

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
ESCOLA DE VETERINÁRIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA ANIMAL**

Bruna Lopes Bueno

**AVALIAÇÃO DOS FATORES DE RESTRIÇÃO RETROVIRAIS E DO
RECEPTOR DE LENTIVÍRUS EQUINO TIPO 1 EM MACRÓFAGOS DE
JUMENTOS E DE CAVALOS INFECTADOS COM O VÍRUS DA ANEMIA
INFECCIOSA EQUINA (EIAV)**

Belo Horizonte
2023

Bruna Lopes Bueno

**AVALIAÇÃO DOS FATORES DE RESTRIÇÃO RETROVIRAIS E DO
RECEPTOR DE LENTIVÍRUS EQUINO TIPO 1 EM MACRÓFAGOS DE
JUMENTOS E DE CAVALOS INFECTADOS COM O VÍRUS DA ANEMIA
INFECCIOSA EQUINA (EIAV)**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito parcial para obtenção do título de Doutor em Ciência Animal.

Orientador: Prof. Dr. Jenner Karlisson Pimenta dos Reis

Coorientadores: Profa. Dra. Érica Azevedo Costa e Prof. Dr. Sidnei Miyoshi Sakamoto

Belo Horizonte
2023

B928a Bueno, Bruna Lopes ,1992 -
Avaliação dos fatores de restrição retrovirais e do receptor de lentivírus equino tipo 1 em macrófagos de jumentos e de cavalos infectados com o vírus da Anemia infecciosa equina (EIAV) / Bruna Lopes Bueno. – 2023.
107f: il

Orientadora: Jenner Karlisson Pimenta dos Reis
Coorientadores: Érica Azevedo Costa
Sidnei Miyoshi Sakamoto

Tese (Doutorado) apresentada à Faculdade de Medicina Veterinária da UFMG, como requisito parcial para obtenção do título de Doutora.
Inclui anexos
Inclui Bibliografias

1- Equino – Doenças - Teses – 2. Anemia infecciosa equina – Teses –
I. Reis, Jenner Karlisson Pimenta dos – II. Costa, Érica Azevedo –
III. Sakamoto, Sidnei Miyoshi - IV. Universidade Federal de Minas Gerais, Escola de Veterinária – V. Título.

CDD – 636.089

Bibliotecária responsável Cristiane Patrícia Gomes CRB 2569
Biblioteca da Escola de Veterinária, UFMG.



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
ESCOLA DE VETERINÁRIA
COLEGIADO DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA ANIMAL

FOLHA DE APROVAÇÃO

BRUNA LOPES BUENO

Tese submetida à banca examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação em CIÊNCIA ANIMAL, como requisito para obtenção do grau de DOUTOR em CIÊNCIA ANIMAL, área de concentração Medicina Veterinária Preventiva.

Aprovado(a) em 14 de junho de 2023, pela banca constituída pelos membros:

Dr.(a). Jenner Karlisson Pimenta dos Reis - Orientador(a)

Dr.(a). Renato Santana de Aguiar

Dr.(a). Camila Pacheco Silveira Martins da Mata

Dr.(a). Luis Lamberti Pinto da Silva

Dr.(a). Ana Paula Ravazzolo



Documento assinado eletronicamente por Jenner Karlisson Pimenta dos Reis, Presidente de comissão, em 15/06/2023, às 18:45, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por Ana Paula Ravazzolo, Usuária Externa, em 27/06/2023, às 10:31, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por Luis Lamberti Pinto da Silva, Usuário Externo, em 04/07/2023, às 23:27, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por Renato Santana de Aguiar, Professor do Magistério Superior, em 07/07/2023, às 09:00, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por Camila Pacheco Silveira Martins da Mata, Usuário Externo, em 09/07/2023, às 16:26, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site https://sei.ufmg.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0, informando o código verificador 2370574 e o código CRC D6A7F738.

*Aos meus filhos Helena e Miguel, o
sentido da minha vida e a razão para que
eu nunca desista de ser alguém melhor
todos os dias.*

AGRADECIMENTOS

Foram quatro anos e meio de muita RESILIÊNCIA, persistência, discussões, aprendizados, choros, risos, derrotas, mas também de muitas vitórias. Sinto uma imensa alegria e gratidão por poder encerrar esse que foi o ciclo mais desafiador da minha vida e, que por vezes pensei em desistir no meio do caminho. Com toda certeza, finalizo com essa tese e com muito orgulho a minha caminhada como discente da Universidade Federal de Minas Gerais.

Contudo, não poderia encerrar esse ciclo sem antes agradecer aqueles que tornaram de alguma forma, esta conquista viável.

Primeiramente a Deus. Nos momentos de total desespero, me mostrou que eu nunca estou só. Obrigado Senhor, pela Tua graça infinita e por todo cuidado. Aos meus filhos, que surgiram no meio desses anos turbulentos de doutorado e pandemia. Helena e Miguel, mais do que qualquer título, vocês com certeza são a minha maior e melhor conquista e agora A MAMÃE É DOUTORA.

Ao meu marido Everson, se existe uma pessoa responsável por eu ter concluído esse doutorado, esse alguém é você, que em todos os momentos que eu cogitei desistir, segurou a minha mão e caminhou comigo, de ficar comigo na madrugada fria da UFMG, a perder metade dos seus sábados dentro de um laboratório, só para não me deixar sozinha.

Aos meus pais Nilson e Luciana, que sempre batalharam comigo, se dedicaram, abdicaram de tempo e de muitos projetos pessoais para que eu tivesse a oportunidade de estudar e de ter uma boa formação profissional. Eu devo tudo o que sou a vocês. Ao meu irmão Matheus, que me rendeu bons momentos de muitas risadas, mesmo sem entender o que eu faço até hoje.

A minha sogra, que cuidou pacientemente e com muito amor do meu filho nesse período final de doutorado, que chegava na minha casa muito cedo e por vezes, saía tarde da noite, me esperando retornar.

A minha família (avós, tios, primos, cunhadas e sobrinho) eu agradeço pelo amor incondicional, pela ausência compreendida, pelas palavras de carinho e por cada vitória comemorada (sempre, com muito festa).

As minhas amigas Amandinha e Aline por vibrarem pelos rumos que a minha vida tomou.

A Grazi que foi essencial para esse trabalho, muito obrigada por me auxiliar com excelência em cada cultura de células, em cada extração e em cada PCR, por ser disponível todas as vezes que precisei, por ser meu ouvido, quando precisei desabafar, por não me deixar desanimar quando tudo desandava, por me atender 1h, 2h, 3h da madrugada para me ajudar com os cálculos de infecção viral e distribuição celular.

A minha antiga família Retrolabiridae, Beca, Cláudia, Fran, Ju, Rapha, Fernanda, Telissa, sou muito grata por todo o ensinamento recebido, por, apesar de estarem super ocupadas com a vida de vocês, se preocuparam e me atenderam todas as vezes que precisei, tiraram minhas dúvidas e me deram diversas dicas. Aos membros atuais do Laboratório de Retrovíruses, apesar do pouco convívio devido a pandemia, obrigada pelo interesse pelo meu trabalho.

Ao professor Jenner e ao professor Rômulo, meu muito obrigada por todas as oportunidades recebidas, pelo crescimento profissional, por todos os puxões de orelha, cobranças de resultados, pelas dicas dadas nas reuniões científicas que me ajudaram a melhorar (e muito) as minhas apresentações e acima de tudo, por acreditarem no meu potencial.

Aos funcionários do Departamento de Medicina Veterinária Preventiva da Escola de Veterinária da UFMG, em especial as técnicas Anna Gabriella e Agda, agradeço a boa vontade que vocês sempre tiveram em me ajudar todas as vezes em que precisei.

As residentes das clínicas de equinos, em especial as residentes Isabela e Lara, obrigada por me auxiliarem nas coletas de sangue e análise clínica dos animais

Aos membros do LPVA que me acolheram e abriram as portas do seu laboratório, me emprestaram reagentes, me ajudaram nos experimentos e compartilharam suas experiências. Em especial, a Bia, que além de tudo, me levou até a Fiocruz para eu conseguir fazer parte dos experimentos que precisava e a Prof. Érica, que sempre se dispôs a me ajudar, todas as vezes que precisei.

A Fiocruz – Centro de Pesquisa René Rachou, por disponibilizar os equipamentos e materiais necessários para realização de uma parte do experimento.

Enfim, A todos que direta ou indiretamente fizeram parte desse trabalho, o meu muito obrigada.

“É justo que muito custe o que muito vale!”

(Santa Tereza D' Avila)

RESUMO

A Anemia Infecciosa Equina (EIA) é uma doença viral, que acomete todos os membros da família Equidae. Apesar disso, os asininos quando infectados são capazes de suprimir os sinais clínicos e manter o título viral abaixo do limiar de provocar doença ao longo de todo período de infecção. Aspectos associados à resposta imune humoral e celular podem estar envolvidos no quadro clínico diferente encontrado em jumentos infectados com o *Equine infectious anemia virus* (EIAV), dentre eles, os fatores de restrição retrovirais (RRFs), proteínas induzíveis por interferons, que limitam alguma etapa do ciclo de replicação viral e a expressão diferenciada do receptor de lentivírus equino tipo I (ELR1) que está associado à entrada do vírus na célula-alvo. Nesse sentido, esse trabalho propôs analisar a expressão dos RRFs APOBEC3, ADAR1, RSAD2, SAMHD1, Mx2, BST2, SERINC e TRIM5 α , bem como comparar a expressão do ELR1 na sua forma funcional e a presença de isoformas solúveis em células mononucleares de cavalos e jumentos infectadas com o EIAV, *in vitro*. Para isso, o sangue total de 3 cavalos e 3 jumentos foram submetidos ao isolamento e cultivo das células mononucleares do sangue periférico (PBMC), seguindo de infecção com a estirpe patogênica EIAVWyo. Nossos resultados demonstraram que o ADAR1 é mais expresso nos equinos, assim como o Mx2. Já os RRFs A3Z3, TRIM5 α e SERINC, são mais expressos nos macrófagos de jumentos quando comparado aos de cavalos. Com relação ao ELR-1, foi observado que macrófagos de jumentos e de cavalos expressam igualmente o receptor ao longo do tempo, porém a isoforma solúvel do receptor (sELR1) é inicialmente mais expressa em macrófagos derivados de monócitos (MDM) de jumentos. Dessa forma, sugerimos que a expressão diferenciada dos RRFs e do sELR1 em MDM de jumentos quando comparado aos de cavalos, pode estar associado ao controle rigoroso da replicação do EIAV nessa espécie.

Palavras-chave: Patogênese, EIAV, fatores de restrição, ELR1, sELR1, macrófagos, jumentos, cavalos.

ABSTRACT

Equine Infectious Anemia (EIA) is a viral disease that affects all members of the Equidae family. Despite this, donkeys, when infected, are able to suppress clinical signs and keep the viral titer below the threshold of causing disease throughout the entire period of infection. Factors associated with the humoral and cellular immune response may be involved in this different issue found in donkeys infected with the *Equine infectious anemia virus* (EIAV), including retroviral restriction factors (RRFs), interferon-inducible proteins that limit some stage of the viral replication cycle and the differentiated expression of the equine lentivirus receptor type I (ELR1) which is associated with virus entry into the target cell. In this sense, this work proposed to analyze the expression of the RRFs APOBEC3, ADAR1, RSAD2, SAMHD1, Mx2, BST2, SERINC and TRIM5 α , as well as to compare the expression of ELR1 in its functional form and the presence of soluble isoforms in mononuclear cells of horses and donkeys infected with EIAV, *in vitro*. For this, whole blood from 3 horses and 3 donkeys were subjected to isolation and culture of peripheral blood mononuclear cells (PBMC), followed by infection with the pathogenic strain EIAV_{Wyo}. Our results demonstrated that ADAR1 is more expressed in horses, as well as Mx2. The RRFs A3Z3, TRIM5 α and SERINC are more expressed in donkey macrophages when compared to horses. With regard to ELR-1, it was observed that macrophages from donkeys and horses equally express the receptor over time, however the soluble receptor isoform (sELR1) is initially more expressed in macrophages derived from monocytes (MDM) from donkeys. Thus, we suggest that the differentiated expression of RRFs and sELR1 in MDM of donkeys when compared to horses, may be associated with the strict control of EIAV replication in this species.

Keywords: Pathogenesis, EIAV, restriction factors, ELR1, sELR1, macrophages, donkeys, horses.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

- Figura 1: Representação esquemática (A) da partícula do EIAV e (B) das proteínas acessórias (Tat, S2 e Rev) e estruturais produzidas a partir de poliproteínas precursoras clivadas por protease (Gag / Pol) ou por endoproteínases (SU / TM), flanqueado nas extremidades por terminais LTR (Fonte: Cook et al., 2013)..... 27
- Figura 2: Análise filogenética sob uma estrutura bayesiana (gerações de 50M) e de Máxima Verossimilhança (500 bootstraps), construída a partir de um alinhamento metagenômico (Fonte: Vilstrup et al., 2013)..... 36
- Figura 3: PCR das amostras de cultura de eMDM e jMDM, proveniente dos 3 cavalos e 3 jumentos doadores de sangue utilizados no estudo, após a infecção pelo EIAV_{Wyo}, in vitro, extração de RNA e síntese de cDNA. Detecção do gene EIAVgag520 24h após a infecção, amplificando um fragmento de 520pb, comprovando a presença do material genético viral na célula-alvo..... 64
- Figura 4: Análise da replicação do EIAV no sobrenadante de cMDM e jMDM. A avaliação por RT-qPCR em tempo real foi realizada a partir do sobrenadante coletado das culturas de células, nos respectivos dias (0, 2 e 7 d.p.i.). Títulos de carga viral do EIAV em cultura de MDM de cavalos ao longo do tempo (barras em preto); Títulos de carga viral do EIAV em cultura de MDM de jumentos ao longo do tempo (barras em cinza). 64
- Figura 5: Representação gráfica da expressão média de mRNA dos RRFs, proveniente da cultura de macrófagos derivados de monócitos, extraídos do PBMC de cavalos e jumentos infectados com o EIAV_{Wyo}, tratados com LPS ou com meio de cultivo RPMI (CC). O eixo x descreve as amostras analisadas e o eixo y indica as expressões relativas do mRNA proveniente dos MDMs de jumentos em relação ao mRNA extraído MDMs dos cavalos, após normalização (log₂) dos fatores ADAR1 (A), Mx2 (B), A3Z3 (C), SERINC (D), TRIM5 (E), A3Z2c-2d (F), BST2 (G), SAMHD1 (H) e RSAD2 (I). *p <0,05. 67
- Figura 6: Resumo da expressão dos RRFs encontrada em macrófagos derivados de monócitos de cavalos e jumentos e suas respectivas ações no ciclo de replicação do EIAV. Em cinza são os RRFs mais expressos em jumentos. A começar pelo TRIM5, que atua na etapa de entrada do capsídeo viral, estimulando o seu desnudamento prematuro, seguindo pela proteína APOBEC3, que induz hipermutações de G para U durante a transcrição do RNA viral em DNA, terminando em SERINC que se liga aos vírions em brotamento e limita as infecções subsequentes. Em branco são os RRFs mais expressos em cavalos. O

Mx2 pode atuar em 3 etapas diferentes do ciclo de replicação viral: Na etapa inicial, degradando o capsídeo viral de maneira precoce (I); bloqueando a ação das nucleoporinas (II) e/ou das transportinas (III), impedindo a integração do material genético viral ao genoma da célula do hospedeiro. Além disso, o ADAR1 também é mais expresso em MDM de cavalos e, atua induzindo hipermutações de A para I, o que ocasiona escape do reconhecimento dos receptores tipo Toll e RIG-1, bem como, aumenta a infecciosidade viral, estimulando a transcrição da região gênica LTR. Fonte: Engelman & Cherepanov, 2012 (adaptado). 68

Figura 6: nPCR para amplificação do gene env, em cultura de MDM de cavalos e jumentos 48h após a infecção das células com a estirpe EIAV_{Wyo}, amplificando um fragmento final de 392pb. CN: cultura de MDM de cavalo cultivada apenas com RPMI. 86

Figura 7: Expressão do receptor ELR1, em cultura de macrófagos derivados de monócitos de cavalos e jumentos infectados com a estirpe patogênica EIAV_{Wyo}. A expressão do ELR1 foi monitorada com 0, 2, 4 e 6 dias após a infecção (d.p.i.). O eixo x descreve os tempos analisados e o eixo y indica as expressões relativas do mRNA proveniente dos MDMs de jumentos em relação ao mRNA extraído MDMs dos cavalos, após normalização (log2). Os dados representam as médias e o desvio padrão da expressão do ELR1 em MDM de cavalos infectados com EIAV ao longo do tempo (barras em preto) e, a média e o desvio padrão do ELR1 em MDM de jumentos infectados com EIAV ao longo do tempo (barras em cinza). 87

Figura 8: Avaliação da expressão da isoforma solúvel do Receptor de lentivírus equino tipo 1 (ELR1) em cultura de macrófagos derivados de monócitos de cavalos comparado a de jumentos infectados com a estirpe patogênica EIAV_{Wyo} (A), em cultura de MDM de cavalos infectados comparado ao controle de macrófagos equinos não infectados tratado apenas com RPMI (Mock) (B), bem como, a cultura de MDM de jumentos infectados comparado ao controle de macrófagos de asininos não infectados tratados apenas com RPMI (C). A expressão do sELR1 foi monitorada com 0, 2, 4 e 6 dias após a infecção (d.p.i.). Os dados representam as médias e os desvio padrão das médias das duas análises. * p < 0,05; ** p < 0,01; *** p < 0,001. 89

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Resumo das respostas encontradas em equinos (<i>Equus caballus</i>) e asininos (<i>Equus asinus</i>) quando infectados experimentalmente com o clone molecular EIAV _{PV} e com a estirpe de campo EIAV _{Wyo}	34
Tabela 2: Perfil hematológico e de proteína plasmática total de cavalos e jumentos imediatamente após o parto, com 24 horas e 7 dias de vida.....	38
Tabela 3: Sequência dos iniciadores utilizados para amplificação dos RRFs e quantificação do EIAV.	60
Tabela 4: Sequência dos iniciadores utilizados para amplificação do receptor ELR1 e sua isoforma solúvel sELR1.	84

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ADAR1: Adenosina desaminase específica de RNA

EIA: Anemia Infecciosa Equina

APOBEC3: Enzima de edição de mRNA da apolipoprotéina B

ASLV-A: *Avian sarcoma leukosis virus*

BST2: Antígeno estromal da medula óssea 2

CAI: Índice de adaptação do códon

cMDM: Macrófago derivado de monócito de cavalos

CR2: Receptor recombinante do complemento tipo II

CRD: Domínios ricos em cisteína

Csfr11: Receptor de fator de crescimento hematopoiético

DRA: Gene DR codificante da cadeia α

EBV: *Epstein-Barr virus*

ECA: *Equus caballus*

ED: Célula imortalizada de derme equina

EIAV: *Equine infectious anemia virus*

EIAV_{17 e 19}: Clone molecular derivados de plasmídeos p19 (baixa virulência) e wenv17 (alta virulência)

EIAV_{PV}: Vírus da anemia infecciosa equina, estirpe pônei patogênica

EIAV_{Wyo}: Vírus da anemia infecciosa equina, estirpe Wyoming

EIV: *Equine influenza virus*

ELISA: Ensaio de imunoabsorção enzimática

ELR1: Receptor de lentivírus equino tipo I

EQMX2: Proteína de resistência a Mixovírus tipo II dos equídeos

ESA: *Equus asinus*

FED: Célula imortalizada de derme fetal equina

FIV: *Feline immunodeficiency virus*

RRF: Fator de restrição retroviral

GenBank: Banco de dados de nucleotídeos público

HDV: *Hepatitis delta virus*

HEK-293T: Cultura de célula imortalizada de rim embrionário humano

HeLa: Célula epithelial humana imortalizada

HIV: *Human immunodeficiency virus*

ICAM-1: molécula de adesão intercelular tipo 1

IDGA: Imunodifusão em gel de ágar

IFN: Interferon

IL: Interleucina

jMDM: Macrófago derivado de monócito de jumentos

LPS: Lipossacarídeo

MDM: Macrófago derivado de monócito

MEM: Meio essencial mínimo

MHC: Complexo de Histocompatibilidade

MOCK: Linha celular de configuração simulada não-infectada (controle negativo)

Mx: Proteína de resistência a Mixovírus

NF- κ B: Fator nuclear kappa B

nPCR: *Nested* PCR

One-Step RT-qPCR: ensaios quantitativos em tempo real de PCR de transcrição reversa

qPCR: PCR quantitativa

RPMI: Meio de cultura celular Roswell Park Memorial Institute

RSAD2: Protéina 2 contendo o domínio radical S-adenosil metionina

RT: Transcriptase reversa

SAMHD1: Domínio SAM e HD contendo desoxinucleosídeo trifosfato trifosfohidrolase tipo I

sELR1: Forma solúvel do Receptor de Lentivírus Equino tipo I

SERINC: Domínio incorporador de serina

SFB: Soro Fetal Bovino

SPEED VAC: Concentrador a vácuo

TNF: Fator de necrose tumoral

TNFR: Receptor do Fator de necrose tumoral

TRIM5: Proteína contendo motivo tripartido 5

VSV: *Vesicular stomatitis virus*

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO GERAL	21
CAPÍTULO 1: Uma revisão sistemática sobre a genômica do gênero <i>Equus</i> correlacionada à patogênese diferenciada da Anemia Infecciosa Equina em cavalos e jumentos.....	24
1.1 Resumo	24
1.2. Importância dos equídeos	24
1.3. Caracterização da Anemia Infecciosa Equina	26
1.3.1 ETIOLOGIA VIRAL.....	26
1.3.2. CICLO DE REPLICAÇÃO VIRAL.....	28
1.3.3. TRANSMISSÃO	29
1.3.4. DIAGNÓSTICO.....	30
1.4. Patogenia comparada da EIA em cavalos e jumentos.....	31
1.5. A genômica por trás da patogenia diferenciada de cavalos e jumentos frente ao EIAV	35
1.6. Conclusões	43
1.6. Referências Bibliográficas	44
CAPÍTULO 2: Análise comparativa da expressão dos fatores de restrição retrovirais em macrófagos de jumentos e de cavalos infectados com o Vírus da Anemia Infecciosa Equina	53
2.1. Resumo	53
2.2. Introdução	53
2.3. Material e Métodos.....	55
2.3.1. DELINEAMENTO EXPERIMENTAL	55
2.3.2. COLETA DAS AMOSTRAS.....	56
2.3.2. OBTENÇÃO DAS CÉLULAS MONONUCLEARES DO SANGUE PERIFÉRICO (PBMC) .	56
2.3.3. TITULAÇÃO E QUANTIFICAÇÃO VIRAL	57
2.3.4. SÍNTESE DOS CONTROLES POSITIVOS DE RNA SINTÉTICO DO EIAV PARA CONSTRUÇÃO DA CURVA PADRÃO	58

2.3.5. INFECÇÃO VIRAL DOS PBMCs PROVENIENTE DO SANGUE DOS JUMENTOS E DOS CAVALOS.....	59
2.3.6. QUANTIFICAÇÃO DOS FATORES DE RESTRIÇÃO EM MDM DE CAVALOS E DE JUMENTOS INFECTADOS COM O EIAV	60
2.3.7. QUANTIFICAÇÃO DO EIAV NO SOBRENADANTE CELULAR DE MDM DE CAVALOS E JUMENTOS	62
2.3.8. ANÁLISE ESTATÍSTICA	62
2.4. Resultados	63
2.4.1. ANÁLISE DA REPLICAÇÃO VIRAL EM MDM DE CAVALOS E JUMENTO	63
2.4.2. AVALIAÇÃO DOS FATORES DE RESTRIÇÃO EM MDM DE CAVALOS E JUMENTOS INFECTADOS COM O EIAV.....	65
2.5. Discussão	68
2.6. Conclusão	74
2.7. Referências Bibliográficas	75
CAPÍTULO 3: Avaliação da expressão do receptor de lentivírus equino tipo 1 em macrófagos de jumentos e de cavalos infectados com o Vírus da Anemia Infecciosa Equina (EIAV).....	80
3.1. Resumo	80
3.2. Introdução	80
3.3. Material e Métodos.....	82
3.3.1. ANÁLISE DA EXPRESSÃO DO RECEPTOR ELR1 E SUA ISOFORMA SOLÚVEL (sELR1) EM MDM DE CAVALOS E JUMENTOS INFECTADOS COM O EIAV	82
3.3.2. ANÁLISE DA EXPRESSÃO DO RECEPTOR ELR1 E SUA ISOFORMA SOLÚVEL (sELR1) 2429 EM MDM DE CAVALOS E JUMENTOS INFECTADOS COM O EIAV.....	83
3.3.5. ANÁLISE ESTATÍSTICA	84
3.4. Resultados	85
3.4.1. AVALIAÇÃO DA INFECÇÃO DO EIAV EM CULTURA DE MDM DE CAVALOS E JUMENTOS	85
3.4.2. ANÁLISE DA EXPRESSÃO DO RECEPTOR ELR1 NA SUA FORMA FUNCIONAL EM MACRÓFAGOS DERIVADOS DE MONÓCITOS DE CAVALOS E JUMENTOS	86

3.4.3. ANÁLISE DA EXPRESSÃO DA ISOFORMA SELR1 EM MACRÓFAGOS DERIVADOS DE MONÓCITOS DE CAVALOS E JUMENTOS	87
3.5. Discussão	89
3.6. Conclusão	92
PERPESCTIVAS FUTURAS.....	96
APÊNDICES	98
ANEXOS	107

INTRODUÇÃO GERAL

A equideocultura é uma atividade ascendente em diversos países do mundo, inclusive no Brasil. Com uma população mundial de aproximadamente 116,7 milhões de equídeos, a importância primária desses animais está diretamente ligada ao rendimento financeiro e à geração de empregos proporcionado pela indústria equídea. No entanto, um grande entrave que vem limitando a expansão da equideocultura são as enfermidades que acometem os animais e trazem grandes prejuízos para os criadores interessados na melhoria das raças (Almeida et al., 2006).

No Brasil, devido às condições geoclimáticas locais, uma das principais doenças que acometem os equídeos é a Anemia infecciosa equina (EIA), uma doença viral, mundialmente distribuída, transmissível e que não possui tratamento e nem vacina eficaz. A EIA acomete todos os membros da família Equidae (equinos, asininos e muares) e é causada pelo *Equine infectious anemia virus* (EIAV), um retrovírus, classificado dentro do gênero *Lentivirus* (Cook et al., 2013).

O curso clínico da EIA é bem documentado em cavalos e se divide em fase aguda, caracterizado por febre, trombocitopenia, letargia e inapetência; fase crônica onde o animal apresenta ciclos de viremia, ocasionando anemia, perda de peso, edema, trombocitopenia com eventuais sinais neurológicos e fase inaparente prolongada, com ausência de sinais clínicos e replicação viral limitada aos tecidos (Cook et al., 2013; Issel et al., 2013)

Assim como os equinos, os muares quando infectados pelo EIAV são sintomáticos (Spyrou et al., 2003). Em contrapartida, os asininos são naturalmente resistentes à manifestação dos sinais clínicos e mantêm o título viral abaixo do limiar de provocar doença, ao longo de todo período de infecção. Além disso, os jumentos têm um ‘atraso’ na soroconversão e apresentam uma expressão diferenciada de citocinas pró-inflamatórias como IL-1, TNF- α e IL-6 (Câmara et al., 2020; Cook et al., 2001; Oliveira, 2016).

Apesar da notável similaridade morfológica, estima-se que o último ancestral comum entre os cavalos e jumentos viveu há aproximadamente 4,5 milhões de anos atrás, desde então, as espécies vêm sendo agrupadas em clados monofiléticos distintos (Vilstrup et al., 2013). Análises dos genomas completos dos equídeos, demonstraram divergências em genes diretamente envolvidos no sistema imunológico e no metabolismo dos animais (Orlando, 2015). Essa evolução independente dos cavalos e jumentos, pode ter alterado a

expressão de componentes importantes do sistema imune entre os animais, como dos fatores de restrição retroviral (RRFs) e das isoformas do receptor ELR-1.

Os RRFs, são sistemas mediados por proteínas frequentemente estimuladas por interferons (IFN), que atuam em alguma etapa do ciclo de replicação viral, limitando ou estimulando a síntese de novas partículas infecciosas (Schoggins, 2014; Schoggins & Rice, 2011). Em equinos, os RRFs APOBEC3, ADAR1, RSAD2, SAMHD1, Mx2 e BST2 já foram descritos com alguma atividade restritiva ou potencializadora do EIAV (Gramberg et al., 2013; Ji et al., 2018; Tang et al., 2014; Tang et al., 2016; Yin et al., 2014a; Zielonka et al., 2009). Todavia, os RRFs SERINC e TRIM5 α , que aparentemente têm algum efeito restritivo sobre o vírus, até o momento, todos estudos são baseados em vírus pseudotipados e cultura de células imortalizadas de rim embrionário humano (HEK-293) (Chande et al., 2016; Stremlau et al., 2005).

Já o receptor ELR1, um membro da superfamília de receptores do fator de necrose tumoral (TNFR), atualmente é o único receptor associado à entrada do EIAV nas células-alvo, monócitos/macrófagos (Leroux et al., 2004; Zhang et al., 2008). Em equinos, além do ELR1 na sua forma funcional, a presença de uma isoforma solúvel (sELR1) permite a ligação do envelope viral à superfície da membrana celular, mas impede as mudanças conformacionais subsequentes que são necessárias para a fusão do EIAV à célula-alvo, exercendo dessa forma, efeitos inibitórios na infecção viral (Lin et al., 2013).

Como *in vitro*, as células de equinos e asininos são igualmente infectadas pelo EIAV (Cook et al., 2001; Oliveira, 2016). Contudo, a expressão diferenciada dos RRFs e do receptor ELR1 nos macrófagos de jumentos quando comparada aos macrófagos de cavalos poderia justificar o eficiente controle da carga viral pelos asininos quando infectadas pelo EIAV.

Nesse sentido, os objetivos desse trabalho foram:

- Comparar o perfil de expressão de mRNA proveniente dos fatores de restrição APOBEC3, ADAR1, RSAD2, SAMHD1, Mx2, BST2, SERINC e TRIM5 α em PBMCs de cavalos e jumentos infectados com o EIAV *in vitro*.
- Detectar a expressão de SERINC e TRIM5 α em macrófagos derivados de monócitos de cavalos e jumentos.
- Identificar a expressão do receptor ELR1 e sELR1 em macrófagos de jumentos, pós infecção pelo EIAV *in vitro*.

- Avaliar a expressão do receptor funcional ELR1 e sua isoforma solúvel sELR1 em macrófagos derivados de monócitos de cavalos e jumentos, ao longo do tempo pós-infecção.

CAPÍTULO 1: Uma revisão sistemática sobre a genômica do gênero *Equus* correlacionada à patogênese diferenciada da Anemia Infecciosa Equina em cavalos e jumentos

1.1 Resumo

A equideocultura é uma atividade ascendente em diversos países do mundo, cuja importância primária está diretamente ligada ao rendimento financeiro e à geração de empregos de forma direta e indireta proporcionado pela indústria equídea. No entanto, um grande entrave que vem limitando a expansão do segmento é a anemia infecciosa equina (EIA), uma doença viral, mundialmente distribuída, transmissível e que não possui tratamento e nem vacina eficaz. Com o curso clínico bem documentado em cavalos e ponês, a EIA é conhecida por desenvolver um quadro inicial agudo caracterizado por febre, trombocitopenia, letargia e inapetência, seguindo de uma fase crônica com ciclos viremia, ocasionando anemia, perda de peso, hemorragias, edema, trombocitopenia e uma fase inaparente prolongada, com ausência de sinais clínicos e replicação viral limitada aos tecidos. Contudo, apesar do EIAV acometer naturalmente todos os equídeos, os asininos de alguma maneira, conseguem suprimir todos os sinais clínicos e manter o título viral abaixo do limiar de provocar doença ao longo de todo período de infecção, além de demonstrarem um ‘atraso’ na soroconversão e uma baixa produção de anticorpos, o que dificulta o diagnóstico precoce dos animais infectados. Apesar da notável similaridade morfológica, geneticamente, cavalos e jumentos são divididos em dois clados distintos dentro do gênero *Equus*. A maioria das variações encontradas entre as espécies, estão em genes envolvidos diretamente no metabolismo energético e na resposta imunológica dos animais. Esse fator poderia justificar a baixa susceptibilidade dos asininos, ao desenvolvimento de sinais clínicos quando acometidos por diversos agentes infecciosos, dentre eles o EIAV.

1.2. Importância dos equídeos

Os cavalos (*Equus caballus*) e os jumentos (*Equus asinus*) são mamíferos ungulados pertencentes a família Equidae e ao gênero *Equus* (Rose et al., 2014). O cruzamento dessas duas espécies resulta em um híbrido estéril, denominado mula/burro, que possui as características morfológicas das duas espécies progenitoras, mas mantém as suas características fisiológicas semelhantes às dos cavalos (Matthews & Van Loon, 2013).

Atualmente, a população mundial de equídeos é de aproximadamente 116,7 milhões de animais, subdivididos em 57,7 milhões de cavalos, 50,4 milhões de jumentos e 8,5 milhões de mulas (FAO, 2019). A maioria destes animais estão concentrados em países em desenvolvimento, garantindo a subsistência de 500 milhões de pessoas, que os utilizam para fins domésticos e comerciais que variam desde a agricultura, construção, turismo, mineração e transporte público (FAO, 2019; Valette, 2015). Apesar disso, a importância primária desses animais está diretamente ligada à movimentação econômica proporcionado pela indústria equídea, que envolve setores ligados a agricultura, negócios, esportes, jogos, entretenimento e recreação (Lima & Cintra, 2016), fazendo da equideocultura um importante componente do agronegócio mundial.

Nos Estados Unidos, que possui atualmente a maior população de equídeos do mundo, a indústria equídea contribui anualmente com cerca de US\$122 bilhões para a economia do país, sustentando aproximadamente 1,74 milhões de empregos (AHCF, 2018). A Irlanda, apesar de ser o sexagésimo maior rebanho de equídeos do mundo é o terceiro maior produtor de puro-sangue, produzindo cerca de €400 milhões por ano para a economia do país, já a França que ocupa a trigésima primeira colocação, com um rebanho de aproximadamente um milhão de animais, possui um volume de negócios anual de aproximadamente €12 bilhões (Gilbert et al., 2018; Jara et al., 2020; Younge & Vial, 2012). Na Austrália, mais de US\$6 bilhões do produto interno bruto (PIB) do país é oriundo da indústria equídea (RIRDC, 2014). A equideocultura canadense, com um rebanho de 398.303 animais, contribui com mais de US\$19 bilhões anuais para a economia nacional e produz aproximadamente 154 mil empregos (Canadian horse industry profile., 2010). Já o Brasil, maior produtor de equídeos da América Latina e quarto maior do mundo, vem arrecadando cerca de R\$16,15 bilhões por ano com a indústria equídea, produzindo cerca de 800 mil empregos diretos e 3,5 milhões indiretos. (Lima & Cintra, 2016).

Mesmo com a relevante importância dos equídeos para a economia mundial, as doenças infecciosas que acometem os animais são um grande obstáculo na expansão da equideocultura por trazerem prejuízos aos proprietários e aos criadores interessados na melhoria das raças e impedir o acesso ao mercado internacional (Almeida et al., 2006). Nesse sentido, a anemia infecciosa equina tem uma grande importância, pois além de trazer grandes prejuízos econômicos, em regiões endêmicas, onde a segregação de animais positivos a uma distância de 200m do restante do rebanho é adotada como uma

alternativa segura à eutanásia (Silva et al., 2001), existe uma preocupação relacionada ao bem-estar animal, uma vez que alguns estudos já relataram a menor capacidade dos equídeos infectados com EIA em realizar atividades de alto impacto como tração, montaria ou carga (Andrade et al., 2018; Benedict, 1999).

1.3. Caracterização da Anemia Infecciosa Equina

Atualmente, a EIA é uma das dezoito doenças que acometem a família Equidae, consideradas de notificação obrigatória pela *World Organisation for Animal Health* (WOAH, 2022), além de ser uma das enfermidades consideradas prioridades dentro dos programas de saúde equídea em todo mundo, devido a sua comum manifestação subclínica, o que garante a manutenção da doença no rebanho e a possibilidade de introdução da mesma em outras subpopulações mediante ao trânsito de animais infectados, porém assintomáticos (Domingues et al., 2015).

A EIA é uma infecção causada pelo *Equine infectious anemia virus* (EIAV), um retrovírus, classificado no gênero *Lentivirus*, de distribuição mundial, transmissível e cuja única forma de controle disponível se dá pela quebra do ciclo de transmissão da doença, através da identificação dos animais positivos, segregação e/ou eutanásia dos mesmos (Reis & Cook, 2014).

1.3.1 Etiologia viral

O EIAV possui aproximadamente 115nm de diâmetro e um capsídeo icosaedro envolvendo o material genético composto de duas cópias de RNA *senso* positivo, não complementares (Figura 1A). Após a ligação do vírus ao receptor da célula hospedeira, a entrada do EIAV pode ocorrer por um mecanismo dependente de pH baixo, utilizando vacúolos revestidos com clatrina ou por um mecanismo independente de pH, onde ocorre a fusão do envelope viral com a membrana celular, seguido da liberação do material genético no citoplasma (Brindley & Maury, 2008). O RNA viral sofre transcrição reversa, mediante a ação da enzima transcriptase reversa, codificada pelo próprio vírus, que sintetiza um DNA de cadeia dupla que migra para o núcleo e se integra ao genoma da célula do hospedeiro, formando o provírus (Poltronieri et al., 2015). O DNA proviral do EIAV possui 8,2 kpb (Cook et al., 2013; Dong et al., 2012), sendo responsável por codificar três proteínas estruturais: gag, pol e env. O gene *gag* sintetiza as proteínas do core viral p26, p15, p11 e p9. O gene *pol* codifica a transcriptase reversa que atua na

síntese de DNA a partir do RNA; a integrase, necessária para a integração do provírus ao genoma do hospedeiro e a protease que é responsável pela clivagem da poliproteína gag e gag-pol. O gene *env* é responsável pela produção de glicoproteínas transmembrana (gp45) e de superfície (gp90), requeridas para a ligação e penetração do vírus na célula hospedeira e que atuam também como potentes imunostimulantes (Li et al., 2005). Além dos genes estruturais, o genoma do vírus codifica três proteínas acessórias: Tat, Rev e S2 que desempenham respectivamente funções reguladoras, de proteção do vírus contra as defesas do hospedeiro e aumento da patogenicidade (Covaleda et al., 2010). O genoma viral é ainda flanqueado nas extremidades por regiões de repetição (LTRs) contendo sequências regulatórias (Craig et al., 2009) (Figura 1B).

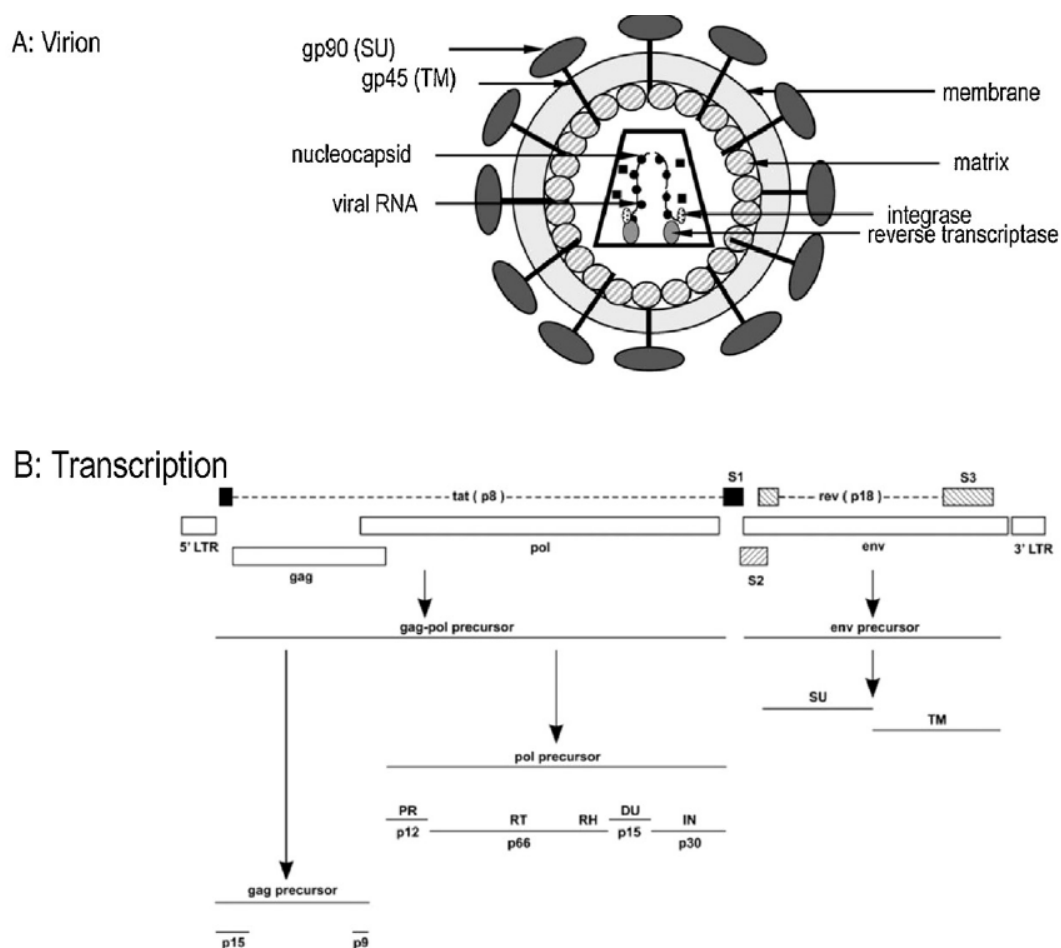


Figura 1: Representação esquemática (A) da partícula do EIAV e (B) das proteínas acessórias (Tat, S2 e Rev) e estruturais produzidas a partir de poliproteínas precursoras clivadas por protease (Gag / Pol) ou por endoproteínases (SU / TM), flanqueado nas extremidades por terminais LTR (Fonte: Cook et al., 2013).

1.3.2. Ciclo de replicação viral

Uma vez no hospedeiro, a infecção retroviral inicia-se quando as glicoproteínas de superfície do vírus (gp90) são reconhecidas e se ligam aos receptores de lentivírus equino tipo 1 (ELR1) que estão presentes na superfície dos monócitos, disponíveis principalmente na corrente sanguínea e medula óssea. Após a ligação, ocorrem mudanças conformacionais tanto no receptor celular quanto na glicoproteína de superfície, permitindo a fusão do envelope viral, seguindo da liberação do capsídeo e desnudamento do material genético do EIAV no citoplasma celular (Lin et al., 2013). No entanto, mesmo sendo as primeiras células-alvo do EIAV e permitir a entrada do vírus, os monócitos não possuem todos os fatores de transcrição necessários para a replicação viral (Evans et al., 2013). Dessa forma, induzido por um processo inflamatório, que causa expressão de citocinas específicas e do receptor de fator de crescimento hematopoiético (Csfr1), os monócitos migram para os tecidos onde se diferenciam em macrófagos ou em células dendríticas, que são capazes de sintetizar as proteínas virais e produzir novos *vírions* (Geissmann et al., 2010; Maury, 1994; Sellon, 1993). Apesar do EIAV infectar inicialmente os monócitos disponíveis principalmente na corrente sanguínea, os principais sítios de replicação viral são os órgãos ricos em macrófagos, como o baço, o fígado e os rins, (Covaleda et al., 2010).

Monócitos/macrófagos são as únicas células descritas *in vivo*, que possuem o ELR1, um membro da superfamília de receptores do fator de necrose tumoral (TNFR) e o único receptor associado a entrada do EIAV nas células-alvo, até o momento (Leroux et al., 2004; Zhang et al., 2008).

O ELR1 é uma proteína transmembrana, formado por quatro domínios ricos em cisteína (CRD1 a CRD4) (Naismith & Sprang, 1998). Estudos demonstraram que uma única leucina (Leu) presente na posição 70, do domínio CRD1 é essencial para a ligação funcional do ELR1 à glicoproteína de superfície (Gp90) do EIAV, enquanto os demais domínios, embora não sejam essenciais, podem influenciar os níveis de ligação do receptor com a Gp90 (Zhang et al., 2008). Todavia, Lin e colaboradores (2013), identificaram na superfície dos monócitos/macrófagos, a presença de uma isoforma predominante funcional do ELR1, contendo 942bp, subdividida em 9 éxons (1-9), bem como, a presença de uma isoforma solúvel (sELR1), contendo uma inserção de 153 nucleotídeos no *ínteron* 6. Enquanto o receptor ELR1 permite a ligação e fusão do envelope viral à superfície da membrana celular, a isoforma sELR1 permite a ligação da gp90 ao receptor, mas impede as mudanças conformacionais subsequentes que são

necessárias para a fusão do EIAV à célula-alvo, exercendo dessa forma, efeitos inibitórios na infecção viral. Além disso, o sELR1 aparece com uma alta frequência em comparação com o transcrito ELR-1 funcional predominante (de 25% a 50%) (Lin et al., 2013; Ma et al., 2014). Posteriormente, um estudo observou que o EIAV regula positivamente a expressão de sELR1, indicando que a presença dessa proteína solúvel atua tanto na infectividade viral quanto na resistência do hospedeiro frente ao vírus (Ma et al., 2014).

1.3.3. Transmissão

Na natureza, a transmissão do EIAV ocorre a partir dos repastos sanguíneos realizados por vetores mecânicos pertencentes ao gênero *Tabanus* e em menor frequência por dípteros das espécies *Hybomitra spp.* ou *Stomoxys spp.* (Hawkins et al., 1976; Issel & Foil, 1984). Para a transmissão ocorrer, é necessário que a alimentação inicial seja suspensa e a mosca encontre um novo hospedeiro para alimentar-se (Issel et al., 2014). O bloqueio do repasto sanguíneo é comum, uma vez que ao voar ao redor dos olhos, pousar na pele e tentar picar, esses insetos induzem nos animais movimentos defensivos da cabeça, orelhas, pele, pernas e cauda (Baldacchino et al., 2013). Contudo, foi observado que 99% das moscas tendem a retornar ao hospedeiro inicial se a sua alternativa estiver a mais de 50 metros de distância (Issel & Foil, 1984). Além disso, o volume de sangue retido no aparelho bucal desses insetos é de 1×10^{-5} mL e o conteúdo viral é de apenas 10TCID₅₀, se o primeiro repasto sanguíneo for realizado em um animal virêmico. Um outro fator limitante é o tempo, uma vez que a infectividade viral no aparelho bucal de um inseto diminui 99% em 1 hora e se torna indetectável após 4 horas (Cook et al., 2013; Reis & Cook, 2014).

Com isso, uma outra forma de disseminação viral muito importante é a iatrogênica, onde o homem atua como o principal vetor, a partir do compartilhamento de agulhas, materiais cirúrgicos ou acessórios de montaria contaminados (Mealey et al., 2005). Estudos demonstram que o volume residual de sangue retido em uma agulha após uma coleta, varia de 0,05 a 0,1 mL, nesse volume a viabilidade do vírus dura cerca de 96 horas (Reis & Cook, 2014). Nesse sentido, a transmissão iatrogênica, vem sendo associada aos recentes surtos da doença em países onde a ocorrência da EIA era baixa, devido a práticas deficientes em biossegurança por parte dos criadores e cuidadores de equídeos durante o manejo dos animais (Oliveira et al., 2017).

Além dessas, outras possíveis rotas de transmissão para EIA se encontram sob investigação. A primeira delas é através da inalação de partículas virais aerossolizadas, após estudos detectarem a presença de antígenos virais no epitélio pulmonar de equídeos

diagnosticados como positivos para EIA. Embora não seja considerada importante em ambientes naturais, tal mecanismo de transmissão em ambientes fechados pode induzir a infecção de animais sadios confinados no mesmo espaço (Bolfá et al., 2013; Bueno et al., 2020; Cook et al., 2013). Uma segunda via de disseminação seria por transmissão vertical seja por via uterina / perinatal ou após a ingestão de colostro infectado, porém, recentemente foi demonstrado que a transmissão do EIAV de mães soropositivas para potros é um evento infrequente quando as éguas se encontram assintomáticas, indicando um risco muito baixo de transmissão viral do desenvolvimento no útero até o desmame completo (Câmara et al., 2020; Resende et al., 2022).

1.3.4. Diagnóstico

O método oficial para o diagnóstico da EIA é o teste sorológico de Imunodifusão em Gel de Ágar (IDGA) ou teste de Coggins (Coggins et al., 1972), capaz de detectar a presença de anticorpos contra a proteína viral p26 (Brasil, 2004; OIE, 2019). O IDGA é considerado um teste altamente específico e já provou estar correlacionado com a presença do vírus no animal (Coggins et al., 1972). No entanto, a necessidade de concentrações de anticorpos relativamente altas para formar linhas visíveis de precipitação, torna o IDGA pouco sensível, produzindo 17% de resultados falso-negativos quando utilizado como teste único no diagnóstico da EIA (Issel et al., 2013; Oliveira et al., 2017; Scicluna et al., 2013).

Para minimizar os resultados errôneos, atualmente, o diagnóstico da EIA vem sendo executado como testes em série (Brasil, 2018; OIE, 2019). O Ensaio de Imunoabsorção Enzimática (ELISA), devido a sua alta sensibilidade é utilizado como teste de triagem e os animais diagnosticados como positivos são novamente testados pelo método de IDGA (Brasil, 2018).

Vários ELISAs vêm sendo padronizados *in-house*, para a detecção de anticorpos do hospedeiro frente às proteínas virais. Tendo em vista que o controle da carga viral plasmática é exercido, dentre outros fatores, pela presença de anticorpos frente as glicoproteínas de superfície (gp90), transmembrana (gp45) e proteína do core viral (p26) (Hammond et al., 1999), esses imunógenos virais vêm sendo constantemente alvos dos testes de ELISA padronizados no Brasil e, alguns já mostraram maior sensibilidade do que o IDGA para o controle eficiente da EIA no país (Naves et al., 2018; Reis et al., 2012). Apesar de atualmente, já existir um teste nacional comercialmente disponível, a exigência de se retestar um animal positivo no ELISA pelo teste de IDGA e nos casos discordantes entre ambos os testes, prevalecer o resultado do IDGA (Cursino et al 2019),

torna o ELISA, um teste ainda dispendioso, e nos dias atuais, vem sendo mais utilizado para fins de monitoramento associados à presença de animais subclínicamente infectados nas propriedades em inquéritos soroepidemiológicos.

Alguns países como os Estados Unidos, a Irlanda e a Itália, tem adotado o diagnóstico em três níveis para detecção da EIA. Nesse caso os testes de ELISA são utilizados para rastreamento de foco, o IDGA é utilizado como teste confirmatório e em caso de resultados discordantes, o ensaio de immunoblot é utilizado como um terceiro teste, fechando assim o diagnóstico final (Issel et al., 2014).

Porém, um dos grandes problemas de usar apenas testes sorológicos para o diagnóstico de EIA é que existe uma “janela imunológica”, que se refere ao tempo após a infecção e antes da soroconversão. Normalmente, este período é geralmente inferior a 45 dias, todavia períodos de até 157 dias já foram relatados (Cullinane et al., 2014). Durante este período, as cargas virais associadas ao sangue atingem seus níveis mais elevados, maximizando o risco de transmissão (Cook et al., 2013). Além disso, estudos já relataram que alguns equídeos quando infectados, estabelecem infecções sorologicamente silenciosas, onde o material genético viral é detectado, mas por um mecanismo ainda não elucidado, a replicação viral não estimula uma resposta imune humoral detectável (Ricotti et al., 2016).

Nesse sentido, alguns testes moleculares baseados em reações em cadeia da polimerase (PCR) para detecção do material genético viral no sangue dos equídeos, foram descritos e avaliados como um possível método de diagnóstico promissor (Cappelli et al., 2011; Dong et al., 2012; Quinlivan et al., 2013). Entretanto, a necessidade de oligonucleotídeos destinados a regiões altamente conservadas do genoma viral, a escassez de informações acerca da variabilidade genética mundial do EIAV e a presença de portadores inaparentes que comumente mantém as cargas virais abaixo do limite de detecção dos ensaios de PCR, inviabiliza o uso dos métodos moleculares para o diagnóstico da EIA (Capomaccio et al., 2012; Craig & Montelaro, 2013).

1.4. Patogenia comparada da EIA em cavalos e jumentos

O curso clínico da doença é bem documentado em cavalos e se divide em três fases: fase aguda, com um pico de viremia associado ao plasma, 3 a 5 semanas pós infecção, promovendo febre, trombocitopenia, letargia e inapetência, fase crônica onde o animal apresenta viremia recorrente e ciclos de anemia, perda de peso, edema, trombocitopenia com eventuais sinais neurológicos e fase inaparente prolongada, com

ausência de sinais clínicos e viremia comumente não detectável, no qual os animais infectados desenvolvem uma resposta imune amplamente robusta, limitando a replicação viral e reduzindo drasticamente a carga viral associada aos tecidos (Issel et al., 2014; Sellon, 1993; Leroux et al., 2004; Montelaro et al., 1993; Dong et al., 2012; Oaks et al., 1999).

Os achados clínico-patológicos e laboratoriais demonstraram que os muare quando infectados pelo EIAV desenvolvem sinais clínicos semelhantes aos observados em cavalos e pôneis (Spyrou et al., 2003). Em contrapartida, Cook et al., (2001) ao realizarem uma infecção experimental em equinos e asininos com o clone molecular altamente patogênico do EIAV (EIAV_{PV}), observaram que os equinos desenvolviam uma queda acentuada na quantidade de plaquetas e recorrentes episódios febris, o que resultou em anorexia e depressão. Além disso, um dos animais infectados desenvolveu um quadro de caquexia e uma queda de 22% do hematócrito. Já os asininos infectados nas mesmas condições e com a mesma estirpe patogênica permaneceram clinicamente saudáveis. Nesse mesmo estudo, um novo grupo de cavalos e jumentos foram infectados experimentalmente, dessa vez, com a estirpe de campo EIAV_{wyo}, nesse caso, enquanto os cavalos desenvolveram uma grave trombocitopenia, febre aguda, edema generalizado nos membros inferiores e hemorragias petéquias na mucosa oral, os jumentos apresentaram apenas um declínio transitório de 14% na quantidade de plaquetas (Cook et al., 2001).

Alguns estudos demonstraram que equinos quando infectados experimentalmente com o clone molecular EIAV_{PV} estabelecem uma viremia plasmática infecciosa de alto título entre 10 e 21 dias após a infecção, onde a quantidade de vírus circulante no plasma dos animais é diretamente proporcional à gravidade dos sinais clínicos (Cook et al., 2001; Hammond et al., 1997). Com o tempo, o título viral reduz drasticamente após a intervenção de uma resposta imune específica do hospedeiro mediada por fatores humorais, especialmente com o aumento da avidéz dos anticorpos anti-EIAV, e celulares (Sellon et al., 1994). Em contrapartida, os jumentos quando infectados experimentalmente nas mesmas condições não estabeleceram viremia detectável antes de 32 dias após a infecção (Cook et al., 2001). Curiosamente, utilizando ensaios moleculares de PCR quantitativa em tempo real, Cook et al., (2001) observaram que quando cavalos e jumentos eram infectados experimentalmente com a estirpe de campo EIAV_{wyo}, o material genético viral era detectado no plasma de ambas as espécies

6 dias após a infecção, entretanto os níveis de RNA viral detectado nos cavalos era 40 vezes maior que nos jumentos. Uma segunda análise realizada 20 dias após a infecção demonstrou que, o título viral no plasma dos cavalos infectados aumentou 1000 vezes, quando comparado ao título detectado com 6 dias após a infecção, enquanto nos jumentos, esse aumento foi de apenas 4 vezes, indicando que, os jumentos mantem um rigoroso ‘controle’ sobre a replicação viral (Cook et al., 2001).

Ainda nesse sentido, o tempo de desenvolvimento e maturação da resposta humoral específica frente ao EIAV em cavalos e jumentos também se diferem. A presença de anticorpos específicos contra as proteínas virais do envelope (gp90 e gp45) e do capsídeo (p26), que são as principais proteínas imunogênicas do EIAV, foram detectadas em equinos experimentalmente infectados com a estirpe EIAV_{PV}, cerca de 21 dias após a infecção inicial (Cook et al., 2001; Hammond et al., 1997), com o tempo, o título dos anticorpos específicos aumentam gradualmente, atingindo os maiores valores entre 50-70 dias após a infecção inicial. Todavia, quando os cavalos são infectados experimentalmente com a estirpe de campo EIAV_{Wyo}, a detecção de anticorpos específicos frente as proteínas virais são observadas 14 dias após a infecção inicial (Cook et al., 2001). Em animais naturalmente infectados, a presença de anticorpos específicos frente ao EIAV é observada em aproximadamente 45 dias após a infecção, com alguns casos incomuns, cuja detecção ocorreu após 119 dias (Reis & Cook, 2014). No entanto, esse período de soroconversão nos animais de campo são baseados em resultados apresentados pelo teste de Imunodifusão em gel de ágar (IDGA), mas sabendo que esse método é muito específico, mas pouco sensível, acredita-se que esse período de soroconversão seja menor do que o observado (Issel et al., 2013). Já em asininos experimentalmente infectados com a estirpe EIAV_{PV}, a detecção de anticorpos específicos frente a proteína p26 foi detectada após 42 dias de infecção, contudo, esses animais só produziram anticorpos detectáveis frente a proteína viral gp45, 63 dias após a infecção inicial. Além disso, quando os asininos são infectados com a estirpe de campo EIAV_{Wyo}, a soroconversão é mais rápida, e em 18 dias após a infecção os anticorpos frente as proteínas virais já são observados, mas em níveis 5 vezes menor que quando comparado aos cavalos (Cook et al., 2001) (Tabela 1).

Tabela 1: Resumo das respostas encontradas em equinos (*Equus caballus*) e asininos (*Equus asinus*) quando infectados experimentalmente com o clone molecular EIAV_{PV} e com a estirpe de campo EIAV_{Wyo}.

Parâmetros analisados	EQUINOS (<i>Equus caballus</i>)		ASININOS (<i>Equus asinus</i>)		
	Infecção com o EIAV _{PV}	Infecção com o EIAV _{Wyo}	Infecção com o EIAV _{PV}	Infecção com o EIAV _{Wyo}	
Período de observação (dias)	365	20	365	365	
Sinais clínicos	Febre	Febre			
	Queda na quantidade de plaquetas	Queda na quantidade de plaquetas	Declínio transitório na quantidade de plaquetas	Declínio transitório na quantidade de plaquetas	
	Anorexia	Edemas nos membros inferiores			
	Depressão	Petéquias na mucosa oral			
Primeira detecção do vírus (d.p.i.)	10 a 21	7	32	7	
Método de detecção do vírus	Isolamento em células FEK	qPCR em tempo real	Isolamento em células FEK	qPCR em tempo real	
Título viral (TCID ₅₀ /ml)	Primeira detecção	3,52x10 ^{5 a,b}	1,6x10 ⁵	<100	4,0x10 ⁴
	20 d.p.i.	7,1x10 ^{5 a,b}	1,9x10 ⁸	4,5x10 ^{2,5 a,b}	1,7x10 ⁵
Tempo para soroconversão (d.p.i.)	ELISA p26	21-28	14	42	18
	ELISA gp45	21	14	63	18
	IDGA p26	21	NF	49	NF

Imunoblot	28	14	28	14
------------------	----	----	----	----

NF: Não foi realizado IDGA para cavalos e jumentos infectados com EIAV_{wyo}.

a: A primeira detecção viral pelo teste de qPCR em tempo real para cavalos infectados com EIAV_{pv} foi com 15 d.p.i., mas nesse mesmo período não houve detecção para jumentos, que só foi primeiramente observada com 20 d.p.i.

b: Média dos níveis virêmicos.

Fonte: (Cook et al., 2001).

1.5. A genômica por trás da patogenia diferenciada de cavalos e jumentos frente ao EIAV

Cavalos, jumentos e zebras são classificados na classe Mammalia, ordem Perissodactyla, família Equidae e em um único gênero, *Equus*, que emergiu a cerca de 4 – 4,5 milhões de anos (m.a.) (Orlando et al., 2009). Atualmente, baseado em análises metagenômicas, o gênero *Equus* é subdividido em uma linhagem caballine, formada por um grupo monofilético contendo cavalos domésticos (*E. caballus*) e selvagens (*E. ferus* ou *E. przewalskii*), bem como, uma linhagem não-caballine, representado pelos asnos selvagens africanos (*E. africanus*), asiáticos (*E. hemionus* e *E. kiang*) e o progenitor do jumento doméstico (*E. asinus*), juntamente com as zebras das planícies (*E. quagga*), as zebra de Grevy (*E. grevyi*) e duas subespécies de zebras da montanha, localizadas na África do Sul (*E. z. zebra*) e sudoeste da Angola/oeste de Namíbia (*E. z. hartmannae*) (Vilstrup et al., 2013)(Figura 2). Embora atualmente, os equídeos sejam uma das famílias mais estudadas devido ao seu rico registro fóssil, a sucessão de eventos que deu origem à diversidade de espécies existentes permanece incerta (Jónsson et al., 2014).

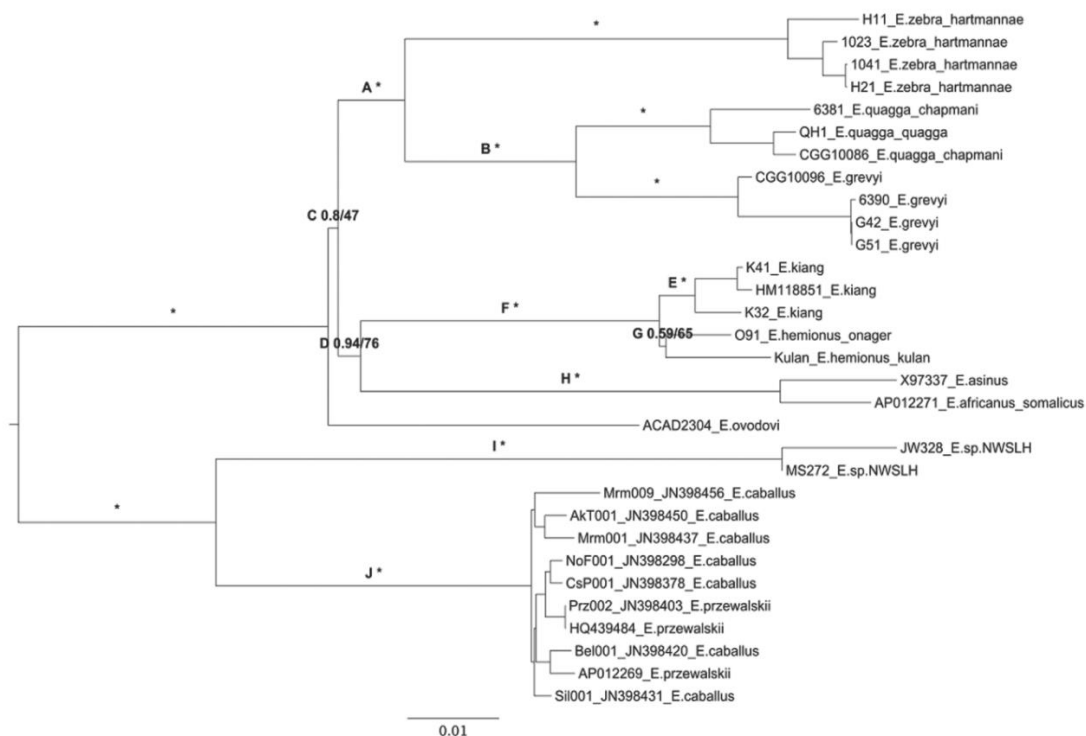


Figura 2: Análise filogenética sob uma estrutura bayesiana (gerações de 50M) e de Máxima Verossimilhança (500 bootstraps), construída a partir de um alinhamento metagenômico (Fonte: Vilstrup et al., 2013).

Os equídeos exibem frequentemente cariótipos muito divergentes: enquanto os jumentos (EAS) dispõem de 31 pares de cromossomos, os cavalos (ECA) apresentam 32 (Bailey & Binns, 1998; Jónsson et al., 2014). Um fator chave envolvido na rápida evolução cariotípica desse gênero foi o reposicionamento do centrômero evolutivo, ocasionando eventos de fusão durante a evolução dos equídeos, desenvolvendo nos jumentos cromossomos ortólogos quando comparados aos cavalos (Carbone et al., 2006; Musilova et al., 2013; Piras et al., 2009). Estima-se que pelo menos oito eventos de reposicionamento dos centrômeros ocorreram nos últimos 3 m.a. no gênero *Equus* e pelo menos seis desses rearranjos estão presentes em asininos, incluindo processos de *crossing-over* entre os cromossomos ECA20/EAS8, ECA14/EAS9, ECA17/EAS11, ECA22/EAS15 (Carbone et al., 2006; Huang et al., 2015; Renaud et al., 2018).

Em se tratando da genômica, Jónsson et al. (2014) observaram na linhagem ancestral dos *E. asinus*, cerca de 58 mutações em microRNAs, quando comparado aos *E. caballus*. Além disso, dentro do gênero *Equus* foram detectadas mutações com seleção positiva em quarenta e oito genes diretamente envolvidos no metabolismo, interações

celulares, tráfego de substâncias, olfato e imunidade. Das mutações observadas, dezessete estão diretamente envolvidas com a evolução dos asininos em comparação aos equinos (Burden & Thiemann, 2015). Parte dessas mutações estão envolvidas em um conjunto de genes que induzem uma eficiente digestão de fibras em dietas de baixa qualidade nutricional, bem como uma maior produção de ácidos graxos voláteis e à reciclagem aprimorada de ureia, diferentemente dos cavalos (Faurie & Tisserand, 1994; Suhartanto et al., 1993; Wood, 2010). Mutações adicionais foram observadas nos genes ITIH4 e SIGLEC1 que estão diretamente envolvidos na resposta inflamatória ao trauma e na interações célula-célula (Lima-camara, 2016; Lisowski et al., 2020).

Em jumentos, estudos pontuais descreveram também polimorfismos em genes que estão diretamente envolvidos na resposta imunológica do hospedeiro, como é o caso de genes codificantes do complexo principal de histocompatibilidade da classe II (MHC-II), que são responsáveis por desencadear o início da resposta imune adaptativa (Vranova et al., 2011). Atualmente, o sistema MHC dos equídeos é dividido em *classe I* (MHC-I) presente em células nucleadas e responsáveis pela ativação de células TCD8+ citotóxicas, *classe II* (MHC-II) expresso principalmente em células dendríticas, macrófagos e células B, que atuam na ativação de células T CD4+ auxiliares e por fim, *classe III* (MHC-III) que não possui uma estrutura e função bem estabelecida na resposta imune do hospedeiro (Wieczorek et al., 2017). Todas as classes de MHCs são sintetizadas mediante a expressão de um complexo do gene do antígeno leucocitário equino (ELA), enquanto o MHC-I é formado pelas regiões ELA -A, -B, -C, -E, -F e -G, o MHC-II é produzido pelos genes ELA -DR, -DP, -DQ, -DO e -DM (Gobin & Van den Elsen, 2000; Kropshofer et al., 1999; Wieczorek et al., 2017). Os genes que codificam os receptores MHCs são altamente polimórficos, devido à necessidade de reconhecimento e ligação dos receptores a diversos antígenos peptídicos (Wieczorek et al., 2017); contudo, para garantir a funcionalidade do receptor, algumas regiões gênicas são pouco variáveis em algumas espécies de mamíferos, como é o caso do gene DR codificantes da cadeia α (DRA), expressos em MHC-II (Handunnetthi et al., 2010). Apesar disso, no gênero *Equus*, a região gênica DRA exibe um nível relativamente alto de polimorfismo interespecies, especialmente em asininos, que apresentam um único locus DRA com pelo menos sete alelos distintos, identificados até o momento e uma taxa de substituições não sinônimas 1,9 vezes maior do que as substituições sinônimas. Além disso, em comparação à sequência DRA de humanos, foi observado a presença de nove sítios polimórficos, sendo 5 sinônimos e 4

não sinônimos, divergindo dos padrões de polimorfismo típico dos mamíferos (Arbanasić et al., 2013; Janova et al., 2009). O complexo principal de histocompatibilidade do cavalo está localizado no cromossomo ECA 20 (Gustafson et al., 2003). Alguns estudos descrevem que o polimorfismo encontrado no locus DRA é um reflexo a adaptação dos asininos a condições climáticas adversas, com diferentes níveis de cuidados gerais e de saúde associados à reprodução seletiva (Trowsdale & Parham, 2004; Vranova et al., 2011).

Ainda nesse sentido, parâmetros hematológicos como o volume de neutrófilos, linfócitos, eosinófilos, basófilos e monócito que estão diretamente envolvidos na resposta imunológica do hospedeiro, são diferenciados entre os asininos e os equinos (Tabela 2). Em ambas as espécies, os valores de neutrófilos e linfócitos tendem a aumentar gradativamente até a vida adulta, contudo os asininos apresentam menores taxas de neutrófilos segmentados e maior quantidade de linfócitos desde o seu nascimento, quando comparado aos equinos (Axon & Palmer, 2008; Vranova et al., 2011).

Tabela 2: Perfil hematológico e de proteína plasmática total de cavalos e jumentos imediatamente após o parto, com 24 horas e 7 dias de vida.

Variável	Após o parto		24 horas		7 dias	
	Cavalo	Jumento	Cavalo	Jumento	Cavalo	Jumento
Hematócrito (%)	40-52	38,7-51,9	32-46	38,6-43,6	28-43	26,7-37,2
Hemoglobina (g/dL)	13,4-19,9	17,4-19	12-16,6	12,9-17	10,7-15,8	10,4-15,3
Hemácia (x10 ⁶ /μL)	9,3-12,9	8,1-11,7	8,2-11	7,4-10,15	7,4-10,6	7,1-7,8
VCM (fL)	37-45	42,5-50,1	36-46	43-48,7	35-44	43-47,8
Leucócitos totais (x10 ³ /μL)						

Neutrófilos	5,5-12,38	3,6-7,6	3,36-9,57	2,9-6,7	4,35- 10,55	4,6-7,7
Linfócitos	-	0,8-2,1	0,67-2,17	1,1-3,1	1,4-2,3	2,1-3,4
Eosinófilos	-	0,02-0,1	0-0,02	0,01-0,2	0-0,09	0,03-0,11
Basófilos	-	0,03-0,11	0-0,03	0,01-0,1	0-0,2	0,02-0,08
Monócitos	-	0,04-0,18	0,07-0,3	0,07-0,21	0,03-0,54	0,2-0,35
PPT (g/dL)	4,4-5,9	3,2-6,6	5,2-8	3-6,25	5,2-7,5	4,2-6,4

VCM: volume corpuscular médio; PPT: proteína plasmática total.

Fonte: (Ricchio et al. 2019; Veronesi et al. 2014)

As funções imunológicas representam um dos principais componentes da aptidão de um organismo e determinam o potencial para interações evolutivas com patógenos ou com outras espécies (Lazzaro & Little, 2009). A diversidade de genes importantes para as funções imunológicas pode estar associada à resistência e suscetibilidade a patógenos (Vranova et al., 2011).

Com relação ao EIAV, sabe-se que uma vez no hospedeiro, o vírus tem tropismo pela linhagem tecidual de monócitos-macrófagos (Geissmann et al., 2010; Oaks et al., 1998; Sellon et al., 1992). Alguns estudos demonstraram que os macrófagos derivados de monócitos (MDMs) de equinos e asininos são igualmente suscetíveis à infecção pelo EIAV *in vitro* (Cook et al., 2001; Oliveira, 2016). No entanto, Lim et al., (2005) observaram que quando os MDMs de equinos são infectados com um clone molecular do EIAV altamente virulento (EIAV₁₇), ocorria um aumento na expressão das interleucinas (IL) 1 α , 1 β , 6, 10 e do fator de necrose tumoral - α (TNF- α), mas, quando a infecção celular era realizada com um clone molecular de baixa virulência (EIAV₁₉), apenas a citocina IL-1 β tinham seus níveis de expressão alterados. Em contrapartida, Oliveira (2016), demonstrou que a infecção de MDMs de jumentos, com clones moleculares do EIAV de patogenicidades diferentes, não alteram significativamente a expressão de citocinas pró-inflamatórias; contudo, quando essas células são infectadas com a estirpe de campo EIAV_{Wyo}, ocorre uma variação da expressão de citocinas pró e anti-inflamatórias TNF- α , IL-1 α e IL-6, IL-10, bem como, da citocina anti-viral interferon- β (IFN- β). Além disso, foi observada uma tendência dos MDMs de jumentos quando

infectados com o EIAV_{wyo}, em apresentar inicialmente uma maior expressão de IL-1 α e IL-6 e uma menor expressão de TNF- α , com o passar do tempo, enquanto que MDMs de cavalos tendem a aumentar a expressão de IL-6 e diminuir a expressão de IL-1 α em comparação aos MDMs de jumentos.

Os sinais clínicos associados à fase aguda da EIA são mediados pela expressão de diversas citocinas pró-inflamatórias, que são liberadas quando a carga viral no plasma, atinge limiares entre 5×10^7 a 1×10^8 cópias RNA/ml (Cook et al., 2003). Enquanto, IL-6 e o TNF- α estão envolvidos diretamente do desenvolvimento de febre e anemia nos equídeos infectados, ativando a via araquidônica para aumentar a produção de prostaglandina E2 (PGE2) e promovendo uma regulação negativa da eritropoiese (Dufour et al., 2003; Felli et al., 2005), o TGF- β e o IFN- α atuam principalmente na supressão de plaquetas circulantes, por inibição do crescimento dos megacariócitos (Tornquist & Crawford, 1997).

A expressão aumentada de IL-1 e TNF- α pode exacerbar a anemia mediada pelo EIAV ativando macrófagos e neutrófilos, aumentando a fagocitose de eritrócitos revestidos de complemento, suprimindo a eritropoiese ao diminuir a produção de eritropoietina e desregulando o metabolismo do ferro (Felli et al., 2005; Reis & Cook, 2014). Todavia, em MDMs infectados, o aumento inicial da expressão de IL-1 induz a potencialização da diferenciação e ativação de outras células relacionadas ao sistema imune, sugerindo um importante papel dessa citocina pró-inflamatória na resposta inicial à infecção. Já, a baixa expressão de TNF- α , pode explicar a ausência de sinais clínicos nos asininos quando infectados pelo EIAV (Akdis et al., 2011; Lim et al., 2005). Por outro lado, o aumento da expressão de IL-6 em MDMs de cavalos, pode estar relacionado à regulação da resposta imune de fase aguda, hipergamaglobulinemia e ativação de células B, aumentando conseqüentemente a concentração sérica de imunoglobulinas M (IgM) e induzindo a formação de complexos imunes, incluindo anemia hemolítica, glomerulonefrite e hepatite, comumente encontrado, a longo prazo, em animais infectados pelo EIAV (Covaleda et al., 2010; Russell et al., 1998).

Além da expressão diferenciada de citocinas em MDMs de cavalos e jumentos quando infectados pelo o EIAV, divergências encontradas em genes envolvidos em outros componentes importantes do sistema imune, podem estar associados à maior resistência dos asininos a infecção pelo vírus, por exemplo, a diferente expressão de Fatores de Restrição Retroviral (RRF) entre equinos e asininos. Os RRFs, são sistemas mediados

por proteínas frequentemente estimuladas por IFNs, que atuam em alguma etapa do ciclo de replicação viral, limitando a síntese de novas partículas infecciosas (Schoggins, 2014; Schoggins & Rice, 2011).

O antígeno 2 do estroma da medula óssea (BST2), conhecido popularmente como teterina é um RRF glicosilado, formado por um domínio transmembranar N-terminal (TM) e uma âncora de glicosilfosfatidilinositol C-terminal (Hinz et al., 2010) A teterina atua por um mecanismo de ‘amarração’, interagindo com o envelope viral e retendo os *vírions* em brotamento na membrana celular (Perez-Ecija & Mendoza, 2017; Venkatesh & Bieniasz, 2013). Recentemente foi relatado que a teterina também atua como um sensor inato para ativar o NF- κ B, que promove a expressão de diversos genes pró-inflamatórios (Galão et al., 2012). Nesse sentido, Yin et al., (2014b), descreveram a presença de dois ortólogos da teterina, sendo um codificado por cavalos e outro por jumentos. A teterina expressa em macrófagos de jumentos apresenta três deleções de aminoácidos valina no domínio transmembrana e outras três mutações ao longo do ectodomínio; contudo, a deleção e substituição de aminoácidos não alterou a atividade antiretroviral desse RRF. Além disso, a teterina expressa nas células de cavalos e jumentos são igualmente sensíveis à proteína de envelope do EIAV e ativam igualmente a sinalização de NF- κ B (Yin et al., 2014b). Um segundo estudo demonstrou que a eficácia da atividade de restrição da teterina de jumentos é dependente da virulência da estirpe infectante, ou seja, quanto menos virulenta for a estirpe infectante, mais forte é o efeito da teterina sobre ela, da mesma forma, quanto mais virulenta for a estirpe infectante, maior o efeito de antagonização sobre a teterina (Yao et al., 2017).

A enzima de edição de mRNA da apolipoproteína B (APOBEC3), pertence à família de proteínas citidina desaminases (CDA) e podem atuar sobre a replicação viral por um mecanismo dependente de desaminase, induzindo uma desaminação excessiva das citidinas durante a etapa de transcrição reversa, transformando-as em uridinas e promovendo dessa forma, uma hipermutação nas fitas de DNA (Newman et al., 2005), bem como, por um mecanismo independente de desaminase, onde a APOBEC3 se liga ao RNA retroviral ou ao ssDNA no início da sua síntese e inibe as reações de alongamento do DNA catalisadas pela transcriptase reversa (Iwatani et al., 2007). Tang et al., (2015) observaram a expressão do gene A3Z3 de asininos (jAPOBEC3) em uma análise da infecciosidade viral. Nesse estudo foi observado que a superexpressão da proteína jAPOBEC3 em cultura de células imortalizadas de rim humano (HEK-293T), infectadas

com o EIAV pseudotipado com as glicoproteínas do *Vesicular stomatitis virus* (VSV), induz mutações de G para A, produzindo códons de parada prematuros e síntese de proteínas truncadas, o que diminui consideravelmente a infecciosidade viral (Mangeat et al., 2003; Zhang et al., 2003). Contudo, não foram divulgadas até o momento, quaisquer informações sobre a sequência do gene isolado de jumentos, com isso, não se sabe o grau de variabilidade do gene A3Z3 da proteína APOBEC3 expresso em macrófagos de equinos e asininos.

As adenosinas desaminases específicas de RNA (ADAR1) são enzimas que reconhecem o RNA de fita dupla e medeiam a conversão de adenosina (A) em inosina (I) (Nishikura, 2010; Samuel, 2011). As propriedades de emparelhamento da inosina são diferentes daquelas da adenosina e, portanto, a edição A para I altera a estrutura do RNA, o potencial de codificação e os padrões de *splicing* (Samuel, 2011). Embora a edição excessiva de uma sequência viral frequentemente resulte em mutações letais ou um aumento do número de alvos nos genomas virais para degradação por ribonucleases específicas da inosina (Scadden, 2005), frente ao EIAV, a ADAR1 expressa em cavalos regula positivamente a replicação viral, ao ampliar a expressão das regiões LTR que atuam como promotor para a transcrição do EIAV e conseqüentemente, contribuindo para o aumento da infecciosidade viral (Tang et al., 2016). Durante o desenvolvimento de uma vacina atenuada contra o EIAV, foi observado que, quando os jumentos são experimentalmente infectados com uma estirpe de campo atenuada em cavalos (LN₄₀), os animais não desenvolvem nenhum sinal clínico da EIA, em contrapartida, quando os jumentos são infectados com uma estirpe atenuada na própria espécie (DV₁₁₇), todos os animais desenvolvem sinais agudos da doença (Shen et al., 1979). Nesse sentido, Tang et al., (2016) observaram que, quando a estirpe do EIAV era atenuada em jumentos, ocorria um aumento significativo da frequência de mutações de A para G preferencialmente nos dinucleotídeos 5'TpA e 5'ApA, o que corrobora com a ação da ADAR1 em cultura de células HEK-293T infectadas com o EIAV. Além disso, foi observado que o ADAR1 é amplamente expresso nos macrófagos dos equídeos, que são as células alvo do EIAV, isso indica que as mutações geradas pela proteína ADAR1 no material genético viral pode ter contribuído para a adaptação do EIAV em jumentos, o que justificaria a capacidade dos jumentos em regular a replicação viral (Tang et al., 2016).

Além das diferenças observadas entre os cavalos e os jumentos quando infectados com o EIAV, o padrão no uso de códons sinônimos pelo EIAV também se

difere entre as espécies. Na natureza, a maioria dos 20 aminoácidos naturais são codificados por diferentes trincas de nucleotídeos, a frequência de utilização de códons sinônimos varia entre os genomas de distintas espécies, sendo que a maior variação na utilização dos códons ocorre principalmente em genes que são amplamente expressos, em função da necessidade de utilização de trincas que maximizem a eficiência traducional (Liu et al., 2005). Nesse sentido, uma análise comparativa dos valores do índice de adaptação do códon (CAI) entre o EIAV e seus hospedeiros sugere que os jumentos têm uma menor eficiência em sintetizar proteínas do EIAV quando comparado aos cavalos, devido a isso, o EIAV utiliza a maquinaria de tradução celular dos cavalos de forma mais eficiente do que dos jumentos. Sendo assim, a interação no uso de códons entre o EIAV e seus hospedeiros influencia na aptidão, replicação, sobrevivência e evolução viral (Yin et al., 2013).

1.6. Conclusões

Os jumentos têm susceptibilidade e manifestações clínicas diferentes dos cavalos, frente a certos agentes infecciosos. No entanto, existem poucos estudos científicos que visam elucidar a patogênese, resposta imune e/ou fisiopatologia dessa espécie. Muitos dos conhecimentos disponíveis vêm das experiências clínicas de médicos veterinários e das inferências extrapoladas dos cavalos para os jumentos. Com relação a EIA, estudos apontam que os jumentos são portadores de EIAV e podem ser fontes de infecção. No entanto, apenas um único estudo experimental comparou a infecção pelo EIAV em equinos e asininos, enfatizando que os jumentos são naturalmente resistentes aos desenvolvimentos dos sinais clínicos e controlam eficientemente a carga viral.

Mesmo sendo morfológicamente similares, eventos de reposicionamento do centrômero observados principalmente durante o processo evolutivo dos asininos, desenvolveu na espécie, a presença de cromossomos ortólogos quando comparados aos equinos. Além disso, a adaptação dos cavalos e jumentos a ambientes e condições distintas induziu uma ampla variação genotípica, causando mutações em genes diretamente envolvidos na resposta imune, o que pode contribuir para a resistência natural dos jumentos ao desenvolvimento de infecções por diversos patógenos, como os vírus.

Até o momento, estudos paliativos vêm apostando na expressão diferenciada de alguns elementos relacionados à resposta imunológica inata e/ou celular como por

exemplo, citocinas, fatores de restrição retrovirais e isoformas solúveis dos receptores de superfície celular como justificativa para o controle rigoroso da replicação viral pelos jumentos, mas, até o momento, nenhum estudo conseguiu compreender os mecanismos imunológicos que atuam na resistência dos asininos ao EIAV.

Todavia, considerando a importância da equideocultura para o agronegócio mundial, compreender os mecanismos imunológicos que são responsáveis pela resistência dos jumentos a EIA, podem ter implicações consideráveis no desenvolvimento de medicamentos e vacinas eficazes que possam ser utilizados frente ao EIAV em cavalos que está diretamente envolvido na rentabilidade proporcionada pela indústria equídea.

1.6. Referências Bibliográficas

AHCF - American Horse Council Foundation. AHCF ANNOUNCES RESULTS OF 2017 ECONOMIC IMPACT STUDY. 2018;

Akdis M, Burgler S, Cramer R, et al. Interleukins, from 1 to 37, and interferon- γ : Receptors, functions, and roles in diseases. *J Allergy and Clin Immunol*. 2011; 127(3):1-70

Almeida VMA, Gonçalves VSP, Martins MF, et al. Anemia infecciosa equina: Prevalência em equídeos de serviço em Minas Gerais. *Arq Bras Med Vet Zootec*. 2006;58(2):141–8.

Andrade DRF, Rezende ASC, Santos SA, et al. Equine infectious anemia affects the athletic performance of equines from the Brazilian Pantanal region. *Pesqui Agropecu Bras*. 2018;53(10):1184–8.

Arbanasić H, Galov A, Ambriović-Ristov A, et al. Extensive polymorphism of the major histocompatibility complex DRA gene in Balkan donkeys: Perspectives on selection and genealogy. *Anim Genet*. 2013;44(6):711–6.

Axon JE, Palmer JE. Clinical Pathology of the Foal. *Vet Clin North Am Equine Pract*. 2008;24(2):357–85.

Bailey E, Binns MM. The horse gene map. *ILAR J*. 1998;39(2–3):171–6.

Baldacchino F, Muenworn V, Desquesnes M, et al. Transmission of pathogens by *Stomoxys* flies (Diptera, Muscidae): a review. *Parasite*. 2013;20:26.

Benedict LG. Economic and Geographic Impact of Equine Infectious Anemia in Louisiana. *Lsuagcenter*. 1999;1:1–4.

Bogerd HP, Tallmadge RL, Oaks JL, et al. Equine Infectious Anemia Virus Resists the Antiretroviral Activity of Equine APOBEC3 Proteins through a Packaging-Independent Mechanism. *J Virol*. 2008; 82(23):889-901.

- Bolfa P, Nolf M, Cadoré JL, et al. Interstitial lung disease associated with Equine Infectious Anemia Virus infection in horses. *Vet Res.* 2013;44(1):113.
- Brasil. INSTRUÇÃO NORMATIVA No 45, DE 15 DE JUNHO DE 2004. Normas para a Prevenção e o Control da Anemia Infecç Eqüina. 2004;
- Brasil. INSTRUÇÃO NORMATIVA N° 52, DE 26 DE NOVEMBRO DE 2018. 2018;
- Brindley MA, Maury W. Equine Infectious Anemia Virus Entry Occurs through Clathrin-Mediated Endocytosis. *J Virol.* 2008; 82(4):1628-37.
- Bueno BL, Câmara RJF, Moreira MVL, et al. Molecular detection, histopathological analysis, and immunohistochemical characterization of equine infectious anemia virus in naturally infected equids. *Arch Virol.* 2020; 165(6):1333-1342.
- Burden F, Thiemann A. Donkeys are different. *J Equine Vet Sci.* 2015;35(5):376–82.
- Câmara RJF, Bueno BL, Resende CF, et al. Viral Diseases that Affect Donkeys and Mules. *Animals.* 2020; 10:2203.
- Canadian horse industry profile. The economic contribution from horses. Equine Hippique Canada. 2010;
- Capomaccio S, Cappelli K, Cook RF, et al. Geographic structuring of global EIAV isolates: A single origin for New World strains? *Virus Res.* 2012;163(2):656–9.
- Cappelli K, Capomaccio S, Cook FR, et al. Molecular detection, epidemiology, and genetic characterization of novel european field isolates of equine infectious anemia virus. *J Clin Microbiol.* 2011;49(1):27–33.
- Carbone L, Nergadze SG, Magnani E, et al. Evolutionary movement of centromeres in horse, donkey, and zebra. *Genomics.* 2006;87(6):777–82.
- Chande A, Cuccurullo EC, Rosa A, et al. S2 from equine infectious anemia virus is an infectivity factor which counteracts the retroviral inhibitors SERINC5 and SERINC3. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2016;113(46):13197–202.
- Coggins L, Norcross NL, Nusbaum SR. Diagnosis of equine infectious anemia by immunodiffusion test. *Am J Vet Res.* 1972; 33(1):11-8.
- Cook FR, Cook SJ, Berger SL, et al. Enhancement of equine infectious anemia virus virulence by identification and removal of suboptimal nucleotides. *Virol.* 2003;313(2):588–603.
- Cook RF, Leroux C, Issel CJ. Equine infectious anemia and equine infectious anemia virus in 2013: A review. *Vet Microbiol.* 2013;167(1–2):181–204.
- Cook SJ, Cook RF, Montelaro RC, Issel CJ. Differential responses of *Equus caballus* and *Equus asinus* to infection with two pathogenic strains of equine infectious anemia virus. *Vet Microbiol.* 2001;79:93–109.
- Covaleda L, Fuller FJ, Payne SL. EIAV S2 enhances pro-inflammatory cytokine and chemokine response in infected macrophages. *Virol.* 2010a;397(1):217–23.

- Covaleda L, Fuller FJ, Payne SL. EIAV S2 enhances pro-inflammatory cytokine and chemokine response in infected macrophages. *Virology*. 2010b;397(1):217–23.
- Craig JK, Barnes S, Zhang B, et al. An EIAV field isolate reveals much higher levels of subtype variability than currently reported for the equine lentivirus family. *Retrovirology*. 2009;6:95.
- Craig JK, Montelaro RC. Lessons in AIDS vaccine development learned from studies of equine infectious anemia virus infection and immunity. *Viruses*. 2013;5(12):2963–76.
- Cullinane A, Quinlivan M, Nelly M, et al. Diagnosis of equine infectious anaemia during the 2006 outbreak in Ireland. *Vet Rec*. 2014;161(19):647–52.
- Cursino AE, Vilela APP, Franco-Luiz APM, et al. Equine infectious anemia virus in naturally infected horses from the Brazilian Pantanal. *Arch Virol*. 2018;163(9):2385–94.
- Domingues LR, Cesar JA, Fassa AG, Domingues MR. Guarda responsável de animais de estimação na área urbana do município de Pelotas, RS, Brasil. *Ciência e Saúde Coletiva*. 2015;20(1):185–92.
- Dong JB, Zhu W, Cook FR, et al. Development of a nested PCR assay to detect equine infectious anemia proviral DNA from peripheral blood of naturally infected horses. *Arch Virol*. 2012;157(11):2105–11.
- Dufour C, Corcione A, Svahn J, et al. TNF- α and IFN- γ are overexpressed in the bone marrow of Fanconi anemia patients and TNF- α suppresses erythropoiesis *in vitro*. *Blood*. 2003; 15;102(6):2053-9.
- Evans DT, Elder JH, Desrosiers RC. Nonhuman lentiviruses. In: *Fields Virology: Sixth Edition*. 2013.
- Etges RN. A GTA e sua importância na estratégia nacional de erradicação e controle de enfermidades dos animais. *Inf Técnico DPA*. 2011;7(2).
- Facin DV. Tema brasileiro de Inspeção de Produtos de Origem Animal. *Inf Técnico DPA*. 2011;7(2).
- FAO. Food and Agriculture Organization of the United Nations. *Live Animals*. 2019.
- Faurie F, Tisserand J. Comparative study of the cellulolytic activity of caecum microbes in ponies and donkeys. *CrossRef Listing Of Deleted DOIs*. 1994;43(3):281–281.
- Felli N, Pedini F, Zeuner A, Petrucci E, Testa U, Conticello C, Biffoni M, di Cataldo A, Winkles JA, Peschle C, de Maria R. Multiple Members of the TNF Superfamily Contribute to IFN- γ -Mediated Inhibition of Erythropoiesis. *The Journal of Immunology*. 2005;
- Galão RP, Le Tortorec A, Pickering S, et al. Innate Sensing of HIV-1 Assembly by Tetherin Induces NF κ B-Dependent Proinflammatory Responses. *Cell Host Microbe*. 2012;12(5):633–44.
- Geissmann F, Manz MG, Jung S, et al. Development of monocytes, macrophages, and dendritic cells. *Science*. 2010, 327(5966):656-61.

- Gilbert M, Nicolas G, Cinardi G, et al. Global distribution data for cattle, buffaloes, horses, sheep, goats, pigs, chickens and ducks in 2010. *Sci Data*. 2018;5(1):1–11.
- Gobin SJP, van den Elsen PJ. Transcriptional regulation of the MHC class Ib genes HLA-E, HLA-F, and HLA-G. *Hum Immunol*. 2000;61(11):1102–7.
- Gramberg T, Kahle T, Bloch N, et al. Restriction of diverse retroviruses by SAMHD1. *Retrovirology*. 2013;
- Gustafson AL, Tallmadge RL, Ramlachan N, et al. An ordered BAC contig map of the equine major histocompatibility complex. *Cytogenet Genome Res*. 2003;102(1–4):189–95.
- Hammond S, Cook SJ, Lichtenstein DL, et al. Maturation of the cellular and humoral immune responses to persistent infection in horses by equine infectious anemia virus is a complex and lengthy process. *J Virol*. 1997;
- Hammond SA, Horohov D, Montelaro RC. Functional characterization of equine dendritic cells propagated ex vivo using recombinant human GM-CSF and recombinant equine IL-4. *Vet Immunol Immunopathol*. 1999; 71(3-4):197-214.
- Handunnetthi L, Ramagopalan SV., Ebers GC, Knight JC. Regulation of major histocompatibility complex class II gene expression, genetic variation and disease. *Genes Immun*. 2010;11(2):99–112.
- Hawkins JA, Adams W V., Wilson BH, Issel CJ, Roth EE. Transmission of equine infectious anemia virus by *Tabanus fuscicostatus*. *J Am Vet Med Assoc*. 1976; 168(1):63-4.
- Hinz A, Miguet N, Natrajan G, et al. Structural basis of HIV-1 tethering to membranes by the BST-2/tetherin ectodomain. *Cell Host Microbe*. 2010; 7(4):314-323.
- Huang J, Zhao Y, Bai D, et al. Donkey genome and insight into the imprinting of fast karyotype evolution. *Sci Rep*. 2015; 5:1–10.
- Issel CJ, Cook RF, Mealey RH, Horohov DW. Equine infectious anemia in 2014: Live with it or eradicate it? *Vet Clin North Am Equine Pract*. 2014;30(3):561–77.
- Issel CJ, Foil LD. Studies on equine infectious anemia virus transmission by insects. *J Am Vet Med Assoc*. 1984; 184(3):293-7.
- Issel CJ, Scicluna MT, Cook SJ, et al. Challenges and proposed solutions for more accurate serological diagnosis of equine infectious anaemia. *Vet Rec*. 2013;172(8):210.
- Iwatani Y, Chan DSB, Wang F, et al. Deaminase-independent inhibition of HIV-1 reverse transcription by APOBEC3G. *Nucleic Acids Res*. 2007; 35(21):7096-108.
- Janova E, Matiasovic J, Vahala J, et al. Polymorphism and selection in the major histocompatibility complex DRA and DQA genes in the family equidae. *Immunogenetics*. 2009;61(7):513–27.
- Jara M, Frias-De-Diego A, Machado G. Phylogeography of Equine Infectious Anemia Virus. *Front Ecol Evol*. 2020; 163(2):656-9.

- Ji S, Na L, Ren H, et al. Equine Myxovirus Resistance Protein 2 Restricts Lentiviral Replication by Blocking Nuclear Uptake of Capsid Protein. *J Virol*. 2018;92(18):1–16.
- Jónsson H, Schubert M, Seguin-Orlando A, et al. Speciation with gene flow in equids despite extensive chromosomal plasticity. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2014;111(52):18655–60.
- Kropshofer H, Hammerling GJ, Vogt AB. The impact of the non-classical MHC proteins HLA-DM and HLA-DO on loading of MHC class II molecules. *Immunol Rev*. 1999;172(1):267–78.
- Lazzaro BP, Little TJ. Immunity in a variable world. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*. 2009;364(1513):15–26.
- Leroux C, Cadoré JL, Montelaro RC. Equine Infectious Anemia Virus (EIAV): what has HIV's country cousin got to tell us? *Vet Res*. 2004;35:467–83.
- Li H, Zhang X, Fan X, et al. A conservative domain shared by HIV gp120 and EIAV gp90: Implications for HIV vaccine design. *AIDS Res Hum Retroviruses*. 2005; 21(12):1057-9.
- Lim W-S, Payne SL, Edwards JF, et al. Differential effects of virulent and avirulent equine infectious anemia virus on macrophage cytokine expression. *Virology*. 2005;332(1):295–306.
- Lima RAS, Cintra AG. Estudo do Complexo do Agronegócio do Cavalo. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. 2016;56.
- Lima-camara TN. Emerging arboviruses and public health challenges in Brazil. *Rev Saude Publica*. 2016;1–7.
- Lin Y, Yang F, Zhang S, et al. The Soluble Form of the EIAV Receptor Encoded by an Alternative Splicing Variant Inhibits EIAV Infection of Target Cells. *PLoS One*. 2013;8(11):1–9.
- Lisowski ZM, Sauter KA, Waddell LA, et al. Immunohistochemical study of morphology and distribution of CD163+ve macrophages in the normal adult equine gastrointestinal tract. *Vet Immunol Immunopathol*. 2020;226(April):110073.
- Liu Q, Dou S, Ji Z, Xue Q. Synonymous codon usage and gene function are strongly related in *Oryza sativa*. *Biosystems*. 2005;80(2):123–31.
- Ma J, Wang SS, Lin YZ, et al. Infection of equine monocyte-derived macrophages with an attenuated equine infectious anemia virus (EIAV) strain induces a strong resistance to the infection by a virulent EIAV strain. *Vet Res*. 2014;45(1):1–12.
- Mangeat B, Turelli P, Caron G, et al. Broad antiretroviral defence by human APOBEC3G through lethal editing of nascent reverse transcripts. *Nature*. 2003;424(6944):99–103.
- Matthews N, van Loon JPAM. Anaesthesia and analgesia of the donkey and the mule. *Equine Veterinary Education*. 2013.

- Maury W. Monocyte maturation controls expression of equine infectious anemia virus. *J Virol*. 1994; 68(10):6270-9.
- Mealey RH, Sharif A, Ellis SA, et al. Early detection of dominant Env-specific and subdominant Gag-specific CD8⁺ lymphocytes in equine infectious anemia virus-infected horses using major histocompatibility complex class I/peptide tetrameric complexes. *Viol*. 2005; 339(1):110-26.
- Musilova P, Kubickova S, Vahala J, Rubes J. Subchromosomal karyotype evolution in Equidae. *Chromosome Research*. 2013;21(2):175–87.
- Naismith JH, Sprang SR. Modularity in the TNF-receptor family. *Trends in Biochemical Sciences*. 1998; 23(2):74-9.
- Naves JHFF, Oliveira FG, Bicalho JM, et al. Serological diagnosis of equine infectious anemia in horses, donkeys and mules using an ELISA with a gp45 synthetic peptide as antigen. *J Virol Methods*. 2018; 266:49–57.
- Newman ENC, Holmes RK, Craig HM, et al. Antiviral function of APOBEC3G can be dissociated from cytidine deaminase activity. *Curr Biol*. 2005; 15(2):166-70.
- Nishikura K. Functions and regulation of RNA editing by ADAR deaminases. *Annu Rev Biochem*. 2010;79:321–49.
- Oaks JL, McGuire TC, Ulibarri C, Crawford TB. Equine Infectious Anemia Virus Is Found in Tissue Macrophages during Subclinical Infection. *J Virol*. 1998; 72(9):7263-9.
- Oaks JL, Ulibarri C, Crawford TB. Endothelial cell infection in vivo by equine infectious anaemia virus. *J Gen Virol*. 1999;80(9):2393–7.
- Oliveira FG, Cook RF, Naves JHF, et al. Equine infectious anemia prevalence in feral donkeys from Northeast Brazil. *Prev Vet Med*. 2017; 140:30–7.
- Oliveira F.G. Vírus da Anemia Infecciosa Equina em Asininos: Sorologia em animais errantes e avaliação “*in vitro*” da resposta em macrófagos. [Tese Vírus da Anemia Infecciosa Equina em Asininos: Sorologia em animais errantes e avaliação “*in vitro*” da resposta em macrófagos]. Universidade Federal de Minas Gerais; 2016.
- Orlando L. Equids. *Current Biology*. 2015;25(20):R973–8.
- Orlando L, Metcalf JL, Alberdi MT, et al. Revising the recent evolutionary history of equids using ancient DNA. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2009;106(51):21754–9.
- Perez-Ecija A, Mendoza FJ. Characterisation of clotting factors, anticoagulant protein activities and viscoelastic analysis in healthy donkeys. *Equine Vet J*. 2017;49(6):734–8.
- Piras FM, Nergadze SG, Poletto V, et al. Phylogeny of horse chromosome 5q in the genus equus and centromere repositioning. *Cytogenet Genome Res*. 2009;126(1–2):165–72.
- Poltronieri P, Sun B, Mallardo M. RNA Viruses: RNA Roles in Pathogenesis, Coreplication and Viral Load. *Curr Genomics*. 2015;

- Quinlivan M, Cook F, Kenna R, et al. Genetic characterization by composite sequence analysis of a new pathogenic field strain of equine infectious anemia virus from the 2006 outbreak in Ireland. *J Gen Virol*. 2013;94(PART3):612–22.
- Reis J, Cook F. Anemia Infecciosa Equina: Um problema ainda a ser resolvido. *Revista VeZ em Minas*. 2014;9–19.
- Reis JKP, Diniz RS, Haddad JPA, et al. Recombinant envelope protein (rgp90) ELISA for equine infectious anemia virus provides comparable results to the agar gel immunodiffusion. *J Virol Methods*. 2012;180(1–2):62–7.
- Renaud G, Petersen B, Seguin-Orlando A, et al. Improved de novo genomic assembly for the domestic donkey. *Sci Adv*. 2018;4(4):1–11.
- Resende CF, Santos AM, Cook RF, et al. Low transmission rates of Equine infectious anemia virus (EIAV) in foals born to seropositive feral mares inhabiting the Amazon delta region despite climatic conditions supporting high insect vector populations. *BMC Vet Res*. 2022;18(1):286.
- Riccio AV, Alonso MA, Belli CB, Fernandes CB. Parâmetros de vitalidade , comportamentais e laboratoriais de neonatos asininos e equinos – revisão comparativa. *RBSPA*. 2019;43(3):756–64.
- Ricotti S, Garcia MI, Veaute C, Bailat A, et al. Serologically silent, occult equine infectious anemia virus (EIAV) infections in horses. *Vet Microbiol*. 2016;187:41–9.
- RIRDC. Rural Industries Research and Development Corporation. Emerging animal and plant industries. 2014;
- Rose KD, Holbrook LT, Rana RS, et al. Early Eocene fossils suggest that the mammalian order Perissodactyla originated in India. *Nat Commun*. 2014;5:1–9.
- Russell KE, Walker KM, Miller RT, Sellon DC. Hyperglobulinemia and lymphocyte subset changes in naturally infected, inapparent carriers of equine infectious anaemia virus. *Am J Vet Res*. 1998;59(8):1009–15.
- Samuel CE. Adenosine deaminases acting on RNA (ADARs) are both antiviral and proviral. *Virology*. 2011;411(2):180–93.
- Scadden ADJ. The RISC subunit Tudor-SN binds to hyper-edited double-stranded RNA and promotes its cleavage. *Nat Struct Mol Biol*. 2005;12(6):489–96.
- Schoggins JW. Interferon-stimulated genes: Roles in viral pathogenesis. *Cur Opin Virol*. 2014; 6:40-6.
- Schoggins JW, Rice CM. Interferon-stimulated genes and their antiviral effector functions. *Cur Opin Virol*. 2011; 1(6):519-25.
- Sciicluna MT, Issel CJ, Cook FR, et al. Is a diagnostic system based exclusively on agar gel immunodiffusion adequate for controlling the spread of equine infectious anaemia? *Vet Microbiol*. 2013;165(1–2):123–34.
- Sellon D. Equine Infectious Anemia. *Vet Clin North Am Equine Pract*. 1993;9(2):321–36.

- Sellon D, Fuller F, McGuire T. The immunopathogenesis of equine infectious anemia virus. *Virus Res.* 1994; 32(2):111-38.
- Sellon D, Perry ST, Coggins L, Fuller FJ. Wild-type equine infectious anemia virus replicates in vivo predominantly in tissue macrophages, not in peripheral blood monocytes. *J Virol.* 1992; 66(10):5906-13.
- Shen R, Xu Z, He Y, Zhang SX. Development of a EIAV donkey leucocyte attenuated vaccine. *China Agriculture Sciences.* 1979;12:1-15.
- Silva RAMS, Abreu UGP, Barros ATM. Anemia Infecciosa Equina : Epizootiologia , Prevenção e Controle no Pantanal. *Embrapa: Pantanal - Circular Técnica*, 29. 2001;1-32.
- Spyrou V, Papanastassopoulou M, Psychas V, et al. Equine infectious anemia in mules: Virus isolation and pathogenicity studies. *Vet Microbiol.* 2003;95(1-2):49-59.
- Stremlau M, Perron M, Welikala S, Sodroski J. Species-Specific Variation in the B30.2(SPRY) Domain of TRIM5 α Determines the Potency of Human Immunodeficiency Virus Restriction. *J Virol.* 2005; 79(5):3139-45.
- Suhartanto B, Julliand V, Faurie F, Tisserand J. Comparison of microbial activity in the cecum of ponies and donkeys. *CrossRef Listing Of Deleted DOIs.* 1993;42(2):185-185.
- Tang YD, Na L, Fu LH, et al. Double-stranded RNA-specific adenosine deaminase 1 (ADAR1) promotes EIAV replication and infectivity. *Virol.* 2015;476:364-71.
- Tang YD, Na L, Zhu CH, et al. Equine Viperin Restricts Equine Infectious Anemia Virus Replication by Inhibiting the Production and/or Release of Viral Gag, Env, and Receptor via Distortion of the Endoplasmic Reticulum. *J Virol.* 2014; 88(21):12296-310.
- Tang YD, Zhang X, Na L, et al. Double-stranded-RNA-specific adenosine deaminase 1 (ADAR1) is proposed to contribute to the adaptation of equine infectious anemia virus from horses to donkeys. *Arch Virol.* 2016;161(10):2667-72.
- Tornquist SJ, Crawford TB. Suppression of megakaryocyte colony growth by plasma from foals infected with equine infectious anemia virus. *Blood.* 1997; 15;90(6):2357-63.
- Trowsdale J, Parham P. Defense strategies and immunity-related genes. *Eur J Immunol.* 2004;34(1):7-17.
- Valette D. Invisible Workers: The Economic Contributions of Working Donkeys, Horses and Mules to Livelihoods. 2015;(October):43.
- Venkatesh S, Bieniasz PD. Mechanism of HIV-1 Virion Entrapment by Tetherin. *PLoS Pathog.* 2013; 9(7):e1003483.
- Vilstrup JT, Seguin-Orlando A, Stiller M, et al. Mitochondrial Phylogenomics of Modern and Ancient Equids. *PLoS One.* 2013;8(2).
- Vranova M, Alloggio I, Qablan M, et al. Genetic diversity of the class II major histocompatibility DRA locus in European, Asiatic and African domestic donkeys. *Infect Gen Evol.* 2011;11(5):1136-41.

Wieczorek M, Abualrous ET, Sticht J, et al. Major Histocompatibility Complex (MHC) Class I and MHC Class II Proteins: Conformational Plasticity in Antigen Presentation. *Front Immunol.* 2017;8:292.

WOAH - World Organization For Animal Health. Equine infectious anemia. In: *Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals.* 2022. p. Chapter 3.5.6.

Wood SJ. Some Factors Affecting the Digestible Energy Requirements and Dry Matter Intake of Mature Donkeys and a Comparison with Normal Husbandry Practices. [Tese Some Factors Affecting the Digestible Energy Requirements and Dry Matter Intake of Mature Donkeys and a Comparison with Normal Husbandry Practices]. 2010.

Yao Q, Ma J, Wang X, et al. A pilot study on interaction between donkey tetherin and EIAV stains with different virulent and replication characteristics. *Microb Pathog.* 2017; 106:65-68.

Yin X, Guo M, Gu Q, Wu X, Wei P, Wang X. Antiviral potency and functional analysis of tetherin orthologues encoded by horse and donkey. *Virologia J.* 2014;11(1):1–8.

Yin X, Lin Y, Cai W, et al. Comprehensive analysis of the overall codon usage patterns in equine infectious anemia virus. *Virologia J.* 2013;10(1):1–6.

Younge B, Vial C. Socio-economic impact of horse production on rural areas: A comparison between Ireland and France. *EAAP Scientific Series.* 2012;

Zhang B, Sun C, Jin S, et al. Mapping of Equine Lentivirus Receptor 1 Residues Critical for Equine Infectious Anemia Virus Envelope Binding. *J Virol.* 2008;82(3):1204–13.

Zhang H, Yang B, Pomerantz RJ, et al. The cytidine deaminase CEM15 induces hypermutation in newly synthesized HIV-1 DNA. *Nature.* 2003;424(6944):94–8.

Zielonka J, Bravo IG, Marino D, et al. Restriction of Equine Infectious Anemia Virus by Equine APOBEC3 Cytidine Deaminases. *J Virol.* 2009; 83(15):7547-59.

CAPÍTULO 2: Análise comparativa da expressão dos fatores de restrição retrovirais em macrófagos de jumentos e de cavalos infectados com o Vírus da Anemia Infecciosa Equina

2.1. Resumo

A Anemia Infecciosa Equina (EIA) é uma doença viral que acomete todos os membros da família Equidae. Contudo, os asininos quando infectados conseguem controlar de maneira eficaz a carga viral e o desenvolvimento de sinais clínicos. Fatores relacionados à resposta imune humoral e celular podem estar envolvidos nessa resistência natural da espécie, dentre eles, os fatores de restrição retrovirais (RRFs), proteínas induzíveis por interferons, que limitam alguma etapa do ciclo de replicação viral. Nesse sentido, esse trabalho propôs analisar a expressão dos RRFs APOBEC3, ADAR1, RSAD2, SAMHD1, Mx2, BST2, SERINC e TRIM5 α em cultura de PBMC isoladas do sangue total de 3 cavalos e 3 jumentos, posteriormente infectados *in vitro*, com a estirpe patogênica EIAV_{Wyo}. Como resultados, observamos que o ADAR1 e o Mx2 são mais expressos em equinos. Já os RRFs A3Z3, TRIM5 α e SERINC, foi observada uma maior expressão em macrófagos de jumentos. Dessa forma, os nossos resultados sugerem que o controle rigoroso da replicação pelo EIAV nos asininos pode estar associado à menor expressão de ADAR1 que aumenta a infecciosidade viral, bem como, a maior expressão de outros RRFs, que atuam em diferentes etapas do ciclo de replicação viral, restringindo a formação de novas partículas virais infecciosas.

2.2. Introdução

A Anemia Infecciosa Equina (EIA) é uma doença de notificação obrigatória, transmissível, incurável, de difícil controle que acomete os membros da família Equidae, e é causada pelo *Equine Infectious Anemia Virus* (EIAV), um retrovírus, classificado no gênero *Lentivirus*.

O curso clínico da EIA é bem documentado em cavalos e se divide em fase aguda, caracterizado por febre, trombocitopenia, seguindo de fase crônica com ciclos de anemia, perda de peso, edema, trombocitopenia e hemorragias, terminando em uma prolongada fase inaparente, com ausência de sinais clínicos (Dong et al., 2012; Harrold et al., 2000). O primeiro controle da carga viral é exercido por linfócitos T citotóxicos e

anticorpos não neutralizantes (Hammond et al., 1997; Mealey et al., 2005). Contudo, isso promove uma pressão seletiva sobre o vírus, induzindo mutações e o surgimento de variantes antigenicamente distintas, as quasispécies, obrigando o hospedeiro a entrar em um constante ciclo de ‘atualização’ até a ampliação e maturação da resposta imune, onde são reconhecidos uma maior variedade de epítomos associados à resposta imune celular, criando interações de alta avidéz, que são capazes de restringir a replicação viral nos tecidos (Hammond et al., 1997; Reis & Cook, 2014).

Todavia, dada a mutabilidade inerente dos vírus e seus mecanismos de evasão do hospedeiro, os mamíferos, no geral, desenvolveram estratégias antivirais que vão além da resposta imune humoral e celular, como os fatores de restrição retrovirais (RRFs), que são sistemas mediados por proteínas frequentemente estimuladas por interferons (IFN), que atuam em alguma etapa do ciclo de replicação viral (Schoggins, 2014; Schoggins & Rice, 2011). Porém, até o momento, poucos são os RRFs descritos que atuam frente à infecção do EIAV em macrófagos de equídeos.

A APOBEC3, foi o primeiro RRF com atividade anti-EIAV caracterizado (Bogerd et al., 2008). Uma das principais funções da APOBEC3 é induzir a desaminação de citidinas (C) em uridinas (U), promovendo uma hipermutação nas fitas de DNA (Newman et al., 2005). Em equinos, as células hematopoiéticas expressam cinco genes diferentes codificantes da proteína APOBEC3: A3Z1b, A3Z2a-Z2b, A3Z2c-Z2d, A3Z2e e A3Z3. Contudo, frente ao EIAV, apenas os genes A3Z3 e A3Z2c-2d são capazes de exercer alguma atividade inibitória; porém, nos macrófagos, estes genes possuem uma baixa expressão (Bogerd et al., 2008; Zielonka et al., 2009).

Um segundo RRF conhecido, ADAR1, também induz uma desaminação excessiva durante a síntese de cDNA, de adenosina (A) para inosina (I) (Samuel, 2011). Embora a edição excessiva de uma sequência viral resulte em mutações letais, em cavalos frente ao EIAV, a ADAR1 regula positivamente a replicação viral, ampliando a expressão da região gênica *LTR* e contribuindo para o aumento da infecciosidade do EIAV (Tang et al., 2015).

Os RRFs RSAD2, SAMHD1, Mx2 e BST2 também já foram descritos com atividades anti-EIAV em equinos, seja interrompendo a síntese de proteínas codificadas pelos genes *gag* e *env*, diminuindo o *pool* de dNTPs intracelular disponível, inibindo o desencapsulamento do capsídeo e a importação nuclear do cDNA proviral, bem como,

interagindo com o envelope viral e retendo os vírions em brotamento na membrana celular (Gramberg et al., 2013; Ji et al., 2018; Tang et al., 2014; Yin et al., 2014)

Demais RRFs amplamente descritos para outras retrovíroses, como o SERINC e o TRIM5 α , aparentemente têm algum efeito restritivo sobre o EIAV, seja restringindo infecções celulares subsequentes ou induzindo a desmontagem prematura do capsídeo viral. Porém todos os estudos conduzidos até o momento, são baseados em vírus pseudotipado, bem como cultura de células imortalizadas de rim embrionário humano (HEK-293) (Chande et al., 2016; Stremlau et al., 2005). Sendo assim, a expressão e a ação anti-retroviral desses RRFs frente ao EIAV em macrófagos de equídeos ainda é desconhecida.

Como supracitado, o EIAV acomete todos os equídeos, todavia, a maioria dos estudos estão concentrados em cavalos, sendo poucas as informações acerca da patogênese do vírus em jumentos. Nesse sentido, Cook et al, (2001) realizaram uma infecção experimental em jumentos e cavalos com a estirpe patogênica EIAV_{Wyo} e observaram que, enquanto os cavalos desenvolveram a forma grave da doença, os jumentos tiveram completa ausência de sinais clínicos. Além disso, a carga viral detectada em ensaios de qPCR, nos jumentos era 1000 vezes menor que nos cavalos, indicando um controle rigoroso desta espécie na replicação viral. Entretanto, até o momento, não se sabe quais são os fatores que poderiam explicar, em partes, as diferenças observadas entre cavalos e jumento infectados pelo EIAV.

Diante desse contexto, o objetivo desse estudo é comparar a expressão dos fatores de restrição APOBEC3, ADAR1, RSAD2, SAMHD1, Mx2, BST2, SERINC e TRIM5 α em células mononucleares de cavalos e jumentos infectadas com o EIAV *in vitro*.

2.3. Material e Métodos

2.3.1. Delineamento experimental

A amostra do trabalho corresponde a cada placa de 24 poços obtidos a partir da coleta de sangue total. Em estudos anteriores, registrados sob o CEUA 354/2012, foi observado que uma bolsa de 450mL de sangue de cavalos e jumentos produzem em média 5×10^7 cel/mL o que corresponde a 2 placas de 24 poços, com 1×10^6 cel/poço (Oliveira, 2016).

Tendo em vista que a expressão de mRNA dos fatores de restrição é diretamente proporcional a atividade de replicação do EIAV (Meier et al., 2018; Yin, X. et al., 2014), utilizamos a média da replicação viral em culturas de MDM de equinos e de asininos infectados com 0.01 MOI do EIAV (Cook et al., 2001; Oliveira, 2016). O tamanho da amostra necessária foi calculado a partir do Software estatístico STATA versão 14.0 (College Station, TX, EUA), com significância de 0.05 e poder de 0.9, para um teste *t* simples com amostras independentes. Para os parâmetros impostos, seriam necessárias 8 observações, ou seja, 8 placas de 24 poços, sendo 9 placas por grupo (9 placas para cavalos e 9 placas para jumentos), considerando que uma bolsa de 450mL de sangue, produz aproximadamente 2 placas de 24 poços de células mononucleares e que a diferença intraespecífica não foi relevante para esse estudo. Utilizamos cerca de 1000mL de sangue por animal coletados de 3 animais por grupo (3 cavalos e 3 jumentos).

2.3.2. Coleta das amostras

Foram coletados 1000mL de sangue periférico da veia jugular de três (n=3) cavalos e três (n=3) jumentos, com idade superior a 3 anos. Os cavalos são pertencentes a Escola de Veterinária da Universidade Federal de Minas Gerais e os jumentos da raça Pêga são oriundos de uma propriedade localizada na grande região metropolitana de Belo Horizonte.

Todos os animais eram negativos para EIA, pelos testes diagnósticos ELISA rgp45 (Naves et al., 2018) e IDGA (Laboratórios Bruch, Brasil).

Toda experimentação animal foi aprovada pelo Comitê de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal de Minas Gerais, sob o protocolo número 59/2020 e registrado no Sistema Nacional de Gestão do Patrimônio Genético e do Conhecimento Tradicional Associado (SISGEN) sob o nº A0DED08 (anexo 1).

2.3.2. Obtenção das células mononucleares do sangue periférico (PBMC)

As culturas de macrófagos derivados de monócitos de cavalos (cMDM) e jumentos (jMDM) foram preparados a partir do sangue total heparinizado dos animais doadores. Após a coleta, foram adicionados ao sangue, volume igual de tampão fosfato-salino 1x (PBS1x). A solução foi alíquotada em tubos de fundo cônico, seguindo da adição de Histopaque 1077 (Sigma Aldrich, EUA), conforme o protocolo estabelecido pelo fabricante.

Os tubos foram submetidos a uma centrifugação inicial por 40min a uma velocidade de 400xg a 20 °C, posteriormente os anéis de PBMC, foram coletados com

pipetas estéreis autoclavadas, transferidos para novos tubos cônicos de 50mL e submetidos a três rodadas sucessivas de diluição com PBS1x em igual volume e centrifugação por 10 minutos a 400xg, 4 °C. O pellet final foi ressuscitado em 15mL de RPMI 1640, um meio para cultura celular rico em aminoácidos e vitaminas, adicionados em erlenmeyers de teflon e incubados a 37°C em atmosfera contendo 5% CO₂ por 4 horas. Posteriormente, as células não aderentes e frouxamente aderentes foram removidas por lavagem com RPMI frio rapidamente por três vezes. As células aderentes restantes foram destacadas, após adição de 5mL do meio de cultura RPMI aquecido (38°C) nos erlenmeyers de teflon, seguindo de uma homogeneização passiva. Posteriormente, as células coletadas foram adicionadas em tubos de fundo cônico estéreis e, submetidas a uma nova centrifugação por 10 minutos a 400xg, 20 °C. Em seguida, foram ressuscitadas em 1mL de RPMI puro a 37°C, contabilizadas em câmara de Neubauer e adicionadas em placas de 96 poços a uma concentração de 10⁶cels/mL, ajustadas para o volume final de 100µL/poço com meio RPMI, suplementado com 20% de Soro Fetal Bovino (SFB), 4 U/mL de estreptomicina, 4 µg/mL de penicilina, 0,05 µg/mL de Fungizon e incubadas a 37°C em atmosfera contendo 5% CO₂ (Ma et al., 2014).

2.3.3. Titulação e quantificação viral

Os títulos dos estoques do EIAV_{wyo} foram determinados a partir da infecção de células de derme equina (ED) (AATCC®CCL-57) com o isolado viral. Para isso, foi realizada uma diluição seriada (log₁₀), de 10⁻² até 10⁻⁶ em meio MEM puro, de um *pool* de sobrenadantes celulares infectados com o vírus, armazenados a -70°C (Oliveira, 2016).

Em placas de 96 poços contendo 100µL de meio MEM, suplementado com 10% de SFB, 4 U/mL de penicilina e estreptomicina, foram adicionadas 5x10⁴ células ED/poço. Após a aderência das células no fundo dos poços, todo o sobrenadante foi retirado e 100µL de cada diluição viral em 8 replicatas, foram adicionadas sobre as células, incubadas a 37°C em atmosfera contendo 5% de CO₂, por 1h, com intervalos de homogeneização a cada 15 minutos. Posteriormente, foram adicionados aos poços mais 100µL de meio MEM, suplementado, com 10% de SFB e 4 U/mL de antibiótico (Hierholzer & Killington, 1996; Ma et al., 2014; Oliveira, 2016) As placas foram monitoradas por 21 dias. Após o intervalo, ensaios quantitativos em tempo real de PCR de transcrição reversa (One-Step RT-qPCR) e atividade de transcriptase reversa (RT) foram usados para identificar a carga do EIAV.

A avaliação da atividade RT, foi realizada utilizando o kit *Reverse Transcriptase Assay, Colorimetric*, (Roche-Applied-Science, EUA), de acordo com as recomendações do fabricante. Onde valores de densidade óptica duas vezes maiores que os determinados para o controle negativo foram considerados como indicativos de replicação viral (Ma et al., 2014). O título infeccioso do EIAV foi estimado pelo método de dose infecciosa de cultura de tecidos mediana (TCID₅₀), conforme descrito por Reed e Muench (1938) (Lei et al., 2020; Reed & Muench, 1938).

Para examinar os perfis de replicação do EIAV, os sobrenadantes coletados com 21 dias após a infecção, foram submetidos a extração do RNA total, utilizando TRIzol (Rio et al., 2010), posteriormente submetidos a quantificação por qRT-PCR, utilizando o método de curva padrão, juntamente com os primers, sondas e condições de volume descritos por Bueno et al., 2018 (Apêndice 2.1.).

Os títulos relativos do EIAV_{Wyo} em células ED foram comparáveis e consistentes quando medidos em ambos os métodos.

2.3.4. Síntese dos controles positivos de RNA sintético do EIAV para construção da curva padrão

A construção dos controles positivos para a padronização da curva padrão, utilizando RNAs sintéticos, se deu conforme o protocolo descrito por Bueno et al., (2018).

Para isso, uma PCR convencional, juntamente com os iniciadores e as condições previamente estabelecidas pelos autores, amplificou um fragmento de 520pb da região gênica de *gag*, de uma amostra de células ED previamente infectadas com o clone molecular infeccioso EIAV_{UK}. Em seguida, o fragmento foi adicionado ao vetor pGEM-T easy (Promega, EUA), usando a enzima T4 ligase (Promega, EUA) e propagado em bactéria *Escherichia coli* DH5- α , com subsequente midiprep (Kit Midi, Qiagen, Alemanha). A posteriori, o produto foi submetido a um concentrador a vácuo (Speed Vac, Thermo Fisher Scientific, EUA) e, após linearização com a enzima *PstI* (Promega, EUA), 100ng do produto foi usado como modelo para transcrição *in vitro* usando o Kit T7 RiboMAX™ Express Large Scale RNA Production System (Promega, EUA), de acordo com as instruções do fabricante. Os RNAs sintéticos foram purificados usando o mini kit RNeasy (Qiagen, Alemanha) e o número de cópias do RNA foi calculado a partir da concentração do produto obtida no Qubit Fluorometric Quantification (Thermo Fisher Scientific, EUA).

O One-Step RT-qPCR para o EIAV foi novamente padronizado usando o kit Go taq Probe 1-Step RT-qPCR System (Promega, EUA) conforme o protocolo estabelecido pelo fabricante, juntamente com 0,8 μ M de cada iniciador e 125nM de sonda (Bueno et al., 2018; Cook et al., 2002). Além disso, foi utilizado o termociclador QuantStudio 1 (Thermo Fisher Scientific, EUA), nas seguintes condições de temperatura 45°C por 15 min, 95°C por 2 min, seguindo de 40 ciclos de 95°C por 15 s e 60°C por 1 min. Os resultados foram analisados no programa QuantiStudio 3 and 5 Real-Time PCR System Software.

2.3.5. Infecção viral dos PBMCs proveniente do sangue dos jumentos e dos cavalos

Após 48h de incubação das células sanguíneas de cada animal em estufa a 37°C com 5% de CO₂, quando boa parte dos monócitos aderentes já se diferenciaram em macrófagos (Apêndice 1), foi realizado o inóculo da estirpe patogênica EIAV_{wyo}, no título de 1x10³TCID₅₀ (MOI 0,01) Para isso, todo o sobrenadante foi inicialmente retirado, 100 μ L do vírus na concentração de interesse, previamente diluído em meio RPMI, foi acrescentado e deixado sobre a superfície celular pelo intervalo de 1h, com homogeneizações a cada 15min. Adiante, o sobrenadante, contendo vírus residual foi totalmente retirado e a cultura de células foi lavada por 3 vezes com meio de cultura. Posteriormente, um volume de 200 μ L de RPMI acrescido de 10% de SFB e 2U/mL de antibiótico (penicilina e estreptomicina) foi adicionado e, as placas foram incubadas a 37°C em atmosfera contendo 5%CO₂ (Ma et al., 2014). Para a análise da expressão de fatores de restrição, as células foram coletadas nos tempos zero, um, dois, três, quatro, cinco, seis e sete dias pós-infecção (d.p.i.), congeladas a -70°C até os procedimentos de extração do RNA total utilizando o reagente TRIzol, conforme descrito por Rio e colaboradores (2010).

O lipopolissacarídeo (LPS) (Sigma aldrish-USA) foi incluído como controle positivo de resposta pró-inflamatória. LPS é conhecido como um clássico ativador de resposta imune dos monócitos/macrófagos, sendo por isso incluído nessa etapa do estudo (Weber et al., 1992). Dessa forma, poços com células destinadas a essa finalidade foram estimuladas com 100 μ L de LPS (2 μ g/mL). O meio de cultura RPMI puro foi utilizado como controle negativo da infecção. Tanto a adsorção viral, quanto o estímulo com LPS foram realizados por 1h, com agitação de 15 em 15 min, em seguida, foi adicionado mais

100µL de meio RPMI acrescido de 10% de SFB, 2 U/mL de estreptomicina e penicilina em cada poço.

A eficiência da infecção viral foi analisada por PCR convencional, utilizando a cultura de células de MDM coletada, após extração do RNA total a partir do método de TRIzol (Rio et al., 2010) e síntese do cDNA utilizando a enzima *M-MLV Reverse Transcriptase kit* (Promega, EUA), conforme recomendado pelo fabricante. Para tal análise, foi utilizado os iniciadores EIAV_{PV1458}: TTCAGAACGCAAATGAGGAA e EIAV_{PV1988}: TGTTACTACCACAAACTGTCCA, produzindo um fragmento de 520pb, bem como, as condições de volume e ciclagem pré-estabelecidos por Bueno et al., (2018).

2.3.6. Quantificação dos fatores de restrição em MDM de cavalos e de jumentos infectados com o EIAV

Para o delineamento das expressões de mRNA referente aos fatores de restrição, APOBEC3, ADAR1, RSAD2, SAMHD1, Mx2, BST2, SERINC e TRIM5 α , as culturas de células foram coletadas nos tempos zero, um, dois, três, quatro, cinco, seis e sete d.p.i., submetidas a extração do RNA total utilizando o reagente TRIzol (Rio et al., 2010) e transcritas em cDNA utilizando a enzima *M-MLV Reverse Transcriptase kit* (Promega, EUA), conforme recomendado pelo fabricante.

Para os estudos referentes à expressão dos RRFs nos cultivos de células mononucleares de cavalo e jumento foi utilizado o kit GoTaq® qPCR Master Mix (Promega, EUA), conforme protocolo estabelecido pelo fabricante, juntamente com um conjunto de iniciadores estabelecidos para cada RRF analisado (Tabela 3) (Apêndice 2.2.). O gene β -actina, foi utilizado como gene normalizador para as qPCRs (Yin et al., 2014). Os resultados foram analisados por quantificação relativa, utilizando o método de CT comparativo, onde se investiga a expressão de um gene em uma determinada amostra de interesse comparada a uma amostra de referência (Pfaffl, 2007).

Tabela 3: Sequência dos iniciadores utilizados para amplificação dos RRFs e quantificação do EIAV.

Gene	Iniciadores (5'-3')	Amplicon (pb)	Referência
A3Z3	F CCGGGAACGGAAACACACAGCATC	132	

	R	ACGGAGCAGCCTTCAGCTGGTAGCA		Zielonka et al., 2019
A3Z2c-2d	F	AGTGGAAAGGAAGGTTGAGCGGC	114	Zielonka et al., 2019
	R	CGGAACCAATCGAGGAAGCAGA		
ADAR1^a	F	GAGACCATCGAAGGAAGCAG	197	<i>In-house</i>
	R	TTGTCATAAAGGGCCTCGTC		
BST2	F	GTGGTGGTCTTTTCTGCTTGTG	99	Yin et al., 2014
	R	GTTGCGACACTCCTGCTCTG		
Mx2	F	TAGCTGGGAATGGAGTTG	197	Ji et al., 2018
	R	CACCAGTTGATCGTCTC		
RSAD2	F	AGCGTCAACTACCACTTCACC	185	Tang et al., 2015
	R	TATTCGCCCCGGTCCTGA		
SAMHD1^a	F	TGATCCTATCCATGGCCACA	78	<i>In-house</i>
	R	CGMAGRCGYTGAAATTGAGG		
SERINC^a	F	AGATGAGACACAAGGCAGGC	129	<i>In-house</i>
	R	ACGGGGGCTGGTATAGAGAA		
TRIM5^{a,b}	F	AATCGGCATGTRGCCAACAT	150	<i>In-house</i>
	R	CTCACAAAGCCAGCAAATGA		
qEIAV	F	GGAGCCTTAAAAGGAGGGCCACTAAA A	227	Cook et al., 2002
	R	TTGTTGTGCTGACTCTTCTGTTGTATCG GG		
	P	FAM CGGGAAGCAAGGGGCTCAAGG GAGGCC BHQ-1		

a: Os iniciadores dos genes ADAR1, SAMHD1, SERINC foram desenhados com base nas seqüências XM_001497551.4, XM-001499498.5, XM_001917430.5 e XM_023618093.1, respectivamente, disponíveis de equinos no Genbank.

b: os iniciadores foram construídos, utilizando como referência a região mais conservada do TRIM5 entre os humanos e outras 10 diferentes espécies de primatas não humanos.

Todos os iniciadores foram previamente padronizados por PCR convencional, utilizando a enzima GoTaq G2 DNA Polymerase (Promega, USA), conforme o protocolo estabelecido pelo fabricante, acrescido de 1,5 μ M de MgCl₂, 1 μ M de cada iniciador e aproximadamente 0,5 μ g de DNA total. A ciclagem consistiu em uma desnaturação inicial a 95°C por 2 min, seguindo de 35 ciclos de desnaturação a 95°C por 30 s, anelamento de 60°C por 60s, extensão a 72°C por 60 s e uma etapa de extensão final de 72°C durante 5 min (Apêndice 3).

A padronização das PCRs se deu, mediante a utilização de material genético extraído de cultura de macrófagos isolados de duas éguas sabidamente positivas para EIA, com sinais clínicos da doença, pertencentes ao banco de amostras do Laboratório de Retrovírus da Universidade Federal de Minas Gerais. O resultado da PCR foi analisado em gel de eletroforese a 1% com 0,01% de brometo de etídio. Os fragmentos amplificados foram cortados, purificados e encaminhados para sequenciamento, que comprovou a presença dos RRFs alvo.

2.3.7. Quantificação do EIAV no sobrenadante celular de MDM de cavalos e jumentos

Em paralelo à análise dos RRFs, também foram observadas as taxas de replicação viral no PBMC dos cavalos e dos jumentos nos tempos zero, dois e sete d.p.i. Para isso, o sobrenadante celular coletado, foi submetido a extração do RNA total utilizando o Kit QIAamp® Viral RNA Kit (Qiagen, EUA), seguindo de uma OneStep RT-qPCR em tempo real, utilizando o kit GoTaq probe 1-Step RT-qPCR (Promega, EUA) e os iniciadores e sonda descritos por Cook et al., (2002) (tabela 3; Apêndice 2.2.). Os resultados foram avaliados por quantificação absoluta, utilizado o método de curva padrão, construída a partir dos RNAs sintéticos produzidos neste estudo (Whelan et al., 2003).

2.3.8. Análise estatística

As expressões de mRNA dos RRFs foram submetidas a um teste de Shapiro-Wilk, para analisar a distribuição normal dos dados (Royston, 1992). Contudo, por não existir uma distribuição normal dos dados, os resultados das reações de qPCR foram normalizadas usando o método $2^{-\Delta\Delta CT}$ (Ji et al., 2018). Posteriormente os resultados foram submetidos a uma análise de variância (ANOVA two-way), um teste paramétrico, utilizado para verificar a existência de diferenças entre as médias de uma variável

(variável resposta) em relação a dois níveis categóricos (com/sem EIAV *versus* espécie), nesse caso o efeito do animal foi considerado aleatório (Fujikoshi, 1993). As variações da média dos dados transformados referentes aos jumentos, em relação à média dos resultados transformados do cavalo, correspondem à variação da resposta (Covaleda et al., 2010; Lim et al., 2005).

Além disso, para compreender a discrepância entre as diferenças encontradas nos testes ANOVA, utilizamos o teste de Tukey, que consiste em comparar todos os pares de médias com mínimas diferenças estatísticas significativas (Kelseman & Rogan, 1977).

Os dados foram analisados pelo programa Infostat Software estatístico. Os resultados foram considerados significativamente diferentes quando $p < 0,05$. Os gráficos foram gerados no programa GraphPad Prism Software, versão 9 (Informer Technologies, Inc.).

2.4. Resultados

2.4.1. Análise da replicação viral em MDM de cavalos e jumento

As culturas de cMDM e jMDM referente às coletas de sangue dos três cavalos ($n=3$) e três jumentos ($n=3$) utilizados nesse estudo, foram infectadas com o inóculo viral de 1×10^3 TCID₅₀ e cultivadas durante sete dias, onde as células foram coletadas diariamente.

Para comprovar a eficiência da infecção, as amostras de RNA total extraídos da cultura de células, após síntese em cDNA, foram submetidas a uma PCR convencional para amplificação de um fragmento de 520pb referente ao gene *gag* do EIAV (Bueno et al., 2018). Como resultado, observamos que após 24h da infecção, foi detectado RNA do EIAV nos MDMs dos três jumentos e dos três cavalos. A infecção viral foi posteriormente confirmada pela detecção de quantidades crescentes de RNA viral no sobrenadante celular (Figura 3 e 4), garantindo que a presença de material genético viral nos MDMs dos cavalos e jumentos é proveniente da infecção celular e não oriundo de vírus residual do inóculo.

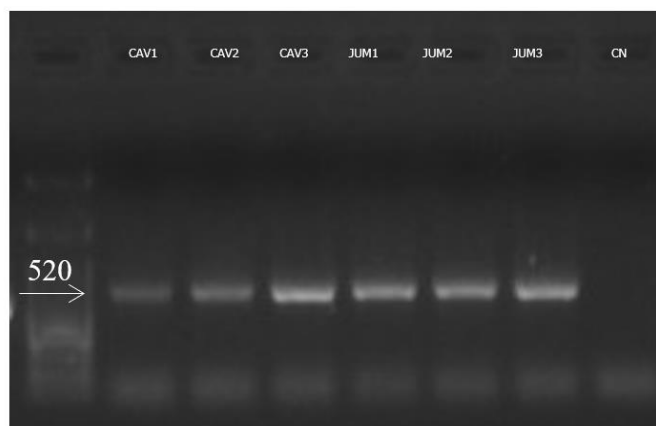


Figura 3: PCR das amostras de cultura de eMDM e jMDM, proveniente dos 3 cavalos e 3 jumentos doadores de sangue utilizados no estudo, após a infecção pelo EIAV_{Wyo}, *in vitro*, extração de RNA e síntese de cDNA. Detecção do gene EIAVgag520 24h após a infecção, amplificando um fragmento de 520pb, comprovando a presença do material genético viral na célula-alvo.



Figura 4: Análise da replicação do EIAV no sobrenadante de cMDM e jMDM. A avaliação por RT-qPCR em tempo real foi realizada a partir do sobrenadante coletado das culturas de células, nos respectivos dias (0, 2 e 7 d.p.i.). Títulos de carga viral do EIAV em cultura de MDM de cavalos ao longo do tempo (barras em preto); Títulos de carga viral do EIAV em cultura de MDM de jumentos ao longo do tempo (barras em cinza).

As taxas de replicação viral no sobrenadante das culturas de MDMs dos cavalos e jumentos infectados com o EIAV_{Wyo}, foram analisadas pelo método de One Step RT-

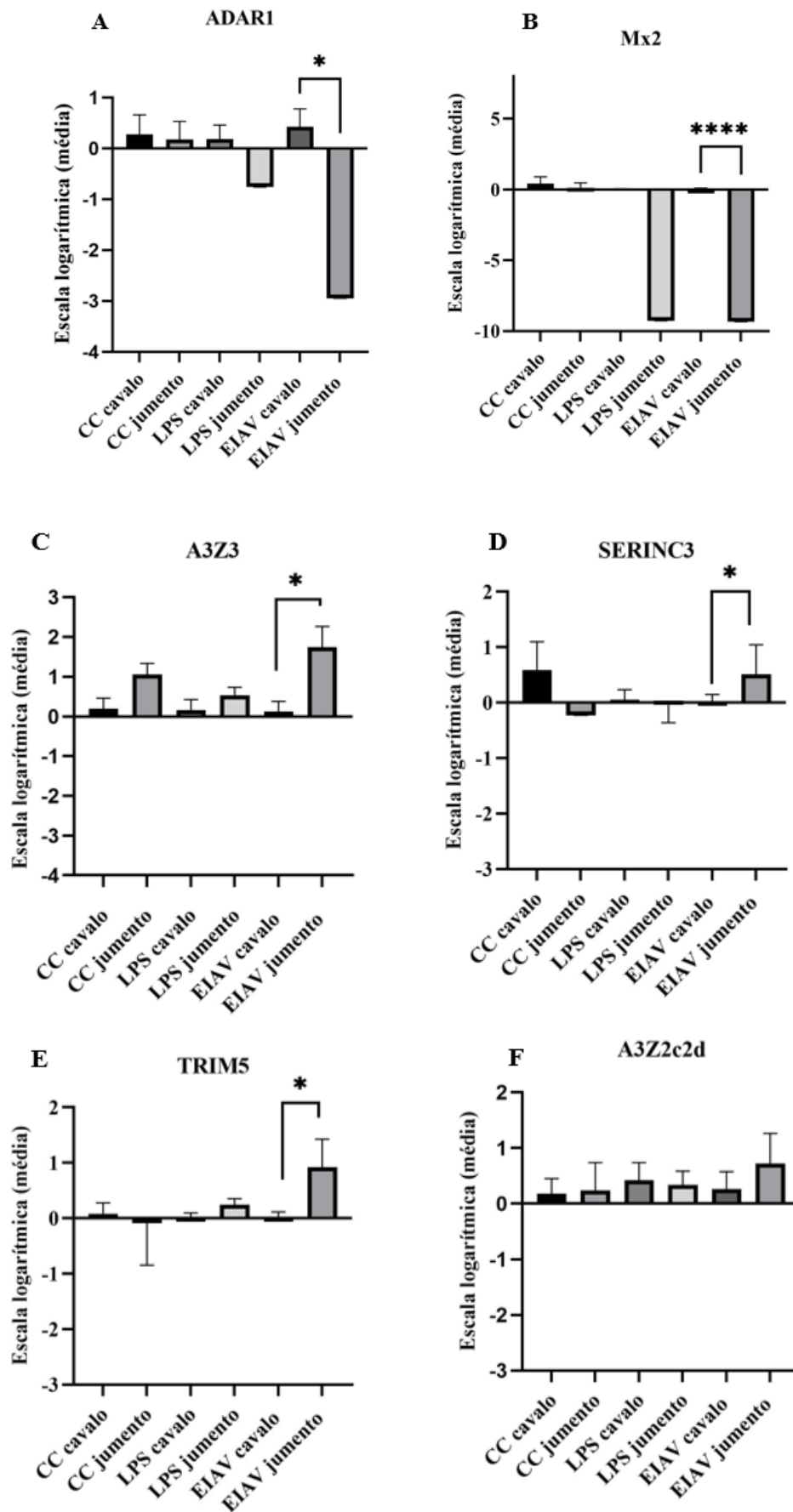
qPCR em tempo real. Uma vez que a quantidade de vírus infectante inicial foi de $1,66 \times 10^3$ n° de cópias de RNA/mL⁻¹, em jMDM a carga viral aumentou aproximadamente 1,3 vezes ($2,13 \times 10^3$ RNA/mL), em contrapartida, nos cMDM o aumento observado foi de aproximadamente 2,6 vezes ($4,31 \times 10^3$ RNA/mL) com 2 d.p.i. Ao final do experimento, com 7 d.p.i., a carga viral nas culturas de células de cavalos e jumentos, aumentou $8,73 \times 10^3$ e $1,40 \times 10^3$ vezes, respectivamente, quando comparados a quantidade infectante inicial ($1,45 \times 10^7$ RNA/mL em cMDM e $2,33 \times 10^6$ RNA/mL em jMDM) (Figura 4).

2.4.2. Avaliação dos fatores de restrição em MDM de cavalos e jumentos infectados com o EIAV

O objetivo inicial do estudo era avaliar a resposta dos MDM de cavalos e jumentos quando infectados pelo EIAV_{Wyo}, referente à expressão dos RRFs APOBEC3, ADAR1, RSAD2, SAMHD1, Mx2, BST2, SERINC_s e TRIM5 α , ao longo dos dias. Contudo, ao realizarmos esse tipo de análise, não foi encontrada diferença estatisticamente significativa entre os grupos (Apêndice 4), isso se deve ao fato de que, para análises de variância utilizando como complemento o teste de Tukey, que é altamente preciso, tendo vários parâmetros a serem analisados como a relação intraespécie, expressão dos RRFs, o tratamento da cultura de MDM e o fator tempo, seria necessário um n maior que 3 animais por espécie.

Contudo, ao excluirmos o fator tempo e analisarmos apenas a diferença na expressão dos RRFs em MDM de jumentos quando comparado aos cavalos, encontramos com relevância estatisticamente significativa, uma maior expressão de ADAR1 na cultura de macrófagos de equinos do que em asininos (Figura 5A). Resultado semelhante foi encontrado, quando analisamos o fator Mx2 (Figura 5B). Em contrapartida, o gene *A3Z3* codificante da proteína APOBEC, bem como a proteína SERINC e TRIM5 α , tinha maior expressão em MDM de jumentos que em MDM de cavalos infectados com o EIAV_{Wyo}, *in vitro* (Figura 5 C, D e E; Figura 6; Apêndice 5).

Nos demais RRFs não foi encontrada relevância estatisticamente significativa, porém existe uma tendência dos fatores *A3Z2c-2d*, BST2, SAMHD1 e o RSAD2, serem igualmente expressos em MDMs independente da espécie (Figura 5 F, G, H e I; Apêndice 5).



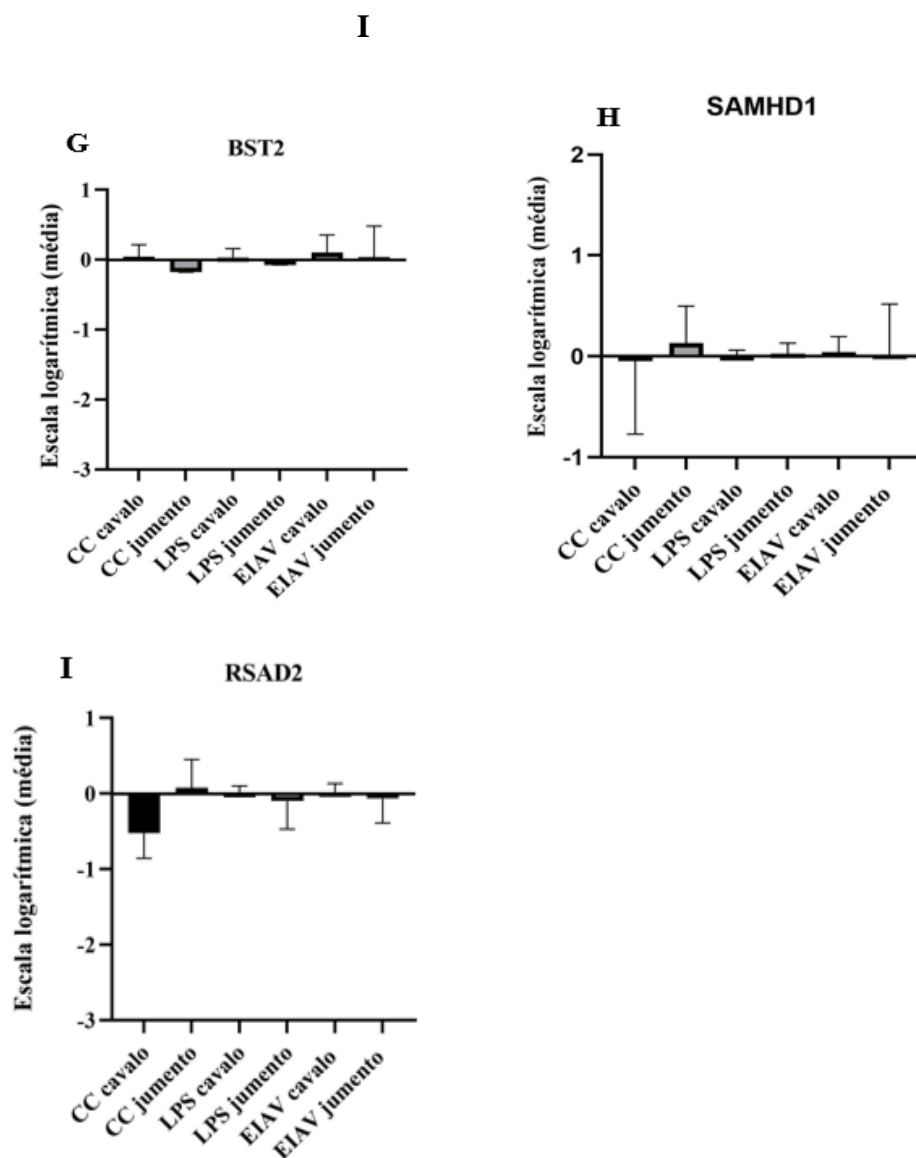


Figura 5: Representação gráfica da expressão média de mRNA dos RRFs, proveniente da cultura de macrófagos derivados de monócitos, extraídos do PBMC de cavalos e jumentos infectados com o EIAVWy, tratados com LPS ou com meio de cultivo RPMI (CC). O eixo x descreve as amostras analisadas e o eixo y indica as expressões relativas do mRNA proveniente dos MDMs de jumentos em relação ao mRNA extraído MDMs dos cavalos, após normalização (log2) dos fatores ADAR1 (A), Mx2 (B), A3Z3 (C), SERINC (D), TRIM5 (E), A3Z2c-2d (F), BST2 (G), SAMHD1 (H) e RSAD2 (I). *p <0,05.

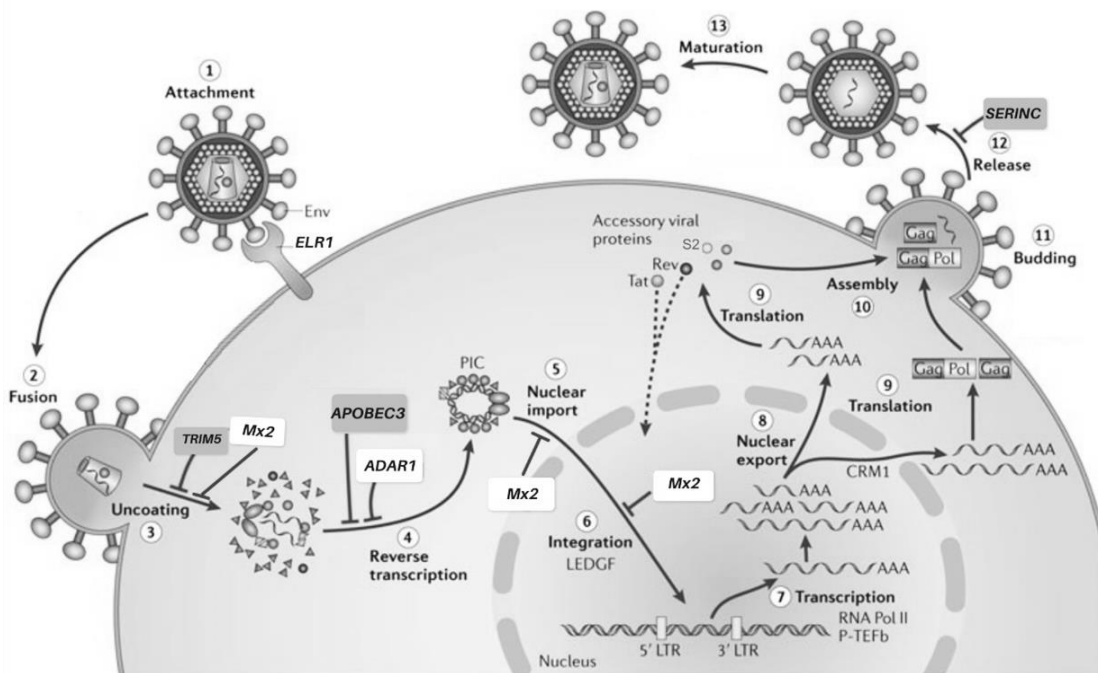


Figura 6: Resumo da expressão dos RRFs encontrada em macrófagos derivados de monócitos de cavalos e jumentos e suas respectivas ações no ciclo de replicação do EIAV. Em **cinza** são os RRFs mais expressos em jumentos. A começar pelo TRIM5, que atua na etapa de entrada do capsídeo viral, estimulando o seu desnudamento prematuro, seguindo pela proteína APOBEC3, que induz hipermutações de G para U durante a transcrição do RNA viral em DNA, terminando em SERINC que se liga aos *vírions* em brotamento e limita as infecções subsequentes. Em **branco** são os RRFs mais expressos em cavalos. O Mx2 pode atuar em 3 etapas diferentes do ciclo de replicação viral: Na etapa inicial, degradando o capsídeo viral de maneira precoce (I); bloqueando a ação das nucleoporinas (II) e/ou das transportinas (III), impedindo a integração do material genético viral ao genoma da célula do hospedeiro. Além disso, o ADAR1 também é mais expresso em MDM de cavalos e, atua induzindo hipermutações de A para I, o que ocasiona escape do reconhecimento dos receptores tipo Toll e RIG-1, bem como, aumenta a infecciosidade viral, estimulando a transcrição da região gênica LTR. Fonte: Engelman & Cherepanov, 2012 (adaptado).

2.5. Discussão

Os jumentos têm uma susceptibilidade diferente a certos agentes infecciosos quando comparados aos cavalos. No entanto, existem poucos estudos científicos que

visam elucidar a patogênese, resposta imune e/ou fisiopatologia dessa espécie. Muitos dos conhecimentos disponíveis vêm das experiências clínicas de médicos veterinários e das inferências extrapoladas dos cavalos para os jumentos. Com relação a EIA, atualmente existe apenas um único estudo que comparou a infecção pelo EIAV em equinos e asininos (Cook et al., 2001) enfatizando que os jumentos são naturalmente resistentes ao desenvolvimento dos sinais clínicos e controlam eficientemente a carga viral quando comparados aos cavalos.

Semelhante aos resultados observados nesse trabalho, alguns estudos descreveram a igual permissibilidade de MDMs de equinos e asininos frente à infecção pelo EIAV *in vitro* (Cook et al., 2001; Oliveira, 2016). Contudo, Oliveira, (2016), demonstrou que os MDMs de jumentos, quando infectados com a estirpe de campo EIAV_{Wyo}, tem uma menor expressão de citocinas pró-inflamatórias, que os MDMs de cavalos. Embora, a presença exacerbada de citocinas pró-inflamatórias possa agravar os quadros de anemia e induzir a formação de imunocomplexos (Covaleda et al., 2010; Russell et al., 1998), a pouca diferença encontrada entre a expressão de citocina nos MDMs de jumentos e cavalos não seria suficiente para explicar a ausência de sinais clínicos, controle da carga viral e atraso na soroconversão dos asininos quando infectados pelo EIAV (Cook et al., 2001; Oliveira, 2016). Dessa forma, outros fatores podem estar associados à resistência natural dessa espécie, como por exemplo a expressão de Fatores de Restrição Retrovirais (RRF), que até o presente momento não tinham sido comparativamente avaliados.

Atualmente, mais de quinze RRFs foram descritos como inibidores potentes do *Human immunodeficiency virus* (HIV) e de retrovírus murinas, felinas ou de primatas não-humanos (Chemudupati et al., 2019; Colomer-Lluch et al., 2018). Contudo, apenas seis foram analisados frente a infecção pelo EIAV em equinos, sendo eles APOBEC3, ADAR1, RSAD2, SAMHD1, Mx2 e BST2. A funcionalidade de outros RRFs, como o SERINC e o TRIM5 α , foram observadas em estudos utilizando pseudovírus expressando o gene *env* ou o gene *s2*, restrito do EIAV, em cultura de células epiteliais humanas imortalizadas (HeLa) (Bogerd et al., 2008; Chande et al., 2016; Gramberg et al., 2013; Ji et al., 2018; Johnson & Sawyer, 2009; Tang et al., 2015; Tang et al., 2014; Yin et al., 2014; Zielonka et al., 2009).

As *adenosinas desaminases específicas de RNA* (ADAR1s) são enzimas que reconhecem o RNA de fita dupla e medeiam a conversão de adenosina (A) em inosina (I), alterando dessa forma a estrutura do RNA, o potencial de codificação e os padrões de

splicing (Nishikura, 2010; Samuel, 2011). Frente ao EIAV, a ADAR1 regula positivamente a replicação viral, pois a edição de A para I converte um códon de parada em um triptofano (Trp), aumentando a trans-ativação da região promotora *U3* do gene *LTR*, ampliando por consequência, a transcrição viral e aumento da infecciosidade do EIAV, resultado esse, também observado em infecções causadas pelo *Hepatitis Delta virus* (HDV) (Poison et al., 1996; Tang et al., 2015). Embora pareça que o ADAR1 é expresso nos macrófagos de todos os equídeos, nos jumentos a expressão desse RRF é menor que nos cavalos. Em infecções *in vitro* de linfócitos T pelo HIV-1, foi observado que a linhagem de linfócitos quando ativada por interferons (IFN), expressa constitutivamente o ADAR1, que mantém a sua funcionalidade em induzir mutações de A para I, regulando positivamente a replicação do HIV. Porém, em linfócitos T em repouso, ocorre uma limitação da expressão de ADAR1, o que prejudica a expressão do HIV e, portanto, contribui parcialmente para o bloqueio da replicação viral (Phuphuakrat et al., 2008). No caso dos jumentos, embora igualmente susceptíveis à infecção pelo EIAV, a menor expressão de IFNs nos macrófagos de asininos quando comparado aos equinos (Oliveira, 2016), pode estar contribuindo para a baixa expressão de ADAR1 na célula-alvo e conseqüentemente, limitando a replicação viral nessa espécie.

As *Proteínas de resistência a mixovirus* (Mxs) são pertencentes a família GTPase e possuem uma ampla gama de funções antivirais. Em equinos, as proteínas Mxs (eqMxs), são subdividas em tipo 1 e 2. Enquanto o Mx1 atua preferencialmente no citoplasma, limitando a replicação do *Equine influenza virus* (EIV) (Fatima et al., 2019), o Mx2, desempenha uma atividade crucial nas infecções retrovirais, tendo como alvo o capsídeo viral e atuando também no bloqueio da entrada nuclear de cDNAs provirais (Goujon et al., 2014). Estudos anteriores, descreveram que a superexpressão de IFN, induz fortemente a ação do eqMx2, que passa a inibir fortemente a replicação do EIAV, *in vitro* (Ji et al., 2018; Meier et al., 2018). Contudo, observamos, que em MDM de jumentos infectados com o EIAV a expressão de Mx2 é menor que em cavalos, isso porque o eqMx2 é dependente da presença de IFNs e, a menor expressão dessas citocinas nos macrófagos dos jumentos limita a expressão e funcionalidade antiviral desse receptor (Meier et al., 2018; Oliveira, 2016). Com esse resultado, era esperado que os cavalos restringissem os sinais clínicos ao invés dos jumentos, porém, observamos que diferentemente de estudos anteriores, a expressão de Mx2 em cMDM infectados com o EIAV_{Wyo} é muito baixa. Hipotetizamos que esse fato ocorreu porque, nesse trabalho as culturas de MDMs não foram previamente tratadas com IFNs, conforme o protocolo feito

em estudos anteriores. Optamos por analisar a expressão natural da célula, mimetizando o mais próximo do que ocorreria em infecções *in-vivo*. Então, por mais que a funcionalidade frente ao EIAV do Mx2 seja mantida, a expressão natural do RRF nos macrófagos dos equinos infectados pelo EIAV é muito baixa. Busnadiago et al., (2014) observaram que o Mx2 de ovinos e caninos desempenha uma fraca atividade antiretroviral frente ao HIV-1, pelo fato dessa proteína ser pouco ou não expressa em poros nucleares. Embora, a localização subcelular de eqMx2 já tenha sido observada em cultura de células HeLa transfectadas, nos macrófagos dos equídeos, que são as células-alvo do vírus, até o momento, esse dado permanece desconhecido. Contudo, estudos adicionais são necessários, para explicar se a pouca expressão de Mx2 nos equídeos, estaria intimamente relacionada à localização celular do RRF nos macrófagos.

A família APOBEC3 (A3) em equídeos é dividida em três classes de genes principais A3Z1 (Z1a e Z1b), A3Z2 (Z2a-Z2b, Z2c-2d e Z2e) e A3Z3, destes, somente os genes A3Z2c-2d e A3Z3 inibem a replicação do EIAV, contudo esses genes são fracamente expressos em macrófagos de equinos (Bogerd et al., 2008; Zielonka et al., 2009), o que corrobora com os resultados observados nesse estudo. A região gênica A3Z2c-2d além de uma baixa expressão, teve uma variação muito pequena interespecie. Possivelmente o sistema A3Z2 tem uma importância limitada no mecanismo de restrição antiviral, enquanto o A3Z3 seria a variante primária que fornece a defesa contra as lentiviruses (Refsland et al., 2010; Troyer et al., 2019). Nesse sentido, os macrófagos de jumentos quando infectados pelo EIAV, parecem desenvolver uma maior expressão de A3Z3 que os cavalos. Em felinos não domésticos, a expressão de uma determinada região gênica de A3 (A3CH) é menos sensível a ação antagonista da proteína acessória Vif, presente no genoma do *Feline Immunodeficiency virus* (FIV), que os felinos domésticos. Por isso, em pumas selvagens infectadas com o vírus, a expressão do gene A3CH é maior que quando comparada aos gatos domésticos (Dietrich, 2013). O EIAV não codifica a proteína Vif e até o momento, não se sabe qual a região genômica do vírus que possa ter alguma ação antagonista frente as proteínas APOBECs. Em todo caso, a maior expressão de uma proteína viral antagonista em uma determinada espécie, pode reduzir a presença de um RRF alvo, o que justificaria a maior expressão do gene A3Z3 em jumentos quando comparada aos cavalos.

Os domínios incorporadores de serina (SERINCs), foram recentemente descritos como potentes inibidores da infecciosidade de retrovíruses como o HIV-1 e o MLV (Usami et al., 2015) Os SERINCs estão localizados na membrana plasmática, onde são

eficientemente incorporados aos *vírions* em brotamento, prejudicando a subsequente penetração em novas células alvo (Rosa et al., 2015). Os achados desse trabalho, demonstram uma propensão dos macrófagos de jumentos expressarem mais SERINC, quando infectados com o EIAV *in vitro*, que os macrófagos de equinos. Estudos apontam que certos subconjuntos de macrófagos de espécies diferentes abrigam quantidades menores de SERINC e, portanto, são mais propensos a liberar vírus infectante (Koppensteiner et al., 2012; Zutz et al., 2020). Além do mais, a proteína acessória S2 do EIAV, desempenha uma potente ação antagonista dos fatores SERINC, não somente ele, mas as glicoproteínas do envelope, também modulam a susceptibilidade retroviral ao SERINC (Chande et al., 2016). Contudo, Cook et al., (2001), descreveram que *in-vivo*, os cavalos uma vez infectados, replicam eficientemente o EIAV, ao contrário dos jumentos, isso indica, que as altas cargas virais, por consequência a alta expressão de S2 em macrófagos de equinos, consegue suprimir eficientemente a ação das SERINC nas células-alvo.

O TRIM5 α (Proteína contendo motivo tripartido 5) é um RRF que atua pós-entrada do vírus na célula do hospedeiro. O mecanismo preciso da restrição ainda é objeto de estudo, mas provavelmente envolve a desmontagem prematura do núcleo do capsídeo viral (Johnson & Sawyer, 2009; Perron et al., 2007; Wu et al., 2006). Nesse estudo, foi observada uma tendência dos MDM de cavalos quando infectados pelo EIAV_{Wyo}, *in vitro*, terem uma menor expressão desse RRF, quando comparada aos MDM de jumentos infectados nas mesmas condições. Estudos apontam que, a expressão da proteína TRIM5 α humana é menos potente, frente ao HIV-1, do que a maioria dos ortólogos de primatas não humanos (Keckesova et al., 2006; Nakayama et al., 2005). Nesse mesmo sentido, Liu et al., (2011), identificaram entre 1294 usuários de drogas venosas, 14 variantes de nucleotídeos diferentes, sendo que uma variante específica (H43Y), altera a expressão e a atividade anti- HIV-1 da proteína TRIM5 α . Acreditamos que a menor expressão de TRIM5 α em MDM de cavalos quando infectados pelo EIAV, possa ser proveniente de polimorfismos genéticos adquiridos ao longo da evolução independente da espécie e, isso pode ser um dos fatores que explicaria as diferenças nas taxas de replicação viral e progressão da doença encontrados entre os cavalos e jumentos diagnosticados com EIA.

Ainda referente às SERINC e TRIM5 α , descrevemos nesse estudo, de maneira inédita a presença desses RRFs em macrófagos derivados de monócitos de cavalos e de jumentos e demonstramos, pela primeira vez a expressão desses RRFs em cultura de MDMs infectados com uma estirpe altamente patogênica do EIAV.

Os demais RRFs analisados nesse trabalho, BST2 (Teterina), SAMHD1 e RSAD2 (Viperina), tem níveis de expressão muito semelhantes entre macrófagos de cavalos e jumentos e a presença do EIAV, parece não interferir na expressão desses RRFs.

Para BST2 (Antígeno estromal da medula óssea 2) ou teterina, como é popularmente conhecida, estudos anteriores já descreveram a presença de dois ortólogos do gene nos equídeos, sendo que em jumentos existem três deleções de aminoácidos valina no domínio transmembrana e três mutações distintas no ectodomínio da teterina. Contudo, a atividade antiviral não é afetada pela deleção ou substituição de aminoácidos (Yao et al., 2017; Yin et al., 2014a; Yin, et al., 2014b). Embora com expressões muito similares, notamos que no geral, os MDMs de cavalos e jumentos, parecem ter uma baixa expressão de BST-2, indicando que, diferentemente de macrófagos primários humanos, os macrófagos de equídeos parecem não expressar em grande escala esse RRF (Chu et al., 2012; Perez-Caballero et al., 2009).

Os domínios SAM e HD contendo desoxinucleosídeo trifosfato trifosfohidrolase 1 é um RRF que inibe a replicação lentiviral, esgotando o *pool* de nucleotídeos, interferindo na transcrição reversa viral, em células mieloides (Ballana & Esté, 2015; Laguette et al., 2011; Lahouassa et al., 2012). Frente ao EIAV, a presença do gene codificante da proteína Rev, no genoma viral, interage com o SAMHD1, levando à translocação do RRF do núcleo para o citoplasma e subsequente degradação de maneira dependente do lisossomo (Ren et al., 2021; Tang et al., 2014). Com isso, a infecção pelo EIAV diminuiu os níveis de SAMHD1, o que justificaria a baixa expressão desse RRF em cultura de MDM de equídeos infectada com o vírus. Contudo, estudos descreveram que SAMHD1 é altamente expresso em macrófagos murinos quando ativados por LPS (Valverde-Estrella et al., 2020), contrapondo os resultados desse estudo. Oliveira, (2016), descreveu que para um estímulo eficaz com LPS na expressão de citocinas pró-inflamatórias, é necessário um processo de sonicação desse indutor, anterior ao processo de inoculação em cultura de células, de modo a facilitar o contato da molécula com os receptores celulares e, conseqüentemente ativação da resposta imune. Nesse estudo, tivemos a limitação de um sonicador, estéril e optamos por um vórtex em máxima agitação, porém a agitação utilizando apenas esse aparelho, não consegue solubilizar o LPS de maneira eficaz, como os processadores ultrasônicos é isso pode ter comprometido os resultados observados nos controles com LPS dos RRFs analisados nesse estudo.

O RSAD2 (Proteína 2 contendo o domínio radical S-adenosil metionina), ou simplesmente viperina, é uma proteína multifuncional associada ao retículo

endoplasmático que regula a replicação do vírus, interferindo no tráfego e no brotamento de proteínas estruturais virais, distorcendo o sistema de transporte da membrana. Tang et al, (2014), demonstraram que a superexpressão de eViperin utilizando vetores lentivirais é regulada positivamente pelo EIAV em eMDM. Contudo, o estudo não demonstrou se nessa cultura de célula primária, a expressão da viperina endógena também teria o mesmo resultado. No nosso trabalho, observamos que em MDMs de cavalos e jumentos, a expressão de mRNA codificante do gene RSAD2 endógeno, não é alterado na presença do EIAV, principalmente em jumentos. Apesar da seleção natural ter atuado sobre a viperina ao longo da evolução dos mamíferos, frente ao HIV-1 foi demonstrado que esse RRFs de humanos não é importante, uma vez que o nocaute da viperina endógena em uma linhagem celular linfocítica não afetou a propagação do vírus. Além disso, o efeito da restrição da viperina é altamente específico a determinadas estirpes, não afetando a maioria dos isolados do HIV-1 e de outras retrovíroses, como o SIV isolado de macaco verde africano (SIVagm) e de chimpanzés (SIVcpz) (Lim et al., 2012). Nesse sentido, acreditamos que assim como para o HIV-1, a viperina endógena não é um RRF significativo para o EIAV, em MDMs dos equídeos e sua expressão pode ser influenciada pela estirpe do EIAV infectante.

2.6. Conclusão

Este foi o primeiro trabalho que descreveu a presença dos fatores de restrição APOBEC3, ADAR1, RSAD2, SAMHD1, Mx2, SERINC e TRIM5 α em macrófagos de asininos e avaliou comparativamente a expressão desses, bem como do BST-2 em infecções *in vitro* de cultura de macrófagos de cavalos e jumentos infectados com a estirpe patogênica EIAV_{wyo}. Além disso, esse estudo descreveu com ineditismo a presença de SERINC e TRIM5 α em macrófagos de equídeos. Nossos resultados demonstraram que, embora equinos e asininos possam ser igualmente susceptíveis a infecção pelo EIAV, a resistência natural dos jumentos, com relação a manifestação de sinais clínicos e controle da carga viral plasmática, pode ser explicada, dentre outros fatores, pela maior expressão de fatores de restrição retrovirais que atuam limitando etapas do ciclo de replicação viral, bem como a menor expressão de ADAR1, que diferente dos demais fatores analisados, contribui para o aumento da infecciosidade do EIAV.

2.7. Referências Bibliográficas

Ballana E, Esté JA. SAMHD1: At the crossroads of cell proliferation, immune responses, and virus restriction. Vol. 23, Trends in Microbiology. Elsevier Ltd; 2015. p. 680–92.

Bogerd HP, Tallmadge RL, Oaks JL, et al. Equine Infectious Anemia Virus Resists the Antiretroviral Activity of Equine APOBEC3 Proteins through a Packaging-Independent Mechanism. *J Virol*. 2008; 82(23):11889-901.

Bueno BL, Oliveira FG, Lima GK, et al. One-step RT-qPCR assay for detection and quantification of equine infectious anemia virus *in vitro*. *Genetics and Molecular Research*. 2018;17(3):1–9.

Busnadiago I, Kane M, Rihn SJ, et al. Host and Viral Determinants of Mx2 Antiretroviral Activity. *J Virol*. 2014; 88(14):7738-52.

Chande A, Cuccurullo EC, Rosa A, et al. S2 from equine infectious anemia virus is an infectivity factor which counteracts the retroviral inhibitors SERINC5 and SERINC3. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2016;113(46):13197–202.

Chemudupati M, Kenney AD, Bonifati S, et al. From APOBEC to ZAP: Diverse mechanisms used by cellular restriction factors to inhibit virus infections. *Biochim Biophys Acta Mol Cell Res*. 2019;1866(3):382–94.

Chu H, Wang JJ, Qi M, Yoon JJ, et al. Tetherin/BST-2 is essential for the formation of the intracellular virus-containing compartment in HIV-infected macrophages. *Cell Host Microbe*. 2012;12(3):360–72.

Colomer-Lluch M, Ruiz A, Moris A, Prado JG. Restriction Factors: From Intrinsic Viral Restriction to Shaping Cellular Immunity Against HIV-1. *Frontiers in immunology*. 2018; 9:2876.

Cook RF, Cook SJ, Li F, Montelaro RC, Issel CJ. Development of a multiplex real-time reverse transcriptase-polymerase chain reaction for equine infectious anemia virus (EIAV). *J Virol Methods*. 2002; 105(1):171-9.

Cook SJ, Cook RF, Montelaro RC, Issel CJ. Differential responses of *Equus caballus* and *Equus asinus* to infection with two pathogenic strains of equine infectious anemia virus. *Vet Microbiol*. 2001; 79:93–109.

Covaleda L, Fuller FJ, Payne SL. EIAV S2 enhances pro-inflammatory cytokine and chemokine response in infected macrophages. *Virology*. 2010;397(1):217–23.

Dietrich I. Feline restriction factors to lentiviral replication. [Tese Feline restriction factors to lentiviral replication]. Escócia: University of Glasgow; 2013.

Dong JB, Zhu W, Cook FR, et al. Development of a nested PCR assay to detect equine infectious anemia proviral DNA from peripheral blood of naturally infected horses. *Arch Virol*. 2012;157(11):2105–11.

Fatima U, Zhang Z, Zhang H, et al. Equine Mx1 restricts influenza A virus replication by targeting at distinct site of its nucleoprotein. *Viruses*. 2019;11(12).

- Fujikoshi, Y. Two-way ANOVA models with unbalanced data. *Discrete Mathematics*, 1993; 116(1-3), 315-334.
- Goujon C, Moncorge O, Bauby H, et al. Transfer of the Amino-Terminal Nuclear Envelope Targeting Domain of Human MX2 Converts MX1 into an HIV-1 Resistance Factor. *J Virol*. 2014; 88(16):9017-26.
- Gramberg T, Kahle T, Bloch N, Wittmann S, et al. Restriction of diverse retroviruses by SAMHD1. *Retrovirol*. 2013; 10:26.
- Hammond S, Cook SJ, Lichtenstein DL, et al. Maturation of the cellular and humoral immune responses to persistent infection in horses by equine infectious anemia virus is a complex and lengthy process. *J Virol*. 1997; 71(5):3840-52.
- Harrold SM, Cook SJ, Cook RF, et al. Tissue sites of persistent infection and active replication of equine infectious anemia virus during acute disease and asymptomatic infection in experimentally infected equids. *J Virol*. 2000;74(7):3112–21.
- Hierholzer JC, Killington RA. Virus isolation and quantitation. In: *Virology Methods Manual*. Elsevier; 1996. p. 25–46.
- Ji S, Na L, Ren H, et al. Equine Myxovirus Resistance Protein 2 Restricts Lentiviral Replication by Blocking Nuclear Uptake of Capsid Protein. *J Virol*. 2018;92(18):1–16.
- Johnson WE, Sawyer SL. Molecular evolution of the antiretroviral TRIM5 gene. *Immunogenetics*. 2009;61(3):163–76.
- Keckesova Z, Ylinen LMJ, Towers GJ. Cyclophilin A Renders Human Immunodeficiency Virus Type 1 Sensitive to Old World Monkey but Not Human TRIM5 α Antiviral Activity. *J Virol*. 2006;80(10):4683–90.
- Keselman HJ, Rogan JC. The Tukey multiple comparison test: 1953–1976. *Psychol Bulletin*, 1977; 84(5), 1050.
- Koppensteiner H, Brack-Werner R, Schindler M. Macrophages and their relevance in Human Immunodeficiency Virus Type I infection. *Retrovirol*. 2012; 9:82.
- Laguet N, Sobhian B, Casartelli N, et al. SAMHD1 is the dendritic- and myeloid-cell-specific HIV-1 restriction factor counteracted by Vpx. *Nature*. 2011;474(7353):654–7.
- Lahouassa H, Daddacha W, Hofmann H, et al. SAMHD1 restricts the replication of human immunodeficiency virus type 1 by depleting the intracellular pool of deoxynucleoside triphosphates. *Nat Immunol*. 2012;13(3):223–8.
- Lei C, Yang J, Hu J, Sun X. On the Calculation of TCID₅₀ for Quantitation of Virus Infectivity. *Virol Sin*. 2020;12250.
- Lim ES, Wu LI, Malik HS, Emerman M. The function and evolution of the restriction factor viperin in primates was not driven by lentiviruses. *Retrovirol*. 2012;9.
- Lim WS, Payne SL, Edwards JF, Kim I, Ball JM. Differential effects of virulent and avirulent equine infectious anemia virus on macrophage cytokine expression. *Virol*. 2005;332(1):295–306.

Ma J, Wang SS, Lin YZ, et al. Infection of equine monocyte-derived macrophages with an attenuated equine infectious anemia virus (EIAV) strain induces a strong resistance to the infection by a virulent EIAV strain. *Vet Res.* 2014;45(1):1–12.

Mealey RH, Sharif A, Ellis SA, et al. Early detection of dominant Env-specific and subdominant Gag-specific CD8⁺ lymphocytes in equine infectious anemia virus-infected horses using major histocompatibility complex class I/peptide tetrameric complexes. *Viol.* 2005; 339(1):110-26.

Meier K, Jaguva Vasudevan AA, et al. Equine MX2 is a restriction factor of equine infectious anemia virus (EIAV). *Viol.* 2018; 523:52-63.

Nakayama EE, Miyoshi H, Nagai Y, Shioda T. A Specific Region of 37 Amino Acid Residues in the SPRY (B30.2) Domain of African Green Monkey TRIM5 α Determines Species-Specific Restriction of Simian Immunodeficiency Virus SIVmac Infection. *J Virol.* 2005;79(14):8870–7.

Naves JHFF, Oliveira FG, Bicalho JM, et al. Serological diagnosis of equine infectious anemia in horses, donkeys and mules using an ELISA with a gp45 synthetic peptide as antigen. *J Virol Methods.* 2018; 266:49–57.

Newman ENC, Holmes RK, Craig HM, et al. Antiviral function of APOBEC3G can be dissociated from cytidine deaminase activity. *Curr Biol.* 2005; 15(2):166-70.

Nishikura K. Functions and regulation of RNA editing by ADAR deaminases. *Annu Rev Biochem.* 2010; 79:321–49.

Oliveira FG. Vírus da Anemia Infecciosa Equina em Asininos: Sorologia em animais errantes e avaliação “*in vitro*” da resposta em macrófagos. [Tese Vírus da Anemia Infecciosa Equina em Asininos: Sorologia em animais errantes e avaliação “*in vitro*” da resposta em macrófagos]. Universidade Federal de Minas Gerais; 2016.

Perez-Caballero D, Zang T, Ebrahimi A, et al. Tetherin Inhibits HIV-1 Release by Directly Tethering Virions to Cells. *Cell.* 2009; 139(3):499-511.

Perron MJ, Stremlau M, Lee M, et al. The Human TRIM5 α Restriction Factor Mediates Accelerated Uncoating of the N-Tropic Murine Leukemia Virus Capsid. *J Virol.* 2007;81(5):2138–48.

Pfaffl, MW. "Relative quantification." *Real-time PCR.* Taylor & Francis, 2007. 89-108.

Phuphuakrat A, Kraiwong R, Boonarkart C, et al. Double-Stranded RNA Adenosine Deaminases Enhance Expression of Human Immunodeficiency Virus Type 1 Proteins. *J Virol.* 2008;82(21):10864–72.

Poison AG, Bass BL, Casey JL. RNA editing of hepatitis delta virus antigenome by dsRNA-adenosine deaminase. *Nature.* 1996;380(6573):454–6.

Reed, LJ, Muench H. A simple method of estimating 50 percent end-points. *Am J Hyg.* 1938; 27(3): 493-7.

Refsland EW, Stenglein MD, Shindo K, et al. Quantitative profiling of the full APOBEC3 mRNA repertoire in lymphocytes and tissues: Implications for HIV-1 restriction. *Nucleic Acids Res.* 2010;38(13):4274–84.

Reis; J, Cook F. Anemia Infecciosa Equina: Um problema ainda a ser resolvido. *Revista VeZ em Minas*. 2014;9–19.

Ren H, Yin X, Su C, et al. Equine lentivirus counteracts SAMHD1 restriction by Rev-mediated degradation of SAMHD1 via the BECN1-dependent lysosomal pathway. *Autophagy*. 2021;17(10):2800–17.

Rio DC, Ares M, Hannon GJ, Nilsen TW. Purification of RNA using TRIzol (TRI Reagent). *Cold Spring Harb Protoc*. 2010;5(6):1–4.

Rosa A, Chande A, Ziglio S, et al. HIV-1 Nef promotes infection by excluding SERINC5 from virion incorporation. *Nature*. 2015; 526(7572):212-7.

Royston, P. Approximating the Shapiro-Wilk W-test for non-normality. *Statistics and computing*, 1992; 2, 117-119.

Russell KE, Walker KM, Miller RT, Sellon DC. Hyperglobulinemia and lymphocyte subset changes in naturally infected, inapparent carriers of equine infectious anaemia virus. *Am J Vet Res*. 1998;59(8):1009–15.

Samuel CE. Adenosine deaminases acting on RNA (ADARs) are both antiviral and proviral. *Virology*. 2011;411(2):180–93.

Schoggins JW. Interferon-stimulated genes: Roles in viral pathogenesis. *Curr Opin Virol*. 2014; 6:40-6.

Stremlau M, Perron M, Welikala S, Sodroski J. Species-Specific Variation in the B30.2(SPRY) Domain of TRIM5 α Determines the Potency of Human Immunodeficiency Virus Restriction. *J Virol*. 2005; 79(5):3139-45.

Tang YD, Na L, Fu LH, et al. Double-stranded RNA-specific adenosine deaminase 1 (ADAR1) promotes EIAV replication and infectivity. *Virology*. 2015; 476:364–71.

Tang Y-D, Na L, Zhu C-H, et al. Equine Viperin Restricts Equine Infectious Anemia Virus Replication by Inhibiting the Production and/or Release of Viral Gag, Env, and Receptor via Distortion of the Endoplasmic Reticulum. *J Virol*. 2014; 88(21):12296-310.

Troyer RM, Malmberg JL, Zheng X, Miller C, Macmillan M, Sprague WS, Wood BA, Vandewoude S. Expression of APOBEC3 Lentiviral Restriction Factors in Cats. *Viruses*. 2019;11(9).

Usami Y, Wu Y, Göttlinger HG. SERINC3 and SERINC5 restrict HIV-1 infectivity and are counteracted by Nef. *Nature*. 2015;526(7572):218–23.

Valverde-Estrella L, López-Serrat M, Sánchez-Sánchez G, et al. Induction of Samhd1 by interferon gamma and lipopolysaccharide in murine macrophages requires IRF1. *Eur J Immunol*. 2020;50(9):1321–34.

Weber G, Heck D, Bartlett RR, Nixdorff K. Modulation of effects of lipopolysaccharide on macrophages by a major outer membrane protein of *Proteus mirabilis* as measured in a chemiluminescence assay. *Infect Immun*. 1992; 60(3):1069-75.

- Whelan JA, Russell NB, Whelan MA. A method for the absolute quantification of cDNA using real-time PCR. *J Immunol Methods*. 2003;278(1–2):261–9.
- Wu X, Anderson JL, Campbell EM, et al. Proteasome inhibitors uncouple rhesus TRIM5 restriction of HIV-1 reverse transcription and infection. *Vol. 103*. 2006.
- Yao Q, Ma J, Wang X, et al. A pilot study on interaction between donkey tetherin and EIAV strains with different virulent and replication characteristics. *Microb Pathog*. 2017; 106:65-8.
- Yin X., Hu Z, Gu Q, et al. Equine Tetherin Blocks Retrovirus Release and Its Activity Is Antagonized by Equine Infectious Anemia Virus Envelope Protein. *J Virol*. 2014a; 88(2):1259-70.
- Yin X, Guo M, Gu Q, et al. Antiviral potency and functional analysis of tetherin orthologues encoded by horse and donkey. *Virol J*. 2014b;11(1):1–8.
- Zielonka J, Bravo IG, Marino D, et al. Restriction of Equine Infectious Anemia Virus by Equine APOBEC3 Cytidine Deaminases. *J Virol*. 2009; 83(15):7547-59.
- Zutz A, Schölz C, Schneider S, et al. SERINC5 Is an Unconventional HIV Restriction Factor That Is Upregulated during Myeloid Cell Differentiation. *J Innate Immun*. 2020;12(5):399–409.

CAPÍTULO 3: Avaliação da expressão do receptor de lentivírus equino tipo 1 em macrófagos de jumentos e de cavalos infectados com o Vírus da Anemia Infecciosa Equina (EIAV)

3.1. Resumo

A Anemia Infecciosa Equina (EIA) é uma enfermidade cosmopolita causada pelo *Equine infectious anemia virus* (EIAV), um *lentivirus* classificado na família *Retroviridae* que acomete exclusivamente os equídeos. O EIAV tem tropismo por macrófagos, que até o momento são as únicas células descritas *in-vivo*, que possuem o receptor ELR1 que permite a entrada do EIAV nas células-alvo. Contudo, além do ELR1 funcional, os macrófagos exibem uma isoforma solúvel (sELR1), que permite a ligação vírus-célula, mas não permite a completa fusão do envelope viral. Entretanto, os estudos atuais mapearam a presença do ELR1 e sELR1 em cavalos, e, nada se sabe sobre a expressão do receptor e sua isoforma nos demais equídeos, como os jumentos. Nesse sentido o objetivo desse estudo foi comparar a expressão do ELR1 na sua forma funcional e solúvel (sELR1) em células mononucleares de cavalos e jumentos infectadas com o EIAV *in vitro*, ao longo do tempo. Para isso, foram coletados a camada de leucócitos do sangue total de 3 cavalos e 3 jumentos e as células foram cultivadas e infectadas pela estirpe patogênica EIAV_{Wyo}, com posterior verificação da expressão do receptor, nas duas isoformas, por qPCR. Nossos resultados demonstraram que enquanto a forma funcional do ELR1 é igualmente expressa em células de equinos e asininos, a isoforma sELR1 é inicialmente mais expressa em jumentos, porém, com o passar do tempo a presença do EIAV parece diminuir a expressão do sELR1, indicando que a capacidade de controlar a carga viral e a manifestação dos sinais clínicos pode estar relacionada à entrada viral reduzida nas células hospedeiras dessa espécie.

3.2. Introdução

A Anemia Infecciosa Equina (EIA) é uma doença viral, que acomete todos os membros da família Equidae (equinos, asininos e muares) e é causada pelo *Equine infectious anemia virus* (EIAV), um retrovírus, classificado dentro do gênero *Lentivirus*.

O EIAV possui aproximadamente 115nm de diâmetro e um DNA proviral de aproximadamente 8200 pb, subdivido em: gene *gag*, responsável por sintetizar as proteínas do core viral; gene *pol* que codifica as enzimas transcriptase reversa, integrase e protease que atuam na síntese de DNA a partir de RNA e inserção do material genético

viral ao genoma da célula hospedeira, bem como, o gene *env* que é responsável pela produção de glicoproteínas transmembrana (gp45) e de superfície (gp90), requeridas para a entrada do vírus na célula alvo (Li et al., 2005). Além disso, o genoma do vírus codifica três proteínas acessórias: Tat, Rev e S2 que desempenham funções reguladoras e aumento da patogenicidade, flanqueado nas extremidades por regiões gênicas de repetição (*LTR*) contendo sequências regulatórias (Covaleda et al., 2010; Craigo et al., 2009).

Uma vez no hospedeiro, o EIAV tem tropismo pela linhagem tecidual de monócitos/macrófagos. A infecção retroviral inicia-se quando as glicoproteínas de superfície viral (gp90) se ligam aos Receptores de Lentivírus Equino tipo 1 (ELR1) presente na superfície dos monócitos, disponíveis principalmente na corrente sanguínea e medula óssea. Após a ligação, ocorrem mudanças conformacionais tanto no receptor celular quanto na glicoproteína de superfície, permitindo a fusão do envelope viral, seguindo da liberação do capsídeo e desnudamento do material genético do EIAV no citoplasma celular (Lin et al., 2013). No entanto, os monócitos não possuem todos os fatores de transcrição necessários para a replicação viral (Evans et al., 2013). Dessa forma, o processo inflamatório causado pela infecção viral, estimula a expressão de citocinas específicas e do receptor de fator de crescimento hematopoiético (Csf1r) que induz a migração dos monócitos para os tecidos onde se diferenciam em macrófagos, que passam a sintetizar novas partículas infecciosas. Os órgãos ricos em macrófagos, como baço, fígado, pulmões e rins se tornam os locais primários da replicação viral (Covaleda et al., 2010; Geissmann et al., 2010; Maury, 1994; Sellon, 1993)

A linhagem tecidual monócitos/macrófagos, de equinos, são as únicas células onde o ELR1 foi descrito até o momento. O ELR1 é um membro da superfamília de receptores do fator de necrose tumoral (TNFR) e o único receptor associado a entrada do EIAV nas células-alvo (Leroux et al., 2004; Zhang et al., 2008).

O ELR1 é uma proteína transmembrana, formado por quatro domínios ricos em cisteína (CRD1 a CRD4) (Naismith & Sprang, 1998). Estudos demonstraram que uma única leucina (Leu) presente na posição 70, do domínio CRD1 é essencial para a ligação funcional do ELR1 a glicoproteína de superfície do EIAV (gp90), enquanto os demais domínios, embora não sejam essenciais, podem influenciar na força de interação do receptor com a gp90 (Zhang et al., 2008). Todavia, Lin et al., (2013), identificaram na superfície dos monócitos/macrófagos, a presença de uma isoforma predominante funcional do ELR1, contendo 942bp, subdividida em 9 éxons (1-9), bem como, a presença de uma isoforma solúvel, contendo uma inserção de 153 nucleotídeos no *intron* 6

(sELR1), processado pós- transcricionalmente, pós traducionalmente ou a partir de *splicings* alternativos, que produziu mudanças no quadro de leitura dos nucleotídeos e consequentemente, alongamento da proteína (Levine, 2004).

Enquanto o receptor ELR1 permite a ligação e fusão do envelope viral à superfície da membrana celular, a isoforma sELR1 permite a ligação da gp90 ao receptor, mas impede as mudanças conformacionais subsequentes que são necessárias para a fusão do EIAV a célula-alvo, exercendo dessa forma, efeitos inibitórios na infecção viral. Além disso, o sELR1 aparece com uma alta frequência em comparação com o transcrito ELR-1 funcional predominante (aproximadamente 25%). Posteriormente, um estudo observou que o EIAV regula positivamente a expressão de sELR1, indicando que a presença dessa proteína solúvel atua tanto na infectividade viral quanto na resistência do hospedeiro frente ao vírus (Ma et al., 2014).

Até o momento, estudos mapearam os resíduos de aminoácidos críticos para a ligação do EIAV ao receptor celular, descreveram a expressão do ELR1 em MDM e identificaram a presença de sELR1, *in vivo* (Lin et al., 2013; Zhang et al., 2008). Todavia, estes estudos estão limitados a equinos. Porém, apesar dos jumentos serem naturalmente acometidos pelo EIAV, essa espécie possui a capacidade de controlar eficientemente a replicação do retrovírus, mantendo os sinais clínicos da EIA ausentes e a carga viral baixa. Contudo, ao longo dos anos, cavalos e jumentos tiveram uma evolução independente, que modificou principalmente genes diretamente envolvidos na resposta imune. Nesse caso, a expressão de isoformas do receptor ELR1 na superfície dos macrófagos, pode ter sido alterada entre as espécies, e isso, poderia justificar as diferentes respostas encontradas nos jumentos quando infectados pelo EIAV.

Dessa forma, o objetivo desse estudo foi comparar a expressão do ELR1 na sua forma funcional, bem como, a expressão da isoforma solúvel do receptor (sELR1) em células mononucleares de cavalos e jumentos infectadas com o EIAV *in vitro*, ao longo do tempo.

3.3. Material e Métodos

3.3.1. Análise da expressão do receptor ELR1 e sua isoforma solúvel (sELR1) em MDM de cavalos e jumentos infectados com o EIAV

Após a coleta de amostras, as células mononucleares foram obtidas, conforme previamente descritas no capítulo 2 (itens 2.3.2.; 2.3.3 e 2.3.5).

Após 48h de incubação das células sanguíneas em estufa a 37°C com 5% de CO₂, os macrófagos foram submetidos a um inóculo com a estirpe patogênica EIAV_{Wyo}, a uma concentração de 1x10³TCID₅₀ (Apêndice 2.1.) (Ma et al., 2014).

Para controle das células, macrófagos livre de vírus de cavalos e de jumentos foram tratados apenas com RPMI puro (grupo mock), nas mesmas condições que a células infectadas. Posteriormente, para comprovar a presença do EIAV_{Wyo}, nas células cultivadas de jumentos, 48h após a infecção, a cultura de células foi coletada e submetida à extração do DNA total, utilizando o DNeasy Blood e Tissue kit (Qiagen, EUA), seguindo de uma *nested* PCR (*n*PCR), para amplificação do gene *env*, utilizando os volumes de reagentes e as condições da reação, conforme descrito por Bueno et al., (2020).

3.3.2. Análise da expressão do receptor ELR1 e sua isoforma solúvel (*sELR1*) 2429 em MDM de cavalos e jumentos infectados com o EIAV

Para a análise da expressão do receptor ELR1 e sua isoforma solúvel *sELR*, as células, foram coletadas nos tempos zero, dois, quatro, e seis dias pós-infecção (d.p.i.) (Lin et al., 2013), posteriormente, o RNA total foi extraído utilizando o reagente TRIzol (Rio et al., 2010), previamente tratado com DNase (Invitrogen, EUA) e transcrito em cDNA utilizando a enzima M-MLV Reverse Transcriptase kit (Promega, EUA), utilizando o protocolo recomendado pelo fabricante.

Para a amplificação do gene codificante do receptor *sELR1* foram utilizados os iniciadores descritos por Ma et al., (2014). Já para o ELR1 funcional foram construídos pares de iniciadores, com base nas sequências completas do gene de *E. caballus* e *E. asinus* disponível no banco de genomas NCBI (BLAST® - <https://blast.ncbi.nlm.nih.gov>) (nº de acesso: NM_001081907; XM_014863094) (Tabela 4). As sequências foram alinhadas do software BioEdit Sequence Alignment Editor 7.2.5. (Hall, 2007) e a região mais conservada do receptor ELR-1 foi destinada à construção dos iniciadores utilizados o software Primer-Blast, integrado ao banco de dados do NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>). Os resultados da qPCR foram analisados por quantificação relativa, utilizando o método de CT comparativo, onde se analisa a expressão de um gene em uma amostra de interesse comparada a uma amostra de referência (Pfaffl, 2007) (Apêndice 2.3.).

Tabela 4: Sequência dos iniciadores utilizados para amplificação do receptor ELR1 e sua isoforma solúvel sELR1.

Gene		Iniciadores (5'-3')	Amplicon (pb)	Referência
ELR1 ^a	F	AGGGCCTTGAGTCTTGAGGT	375	<i>In-house</i>
	R	TACTCCTCCTCTTTGCACTGG		
sELR1	F	GGAGAGTCCTTCAGACCTGAGTTCAC	149	Ma et al., 2014
	R	CGTGCACCTAGGAGAGAAGATTGGC		

a: os iniciadores foram construídos, utilizando a região mais conservada das sequências completas do gene ELR1 de cavalos e jumentos (nº de acesso: NM_001081907; XM_014863094).

Antes das análises por qPCR, todos os iniciadores foram devidamente testados por PCR convencional (Apêndice 6). Para isso foi utilizado como controle positivo uma cultura de macrófagos isolado de duas éguas positivas para EIA, naturalmente infectadas e com sinais clínicos da doença, pertencente ao banco de amostras do Laboratório de Retrovírus da Universidade Federal de Minas Gerais. Os ensaios de PCR convencional foram feitos em um volume de reação final de 25µL contendo 1,25U de Taq DNA polimerase (Promega, EUA) juntamente com a adição dos reagentes e volumes recomendados pelo fabricante, acrescido de 2mM de MgCl₂ (Promega, EUA), 0,8 µM de cada par de iniciadores e 0,25µg de cDNA total. A ciclagem utilizada consistiu em uma desnaturação inicial a 95°C por 2 min, seguida de 35 ciclos de desnaturação a 95°C por 1 min., anelamento de 62°C por 1 min., extensão a 72°C por 1 minuto e uma etapa de extensão final de 72°C por 5 minutos. Posteriormente, os produtos da PCR foram submetidos à corrida eletroforética em gel de 1,0 % de agarose, com 0,01% de brometo de etídio. As bandas amplificadas foram coletadas, purificadas e encaminhadas para sequenciamento, que comprovou a presença do fragmento de interesse.

3.3.5. Análise estatística

As expressões de mRNA dos RRFs foram submetidas a um teste de Shapiro-Wilk, para analisar a distribuição normal dos dados (Royston, 1992). Contudo, os resultados das reações de qPCR precisaram ser transformadas usando o método $2^{-\Delta\Delta CT}$, pois não existia uma distribuição normal dos dados (Ji et al., 2018). Posteriormente os resultados foram analisados por análise de variância (ANOVA two-way), um teste

paramétrico, utilizado para verificar se existem diferenças entre as médias de uma variável (variável resposta) em relação a dois níveis categóricos (com/sem EIAV *versus* espécie), nesse caso o efeito do animal foi considerado aleatório (Fujikoshi, 1993). As variações da média dos dados transformados referentes aos jumentos, em relação à média dos resultados transformados do cavalo, correspondem à variação da resposta (Covalada et al., 2010; Lim et al., 2005).

Além disso, para compreender a discrepância entre as diferenças encontradas nos testes ANOVA ao longo do tempo, utilizamos o teste Duncan, um teste de média mais permissível que os demais existentes, que compara a amplitude de um conjunto de médias amostrais, com uma amplitude mínima significativa calculada (Permanasari, 2010).

Os dados foram analisados pelo programa Infostat Software estatístico. Os resultados foram considerados significativamente diferentes quando $p < 0,05$. Os gráficos foram gerados no programa GraphPad Prism Software, versão 9 (Informer Technologies, Inc.).

3.4. Resultados

3.4.1. Avaliação da infecção do EIAV em cultura de MDM de cavalos e jumentos

As culturas de cMDM e jMDM referente as coletas de sangue dos três cavalos (n=3) e três jumentos (n=3) utilizados nesse estudo, foram submetidas a um inóculo viral de 1×10^3 TCID₅₀ (0,01 MOI) por poço e cultivadas durante sete dias.

Para comprovar a presença do EIAV_{wyo}, MDMs dos cavalos e jumentos, foram submetidos a extração do DNA total, seguindo de uma *n*PCR, para amplificação do gene viral *env*, 48h após a infecção com o vírus. Os resultados demonstraram que os MDMs dos 3 cavalos e dos 3 jumentos tinha a presença do material genético viral, possivelmente integrado ao genoma da célula hospedeira (Figura 6).

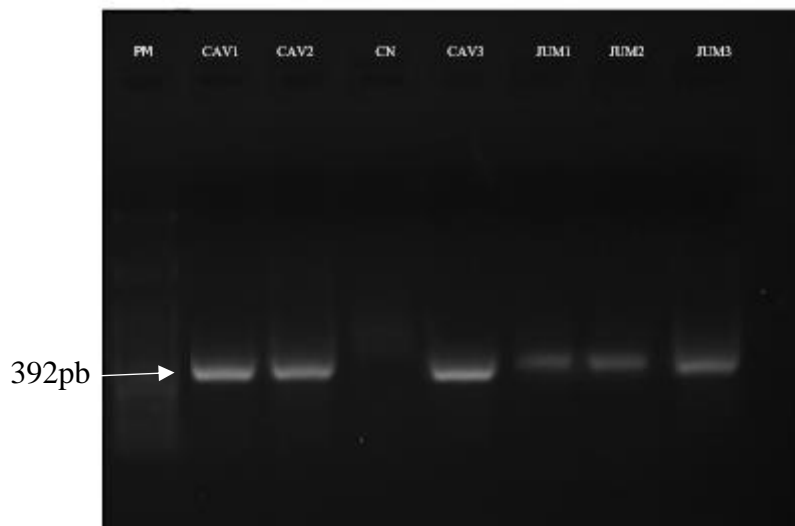


Figura 6: *n*PCR para amplificação do gene *env*, em cultura de MDM de cavalos e jumentos 48h após a infecção das células com a estirpe EIAV_{wyo}, amplificando um fragmento final de 392pb. CN: cultura de MDM de cavalo cultivada apenas com RPMI.

3.4.2. Análise da expressão do receptor *ELR1* na sua forma funcional em macrófagos derivados de monócitos de cavalos e jumentos

Analisamos a presença e expressão do receptor ELR1 (Ma et al., 2014), utilizando primers construídos *in-house*, que amplifica o éxon 1. Nas análises de similaridade de nucleotídeos, observamos que dentre as sequências completas do receptor isoladas de cavalos e jumentos, disponíveis no banco de dados de nucleotídeos (GenBank), esta era a região mais conservada do ELR1 entre as espécies.

Observamos que existe uma tendência de cavalos e jumentos expressarem níveis muito próximos do receptor ELR1 na superfície dos macrófagos, indicando que possivelmente não existe uma diferença com relação a presença do ELR1 funcional nos macrófagos, entre as espécies (Figura 7). Além disso, demonstramos que a presença do EIAV em cultura de MDM de cavalos e jumentos, não influencia na expressão do receptor, ao longo do tempo.

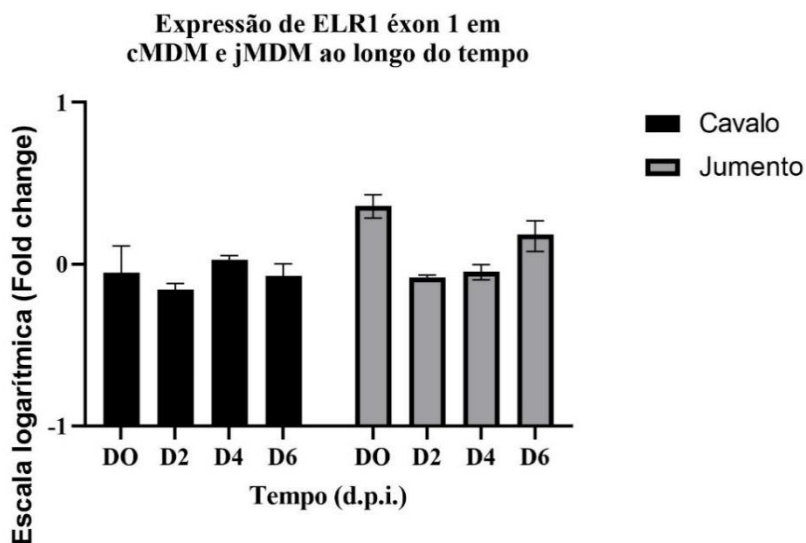


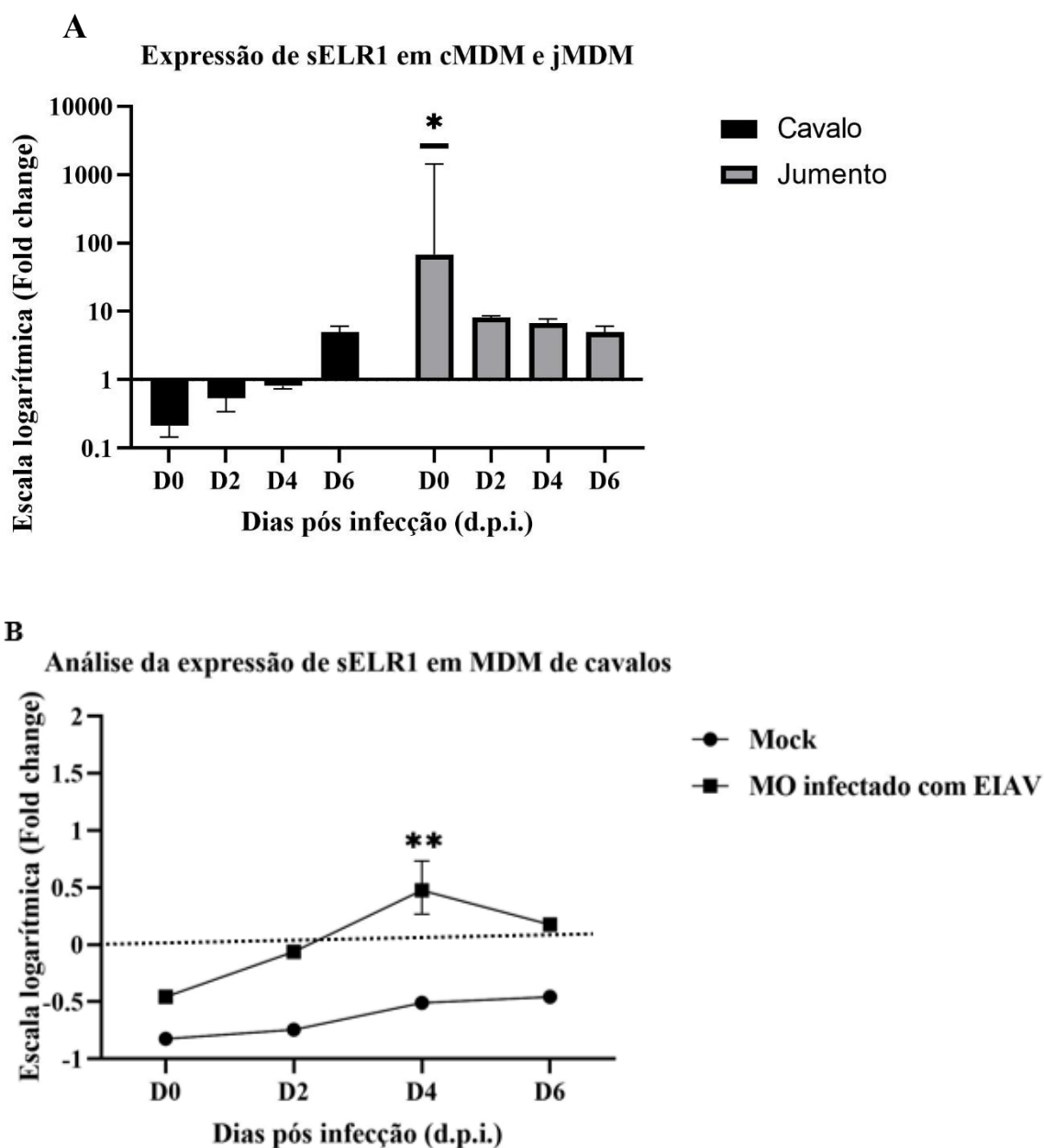
Figura 7: Expressão do receptor ELR1, em cultura de macrófagos derivados de monócitos de cavalos e jumentos infectados com a estirpe patogênica EIAV_{Wyo}. A expressão do ELR1 foi monitorada com 0, 2, 4 e 6 dias após a infecção (d.p.i.). O eixo x descreve os tempos analisados e o eixo y indica as expressões relativas do mRNA proveniente dos MDMs de jumentos em relação ao mRNA extraído MDMs dos cavalos, após normalização (log2). Os dados representam as médias e o desvio padrão da expressão do ELR1 em MDM de cavalos infectados com EIAV ao longo do tempo (barras em preto) e, a média e o desvio padrão do ELR1 em MDM de jumentos infectados com EIAV ao longo do tempo (barras em cinza).

3.4.3. Análise da expressão da isoforma sELR1 em macrófagos derivados de monócitos de cavalos e jumentos

Para a análise da expressão da isoforma solúvel do ELR-1, utilizamos pares de primers descritos por Ma et al., (2014), previamente testados por PCR convencional em amostras de equinos infectados naturalmente com o EIAV e posteriormente sequenciados.

Observamos que inicialmente os macrófagos de jumentos expressam maiores quantidades da isoforma solúvel do receptor (sELR1) quando comparado aos macrófagos de cavalos (Figura 8A; Apêndice 4). Porém, ao longo dos dias pós infecção, a expressão de sELR1 em MDM de cavalos foi aumentando, enquanto dos jumentos permaneceu estável.

Em contrapartida, ao analisarmos comparativamente a expressão da isoforma solúvel do ELR1 em MDM de cavalos e jumentos infectados com EIAV_{Wyo}, frente ao controle de células Mock (macrófagos livres de vírus tratado apenas com RPMI), notamos que as expressões de sELR1 foram significativamente maiores na cultura de células infectadas que nas células não infectadas dentre 4-6 dias pós infecção (Figura 8 B e C).



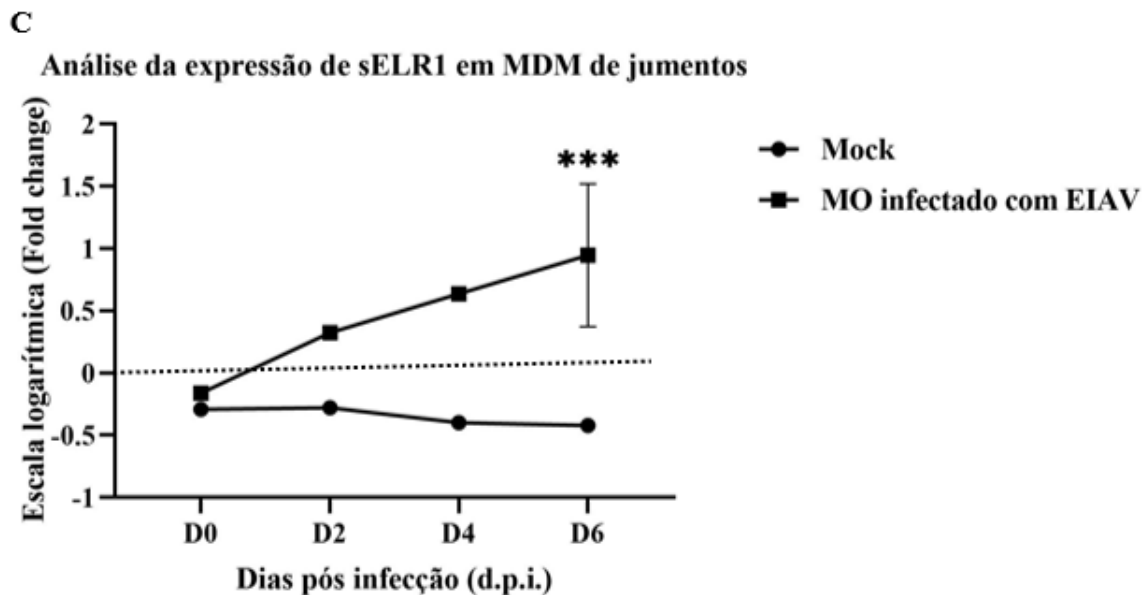


Figura 8: Avaliação da expressão da isoforma solúvel do *Receptor de lentivírus equino tipo 1* (ELR1) em cultura de macrófagos derivados de monócitos de cavalos comparado a de jumentos infectados com a estirpe patogênica EIAV_{Wyo} (A), em cultura de MDM de cavalos infectados comparado ao controle de macrófagos equinos não infectados tratado apenas com RPMI (Mock) (B), bem como, a cultura de MDM de jumentos infectados comparado ao controle de macrófagos de asininos não infectados tratados apenas com RPMI (C). A expressão do sELR1 foi monitorada com 0, 2, 4 e 6 dias após a infecção (d.p.i.). Os dados representam as médias e os desvio padrão das médias das duas análises. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$.

3.5. Discussão

Até o presente momento o Receptor de Lentivírus Equino tipo 1 (ELR1), é o único caracterizado como receptor funcional específico que medeia a entrada do *Equine infectious anemia virus* (EIAV) nos macrófagos de cavalos (Leroux et al., 2004; Zhang et al., 2008). Como o ELR1 atua tanto como receptor do EIAV quanto como membro da família TNFR, a descoberta de isoformas de ELR1 e a evidência de que a isoforma solúvel de ELR1 (sELR1) pode competir com sua forma funcional associada à membrana, implica o envolvimento dessa proteína tanto na infectividade viral quanto na resposta do hospedeiro (Lin et al., 2013), sugerindo que a existência de diferentes variantes alélicas pode ser relevante em termos de resposta imune do hospedeiro e eficiência da infecção viral.

Nesse estudo, demonstramos de maneira inédita a expressão do receptor ELR1, em MDM de jumentos infectados com o EIAV, bem como, comparamos com a expressão do receptor em cultura de MDM de cavalos infectados nas mesmas condições. Analisamos também a expressão do receptor funcional (ELR1) e sua isoforma solúvel (sELR1) nos dias 0, 2, 4 e 6 d.p.i. tendo como referência o trabalho de Lin et al., (2013), que analisaram também até o dia 8 d.p.i. Porém a viabilidade da nossa cultura de células primária, não nos permitiu estender as análises por mais tempo.

Nossos resultados demonstraram que o ELR1 funcional parece ser igualmente expresso em macrófagos derivados de monócitos de cavalos e jumentos e a quantidade de ELR1 ligada à membrana não é alterada na presença do EIAV, corroborando com estudos anteriores (Brindley & Maury, 2008; Ma et al., 2014; Maury & Wendy et al., 2003). Contudo, Corbi-Botto et al., (2017), descreveram vários polimorfismos encontrados em domínios do ELR1 entre um grupo de 47 equinos, incluindo animais positivos e negativos para EIA. Várias mutações não sinônimas foram encontradas principalmente no domínio CRD2 e parte do CRD3, que embora não seja crucial em termos de ligação à gp90 do EIAV, pode ter um impacto na conformação do receptor e nas interações com a proteína, influenciando na afinidade da ligação vírus-hospedeiro (Zhang et al., 2008). A presença dessas mutações, produzem uma série de aminoácidos diferentes, e as alterações funcionais em proteínas que interagem com um determinado vírus pode resultar em rápida evolução e explicar diferenças na resposta, e mesmo na progressão da doença (Barreiro & Quintana-Murci, 2010)

Nesse caso, apesar das culturas de MDMs de cavalos e jumentos expressarem o receptor ELR1 na mesma proporção, a presença de polimorfismos genéticos no ELR1 expresso em jumentos poderia explicar o eficiente controle da carga viral pelos jumentos quando infectados pelo EIAV, uma vez que a presença de mutações não sinônimas pode estar influenciando na ligação do EIAV ao ELR1 funcional, já que a carga viral do EIAV em macrófagos de jumentos analisadas *in-vivo*, tende a ser menor que quando comparada aos cavalos (Cook et al., 2001).

Alguns estudos identificaram a presença de uma variante de *splicing* alternativo de ELR1 na superfície de macrófagos de equinos. Esta variante retém um fragmento de 153 nucleotídeos no *intron* 6 e é responsável por uma grande proporção de transcritos de ELR1 (de 25% a 50% aproximadamente). A inserção dos nucleotídeos no *intron* 6, modifica o quadro de leitura de nucleotídeos, produzindo uma proteína mutante com quatro resíduos de aminoácidos a mais e um códon de parada prematuro (Lin et al., 2013;

Ma et al., 2014). Isso permite que a gp90 do EIAV se ligue ao receptor da célula hospedeira, mas impede as mudanças conformacionais subsequentes, que são necessárias para a fusão do envelope viral a célula.

A presença de isoformas solúveis de receptores celulares são supostamente um mecanismo de resistência do hospedeiro frente a infecções virais. A expressão de isoformas solúveis de receptores e sua função frente a infecção viral, já foi descrita para vários outros patógenos, como por exemplo os Rinovírus, onde a forma solúvel da molécula de adesão intercelular – 1 (ICAM-1) é um inibidor potente e específico da infecção por esse vírus (Marlin et al., 1990). Além disso, uma isoforma de IL-7 com *splicing* diferencial, leva à fosforilação de STAT-5 em células T CD4+ e CD8+ e consequentemente, impede uma replicação eficaz do HIV-1 (Vudattu et al., 2009). Por fim, a forma solúvel do subgrupo A do receptor Tva (sTva) em baixas concentrações, inibiu a infecciosidade do *Avian sarcoma leukosis virus* (ASLV-A) em 90% (Balliet et al., 1999).

Nesse estudo, observamos que no dia 2 pós infecção, o sELR1 foi mais expresso em jumentos que em cavalos. Nemerow et al., (1990), demonstraram que em cultura de linfócitos B, a presença de um recombinante solúvel do CR2 (CD21), causava uma inibição substancial da replicação do *Epstein-Barr virus* (EBV), *in vitro*, indicando que o CR2 é responsável pelo início da infecção do EBV.

Cook et al., (2001), observaram que ao infectar cultura de MDM de cavalos e jumentos com a estirpe patogênica EIAV_{PV}, a permissibilidade das células interespecie frente a infecção viral, permanece inalterada, porém, apesar de níveis de replicação muito próximos, nos jumentos os títulos virais eram sempre menores quando comparados aos cavalos infectados nas mesmas condições. Um estudo demonstrou que a superexpressão de sELR1 em células de derme fetal equina (FED) transfectadas com vetor de expressão, reduzia significativamente as taxas de replicação do EIAV, caracterizada por baixa e atrasada atividade de RT detectável (Lin et al., 2013). Nesse sentido, hipotetizamos que a capacidade dos jumentos em restringir a infecção pelo EIAV nas células-alvo pode estar relacionada à entrada viral reduzida nas células-alvo, devido a uma expressão aumentada da isoforma solúvel do receptor ELR1.

Com o passar do tempo, observamos nesse estudo que macrófagos de cavalos infectados tendem a aumentar os níveis de expressão de sELR1, condizentes com os resultados observados por Lin et al., (2013). Apesar de parecer que a entrada do EIAV nos macrófagos de equinos é facilitada pela menor expressão de sELR1 quando

comparado aos macrófagos de asininos, ao longo do tempo, a presença do vírus, regula positivamente a expressão da isoforma solúvel do receptor.

O receptor ELR1 é um membro da superfamília de receptores do fator de necrose tumoral (TNFR) (Leroux et al., 2004; Zhang et al., 2008). Em pacientes HIV positivos, foi observado que as sucessivas infecções virais a novas células-alvo, estimula constantemente a ativação do sistema imunológico, com produção de TNF- α e por consequência, ocorre o aumento sérico da liberação de receptores solúveis do TNF (sTNF-R), que atua como um inibidor e protetor dos efeitos causados pelo excesso dessas citocinas (Kalinkovich et al., 1992). Semelhante ao HIV, infecções causadas pelo EIAV, estimulam a expressão de citocinas pró-inflamatórias, principalmente o TNF- α , que está diretamente envolvido com o desenvolvimento de febre e anemia nos equídeos infectados (Dufour et al., 2003; Felli et al., 2005). A regulação positiva na expressão de sELR1 em macrófagos de equinos após a infecção com EIAV, pode ser uma tentativa do hospedeiro em neutralizar o excesso de TNF- α , diminuindo a infecção de novos *vírions* e, consequentemente reduzindo a cascata de sinalização que termina na expressão de mais citocinas pró-inflamatórias, dentre elas o TNF- α .

Por fim, a maior expressão de sELR1 encontrada em uma cultura de macrófagos derivados de monócitos infectados com EIAV, quando comparados a uma cultura de células não infectadas, independente da espécie, já era esperada, uma vez que estudos anteriores já descreveram que os níveis de expressão do receptor ELR1 e suas variantes de *splicing* alternativo são regulados positivamente pela infecção por EIAV (Lin et al., 2013; Ma et al., 2014).

3.6. Conclusão

Esse foi o primeiro trabalho que avaliou a presença do Receptor de Lentivírus equino tipo I e sua variante de *splicing* alternativo (sELR1) em macrófagos derivados de monócitos de jumentos, bem como, correlacionou com a expressão delas em macrófagos derivados de monócitos de cavalos *in vitro*. Esse estudo demonstrou que a expressão de ELR1 não foi alterada ao longo da evolução independente de cavalos e jumentos, contudo, em jumentos o receptor ELR1 na sua forma funcional pode apresentar polimorfismos não sinônimos, ainda não elucidados, que interfeririam na ligação vírus-célula. Além disso, observamos uma maior expressão inicial de sELR1 em macrófagos de jumentos que em macrófagos de cavalos, que também é um mecanismo que diminui eficientemente a

entrada do vírus da célula-alvo. Em conjunto, a expressão de ELR1 pode estar envolvida no mecanismo de resistência dos asininos frente a infecção pelo EIAV.

3.6. Referências Bibliográficas

- Balliet JW, Berson J, D’cruz CM, et al. Production and Characterization of a Soluble, Active Form of Tva, the Subgroup A Avian Sarcoma and Leukosis Virus Receptor. *J Virol.* 1999; 73(4):3054-61.
- Barreiro LB, Quintana-Murci L. From evolutionary genetics to human immunology: How selection shapes host defence genes. Vol. 11, *Nature Rev Genet.* 2010;17–30.
- Brindley MA, Maury W. Equine Infectious Anemia Virus Entry Occurs through Clathrin-Mediated Endocytosis. *J Virol.* 2008; 82(4):1628-37.
- Bueno BL, Câmara RJF, Moreira MVL, et al. Molecular detection, histopathological analysis, and immunohistochemical characterization of equine infectious anemia virus in naturally infected equids. *Arch Virol.* 2020; 165(6):1333-1342.
- Bueno BL, Oliveira FG, Lima GK, et al. One-step RT-qPCR assay for detection and quantification of equine infectious anemia virus in vitro. *Genetics and Molecular Research.* 2018;17(3):1–9.
- Cook SJ, Cook RF, Montelaro RC, Issel CJ. Differential responses of *Equus caballus* and *Equus asinus* to infection with two pathogenic strains of equine infectious anemia virus. *Vet Microbiol.* 2001; 79:93–109.
- Corbi-Botto CM, Sadaba SA, Zappa ME, et al. Nonsynonymous changes of equine lentivirus receptor-1 (ELR1) gene in amino acids involved in the interaction with equine infectious anemia virus (EIAV). *Res Vet Sci.* 2017; 112:185–91.
- Covalada L, Fuller FJ, Payne SL. EIAV S2 enhances pro-inflammatory cytokine and chemokine response in infected macrophages. *Virol.* 2010;397(1):217–23.
- Craig JK, Barnes S, Zhang B, et al. An EIAV field isolate reveals much higher levels of subtype variability than currently reported for the equine lentivirus family. *Retrovirol.* 2009; 6:95.
- Dufour C, Corcione A, Svahn J, et al. TNF- α and IFN- γ are overexpressed in the bone marrow of Fanconi anemia patients and TNF- α suppresses erythropoiesis *in vitro*. *Blood.* 2003; 102(6):2053-9.
- Evans DT, Elder JH, Desrosiers RC. Nonhuman lentiviruses. In: *Fields Virology: Sixth Edition.* 2013.
- Felli N, Pedini F, Zeuner A, et al. Multiple Members of the TNF Superfamily Contribute to IFN- γ -Mediated Inhibition of Erythropoiesis. *J Immunol.* 2005; 175(3):1464-72.

- Fujikoshi Y. Two-way ANOVA models with unbalanced data. *Discrete Math.* 1993; 116:315–34.
- Geissmann F, Manz MG, Jung S, et al. Development of monocytes, macrophages, and dendritic cells. *Science.* 2010; 327(5966):656-61.
- Hall TA. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucl Acids Symp Ser* 41: 95–98 (1999). *Nucleic Acids Symp Ser.* 2007;
- Hierholzer JC, Killington RA. Virus isolation and quantitation. In: *Virology Methods Manual.* Elsevier; 1996. p. 25–46.
- Ji S, Na L, Ren H, et al. Equine Myxovirus Resistance Protein 2 Restricts Lentiviral Replication by Blocking Nuclear Uptake of Capsid Protein. *J Virol.* 2018;92(18):1–16.
- Kalinkovich A, Engelmann H, Harpaz N, et al. Elevated serum levels of soluble tumour necrosis factor receptors (sTNF-R) in patients with HIV infection. Vol. 89, *Clin. exp. Immunol.* 1992; 89(3):351-5.
- Lei C, Yang J, Hu J, Sun X. On the Calculation of TCID₅₀ for Quantitation of Virus Infectivity. *Virol Sin.* 2020;12250.
- Leroux C, Cadore J-L, Montelaro RC. Equine Infectious Anemia Virus (EIAV): what has HIV's country cousin got to tell us? *Vet Res.* 2004; 35:467–83.
- Levine SJ. Mechanisms of Soluble Cytokine Receptor Generation. *The Journal of Immunology.* 2004;173(9):5343–8.
- Li H, Zhang X, Fan X, et al. A conservative domain shared by HIV gp120 and EIAV gp90: Implications for HIV vaccine design. *AIDS Res Hum Retroviruses.* 2005; 21(12):1057-9.
- Lim W-S, Payne SL, Edwards JF, Kim I, Ball JM. Differential effects of virulent and avirulent equine infectious anemia virus on macrophage cytokine expression. *Virol.* 2005;332(1):295–306.
- Lin Y, Yang F, Zhang S, et al. The Soluble Form of the EIAV Receptor Encoded by an Alternative Splicing Variant Inhibits EIAV Infection of Target Cells. *PLoS One.* 2013;8(11):1–9.
- Ma J, Wang SS, Lin YZ, et al. Infection of equine monocyte-derived macrophages with an attenuated equine infectious anemia virus (EIAV) strain induces a strong resistance to the infection by a virulent EIAV strain. *Vet Res.* 2014;45(1):1–12.
- Marlin SD, Staunton DE, Springer TA, et al. A soluble form of intercellular adhesion molecule-1 inhibits rhinovirus infection. *Nature.* 1990;344.
- Maury W. Monocyte maturation controls expression of equine infectious anemia virus. *J Virol.* 1994; 68(10):6270-9.
- Maury W, Wright PJ, Bradley S. Characterization of a Cytolytic Strain of Equine Infectious Anemia Virus. *J Virol.* 2003;77(4):2385–99.

- Naismith JH, Sprang SR. Modularity in the TNF-receptor family. *Trends in Biochemical Sciences*. 1998; 23(2):74-9.
- Naves JHFF, Oliveira FG, Bicalho JM, et al. Serological diagnosis of equine infectious anemia in horses, donkeys and mules using an ELISA with a gp45 synthetic peptide as antigen. *J Virol Methods*. 2018; 266:49–57.
- Nemerow GR, Iii JJM, Dickson PW, Cooper NR. Soluble Recombinant CR2 (CD21) Inhibits Epstein-Barr Virus Infection. *J Virol*. 1990; 64(3):1348-52.
- Oliveira FG. Vírus da Anemia Infeciosa Equina em Asininos: Sorologia em animais errantes e avaliação “*in vitro*” da resposta em macrófagos. [Tese Vírus da Anemia Infeciosa Equina em Asininos: Sorologia em animais errantes e avaliação “*in vitro*” da resposta em macrófagos]. Universidade Federal de Minas Gerais; 2016.
- Permanasari AE, Rambli DRA, Selvam DDDP. Forecasting method selection using ANOVA and Duncan multiple range tests on time series dataset. *International Symposium on Information Technology*. 2010;2.
- Pfaffl MW. Relative quantification. *Real-time PCR* Taylor & Francis. Publicado em International University Line (Editor: T. Dorak). 2007;89–108.
- Reed, LJ, Muench H. A simple method of estimating 50 percent end-points. *Am J Hyg*. 1938; 15:468.
- Rio DC, Ares M, Hannon GJ, Nilsen TW. Purification of RNA using TRIzol (TRI Reagent). *Cold Spring Harb Protoc*. 2010;5(6):1–4.
- Royston P. Approximating the Shapiro-Wilk W-test for non-normality. *Statistics and computing* 2. 1992;117–9.
- Sellon DC. Equine Infectious Anemia. *Veterinary Clinics of North America - Equine Practice*. 1993;9(2):321–36.
- Vudattu NK, Magalhaes I, Hoehn H, Pan D, Maeurer MJ. Expression analysis and functional activity of interleukin-7 splice variants. *Genes Immun*. 2009;10(2):132–40.
- Zhang B, Sun C, Jin S, Cascio M, Montelaro RC. Mapping of Equine Lentivirus Receptor 1 Residues Critical for Equine Infectious Anemia Virus Envelope Binding. *J Virol*. 2008;82(3):1204–13.

PERPESCTIVAS FUTURAS

Nesse trabalho, observamos que diferentes fatores de restrição que atuam limitando alguma etapa do ciclo de replicação do EIAV são mais expressos em macrófagos de jumentos, bem como a proteína ADAR1 que diferente dos demais fatores, auxilia no aumento da infecciosidade viral é mais expresso em macrófagos de cavalos. Em conjunto, a expressão diferenciada dos fatores de restrição nas células-alvo do EIAV *in vitro*, pode ser um dos mecanismos envolvidos na resistência natural dos asininos *in vivo*.

Até o momento apenas seis RRFs foram descritos na literatura atuando frente ao EIAV em macrófagos de equídeos e neste trabalho, comprovamos a atuação de mais dois RRFs. Contudo, atualmente existem mais de 37 RRFs descritos frente ao HIV-1, SIV e FIV, nesse caso, precisaria de mais estudos que visam elucidar a possível presença e atuação dos demais RRFs em macrófagos de equídeos, quando infectados pelo EIAV.

Descrevemos que o *Receptor de Lentivírus Equino tipo I* (ELR1) é igualmente expresso em macrófagos de cavalos e jumentos. Contudo, analisamos a presença de mRNA, mas não sabemos se esse mesmo resultado seria encontrado em se tratando da proteína ELR-1. Além disso, um sequenciamento de nucleotídeos, seguindo de uma análise de aminoácidos do receptor ELR1 expresso em MDM de asininos, deve ser realizado, visando identificar polimorfismos de nucleotídeos simples (SNP), que produzam mutações não sinônimas, principalmente em regiões de éxons codificantes dos domínios 2, 3 e 4, que embora, não sejam cruciais em termos de ligação à gp90 do EIAV, pode ter impacto na conformação do receptor e nas interações com a proteína, influenciando na afinidade da ligação vírus-hospedeiro.

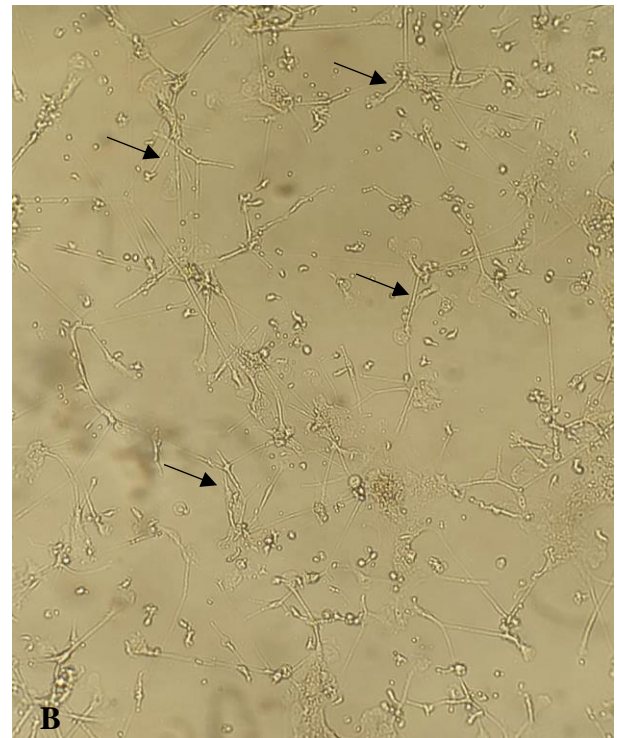
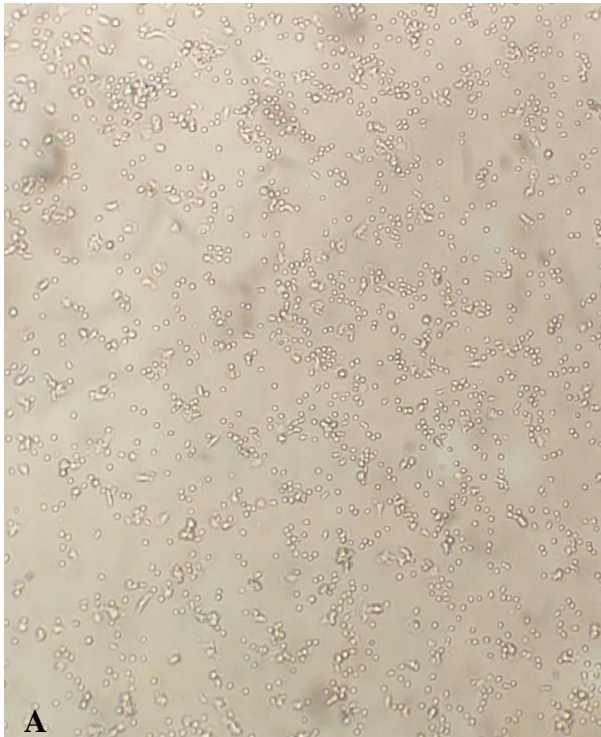
Identificamos nesse estudo que a isoforma solúvel do ELR1, que permite ao vírus se ligar, mas não permite as etapas subsequentes de fusão é expressa em macrófagos de asininos. Atualmente, em equinos, a isoforma sELR1 é a única expressa na superfície dos macrófagos de equídeos que interfere na entrada do EIAV nas células-alvo. Todavia, essa é a primeira vez que o ELR1, bem como uma isoforma mutante do receptor é descrita em jumentos. Nesse sentido, são necessárias novas investigações visando identificar outras variantes do ELR1 que estejam disponíveis na superfície dos macrófagos de asininos e a possível influencia dessas novas isoformas na entrada do EIAV.

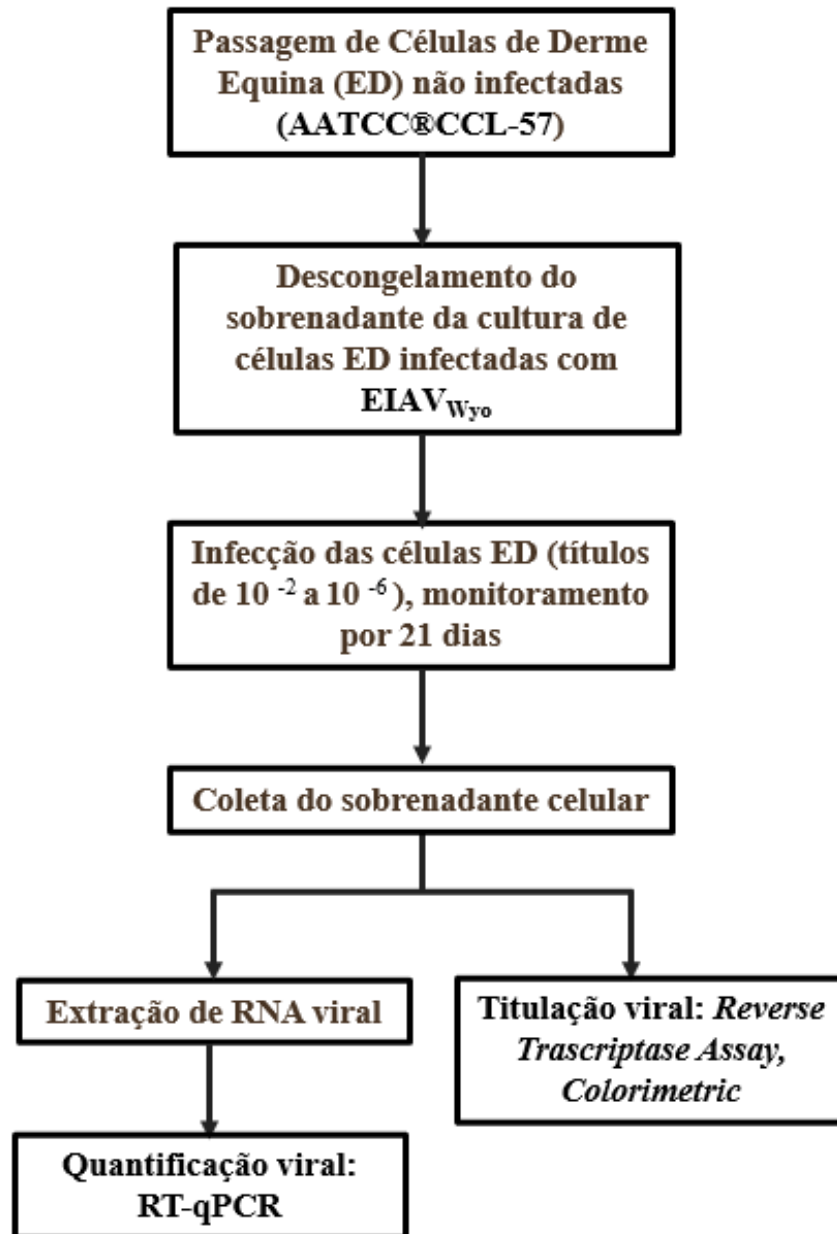
Outros fatores que afetam a resposta imune podem estar associados a maior resistência dessa espécie ao EIAV, como por exemplo, atividade do CTL, modulação da resposta imune pelos linfócitos. Além disso, estudos já demonstraram que a infecção pelo EIAV induz o desenvolvimento de estresse oxidativo em cavalos. O estresse oxidativo desempenhe um papel importante na progressão de outras infecções lentivirais, como o HIV. Mas até o momento, esses parâmetros ainda permanecem desconhecidos com relação a infecção do EIAV em jumentos.

Por fim, as perspectivas futuras para esse trabalho são mais investigações acerca dos assuntos supracitados que podem, juntamente com os RRFs e a expressão do ELR1 e sELR1, descritos nesse estudo, contribuir para a completa compreensão dos mecanismos imunológicos envolvidos no controle rigoroso da replicação viral dos asininos quando infectados pelo EIAV. Mais tarde, essas descobertas podem ter implicações no desenvolvimento de medicamentos e vacinas eficazes frente ao EIAV e outras lentivirose, como o FIV ou o HIV que acometem respectivamente, os felídeos e os seres humanos, conhecidos pelo seu potencial de desenvolver infecções imunossupressoras e incuráveis, que comumente variam de assintomáticas a fatais.

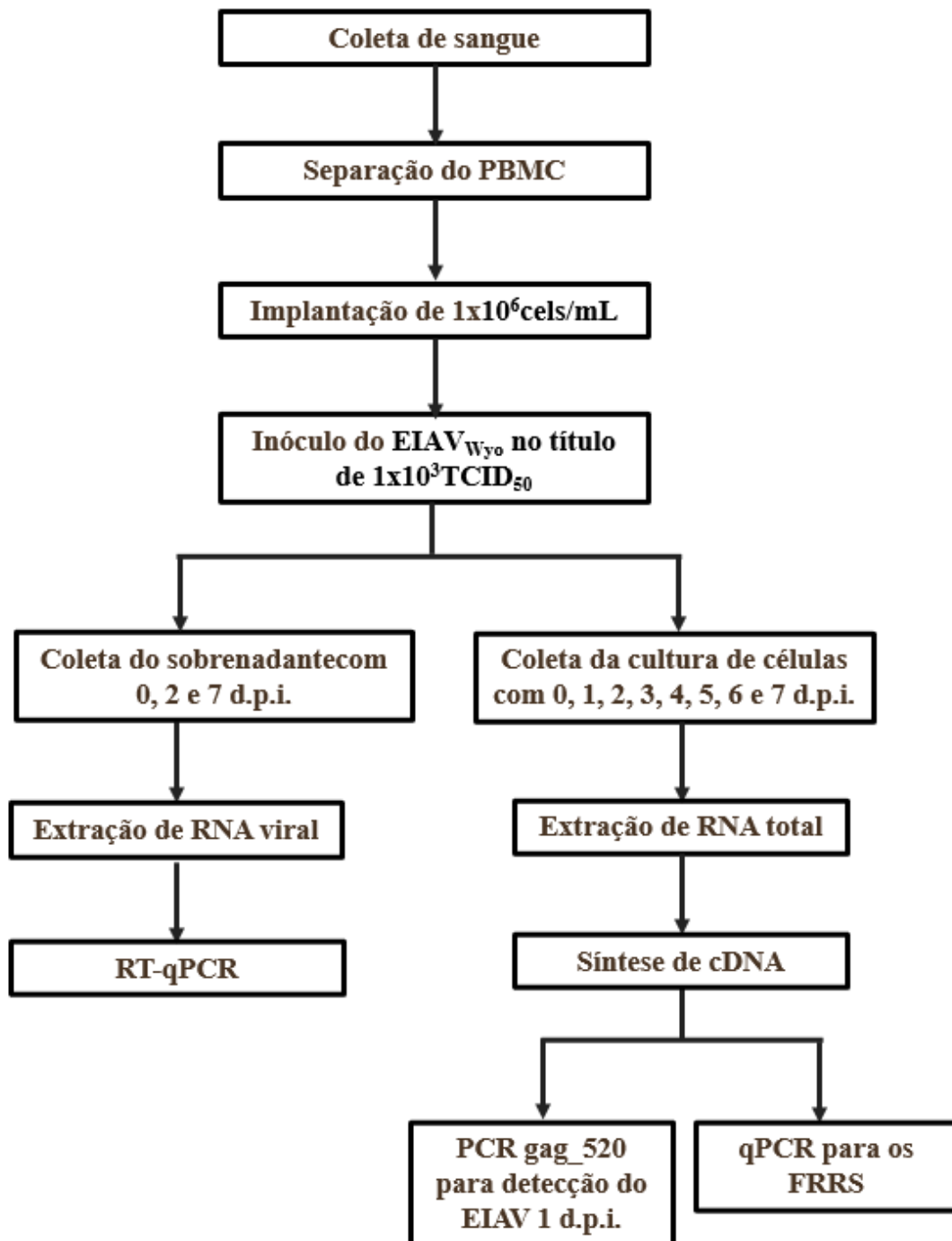
APÊNDICES

Apêndice 1: Diferenciação dos monócitos em macrófagos após 48h de isolamento em cultura celular, após a distribuição das células sanguíneas em 10^6 cel/poço (A) e 48h após a distribuição celular em placas (B). ↗ Destaque para presença de pseudópodes.

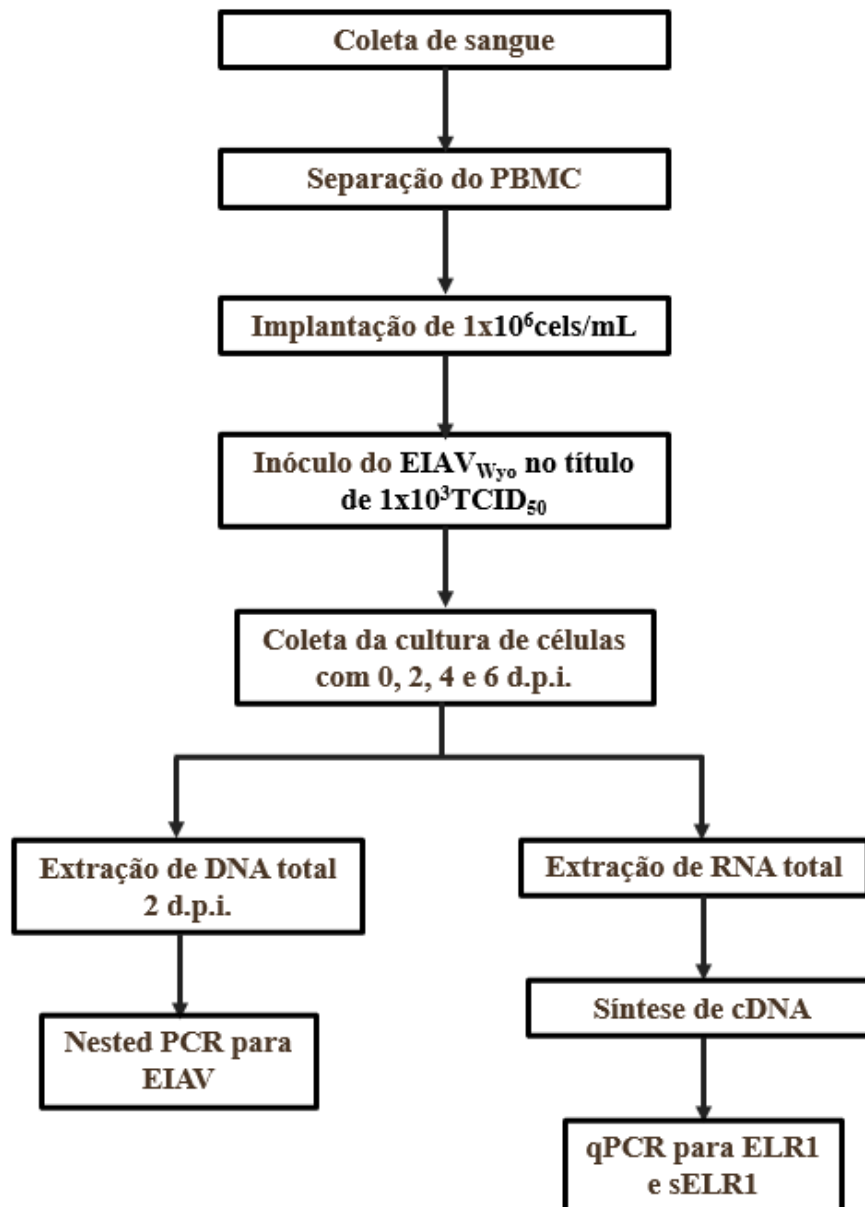


Apêndice 2: Resumo do material e métodos**Apêndice 2.1.** Quantificação do estoque do EIAV_{Wyo}

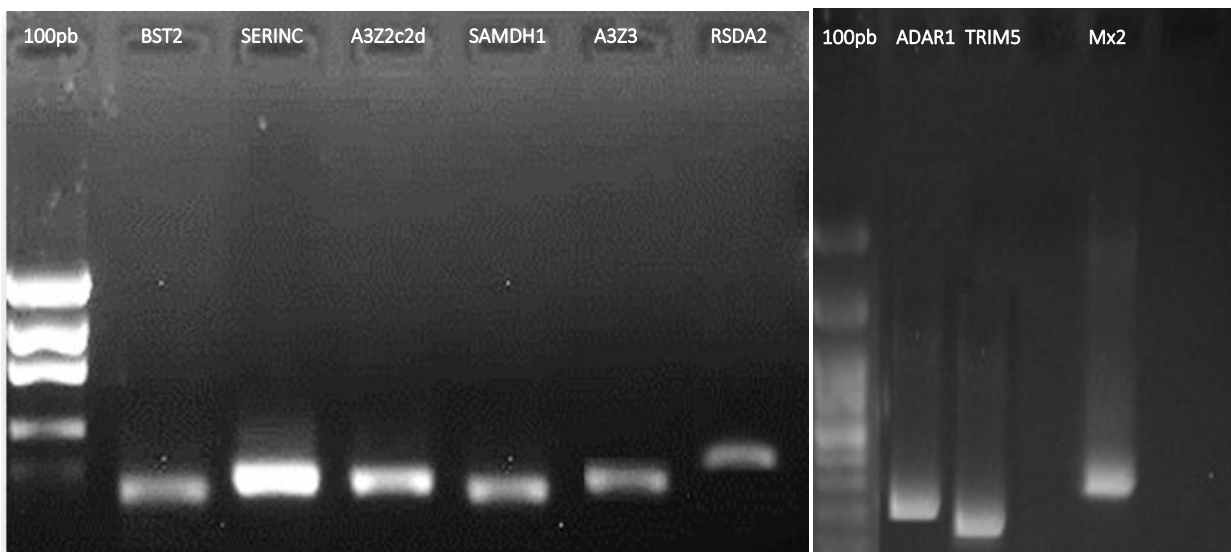
Apêndice 2.2. Infecção das culturas de MDM de cavalos e jumentos com o EIAV_{Wyo} para análise dos RRFs



Apêndice 2.3. Infecção das culturas de MDM de cavalos e jumentos com o EIAV_{Wyo} para análise do ELR1/ sELR1



Apêndice 3: Amplificação dos RRFs por PCR convencional, utilizando como controle, um pool de amostras de duas éguas positivas para EIA, naturalmente infectadas e com sinais clínicos presentes. BST2 (99pb), SERINC (129pb), A3Z2c-2d (114pb), SAMHD1 (78pb), A3Z3 (132pb), RSAD2 (185pb), ADAR1 (197pb), TRIM5 α (150pb) e Mx2 (197pb).



Apêndice 4: Relação comparativa entre a expressão dos RRFs em MDM de jumentos e cavalos nos dias 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6 e 7 d.p.i.

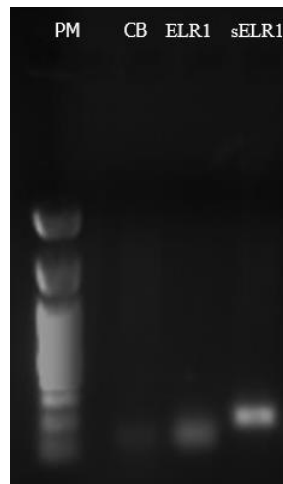
Gene	Tempo	Descritivo	IC (95%)	P value
A3Z2c-2d	Dia 0	MO CAV vs. MO JUM	-16,27 a 9,576	>0,9999
	Dia 1	MO CAV vs. MO JUM	-16,27 a 9,576	>0,9999
	Dia 2	MO CAV vs. MO JUM	-16,27 a 9,576	>0,9999
	Dia 3	MO CAV vs. MO JUM	-13,14 a 12,71	>0,9999
	Dia 4	MO CAV vs. MO JUM	-16,27 a 9,576	>0,9999
	Dia 5	MO CAV vs. MO JUM	-16,27 a 9,576	>0,9999
	Dia 6	MO CAV vs. MO JUM	-16,27 a 9,576	>0,9999
	Dia 7	MO CAV vs. MO JUM	-16,27 a 9,576	>0,9999
A3Z3	Dia 0	MO CAV vs. MO JUM	-165,8 a 63,65	0,996
	Dia 1	MO CAV vs. MO JUM	-165,8 a 63,65	0,996
	Dia 2	MO CAV vs. MO JUM	-165,8 a 63,65	0,996
	Dia 3	MO CAV vs. MO JUM	-114,6 a 114,8	>0,9999
	Dia 4	MO CAV vs. MO JUM	-165,8 a 63,65	0,996
	Dia 5	MO CAV vs. MO JUM	-165,8 a 63,65	0,996
	Dia 6	MO CAV vs. MO JUM	-165,8 a 63,65	0,996
	Dia 7	MO CAV vs. MO JUM	-165,8 a 63,65	0,996
ADAR	Dia 0	MO CAV vs. MO JUM	-165,8 a 63,65	0,996
	Dia 1	MO CAV vs. MO JUM	-1,687 a 6,972	0,8263
	Dia 2	MO CAV vs. MO JUM	-1,687 a 6,972	0,8263
	Dia 3	MO CAV vs. MO JUM	-1,687 a 6,972	0,8263
	Dia 4	MO CAV vs. MO JUM	-1,687 a 6,972	0,8263
	Dia 5	MO CAV vs. MO JUM	-1,687 a 6,972	0,8263
	Dia 6	MO CAV vs. MO JUM	-1,687 a 6,972	0,8263
	Dia 7	MO CAV vs. MO JUM	-1,687 a 6,972	0,8263
BST2	Dia 0	MO CAV vs. MO JUM	-2,051 a 2,409	>0,9999
	Dia 1	MO CAV vs. MO JUM	-2,051 a 2,409	>0,9999
	Dia 2	MO CAV vs. MO JUM	-2,051 a 2,409	>0,9999
	Dia 3	MO CAV vs. MO JUM	-1,175 a 3,285	0,9899
	Dia 4	MO CAV vs. MO JUM	-2,051 a 2,409	>0,9999
	Dia 5	MO CAV vs. MO JUM	-2,051 a 2,409	>0,9999
	Dia 6	MO CAV vs. MO JUM	-2,051 a 2,409	>0,9999
	Dia 7	MO CAV vs. MO JUM	-2,051 a 2,409	>0,9999
Mx2	Dia 0	MO CAV vs. MO JUM	-3,897 a 5,957	>0,9999
	Dia 1	MO CAV vs. MO JUM	-3,897 a 5,957	>0,9999
	Dia 2	MO CAV vs. MO JUM	-3,897 a 5,957	>0,9999
	Dia 3	MO CAV vs. MO JUM	-3,897 a 5,957	>0,9999
	Dia 4	MO CAV vs. MO JUM	-3,897 a 5,957	>0,9999
	Dia 5	MO CAV vs. MO JUM	-3,897 a 5,957	>0,9999
	Dia 6	MO CAV vs. MO JUM	-3,897 a 5,957	>0,9999
	Dia 7	MO CAV vs. MO JUM	-3,897 a 5,957	>0,9999
RSDA2	Dia 0	MO CAV vs. MO JUM	-3,243 a 3,613	>0,9999

	Dia 1	MO CAV vs. MO JUM	-3,243 a 3,613	>0,9999
	Dia 2	MO CAV vs. MO JUM	-3,243 a 3,613	>0,9999
	Dia 3	MO CAV vs. MO JUM	-5,858 a 0,9981	0,5562
	Dia 4	MO CAV vs. MO JUM	-3,243 a 3,613	>0,9999
	Dia 5	MO CAV vs. MO JUM	-3,243 a 3,613	>0,9999
	Dia 6	MO CAV vs. MO JUM	-3,243 a 3,613	>0,9999
	Dia 7	MO CAV vs. MO JUM	-3,243 a 3,613	>0,9999
SAMHD1	Dia 0	MO CAV vs. MO JUM	-9,495 a 9,621	>0,9999
	Dia 1	MO CAV vs. MO JUM	-9,495 a 9,621	>0,9999
	Dia 2	MO CAV vs. MO JUM	-9,495 a 9,621	>0,9999
	Dia 3	MO CAV vs. MO JUM	-6,570 a 12,55	>0,9999
	Dia 4	MO CAV vs. MO JUM	-9,495 a 9,621	>0,9999
	Dia 5	MO CAV vs. MO JUM	-9,495 a 9,621	>0,9999
	Dia 6	MO CAV vs. MO JUM	-9,495 a 9,621	>0,9999
	Dia 7	MO CAV vs. MO JUM	-9,495 a 9,621	>0,9999
SERINC3	Dia 0	MO CAV vs. MO JUM	-12,68 a 8,241	>0,9999
	Dia 1	MO CAV vs. MO JUM	-12,68 a 8,241	>0,9999
	Dia 2	MO CAV vs. MO JUM	-12,68 a 8,241	>0,9999
	Dia 3	MO CAV vs. MO JUM	-7,180 a 13,74	>0,9999
	Dia 4	MO CAV vs. MO JUM	-12,68 a 8,241	>0,9999
	Dia 5	MO CAV vs. MO JUM	-12,68 a 8,241	>0,9999
	Dia 6	MO CAV vs. MO JUM	-12,68 a 8,241	>0,9999
	Dia 7	MO CAV vs. MO JUM	-12,68 a 8,241	>0,9999
SERINC5	Dia 0	MO CAV vs. MO JUM	-2,838 a 5,559	>0,9999
	Dia 1	MO CAV vs. MO JUM	-2,838 a 5,559	>0,9999
	Dia 2	MO CAV vs. MO JUM	-2,838 a 5,559	>0,9999
	Dia 3	MO CAV vs. MO JUM	-8,258 a 0,1382	0,0702
	Dia 4	MO CAV vs. MO JUM	-2,838 a 5,559	>0,9999
	Dia 5	MO CAV vs. MO JUM	-2,838 a 5,559	>0,9999
	Dia 6	MO CAV vs. MO JUM	-2,838 a 5,559	>0,9999
	Dia 7	MO CAV vs. MO JUM	-2,838 a 5,559	>0,9999
TRIM5	Dia 0	MO CAV vs. MO JUM	-23,56 a 8,966	0,9955
	Dia 1	MO CAV vs. MO JUM	-23,56 a 8,966	0,9955
	Dia 2	MO CAV vs. MO JUM	-23,56 a 8,966	0,9955
	Dia 3	MO CAV vs. MO JUM	-15,08 a 17,45	>0,9999
	Dia 4	MO CAV vs. MO JUM	-23,56 a 8,966	0,9955
	Dia 5	MO CAV vs. MO JUM	-23,56 a 8,966	0,9955
	Dia 6	MO CAV vs. MO JUM	-23,56 a 8,966	0,9955
	Dia 7	MO CAV vs. MO JUM	-23,56 a 8,966	0,9955

Apêndice 5: Resumo dos RRFs analisados, suas respectivas funções e os resultados observados em cultura de MDM de equídeos infectadas com o EIAV *in vitro*.

Fator de restrição	ID	Etapa de atuação no ciclo de replicação viral	Função	Índices de expressão
APOBEC (gene A3Z2c-2d)	Enzima de edição de mRNA da apolipoproteína B	Transcrição Reversa	Dependente de desaminase: induz uma hipermutação de C para U nas fitas de DNA sintetizadas Independente de desaminase: inibe as reações de alongamento do DNA catalisadas pela transcriptase reversa	Igualmente expresso Mais expresso em asininos
APOBEC (gene A3Z3)				
ADARI	Adenosina desaminase específicas de RNA	Transcrição Reversa	Induz mutações de A para I na síntese do DNA. Amplia a expressão de proteínas LTRs e impede o reconhecimento dos receptores tipo TOIL e RIG-I	Mais expresso em equinos
BST-2 (Teterina)	Antígeno 2 do estroma da medula óssea	Brotamento viral	Interage com o envelope viral e retém os vírus em brotamento na membrana celular	Igualmente expresso
Mx2	Proteína de resistência a Myxovirus Tipo II	* Liberação do material genético viral * Integração do DNA viral	Desempacotamento prematuro do capsídeo, Bloqueio das nucleoporinas, Depleção dos fatores de transporte celular, como a transportina 3	Mais expresso em equinos
RSAD2 (Viperina)	Radical S-adenosil metionina domínio 2	Brotamento viral	Reduz a síntese de <i>env</i> e do receptor de superfície celular, compromete o tráfego de proteínas	Igualmente expresso
SAMHD1	Motivo α estéril e proteína 1 contendo domínio de histidina/ácido aspártico	Transcrição Reversa	Diminui o pool de dNTP intracelular disponíveis, limitando o acúmulo de produtos da transcrição reversa tardia	Igualmente expresso
SERINC	Domínio incorporador de serina	Brotamento viral	Incorpora aos <i>virions</i> em formação e prejudica as infecções subsequentes	Mais expresso em asininos
TRIM5	Proteínas de motivo tripartido	Liberação do material genético	Induz a desmontagem prematura do capsídeo e bloqueia a transcrição reversa	Mais expresso em asininos

Apêndice 6: Amplificação dos receptores ELR1 e sELR1 por PCR convencional, utilizando como controle, um pool de amostras de duas éguas positivas para EIA, naturalmente infectadas e com sinais clínicos presentes. CB (Controle Branco; água); ELR1 (375pb); sELR1(149pb).



ANEXOS

Anexo 1: Certificado da Comissão de Ética no uso de animais (UFMG).

 <p>UFMG</p>	<p>UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS</p> <p>CEUA COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS</p>
<p>Prezado(a):</p>	
<p>Esta é uma mensagem automática do sistema Solicite CEUA que indica mudança na situação de uma solicitação.</p>	
<p>Protocolo CEUA: 59/2020 Título do projeto: Análise comparativa das isoformas dos receptores de lentivírus equino tipo 1 (ELR-1) e da expressão dos fatores de restrição retroviral em macrófagos de jumentos e cavalos infectados com o vírus da anemia infecciosa equina (EIAV) Finalidade: Pesquisa Pesquisador responsável: Jenner Karlisson Pimenta dos Reis Unidade: Escola de Veterinária Departamento: Departamento de Medicina Veterinária Preventiva</p>	
<p>Situação atual: Decisão Final - Aprovado</p>	
<p>Aprovado na reunião "on line" do dia 25/05/2020. Validade: 25/05/2020 à 24/05/2025.</p>	
<p>Belo Horizonte, 25/05/2020.</p>	
<p>Atenciosamente,</p>	
<p>Sistema Solicite CEUA UFMG https://aplicativos.ufmg.br/solicite_ceua/</p>	
<p>Universidade Federal de Minas Gerais Avenida Antônio Carlos, 6627 – Campus Pampulha Unidade Administrativa II – 2º Andar, Sala 2005 31270-901 – Belo Horizonte, MG – Brasil Telefone: (31) 3409-4516 www.ufmg.br/bioetica/ceua - cetea@prpq.ufmg.br</p>	