK S.J., ISSEL C.J., SANTOS E.M., REIS J.K.P., COOK R.F. Detection, molecular characterization and phylogenetic analysis of full-length equine infectious anemia (EIAV) gag genes isolated from Shackleford Banks wild horses. **Veterinary Microbiology**, v.157, p.320-332, 2012.

CAPPELLI K., CAPOMACCIO S., COOK F.R., FELICETTI M., MARENZONI M. L., COPPOLA G., VERINI-SUPLIZI A., COLETTI M., PASSAMONTI F. Molecular detection, epidemiology and genetic characterization of novel european Field isolates

of equine infectious anemia virus. **Journal of Clinical Microbiology**, v.49, p.27-33, 2011.

CAPPELLI K., COOK R.F., STEFANETTI V., PASSAMONTI F., AUTORINO G. L., SCICLUNA M.T., COLETTI M., VERINI SUPPLIZI A., CAPOMACCIO S. Deep sequencing and variant analysis of an Italian pathogenic field strain of equine infectious anaemia virus. **Transboundary and Emerging Diseases**, p.1–9, 2017.

CARTER, J.B., SAUNDERS, V.A. Retroviridae. In: **Virology: Principles and Applications**. JOHN WILEY & SONS. p.185-196, 2007.

CARROLL R. & DERSE D. Translation of equine infectious anemia virus bicistronic tat-rev mRNA requires leaky ribosome scanning of the tat CTG initiation codon. **Journal of Virology**, v.67,n°3, p.1433-1440, 1993.

CARROLL R., MARTARANO L., DERSE D. Identification of lentivirus tat functional domains through generation of equine infectious anemia virus/ human immunodeficiency virus type 1 tat gene chimeras. **Journal of Virology**, v.65, n°7, p.3460-3467, 1991.

CARVALHO M., DERSE D. Mutational analysis of the equine infectious anemia virus tat-responsive element. **Journal of Virology**, v.65, n°4, p.3468-3474, 1991.

CARVALHO M., DERSE D. Physical and functional characterization of transcriptional control elements in the Equine infectious anemia virus promoter. **Journal of Virology**, v.19, n°4, p.206-2074, 1993.

CHARMAN H.P., BLADEN S., GILDEN R.V., COGGINS L. Equine infectious anemia virus: evidence favoring classification as a retrovirus. **Journal of Virology**, v.19, p.1073-1079, 1976.

CHEEVERS W.P., ARCHER B.G., CRAWFORD T.B. Characterization of RNA from Equine infectious anemia virus. **Journal of Virology**, v.24, p.489-497, 1977.

CLABOUGH, D.L., GEBHARD, D., FLAHERTY, M.T., WHETTER, L.E., PERRY, S.T., COGGINS, L., FULLER, F.J. Immune-mediated thrombocytopenia in horses infected with equine infectious anemia virus. **Journal of Virology**, v.65, p.6242-6251, 1991.

CLEMENTS, J.E., ZINK M.C. Molecular biology and pathogenesis of animal lentivirus infections. **Clinical Microbiology Reviews**, v.9, p.100-117, 1996.

COHEN. Vaccine development with a distinctly Chinese Flavor. **Science**, v.304, p.1437, 2004.

COOK R.F., LEROUX C., COOK S.J., BERGER S.L., LICHTENSTEIN D.L., GHABRIAL N.N., MONTELARO R.C. Development and characterization of an in vivo pathogenic molecular clone of equine infectious anemia virus. **Journal of Virology**, v.72, n^o2, p.1383-1393, 1998.

COOK S.J., COOK R.F., MONTELARO R.C., ISSEL C.J. Differential responses of *Equus caballus* and *Equus asinus* to infection with two pathogenic strains of equine infectious anemia virus. **Veterinary Microbiology**, v.79, p.93-109, 2001.

COOK R.F., COOK S.J., LI F., MONTELARO R.C., ISSEL C.J. Development of a multiplex real-time reverse transcriptase-polymerase chain reaction for equine infectious anemia virus (EIAV). **Journal of Virological Methods**, v.105, p.171–179, 2002.

COOK R.F., LEROUX C., ISSEL C.J. Equine infectious anemia and equine infectious anemia virus in 2013: A review. **Veterinary Microbiology**, v.167, p.181–204, 2013.

COOK R.F., LEE M.B.P.-Y.A., TSAI C.-F., SHEN Y.-H., TSAI Y.-L., CHANG G., WANG H.-T.T., BALASURIYA. Rapid detection of equine infectious anemia virus nucleic acid by insulated isothermal RT-PCR assay to aid diagnosis under field conditions. **Equine Veterinary Journal**, 0, p.1-6, 2018.

CORDES T., ISSEL C. Equine infectious anemia. A status report on its control, 1996. **United States Department of Agriculture Animal and Plant Health Inspection Service**.

CRAIGO, J.K., MONTELARO, R.C. EIAV Envelope diversity: shaping viral persistence and encumbering vaccine efficacy. **Current HIV Research**, v.8 p.81-86, 2010.

CRAIGO J. K., MONTELARO R. C. Lessons in AIDS vaccine development learned from studies of Equine infectious, Anemia virus infection and immunity. **Viruses**, v.5, p.2963-2976, 2013.

CULLINANE A., QUINLIVAN M., NELLY M., PATTERSON H., KENNA R., GARVEY M., GILDEA S., LYONS P., FLYNN M., GALVIN P., NEYLON M., JANKOWSKA K. Diagnosis of equine infectious anaemia during the 2006 outbreak in Ireland. **Veterinary Record**, v.161, p.647-652, 2007.

CURSINO A. E., VILELA A. P. P., FRANCO-LUIZ A. P. M., DE OLIVEIRA J. G., NOGUEIRA M. F., ARAÚJO JÚNIOR J. P., DE AGUIAR D. M., KROON E. G. Equine infectious anemia virus in naturally infected horses from the Brazilian Pantanal. **Archives of Virology**, v.163, p.1-10, 2018.

DARRIBA D., TABOADA G. L., DOALLO R., POSADA D. jModelTest 2: more models, new heuristics and high-performance computing. **Europe PMC Funders Group**, 2012.

DEMIROV D.G., FREED E.O. Retrovirus budding. **Virus Research**, v.106, p.87-102, 2004.

DERSE D., DORN P. L., LEVY L., STEPHENS R.M., RICE N.R., CASEY J.W. Characterization of Equine infectious anemia virus long terminal repeat. **Jornal of Virology**, v.61, p.743-747, 1987.

DONG J-B., ZHU W., COOK F.R., GOTO Y., HORII Y., HAGA T. Development of a nested PCR assay to detect equine infectious anemia proviral DNA from peripheral blood of naturally infected horses. **Archives of Virology**, v.157 (11), p.2105-2111, 2012.

DONG J-B., ZHU W., COOK F.R., GOTO Y., HORII Y., HAGA T. Identification of a novel equine infectious anemia virus field strain isolated from feral horses in southern Japan. **Journal of General Virology**, v.94, p.360-365, 2013.

DONG J-B., COOK F.R., ZHU W. Equine infectious anemia virus in Japan: Viral isolates V70 and V26 are of North American not Japanese origin. **Veterinary Microbiology**, v.174, p.276-278, 2014.

DONG J., COOK F. C., HAGA T., HORII Y., NORIMINE J., MISAWA N., GOTO Y., ZHU W. Comparative analysis of LTR and structural genes in an equine infectious anemia virus strain isolated from a feral horse in Japan. **Archives of Virology**, v.159 (12), p.3413–3420, 2014.

ELLERMAN, C., BANG, O. Experimentelle Leukämie bei Hunden. **Zentralblatt für Bakteriologie**, 46, 595–609, 1908.

Equine Infectious anemia 2009. **The Center for Food Security & Public Health (CFSPH)**. Disponível em:

http://www.cfsph.iastate.edu/Factsheets/pdfs/equine_infectious_anemia.pdf

Equine Infectious Anemia Virus Antibody Test Kit, AGID. **VMRD Inc (Veterinary Medical Research e Development)**. Veterinary diagnostic test kits e reagents. VMRD CATALOG, 2010.

FREED E.O. HIV-1 gag proteins: diverse functions in the virus life cycle. **Virology**, v.25, p.1-15, 1998.

FOIL, L.D., ISSEL, C. Transmission of retroviruses by arthropods. **Ann. Rev. Entomol**, v.36, p.355-381, 1991.

FOIL L. D., HOGSETTE J. A. Biology and control of tabanids, stable flies and horn flies. **Revue Scientifique et Technique**, v.13, p.1125-1158, 1994.

GAUDAIRE D., LECOUTURIER F., PONÇON N., MORILLAND E., LAUGIER C., ZIENTARA S., HANS A. Molecular characterization of equine infectious anemia virus from a major outbreak in southeastern France. **Transboundary and Emerging Diseases**, v.65 (1), p.7-13, 2017.

GREGG, K., POLEJAEVA, I. Risk of equine infectious anemia virus disease transmission through in vitro embryo production using somatic cell nuclear transfer. **Theriogenology**, v.72, p.289-299, 2009.

GOFF SP. Retroviridae. In **Fields Virology**. KNIPE DM & HOWLEY PM, 6th Edition, Volume 2, chapter 47, p.1424-1473, 2013.

HAMMOND, S.A., COOK, S.J., LICHTENSTEIN, D.L., ISSEL, C.J., MONTELARO, R.C. Maturation of the cellular and humoral immune responses to persistent infection in horses by equine infectious anemia virus is a complex and lengthy process. **Journal of Virology**, v.71, p.3840-3852, 1997.

HARROLD, S.M., COOK, S.J., COOK R.F., RUSHLOW, K.E., ISSEL, C.J., MONTELARO, R.C. Tissue sites of persistent infection and active replication of

equine infectious anemia virus during acute disease and asymptomatic infection in experimentally infected equids. **Journal of Virology**, v.74, p.3112-3121, 2000.

HATANAKA H., IOURIN O., RAO Z., FRY E., KINGSMAN A., Stuart D. Structure of Equine Infectious Anemia Virus Matrix Protein. **Journal of Virology**, v.76, n°4, p.1876–1883, 2002.

HINES R., SORENSEN B.R., SHEA M.A, MAURY W. PU.1 Binding to ets Motifs within the Equine Infectious Anemia Virus Long Terminal Repeat (LTR) Enhancer: Regulation of LTR Activity and Virus Replication in Macrophages. **Journal of Virology**, v.78, n°7, p. 3407–3418, 2004.

HURT C.B., NELSON J.A.E., HIGHTOW-WEIDMAN L.B., MILLER W.C. Selecting an HIV test: a narrative review for clinical and researchers. **Sexually Transmitted Diseases**, v.44, n°12, p. 739-746, 2017.

HUSSAIN K.A., ISSEL C.J., RWAMBO P.M., ARNIZAUT A.B., BALL J.M., SCHNORR K.L., MONTELARO R.C. Identification of gag precursor of equine infectious anemia virus with monoclonal antibodies to the major viral core protein, p26. **Journal of General Virology**, v.69, p.1719-1724, 1988.

Produção da pecuária municipal 2016, Brasil, v.44. Ministério do Planejamento, Desenvolvimento e Gestão, **Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE)**, 2016.

ISSEL C.J., RUSHLOW, E., FOIL, L.D., MONTELARO, R.C. A perspective on equine Infectious Anemia with an emphasis on vector transmission and genetic analysis. **Veterinary Microbiology**, v.17, p.251-286, 1988.

ISSEL C.J.R., COOK R.F. A review of techniques for the serologic diagnosis of equine infectious anemia. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v.5, p.137-141, 1993.

ISSEL C.J., COOK S.J., COOK R.F., CORDES T.R. Optimal paradigms to detect reservoirs of equine infectious anemia virus (EIAV). World equine veterinary association. 6th world Congress. WEVA/AVEF. Paris France. **Journal of equine veterinary science**, p.728-732, 1999.

ISSEL C.J., SCICLUNA M.T., COOK S.J., COOK R.F., CAPRIOLI A., RICCI I., ROSONE F., CRAIGO J.K., MONTELARO R.C., AUTORINO G.L. Challenges and proposed solutions for more accurate serological diagnosis of equine infectious anaemia. **Veterinary Record**, v.172, 2013.

ISSEL C.J., COOK R.F., MEALEY R.H., HOROHOV D.W. Equine infectious anemia in 2014: Live with it or eradicate it? **Veterinary Clinics of North America: Equine Practice**, v.30, p.561-577, 2014.

JIN S., ZHANG B., WEISZ O.A., MONTELARO R.C. Receptor-mediated entry by equine infectious anemia virus utilizes a pH-dependent endocytic pathway. **Journal of Virology**, v.79, p.14489-14497, 2005.

KIM C. H., CASEY J. W. Genomic Variation and Segregation of Equine Infectious Anemia Virus during Acute Infection. **Journal of Virology**, v.66, n°6, p.3879-3882, 1992.

JUNK W.J., DA CUNHA C.N., WANTZEN K.M., PETERMANN P., STRÜSSMANN C., MARQUES M.I., ADIS J. Biodiversity and its conservation in the Pantanal of Mato Grosso, Brazil. **Aquatic Sciences**, v.68, p.278-309, 2006.

KUHAR U., ZAVRŠNIK J., TOPLAK I., MALOVRH T. Detection and molecular characterisation of equine infectious anaemia virus from field outbreaks in Slovenia. **Equine Veterinary Journal**, v.46, p.386-391, 2013.

KUHAR U. & MALOVRH T. High genetic of equine infectious anaemia virus strains from Slovenia revealed upon phylogenetic analysis of the p15 gag gene region. **Equine Veterinary Journal**, 48, p.205-210, 2016.

KUMAR S., STECHER G., LI M., KNYAZ C., TAMURA K. MEGA X: Molecular Evolutionary Genetics Analysis across computing platforms. **Molecular Biology and Evolution**, 35, p.1547-1549, 2018. <https://doi.org/10.1093/molbev/msy096>.

LANGEMEIER J.L., COOK S.J., COOK R.F., RUSHLOW K.E., MONTELARO R.C., ISSEL C.J. Detection of equine infectious anemia viral RNA in plasma samples from recently infected and long-term inapparent carrier animals by PCR. **Journal of Clinical Microbiology**, v.34, p.1481-1487, 1996.

LEROUX, C., CADORÉ, J.-L.,B, MONTELARO, R.C. Equine infectious anemia virus (EIAV): what has HIV's country cousin got to tell us? **Veterinary Research**, v.35, p.485–512, 2004.

LI F., PUFFER B.A., MONTELARO R. C. The S2 gene of equine infectious anemia virus is dispensable for viral replication in vitro. **Jornal of virology**, v.72, n°10, p.8344-8348, 1998.

LI F., LEROUX C., CRAIGO J.K., COOK S.J., ISSEL C.J., MONTELARO R.C. The S2 gene of equine infectious anemia virus is a highly conserved determinant of viral replication and virulence properties in experimentally infected ponies. **Journal of Virology**, v.74, p.573–579, 2000.

LICHTENSTEIN D.L., RUSHLOW K.E., COOK R.F., RAABE M.L., SWARDSON C.J., KOCIBA G.J., ISSEL C.J., MONTELARO R.C. Replication In Vitro and In Vivo of an

Equine Infectious Anemia Virus Mutant Deficient in dUTPase Activity. **Journal of virology**, v.69, p.2881-2888, 1995.

LICHTENSTEIN D.L., ISSEL C.J., MONTELARO R.C. Genomic Quasispecies Associated with the Initiation of Infection and Disease in Ponies Experimentally Infected with Equine Infectious Anemia Virus. **Journal of Virology**, v.70, n°6, p. 3346–3354, 1996.

LIGNEE M. Mémoire et observations sur une maladie de sang, connue sous le nom d'anémie hydrohémie, cachexie acquise Du cheval. **Rec. Med. Vet. Ec. Alfort**, v.30, p.30-45, 1843.

LIU Q., WANG X.-F., MA J., HE X.-J., WANG X.-J., ZHOU J.-H. Characterization of equine infectious anemia virus integration in the horse genome. **Viruses**, 7, p.3241-3260, 2015.

MA J., SHI N., JIANG C-G., LIN Y-Z., WANG X-F., WANG S., LV X-L., ZHAO L-P., ZHAO L-P., SHAO Y-M., KONG X-G., ZHOU J-H., SHEN R-X. A proviral derivative from a reference attenuated EIAV vaccine strain failed to elicit protective immunity. **Virology**, v.410, p.96-106, 2011.

MARTARANO L., STEPHENS R., RICE N., DERSE D. Equine infectious anemia virus trans-regulatory protein rev controls viral mRNA stability, accumulation, and alternative splicing. **Jornal of Virology**, v.68, n°5, p.3102-3111, 1994.

MAURY, W. Monocyte maturation controls expression of equine infectious anemia virus. **Jornal of Virology**, v.68, p.6270-6279, 1994.

MAURY, W., PERRYMAN S., OAKS L., SEID, B.K., CRAWFORD T., MCGUIRE, T., CARPENTER S. Localized sequence heterogeneity in the long terminal repeats of in vivo isolates of equine infectious anemia virus. **Journal of Virology**, v.71 (7), p.4929-4937, 1997.

MAURY, W., THOMPSON, R.J., JONES Q., BRADLEY S., DENKE T., BACCAM P., SMAZIK, M., OAKS, L. Evolution of the equine infectious anemia virus long terminal repeat during the alteration of the cell tropism. **Journal of Virology**, v.79 (9), p.5653-5664, 2005.

MCGUIRE, T.C., CRAWFORD, T.B., HENSON, J.B. Immunofluorescent localization of equine infectious anemia virus in tissue. **American Journal of Pathology**, v.62, p. 283-294, 1971.

MCGUIRE T.C., LEIB S.R., LONNING S.M., ZHANG W., BYRNE K.M., MEALEY R.H. Equine infectious anaemia virus proteins with epitopes most frequently recognized by cytotoxic T lymphocytes from infected horses. **Journal of General Virology**, 81 (11), p.2735–2739, 2000.

MCGUIRE, T.C., FRASER, D.G., MEALEY, R.H. Cytotoxic T lymphocytes and neutralizing antibody in the control of equine infectious anemia virus. **Viral Immunology**, v.15, p.521-531, 2002.

MELO R.M., CAVALCANTI R.C., VILLALOBOS E.M.C., CUNHA E.M.S., LARA M.C.C.S.H., AGUIAR D.M. Ocorrência de equídeos soropositivos para os vírus das Encefalomyelites e Anemia Infeciosa Equina no estado de Mato Grosso. **Arquivos do Instituto Biológico**, v.79, nº2, p.169-175, 2012.

METCALF, E.S. The role of international transport of equine semen on disease transmission. **Animal Reproduction Science**, v.68, p.229-237, 2001.

Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA). Instrução Normativa Nº 45, de 15 de Junho de 2004. Disponível em: <http://www.cidasc.sc.gov.br/defesasanimariaanimal/files/2012/10/Instrução-normativa-nº-45-Aprova-as-Normas-para-a-Prevenção-e-o-Controle-da-Anemia-Infeciosa-Eqüina-A.I.E.1.pdf>

Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento (MAPA)/ Secretaria de Defesa Agropecuária. Instrução Normativa N° 52, de 26 de novembro de 2018. http://www.in.gov.br/materia/-/asset_publisher/Kujrw0TZC2Mb/content/id/52002092/do1-2018-11-27-instrucao-normativa-n-52-de-26-de-novembr

MONTELARO R.C., LOHREY N., PAREKH B., BLAKENEY E.W, ISSEL C. J. Isolation and comparative biochemical properties of the major Internal polypeptides of equine infectious anemia virus. **Journal of Virology**, v.42, p.1029-1038, 1982.

MONTELARO, R.C., BALL J.M., RUSHLOW K.E. The Retroviridae. In: LEVY, J.A. The viruses. **Plenun Press**, New York, 1993.

NAGARAJAN M.M., SIMARD C. Detection of horses infected naturally with equine infectious anemia virus by nested polymerase chain reaction. **Journal of Virological Methods**, v.94, p.97-109, 2001.

NAGARAJAN M.M., SIMARD C. Gag genetic heterogeneity of equine infectious anemia virus (EIAV) in naturally infected horses in Canada. **Virus Research**, v.129, p228-235, 2007.

NAKAJIMA H., USHIMI C. Immunodiffusion studies of purified equine infectious anemia virus. **Infection and Immunity**, v.3, p.373-377, 1971.

NAVES J.H.F.F., OLIVEIRA F.G., BICALHO J.M., SANTOS P.S., MACHADO-DE-ÁVILA R.A., CHAVEZ-OLORTEGUI C., LEITE R.C., REIS J.K.P. Serological diagnosis of equine infectious anemia in horses, donkeys and mules using na ELISA with a gp45 synthetic peptide as antigen. **Journal of Virological Methods**, 266, p.49-57, 2019.

NOGUEIRA M.F., OLIVEIRA J.M., CARLOS J.S. SANTOS C.J.S., PETZOLD H.V., AGUIAR D.M., JULIANO R.S., REIS J.K.P., ABREU U.G.P. Equine infectious anaemia in equids of Southern Pantanal, Brazil: seroprevalence and evaluation of the adoption of a control programme. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, 37 (3), p.227-233, 2017.

NORCROSS N.L., COGGINS L. Characterization of an equine infectious anemia antigen extracted from infected horse spleen tissue. **Infection and Immunity**, v.4, n°5, p. 528-531, 1971.

OAKS J.L., MCGUIRE T.C., ULIBARRI C., CRAWFORD T.B. Equine infectious anemia virus is found in tissue macrophages during subclinical infection. **Journal of Virology**, v.72, p.7263-7269, 1998.

OAKS J.L., ULIBARRI C., CRAWFORD T.M. Endothelial cell infection in vivo by equine infectious anaemia Virus. **Journal of General Virology**, v.80, p.2393–2397, 1999.

OIE-2019-A. OIE-Listed diseases, infections and infestations in force in 2019. In: World Organisation For Animal Health (OIE). Disponível em: <http://www.oie.int/animal-health-in-the-world/oie-listed-diseases-2019/>

OIE-2018-B. Disease distribution maps. In: World Organisation for Animal Health (OIE). Disponível em: http://www.oie.int/wahis_2/public/wahid.php/Diseaseinformation/Diseasedistributionmap?disease_type_hidden=&disease_id_hidden=&selected_disease_name_hidden=&disease_type=0&disease_id_terrestrial=59&species_t=0&disease_id_aquatic=999&species_a=0&sta_method=semesterly&selected_start_year=2018&selected_report_period=1&selected_start_month=1&date_submit=OK

OIE-2018-C. Disease information. Detailed country (ies) disease incidence. Number of new outbreaks reported. In: World Organisation For Animal Health (OIE).

Disponível em:

http://www.oie.int/wahis_2/public/wahid.php/Diseaseinformation/statusdetail

OIE-2019-D. Chapter 3.5.6 Equine infectious anaemia. OIE Terrestrial manual 2019. World Organisation For Animal Health (OIE). Disponível em: https://www.oie.int/fileadmin/Home/eng/Health_standards/tahm/3.05.06_EIA.pdf

OLIVEIRA F.G., COOK R.F., NAVES J.H.F., OLIVEIRA C.H.S., DINIZ R.S., FREITAS F.J.C., LIMA J.M., SAKAMOTO S.M., LEITE R.C., ISSEL C.J., REIS J.K.P. Equine infectious anemia prevalence in feral donkeys from Northeast Brazil. **Preventive Veterinary Medicine**, 140, p.30-37, 2017.

O'ROURKE K., PERRYMAN L.E., MCGUIRE T.C. Antiviral, anti-glycoprotein and neutralizing antibodies in foals with equine infectious anemia virus. **Journal General Virology**, 69, p.667-674, 1988.

PAREKH B., ISSEL J.C., MONTELARO R.C. Equine infectious anemia virus, a putative lentivirus, contains polypeptides analogous to prototype-C Oncornaviruses. **Virology**, v.107, p.520-525, 1980.

PERRYMAN, L.E., O'ROURKE, K.I., MCGUIRE, T.C. Immune responses are required to terminate viremia in equine infectious anemia lentivirus infection. **Journal of Virology**, v.62, n°8, p.3073-3076, 1988.

PETROPOULOS, C.J. Retroviral taxonomy, protein structures, sequences, and genetic maps. In: Coffin, J.M. (Ed.), **Retroviruses. Cold Spring Harbor Laboratory Press**, New York, p.757, 1997.

OligoAnalyzer 3.1 In: **Integrated DNA Technologies**. Disponível em: <https://www.idtdna.com/calc/analyzer>

QUINLIVAN M., COOK R. F., CULLINNE A. Real-time quantitative RT-PCR and PCR assays for a novel European field isolate of equine infectious anemia virus based on sequence determination of the gag gene. **Veterinary Record**, 160, p.611-618, 2007.

QUINLIVAN M., COOK F., KENNA R., CALLINAN J.J., CULLINANE A. Genetic characterization by composite sequence analysis of a new pathogenic field strain of equine infectious anemia virus from the 2006 outbreak in Ireland. **Journal of General Virology**, v.94, p.612-622, 2013.

REIS J.K.P., DINIZ R. S., HADDAD J.P.A., FERRAZ I.B.F., CARVALHO A.F., KROON E.G., FERREIA P.C.P., LEITE R.C. Recombinant envelope protein (rgp90) ELISA for equine infectious anemia virus provides comparable results to the agar gel immunodiffusion. **Journal of Virological Methods**, v.180, p.62-67, 2012.

Retroviridae. **International Committee on Taxonomy of Viruses (ICTV)** 2018. Disponível em: <https://talk.ictvonline.org/>

ROUS, P. Transmissible avian neoplasm (sarcoma of the common fowl). **Journal of Experimental Medicine**, 12, 696–705, 1910.

RUSHLOW K., OLSEN K., STIEGLER G., PAYNE S.L., MONTELARO R.C., ISSEL C.J. Lentivirus Genomic Organization: The Complete Nucleotide Sequence of the env Gene Region of Equine Infectious Anemia Virus. **Virology**, v.155, p.309-321, 1986.

SANGER F., NICKLEN S., COULSON A. R. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. **Proc. Natl. Acad. Sci, Biochemistry**, v.74, nº12, p.5463-5467, 1977.

SANTOS A.S., SALIS S.M., COMASTRI FILHO J.A. Cavalo Pantaneiro: rústico por natureza. **Embrapa Pantanal**, Brasília, DF, 603p, 2016.

SCHIMIDT H. A., STRIMMER K., HAESLER A. V. TREE-PUZZLE - Maximum likelihood analysis for nucleotide, amino acid, and two-state data, version 5.2, 2004.

SCICLUNA M.T., AUTORINO G.L., COOK S.J., ISSEL C.J., COOK R.F., NARDINI R. Validation of an immunoblot assay, employing an objective reading system, used as a confirmatory test in equine infectious anaemia surveillance programs. **Journal of Virological Methods**, 2019.

SELLON, D.C., PERRY, S.T., COGGINS, L., FULLER, F.J. Wild-type equine infectious anemia virus replicates in vivo predominantly in tissue macrophages, not in peripheral blood monocytes. **Journal of Virology**, v.66, p.5906-5913, 1992.

SELLON D.B., LONG M. T. Equine infectious anemia. In: **Equine infectious diseases**, ISBN 978-1-4557-0891, Elsevier, 2014.

SHARAV T., KONNAI S., OCHIRKHUU N., OCHIR TS E. , MEKATA H., SAKODA Y., UMEMURA T., MURATA S. , CHULTEMDORJ T., OHASHI K. Detection and molecular characterization of equine infectious anemia virus in Mongolian horses. **The Journal of Veterinary Medical Science**, 79 (11), p.1884-1888, 2017.

SHERMAN L., GAZIT A., YANIV A., KAWAKAMI T., DAHLBERG J.E., TRONICK S.R. Localization of sequences responsible for trans-activation of the Equine infectious anemia virus long terminal repeat. **Journal of Virology**, v.62, p.120-126, 1988.

DA SILVA J. S. V., ABDON M. M. Delimitação do Pantanal brasileiro e suas sub-regiões. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, Brasília, 33, p.1703-1711, 1998.

SILVA R.A.M.S, ABREU U.G.P. DE, BARROS A.T.M. DE. Anemia Infeciosa Equina: Epizootiologia, Prevenção e Controle no Pantanal. Corumbá: **Embrapa Pantanal** (Embrapa Pantanal. Circular Técnica, 29), 2001. Disponível em: <https://www.infoteca.cnptia.embrapa.br/bitstream/doc/807376/1/CT29.pdf>.

SILVA R.A.M.S., BARROS A.T.M., NETO A.A.C., LOPES N., CORTADA V.M.C.C., MATSUURA T.M.S.M., FELDENS O., MORI A.E., MADUREIRA J., SANTOS S.A.A.P., BANDINI O. **Programa de Prevenção e Controle da Anemia Infecciosa Equina no Pantanal Sul-Mato-Grossense**. Corumbá: Embrapa Pantanal, ISSN 1517-1973, 68, 2004.

SILVA C.F., PEQUENO N.B., CLEMENTINO I.J., AZEVEDO S.S., SILVA A. Frequência de anemia infecciosa equina em equinos nos estados da Paraíba, Rio Grande do Norte e Ceará durante o ano de 2010. **Brazilian Journal Veterinary Research and Animal Science**, v.50, nº1, p.12-17, 2013.

SPYROU V., PAPANASTASSOPOULOU M., PSYCHAS V., BILLINIS CH., KOUMBATI M., VLEMMAS J., KOPTOPOULOS G. Equine infectious anemia in mules: virus isolation and pathogenicity studies. **Veterinary Microbiology**, v.95, p.49-59, 2003.

STEPHENS R. M., CASEY J. W., RICE N. R. Equine infectious anemia virus gag and pole genes: relatedness to Visna and AIDS virus. **Science**, v.231, p.589-594, 1986.

STUCKY B. J. SeqTrace: A graphical tool for rapidly processing DNA sequencing chromatograms. **Journal of Biomolecular Techniques**, 23, 90-93, 2012.

TAJIMA M., NAKAJIMA H., ITO Y. Electron microscopy of equine infectious anemia virus. **Journal of Virology**, v.4, p.521-527, 1969.

TAMURA K., STECHER G., PETERSON D., FILIPSKI A., KUMAR S. **MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 6.0**, 2013.

TANG H., KUHEN K. L., WONG-STAAAL F. Lentivirus replication and regulation. **Annu. Ver. Genet.**, v.33, p.133-70, 1999.

TELESNITSKY A., GOFF S.P. Reverse Transcriptase and the Generation of Retroviral DNA. In: COFFIN J.M., HUGHES S.H., VARMUS H.E. (Eds.). **Retroviruses, Cold Spring Harbor Laboratory Press**, Cold Spring Harbor, New York, p.263–334, 1997.

THREADGILL D.S., STEAGALL W.K., FLAHERTY M.T., FULLER F.J., PERRY S.T., RUSHLOW K.E., LE GRICE S.T.J., PAYNE S.L. Characterization of equine infectious anemia virus dUTPase: growth properties of a dUTPase-deficient mutant. **Journal of Virology**, v.67, p.2592-2600, 1993.

TIGRE D.M., BRANDÃO C.F., DE PAULA F.L., CHINALIA F.A., CAMPOS G.S., SARDI S.I. Characterization of isolates of equine infectious anemia virus in Brazil. **Archives of Virology**, (3), p.873-877, 2017.

TU Y-B., ZHOU T., YUAN X-F., QIU H-J., XUE F., SUN C-Q., WANG L., WU D-L., PENG J-M., KONG X-G., TONG G-Z. Long terminal repeats are not the sole determinants of virulence for equine infectious anemia virus. **Archives of Virology**, v.152, p.209-218, 2007.

VALLE H., CARRE H. Sur la nature infectieuse de l'anémie Du cheval. **CR Acad. Sci.**, v.139, p.331-333, 1904.

Veterinary Services. Animal and Plant Health Inspection Service. Safeguarding American Agriculture. **United States Department of Agriculture**. 2008. Disponível em:

http://www.aphis.usda.gov/publications/animal_health/content/printable_version/fs_equine_infectious_anemia.pdf

XIA X. DAMBE6: New tools for microbial genomics, phylogenetics and molecular evolution. **Journal of Heredity**, 108 (4), p.431-437, 2017.

WANG X., WANG S., LIN Y., JIANG C., MA J., ZHAO L., LV X., WANG F., SHEN R., KONG X., ZHOU J. Genomic comparison between attenuated Chinese equine infectious anemia virus vaccine strains and their parental virulent strains. **Archives of Virology**, 156 (2), p.353–357, 2011.

WEILAND F., MATHEKA H.D., COGGINS L., HARTNER D. Electron microscopic studies on Equine infectious anemia virus (EIAV). **Archives of Virology**, v.55, p. 335-340, 1977.

WHETTER L., ARCHAMBAULT D., PERRY S., GAZIT A., COGGINS L., YANIV A., CLABOUGH D., DAHLBERG J., FULLER F., TRONICK S. Equine Infectious Anemia Virus Derived from a Molecular Clone Persistently Infects Horses. **Journal of Virology**, v. 64, n°12, p. 5750-5756, 1990.

ZHANG B., JIN S., JIN J., LI F., MONTELARO R.C. A tumor necrosis factor receptor family protein serves as a cellular receptor for the macrophage-tropic equine lentivirus. **PNAS**, v.102, n°28, p.9918-9923, 2005.

ZHANG B., SUN C., JIN S., CASCIO M., MONTELARO R.C. Mapping of equine lentivirus receptor 1 residues critical for equine infectious anemia virus envelope binding. **Journal of Virology**, v.82, p.1204–1213, 2008.

ZHENG Y-H., SENTSU H., KONO Y., IKUTA K. Mutations occurring during serial passage of Japanese equine infectious anemia virus in primary horse macrophages. **Virus Research**, v.68, p.93–98, 2000.

9. PRODUÇÃO CIENTÍFICA

9.1. Participação em eventos

- Participação como ouvinte e apresentação de pôster no II Simpósio de Microbiologia da UFMG – Microbiologia Translacional do Ambiente Natural às Aplicações Biotecnológicas, realizado nos dias 05 e 06 de outubro de 2015 no Auditório Nobre do Centro de Atividades Didáticas (CAD1)/UFMG.
- Participação como ouvinte e apresentação de dados no III Workshop do projeto: Anemia Infeciosa Equina no Pantanal brasileiro: caracterização do agente, diagnóstico molecular, avaliação de práticas de manejo e modelagem quantitativa, realizado pela Embrapa/Pantanal – Corumbá/MS, em março de 2015 em Poconé/MT.
- Participação como ouvinte e palestrante no Curso de reciclagem do Laboratório de vírus/Departamento de Microbiologia/ICB/UFMG, realizado em março de 2016.
- Participação como ouvinte e apresentação de pôster no III Simpósio de Microbiologia da UFMG – Doenças Microbianas Emergentes, realizado nos dias 05 e 06 de setembro de 2016 no Auditório Nobre do Centro de Atividades Didáticas (CAD1)/UFMG.
- Participação como ouvinte e apresentação de dados no IV Workshop do projeto: Anemia Infeciosa Equina no Pantanal brasileiro: caracterização do agente, diagnóstico molecular, avaliação de práticas de manejo e modelagem quantitativa, realizado pela Embrapa/Pantanal – Corumbá/MS, nos dias 27, 28 e 29 de setembro de 2016 em Rio Verde de Mato Grosso/MS.
- Participação como ouvinte e palestrante no Curso de reciclagem do Laboratório de vírus/Departamento de Microbiologia/ICB/UFMG, realizado nos dias 08 e 10 de maio de 2017.
- Participação como ouvinte no II Encontro Científico do Laboratório de Vírus – Comemoração dos 55 anos, realizado no dia 05 de setembro de 2017 Auditório Nobre do Centro de Atividades Didáticas (CAD1)/UFMG.

- Participação como ouvinte no XVIII Congresso Brasileiro de Virologia – XII – Encontro de Virologia Mercosul, realizado entre os dias 06 a 10 de setembro de 2017 na UFMG em Belo Horizonte/MG.
- Participação como ouvinte e apresentação de pôster no IV Simpósio de Microbiologia da UFMG – Metabolismo Microbiano: Saúde, Ambiente e Biotecnologia, realizado nos dias 02 e 03 de outubro de 2017 no Auditório Nobre do Centro de Atividades Didáticas (CAD1)/UFMG.
- Participação como ouvinte e apresentação de pôster no V Simpósio de Microbiologia da UFMG – Professor Eduardo Osório Cisalpino: Desafios atuais no enfrentamento de doenças microbianas, realizado nos dias 05 e 06 de setembro de 2018 no Auditório Nobre do Centro de Atividades Didáticas (CAD1)/UFMG.

9.2. Apresentação de trabalhos em eventos científicos

- Participação como palestrante no Curso de reciclagem do Laboratório de vírus/Departamento de Microbiologia/ICB/UFMG, realizado em março de 2016. Apresentação da palestra Reação em Cadeia da Polimerase e Sequenciamento.
- Participação como palestrante no Curso de reciclagem do Laboratório de vírus/Departamento de Microbiologia/ICB/UFMG, realizado nos dias 08 e 10 de maio de 2017. Apresentação da palestra 'Reação em Cadeia da Polimerase e Sequenciamento'.
- Apresentação de pôster no II Simpósio de Microbiologia da UFMG – Microbiologia Translacional do Ambiente Natural às Aplicações Biotecnológicas, realizado nos dias 05 e 06 de outubro de 2015 no Auditório Nobre do Centro de Atividades Didáticas (CAD1)/UFMG, com o trabalho 'Detecção e caracterização molecular do *Equine infectious anemia virus* em amostras de cavalos provenientes do Pantanal brasileiro'.
- Apresentação de pôster no III Simpósio de Microbiologia da UFMG – Doenças Microbianas Emergentes, realizado nos dias 05 e 06 de setembro de 2016 no Auditório Nobre do Centro de Atividades Didáticas (CAD1)/UFMG, com o trabalho

‘Caracterização molecular e análise filogenética do *Equine infectious anemia virus* em amostras de campo de cavalos do pantanal brasileiro’.

- Apresentação de pôster no XVIII Congresso Brasileiro de Virologia – XII – Encontro de Virologia Mercosul, realizado entre os dias 06 a 10 de setembro de 2017 na UFMG em Belo Horizonte/MG, com o trabalho ‘Detection, molecular characterization and phylogenetic analysis of *Equine infectious anemia virus* of naturally infected horses from the brazilian Pantanal’.
- Apresentação de pôster no IV Simpósio de Microbiologia da UFMG – Metabolismo Microbiano: Saúde, Ambiente e Biotecnologia, realizado nos dias 02 e 03 de outubro de 2017 no Auditório Nobre do Centro de Atividades Didáticas (CAD1)/UFMG, com o trabalho ‘Detection, molecular characterization and phylogenetic analysis of *Equine infectious anemia virus* of naturally infected horses from the brazilian pantanal’.
- Apresentação de pôster no V Simpósio de Microbiologia da UFMG – Professor Eduardo Osório Cisalpino: Desafios atuais no enfrentamento de doenças microbianas, realizado nos dias 05 e 06 de setembro de 2018 no Auditório Nobre do Centro de Atividades Didáticas (CAD1)/UFMG, com o trabalho Caracterização molecular de duas regiões parciais do genoma do *Equine infectious anemia virus* a partir de uma amostra de campo de um cavalo do Pantanal brasileiro.
- Apresentação de pôster no XXIX Congresso Brasileiro de Virologia – XII – Encontro de Virologia Mercosul, realizado entre os dias 17 a 21 de outubro de 2018 Gramado/RS, com o trabalho ‘Partial molecular characterization of two genome regions of *Equine infectious anemia virus* from a field sample of a brazilian pantanal horse’.