

Fernanda Gonçalves de Oliveira

**VÍRUS DA ANEMIA INFECCIOSA EQUINA EM ASININOS:
SOROLOGIA EM ANIMAIS ERRANTES E
AVALIAÇÃO “IN VITRO” DA RESPOSTA EM MACRÓFAGOS**

Tese apresentada à Universidade Federal de Minas Gerais, Escola de Veterinária, como requisito parcial para obtenção do grau de Doutor em Ciência Animal.

Área de concentração: Medicina Veterinária Preventiva

Orientador: Jenner Karlisson Pimenta dos Reis

Belo Horizonte –MG
2016

O48v Oliveira, Fernanda Gonçalves de, 1984-
Vírus da anemia infecciosa equina em asininos: sorologia em animais errantes e avaliação
“in vitro” da resposta em macrófagos / Fernanda Gonçalves de Oliveira. – 2016.
101 p. : il.

Orientador: Jenner Karlisson Pimenta dos Reis
Tese (doutorado) – Universidade Federal de Minas Gerais. Escola de Veterinária
Inclui bibliografia

1. Asinino – Doenças – Teses. 2. Anemia infecciosa equina – Teses. 3. Lentivírus – Teses.
4. Sorologia veterinária – Teses. I. Reis, Jenner Karlisson Pimenta dos. II. Universidade
Federal de Minas Gerais. Escola de Veterinária. III. Título.

CDD – 636.108 969 2

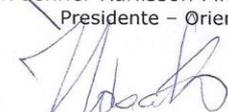
FOLHA DE APROVAÇÃO

FERNANDA GONÇALVES DE OLIVEIRA

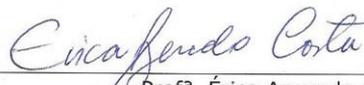
Tese submetida à banca examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação em CIÊNCIA ANIMAL, como requisito para obtenção do grau de DOUTOR em CIÊNCIA ANIMAL, área de concentração em MEDICINA VETERINÁRIA PREVENTIVA.

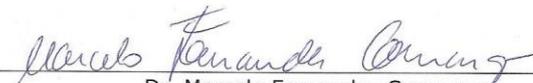
Aprovada em 30 de Março de 2016, pela banca constituída pelos membros:


Prof. Jenner Karlisson Pimenta dos Reis
Presidente - Orientador


Profª. Zélia Inês Portela Lobato
Escola de Veterinária - UFMG


Prof. Sidnei Miyoshi Sakamoto
Universidade Federal Rural do Semi-Árido - UFRSA


Profª. Érica Azevedo Costa
Escola de Veterinária - UFMG


Dr. Marcelo Fernandes Camargos
Laboratório Nacional Agropecuário - LANAGRO/MAPA

AGRADECIMENTOS

Após todos esses anos de dedicação, estou chegando ao final daquilo que um dia foi um sonho, e alcançá-lo foi devido a ajuda de muitas, muitas pessoas mesmo, por todos os momentos dessa caminhada.

Agradeço a Deus por me abençoar em todos os momentos de minha vida, ao me fortalecer na grande jornada que é a vida.

À minha mãe, Sueli, e ao meu irmão, Henrique, pelo apoio incondicional, amor e paciência durante a realização de todo o processo. Ao meu pai, que continua sendo o meu grande exemplo de luta e perseverança, mesmo nas horas mais difíceis. À minha linda sobrinha Millena pelas alegrias, sorrisos, orgulho, sempre!

Ao Laudo, por todo amor, carinho, enorme paciência, incentivos, companheirismo, porto seguro, enfim, por ter aguentado firme ao meu lado nesse caminho.

Ao Professor Jenner por todas as oportunidades (e olha que foram muitas), orientação, confiança, ensinamentos, incentivos, puxões de orelha, paciência, convívio durante todo o tempo de minha formação profissional (desde o COLTEC!).

Ao Professor Rômulo, agradeço as muitas oportunidades que, juntamente com o Professor Jenner foram abertas, os incentivos, os conselhos, ensinamentos, convívio, muitos puxões de orelha, e confiança durante todos esses anos de formação. Agradeço também a Sueli, pelo ótimo convívio e por sempre me receber em sua casa.

À Graciela, pela orientação, ensinamentos, incentivos, muita paciência, atenção, carinho e amizade. Você foi um grande presente que ganhei nesse doutorado.

Aos membros do Retrolab, da velha guarda: Cairo, João Helder, Ana Paula, Gissandra, Daniela, Fabiana, Helen, Julianas, André, Paula, Érica; e as meninas da jovem guarda: Cláudia, Bruna, Luciana, Telissa, Camila, Lízia, Renata, Emília, pela boa convivência, na manutenção do laboratório, auxílio no preparo e execução dos experimentos, mesmo que de madrugada (né Cláudia?). Valeu mesmo!

Aos funcionários do Departamento de Medicina Veterinária Preventiva da Escola de Veterinária da UFMG, em especial, Eduardo, Grazi e Agda Leite (haha) por todos os auxílios, convivência e amizade. Ao Colegiado de Pós-Graduação em Ciência Animal por todos os serviços prestados.

A todos os outros funcionários da Escola, porteiros, faxineiras, que com seus trabalhos sempre me ajudaram e me deram suporte. Um abraço especial para a Lúcia, que tenho tanto carinho e também vou sentir saudades.

Ao professor Frank Cook, pelo fornecimento dos clones virais do projeto, pelos ensinamentos, contribuições no trabalho e em minha formação profissional.

Ao professor Chuck Issel, pelo fornecimento de kits CELISA e pelas contribuições no trabalho.

Ao professor Udeni Balasuriya pelo fornecimento de anticorpo para citometria de fluxo e disponibilização de protocolos de seu laboratório.

Ao Professor Sidnei Sakamoto, da Universidade Federal Rural do Semi-Árido (UFERSA), pela parceria, pela recepção e apoio no período em que estive em Mossoró e por me levar para ver de pertinho a realidade dos jumentos nordestinos. É claro, não posso deixar de incluir e agradecer a Cris, que também foi muito receptiva e me auxiliou de diversas formas, incluindo a mobilidade!!

À Rebeca, por todo carinho, disponibilidade, auxílio no laboratório, nas coletas durante todo o período que estive em Mossoró e agora, nessa etapa final da tese, na conferência das referências!! Também agradeço a sua família pela acolhida e recepção.

À Fazenda Modelo de Pedro Leopoldo pela disponibilização inicial dos animais para esse estudo.

Ao Rivaldo Nunes da Costa por me apresentar ao Sr. Clayton Leal Brum, que disponibilizou os jumentos de sua propriedade para o desenvolvimento de parte desse trabalho.

Ao Jose, por ter me acompanhado e auxiliado em praticamente todas as coletas realizadas em Divinópolis (mesmo você sendo da Clínica de Ruminantes!!), e por sua amizade.

Ao Dr. Antônio Augusto Fonseca Jr., pela oportunidade de realização de experimentos, paciência em explicar, pela recepção, boa convivência e contribuições na execução desse trabalho. Aos demais membros do Laboratório de Biologia Molecular (LBM-LANAGRO-MG), Cláudia, Livinha, Mateus, Natália, Ana Paula, Éricas (porque são duas!), Mikael, Tati, Anapolino, pelo convívio e auxílios durante o período que estive por lá.

Aos professores da Escola de Veterinária, por todos os ensinamentos, abertura da porta de suas salas e laboratórios e compartilhamento de experiências.

Ao Alex e Fernanda pela disponibilidade e paciência em tirar as minhas dúvidas sempre que precisei.

Aos amigos e colegas do departamento, pela amizade e convívio nesses últimos anos, Lu, Raquel, Iza, Carol, Júlio, Prhiscylla, Fernanda, Jamili, pelo convívio e amizade.

Ao Professores do Departamento de Análises Clínicas do COLTEC, Cláudia Natália Ferreira e Eduardo Antônio Ferraz Coelho, pelo convívio, pela oportunidade e confiança no período em que participei do programa de Suporte ao COLTEC.

Ao Danilo Bastos, por rodar os dados estatísticos e à professora Ângela, pelas elucidações das dúvidas.

Às minhas queridas amigas de infância Renata, Rachel, Carolina, Janaína, Catarina e amigas do COLTEC, Luciana, Priscilla, Ana Lígia e Joana pelo carinho, amizade, incentivos e compreensão pela ausência nos últimos tempos.

SUMÁRIO

	LISTA DE ABREVIATURAS	10
	RESUMO	11
	ABSTRACT	12
	INTRODUÇÃO GERAL	13
1	CAPÍTULO 1: REVISÃO DE LITERATURA	15
1.1	ETIOLOGIA DA AIE.....	15
1.2	EPIDEMIOLOGIA.....	16
1.3	DIAGNÓSTICO DA AIE.....	16
1.4	CÉLULAS-ALVO.....	17
1.5	CICLO DE REPLICAÇÃO.....	19
1.6	SINAIS CLÍNICOS DA AIE.....	20
1.7	RESPOSTA IMUNE DO HOSPEDEIRO.....	21
1.9	PATOGÊNESE DA AIE.....	22
1.10	EVOLUÇÃO DA FAMÍLIA EQUIDAE.....	22
1.11	ESTIRPES DE EIAV PARA ESTUDOS DE VIRULÊNCIA E PATOGÊNESE.....	23
2	CAPÍTULO 2: ANEMIA INFECCIOSA EQUINA EM JUMENTOS LIVRES NA REGIÃO DE MOSSORÓ, RIO GRANDE DO NORTE, BRASIL	25
2.1	INTRODUÇÃO.....	25
2.2	MATERIAL E MÉTODOS.....	27
2.2.1	Amostras.....	27
2.2.2	IDGA.....	28
2.2.3	CELISA p26.....	28
2.2.4	rgp90ELISA.....	28
2.2.5	Imunoblot.....	29
2.3	RESULTADOS.....	30
2.4	DISCUSSÃO.....	34
2.5	CONCLUSÕES.....	36
3	CAPÍTULO 3: Estudo de resposta celular <i>in vitro</i> de PBMC de cavalos e jumentos e de macrófagos de jumentos infectados com EIAV	37
3.1	INTRODUÇÃO.....	37
3.2	MATERIAL E MÉTODOS.....	38
3.2.1	Células de Derme Equina Persistentemente Infectadas com EIAV _{WYO}	38
3.2.2	Efeito da infecção pelo EIAV _{WYO} em PBMC de cavalos e jumentos.....	38
3.2.3	Produção de estoques de EIAV estirpe UK3 (EIAV _{UK3}) e estirpe 44-1 (EIAV ₄₄₋₁).....	40
3.2.3.1	Transfecção de células ED com clones moleculares do EIAV.....	40
3.2.3.2	Titulação viral (TCID ₅₀).....	41
3.2.4	Efeito da infecção de macrófagos de jumentos pelas estirpes virais EIAV _{UK3} e EIAV ₄₄₋₁	42
3.2.5	One Step qRT-PCR em tempo real para quantificação do EIAV.....	44
3.2.6	Nested PCR.....	45
3.2.7	Análise estatística.....	45
3.2.8	Resumo Material e Métodos em Fluxogramas.....	47
3.2.8.1	Produção de estoque de EIAV, estirpe Wyoming (EIAV _{WYO}).....	47
3.2.8.2	Efeito da infecção pelo EIAV _{WYO} em PBMC de cavalos e jumentos.....	48
3.2.8.3	Produção de estoques de EIAV estirpe UK3 (EIAV _{UK3}) e estirpe 44-1 (EIAV ₄₄₋₁).....	49
3.2.8.4	Efeito da infecção de macrófagos de jumentos pelas estirpes virais EIAV _{UK3} e EIAV ₄₄₋₁	50
3.4	RESULTADOS.....	51
3.4.1	Células de Derme Equina Persistentemente Infectadas com EIAV _{WYO}	51

3.4.2	Efeito da infecção pelo EIAV _{WYO} em PBMC de cavalos e jumentos.....	51
3.4.2.1	Avaliação da replicação viral.....	51
3.4.2.2	Análise da expressão de citocinas em PBMC de cavalos e jumentos.....	52
3.4.3	Produção de estoques de EIAV estirpe UK3 (EIAV _{UK3}) e estirpe 44-1 (EIAV ₄₄₋₁).....	55
3.4.3.1	Transfecção de células ED com clones moleculares do EIAV.....	55
3.4.3.2	Titulação viral (TCID ₅₀).....	55
3.4	Efeito da infecção de macrófagos de jumentos pelas estirpes virais EIAV _{UK3} e EIAV ₄₄₋₁	56
3.5	DISCUSSÃO.....	61
3.6	CONCLUSÕES.....	65
4	CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	66
5	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	67
6	ANEXOS.....	84

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO 2: ANEMIA INFECCIOSA EQUINA EM JUMENTOS LIVRES NA REGIÃO DE MOSSORÓ, RIO GRANDE DO NORTE, BRASIL		
Tabela 1 -	Identificação de jumentos soropositivos para AIE em Mossoró e região – RN.....	30
Tabela 2 -	Análise de amostras de soro de jumentos da região de Mossoró, negativas no teste de IDGA e testadas em CELISA, rg90 ELISA e IB.....	33
CAPÍTULO 3: Estudo de resposta celular <i>in vitro</i> de PBMC de cavalos e jumentos e de macrófagos de jumentos infectados com EIAV		
Tabela 1 -	Iniciadores utilizados na PCR em tempo real para citocinas pró e anti-inflamatórias em PBMC de cavalos e jumentos infectados pelo EIAV _{WYO}	40
Tabela 2 -	Iniciadores utilizados PCR em tempo real para citocinas do estudo de infecção de macrófagos de jumentos com EIAV ₄₄₋₁ e EIAV _{UK3}	44
Tabela 3 -	Iniciadores utilizados na PCR em tempo real para região gag do EIAV.....	45
Tabela 4 -	Iniciadores utilizados na Nested PCR para região gag do EIAV.....	45
Tabela 5 -	Pesquisa de RNA do EIAV em PBMC de cavalos e jumentos 24 e 96 hpi.....	51
Tabela 6 -	PCR em tempo Real para detecção de EIAV (CT) em sobrenadantes de cultivos de ED transfectados com clones plasmídias de EIAV ₄₄₋₁ e EIAV _{UK3}	55
Tabela 7 -	Pesquisa de DNA proviral do EIAV em monócitos/macrófagos de jumentos um e dois dpi por Nested PCR.....	59

LISTA DE FIGURAS

CAPÍTULO 1: REVISÃO DE LITERATURA		
Figura 1 -	Em (A) representação esquemática da partícula do EIAV demonstrando suas principais proteínas estruturais e funcionais. Em (B) representação do genoma do EIAV.....	15
Figura 2 -	Representação esquemática do ciclo de replicação do EIAV na célula hospedeira.....	19
Figura 3 -	Representação esquemática do curso clínico da AIE correlacionando a temperatura corporal, contagem de plaquetas e número de cópias de RNA viral no plasma durante as fases da doença.....	20
CAPÍTULO 2: ANEMIA INFECCIOSA EQUINA EM JUMENTOS LIVRES NA REGIÃO DE MOSSORÓ, RIO GRANDE DO NORTE, BRASIL		
Figura 1 -	Localização do município de Mossoró nos mapas do Brasil e do estado do Rio Grande do Norte.....	27
Figura 2 -	Fluxograma dos resultados de testes sorológicos para AIE em 367 amostras de soro de jumentos errantes do município de Mossoró – RN testadas em IDGA, rgp90 ELISA, CELISA e Immunoblot.....	31
Figura 3 -	Análise de amostras de soro CELISA ou rgp90 ELISA positivas/IDGA negativas pelo IB.....	32
CAPÍTULO 3: Estudo de resposta celular <i>in vitro</i> de PBMC de cavalos e jumentos e de macrófagos de jumentos infectados com EIAV		
Figura 1 -	Avaliação da replicação do EIAV _{WYO} a partir da análise do sobrenadante de cultivo de PBMC de cavalos e jumentos por qRT-PCR para EIAV.....	52
Figura 2 -	Representação gráfica da expressão de mRNA de citocinas em PBMC provenientes de três cavalos e três jumentos, infectados com EIAV _{WYO} , tratados com LPS ou meio de cultivo (controle de células).....	54
Figura 3 -	Cultivo de monócitos/macrófagos aderentes de jumentos (Aumento 200X).....	57
Figura 4 -	Avaliação da replicação do EIAV ₄₄₋₁ (A) e EIAV _{UK3} (B) a partir da análise dos sobrenadantes dos cultivos de macrófagos de jumentos no período de 7 dias de infecção, através por qRT-PCR para EIAV.....	58
Figura 5 -	Representação gráfica da expressão de mRNA de citocinas pró-inflamatórias em macrófagos de jumentos infectados com EIAV ₄₄₋₁ e EIAV _{UK3} , como também estimulados com LPS ou meio de cultivo (controle de células -CC).....	60

LISTA DE ANEXOS

Anexo 1 - Certificado da Comissão de Ética no uso de animais.....	84
Anexo 2 - Análise de digestão de clones plasmidiais de EIAV.....	85
Anexo 3 - Padronização de cultivo de macrófagos.....	86
Anexo 4 - Citometria de fluxo para avaliação das populações celulares do cultivo de macrófagos.....	90
Anexo 5 - Protocolo de lavagem e desinfecção dos frascos de Teflon para cultivo de macrófagos.....	92
Anexo 6 - Obtenção de controles positivos para OneStep qRT-PCR EIAV.....	93
Anexo 7 - Fotos de géis de agarose 1,5% correspondentes aos resultados que estão resumidos na Tabela 5 do item 3.4.2.1.....	98
Anexo 8 - Eficiência qRT-PCR para citocinas.....	99
Anexo 9 - Nested PCR para pesquisa de EIAV em macrófagos de jumentos experimentalmente infectados.....	100

LISTA DE ABREVIATURAS

AIE: Anemia Infecciosa Equina
cELISA: ELISA competitivo
Cf2Th: células de timo canino
CTL: linfócito citolítico
ED: células de derme equina (equine dermis)
ED: células de derme equina não infectadas
EIAV: vírus da anemia infecciosa equina
EIAV₄₄₋₁: vírus da anemia infecciosa equina, clone não patogênico 44-1
EIAV_{PR}: vírus da anemia infecciosa equina, protótipo avirulento
EIAV_{PV}: vírus da anemia infecciosa equina, estirpe pônei patogênica
EIAV_{UK3}: vírus da anemia infecciosa equina, clone patogênico UK3
EIAV_{WYO}: vírus da anemia infecciosa equina, estirpe Wyoming
FDD: células de derme de feto de jumento (*fetal donkey derm*)
FEK: células de rim de feto equino (*fetal equine kidney*)
FRR: fator de restrição retroviral
GAPDH: gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase
hpi: horas pós-infecção
IB: Imunoblot
IDGA: imunodifusão em gel de ágar
IFN- β : interferon do tipo β
IL-10: interleucina 10
IL-1 α : interleucina 1 alfa
IL-6: interleucina 6
LPS: lipopolisacáride
mAb: anticorpos monoclonais
mRNA: RNA mensageiro
OD_{492nm}: densidade ótica em 492 nm
OD_{650nm}: densidade ótica em 650 nm
PBMC: células mononucleares do sangue periférico
PBST: phosphate buffered saline (pH 7.2) contendo 0.05% de Tween 20
PCR: reação em cadeia da polimerase
qRT-PCR: reação em cadeia da polimerase quantitativa com transcrição reversa
rgp90 ELISA: ELISA com proteína recombinante rgp90
RN: Rio Grande do Norte
TA: temperatura ambiente
TGF- β : fator de crescimento tumoral
TNF- α : fator de necrose tumoral
 β GUS: β -glucoronidase

RESUMO

O vírus da anemia infecciosa equina (EIAV) é um lentivírus que pode infectar todos os membros da família *Equidae*, porém a maioria dos estudos, até o momento, foram conduzidos em cavalos (*Eqqus caballus*) com pouca informação comparativa sobre a infecção nas outras espécies da família. O Brasil possui uma das maiores populações de jumentos (*E. asinus*) do mundo, concentrada principalmente na região nordeste, sendo que muitos deles vivem de forma errante ou abandonados, com *status* sanitário desconhecido. O presente trabalho teve dois objetivos: primeiro, determinar a ocorrência da AIE em uma população de jumentos da região de Mossoró-RN, através da associação de testes diagnósticos; em segundo, avaliar a expressão de citocinas importantes na patogênese da AIE em PBMC de cavalos e jumentos, e macrófagos de jumentos infectados *in vitro* com estirpes do EIAV de diferentes patogenicidades. Os resultados demonstraram que, baseando apenas no teste de IDGA, 1,63% dos jumentos testados foram positivos para AIE. Ao associar rpg90 ELISA, CELISA e imunoblot, o índice de animais positivos aumentou em 50%. Um achado interessante foi que 56,9% dos soros testados no imunoblot reagiram apenas com a proteína do capsídeo viral p26. Nas infecções *in vitro* com EIAV, foi observada maior tendência de variação na expressão das citocinas TNF- α (24 h), IL-6 e IFN- β (96 h) nos cultivos de PBMC de cavalos do que de jumentos pós-infecção com EIAV_{WYO}. Não foram observadas diferenças significativas na expressão de TNF- α , IL- α , IL-6 e TGF- β nas infecções de macrófagos de jumentos com estirpe patogênica e não patogênica do EIAV ($p \leq 0,05$). Estudos adicionais são necessários para investigar se os jumentos que reagiram com a p26 são recentemente infectados, ou foram expostos a outras estirpes de EIAV antigenicamente distintas ou outros retrovírus que ainda não foram identificados. A não desregulação de citocinas pelos macrófagos infectados do nosso estudo talvez indique que a patogênese da AIE em jumentos ocorra por mecanismos diferentes daqueles estabelecidos para a espécie equina. Os resultados das infecções *in vitro* indicam a necessidade de se aprofundar os estudos da resposta imune celular de jumentos ao EIAV, bem como pesquisar outros fatores relacionados ao hospedeiro, como por exemplo receptor de lentivírus equino (ELR) e fatores de restrição retroviral.

Palavras-chave: AIE, jumentos, sorologia, patogênese

ABSTRACT

Equine infectious anemia virus (EIAV) is a lentivirus agent which infects all *Equidae* members throughout the world however the vast majority of studies have been conducted in horses (*Equus caballus*) with comparatively little information available for other equid species. Brazil has one of the most abundant donkey (*E. asinus*) populations of any nation especially in the Northeast of the country where they have been released and allowed pursue an almost feral existence with unknown sanitary status. The present study had two objectives: first, was to conduct a serological survey for EIAV in populations of free living donkeys in Mossoró city and adjacent areas, Rio Grande do Norte state, Brazil using combination of EIA diagnostic tests; second, was to evaluate the cytokine profile of equine and donkeys PBMC and, donkey's macrophages after challenge with virulent and avirulent EIAV strains *in vitro*. The EIA seropositive rate was 1.63% in officially approved AGID test. However, subsequent testing using CELISA and rgp90 ELISA with IB used to clarify discrepant results found between AGID and both ELISA demonstrated that the EIA rate was underestimated by 50%. A potentially highly significant finding is that 56.9% of the donkey serum samples had reactivity to EIAV p26 only in IB. At the *in vitro* infections, the equine PBMC showed increased expression of TNF- α (24h), IL-6 e IFN- β (96 h) after infection with EIAV_{WYO} compared to donkeys PBMC. In the experiments of donkey macrophages infections with virulent and avirulent EIAV strains, it was not observed dysregulations in cytokine expression such as TNF- α , IL-1 α , IL-6 e TGF- β ($p \leq 0,05$). Additional studies are needed to investigate whether the donkeys that reacted with p26 only had recent exposure to EIAV strains with envelope glycoproteins that are different from any other that have been previously characterized or other retrovirus not yet described. In our study smaller or not evident dysregulation of cytokines by donkey infected PBMC and macrophages may indicate that the pathogenesis of EIA in donkeys occur by different mechanisms from those established for the equine species. It indicates the need of more studies at donkey cellular immune response against EIAV, searching for other host factors, such as equine lentivirus receptor (ELR) and retroviral restriction factors (RRF).

Key-words: EIA, donkeys, serology, pathogenesis

INTRODUÇÃO GERAL

Os jumentos são animais que no passado desempenharam importante papel como força de trabalho na agricultura familiar e como transporte. São animais que suportam viver em climas tanto áridos, quanto úmidos e frios, são dóceis e podem apresentar maior resistência a doenças que acometem outras espécies da família *Equidae*. Em decorrência de suas especificidades, atenção especial tem sido dada aos jumentos no que se refere a sua criação para fins comerciais. No entanto, em outra esfera, populações de jumentos abandonados crescem dia após dia, na região Nordeste brasileira, onde se concentra uma das maiores populações dessa espécie no mundo, com pouca informação acerca da sanidade desses animais. O apelo que se tem em comum é que os jumentos não deveriam ser considerados como cavalos, assim como as doenças que os acometem, não deveriam ser estudadas e tratadas da mesma maneira que para cavalos.

A Anemia Infecciosa Equina (AIE) é uma enfermidade de importância significativa na equideocultura brasileira e mundial. É uma doença infecciosa de notificação obrigatória para trânsito e participação em eventos, acomete tanto equinos, muares (burros e mulas), quanto asininos (jumentos), porém o curso clínico da infecção pelo EIAV foi amplamente estudado apenas em cavalos. O mesmo ocorreu em inquéritos sorológicos, onde a pesquisa da ocorrência da AIE, normalmente tem sido estimada em populações de maioria composta por equinos.

Sabe-se que a AIE é mais prevalente em regiões de clima quente e úmido, onde há uma grande concentração de insetos hematófagos, como os tabanídeos, conhecida como a principal forma de transmissão do vírus pela picada durante repasto sanguíneo. A ação do homem tem sido atribuída ao surgimento de surtos da doença em países/regiões onde a ocorrência da AIE é baixa, devido a hábitos deficientes em biossegurança no manejo dos animais.

Há descrições na literatura de que algumas espécies de macacos podem responder diferentemente às infecções pelo vírus da imunodeficiência símia (SIV), assim como os jumentos não apresentam sinais clínicos semelhantes aos de cavalos/pôneis infectados por estirpes patogênicas da AIE. Dessa forma, pesquisas vem sendo realizadas para determinar quais fatores da resposta imune, tais como ativação de células inflamatórias e expressão de citocinas, que possam explicar, em parte, essas diferenças observadas às infecções por diferentes lentivírus.

Para elucidar as diferenças entre a doença induzida pelo EIAV em equinos e jumentos, deve-se investigar a interação do vírus com as células-alvo (monócitos e macrófagos) das duas espécies, como também verificar a magnitude da indução dessas respostas pelos macrófagos frente à infecção por estirpes de EIAV com diferentes patogenicidades.

O conhecimento da patogênese e da resposta imune ao EIAV em jumentos pode auxiliar na aplicação de métodos mais eficientes para o diagnóstico da AIE nessa espécie. Bem como identificar fatores que caracterizam os jumentos como naturalmente resistentes à AIE.

Dessa forma, os objetivos desse trabalho foram:

- Avaliar a ocorrência da AIE em uma população de jumentos errantes no município de Mossoró, estado do Rio Grande do Norte, Brasil, através da associação de técnicas de diagnóstico com diferentes sensibilidades e especificidades.

- Comparar o perfil de expressão de mRNA de citocinas importantes na patogênese da AIE (TNF- α , IL-1 α , IL-6, IL-10 e IFN- β) em cultivos de PBMC de equinos (*Equus caballus*) e jumentos (*Equus asinus*), utilizando PCR em tempo Real, após infecção com EIAV altamente patogênico (EIAV_{WYO}).
- Avaliar o perfil de expressão de mRNA de citocinas pró-inflamatórias (TNF- α , IL-1 α , IL-6 e TGF- β) em cultivos de macrófagos de jumentos (*Equus asinus*), utilizando PCR em tempo Real, após infecção com clones patogênico (EIAV_{UK3}) e não patogênico do EIAV (EIAV₄₄₋₁).
- Avaliar a cinética da replicação do EIAV em cultivos de PBMC e macrófagos após as infecções virais.

CAPÍTULO 1

REVISÃO DE LITERATURA

1.1 ETIOLOGIA DA AIE

O vírus da anemia infecciosa equina (EIAV) é um *lentivírus*, pertencente à família *Retroviridae*, que causa infecção persistente em espécies da família *Equidae* (equinos, muares e asininos). Da mesma forma que os outros retrovírus, o EIAV possui três genes estruturais principais (*gag*, *pol* e *env*) flanqueados por elementos repetitivos em cada extremidade (LTR), que contém sequências regulatórias (Cook et al., 2009). O gene *gag* codifica as proteínas do core viral p26, p15, p11 e p9; o gene *pol* codifica a transcriptase reversa, que é responsável pela síntese de DNA a partir de RNA; a integrase necessária para a integração do provirus e a protease, essencial para o processamento das poliproteínas Gag e Gag-pol. O gene *env* codifica as glicoproteínas transmembrana, gp45, e do envelope, gp90, que são requeridas pelo vírus para sua penetração na célula hospedeira através do receptor ELR-1 (Receptor de Lentivírus Equino 1) (Zhang et al., 2005), atuando como potentes imuno-estimulantes (Leroux et al., 2004). Além dos genes principais, os lentivírus codificam proteínas acessórias que variam em número e função de acordo com a complexidade do vírus (Cook et al., 2009). Os genes Tat e Rev do EIAV, codificam proteínas que atuam na replicação viral (Tat -transativador para replicação) e Rev, expresso para exportar RNA viral do núcleo para o citoplasma. O gene S2, codifica proteína essencial para determinação de virulência *in vivo* (Li et al., 2000). Na Figura 1 está a representação esquemática da estrutura da partícula viral, como também do genoma do EIAV.

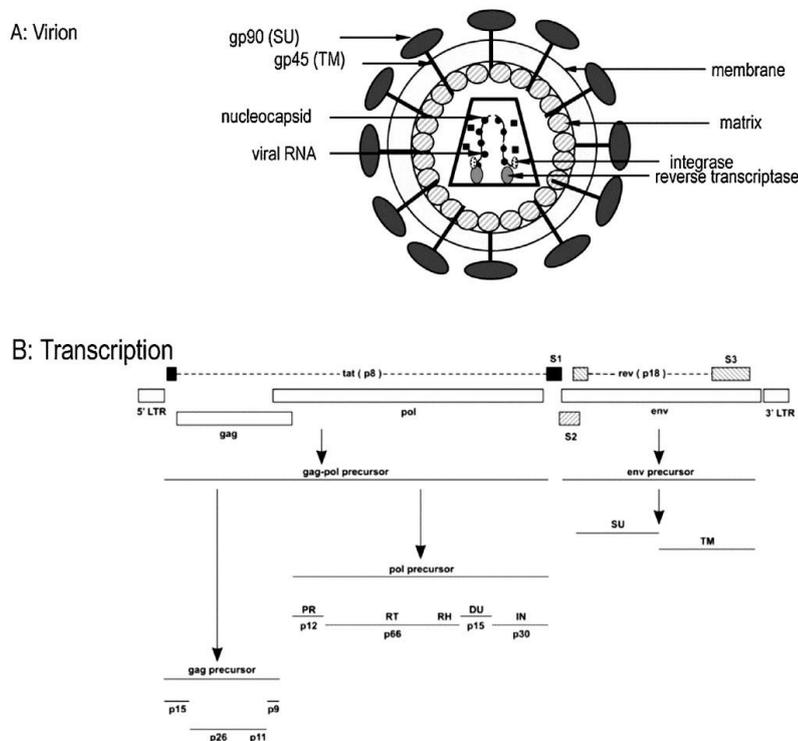


Figura 1: Em (A) representação esquemática da partícula do EIAV demonstrando suas principais proteínas estruturais e funcionais. Em (B) representação do genoma do EIAV (Fonte: Cook et al., 2013)

1.2 EPIDEMIOLOGIA

O EIAV possui distribuição mundial, no entanto, a sua prevalência é bem variada nas diversas regiões do Brasil e do mundo. Os dados de prevalência da doença são baseados nos testes de diagnóstico realizados, geralmente para comercialização, participação em eventos agropecuários e exposições, como também viagens intermunicipais e estaduais. No Brasil, acredita-se que menos de 10% da população de equídeos seja frequentemente testada para AIE, o que gera dados subestimados da real prevalência da doença no país. Estudos demonstram que a prevalência média da AIE no Brasil e na América do Sul varia de 2-3%, índices ainda menores em animais de haras. No entanto, considera-se que regiões como o Pantanal Mato-grossense e a região Norte do Estado de Minas Gerais são endêmicas para AIE (Almeida et al., 2006; Borges et al., 2013). Os estudos publicados têm seus dados baseados somente na utilização da técnica de IDGA como ferramenta de diagnóstico, uma vez que este foi, por muito tempo, o único teste oficial para diagnóstico da AIE no Brasil, fator que também pode subestimar os dados de prevalência da doença no país.

O EIAV é um vírus cuja transmissão sanguínea ocorre pela ação mecânica de insetos da família *Tabanidae*, quando sua alimentação em um animal infectado é interrompida e, em seguida se encontra outro equídeo não infectado próximo para continuar a alimentação (Issel et al., 2014). No entanto, essa não é a forma mais eficaz de transmissão do vírus, uma vez que o volume de sangue que fica no aparelho bucal do inseto, como também a densidade populacional de animais suscetíveis, e o tempo para se alcançar outros equídeos durante a alimentação, são fatores limitantes dessa via (Cook et al., 2009; Reis e Cook, 2014). Como não há etapa de replicação do vírus no organismo do inseto que resulte em aumento da carga viral neste vetor, o mesmo deve continuar o repasto sanguíneo dentro de até 4 horas. O que pode aumentar a eficiência de transmissão por esta via seriam altas densidades de insetos vetores associado a uma alta carga viral no equídeo, no momento da picada do inseto (Cook et al., 2013; Issel et al., 2014). No entanto, uma via importante de transmissão do EIAV para outros equídeos ocorre, pela ação do homem, através da reutilização de agulhas, seringas, luvas e compartilhamento de selas que tiveram contato com sangue de um animal infectado (Issel et al., 2014). O volume de sangue retido em uma agulha hipodérmica varia de 10-100 μ L, tornando o vírus viável por até 96 h. Os dois fatos associados tornam essa via de transmissão do EIAV 1000 a 10000 vezes mais eficiente que a transmissão mediada por insetos (Reis e Cook, 2014).

1.3 DIAGNÓSTICO DA AIE

A AIE é uma doença que não possui tratamento nem vacina com ampla eficácia, portanto, seu controle ocorre basicamente pela identificação, segregação e/ou eutanásia dos animais soropositivos para o EIAV, através do uso de métodos laboratoriais aprovados. No Brasil e em vários países do mundo, por muito tempo, o método oficial para o diagnóstico da AIE foi exclusivamente a Imunodifusão em Gel de Ágar (IDGA) ou teste de Coggins (Brasil, 2004; OIE, 2012) que detecta anticorpos anti-p26. A partir de 1980, o USDA (*United States Department of Agriculture*) aprovou o uso de ensaios imunoenzimáticos (ELISA), devido à alta sensibilidade, como método de triagem, sendo que os animais que desenvolvem resultados positivos no ELISA devem ser confirmados pelo teste de IDGA (Issel e Cook, 1993; Cook et al., 2013).

Nesse mesmo sentido, recentemente, o Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA), aprovou uma portaria que permite o uso de testes ELISA para o diagnóstico da AIE, no entanto, todas as amostras que apresentarem resultados positivos devem ser confirmadas pelo teste de IDGA (BRASIL, 2014), devido à sua alta especificidade e ser o único teste que já provou ser correlacionado com a presença do vírus no animal (Coggin, 1972). Esta resolução do MAPA é um avanço para o diagnóstico da AIE no Brasil, apesar disso os kits ELISA ainda estão em fase de validação e registro para comercialização. O imunoblot para AIE é uma importante ferramenta de pesquisa utilizada para elucidar casos em que há discordância entre os resultados de IDGA e ELISA (Issel et al., 2012; Scicluna et al., 2013). O imunoblot é um dos métodos sorológicos mais sensíveis, pois detecta, simultaneamente, reação de anticorpos anti-gp90, anti-gp45 e anti-p26 com as respectivas proteínas virais (Issel et al., 1999). O imunoblot possibilita a confirmação do *status* imunológico do animal infectado pelo EIAV, pois é utilizado como ferramenta de estudo da cinética da resposta imune dos equídeos com AIE (Issel e Cook, 1993; Cullinane, et al., 2007). Esse método não está disponível comercialmente, no entanto, tem sido usado como ferramenta auxiliar no diagnóstico da AIE no laboratório referência da Universidade de Kentucky, nos Estados Unidos, como também foi utilizado em surto da AIE ocorrido na Irlanda em 2006 (Cullinane et al., 2007) e no Programas de Vigilância da AIE na Itália (Issel et al., 2012; Scicluna et al., 2013). Vários métodos moleculares de diagnóstico têm sido descritos e avaliados, baseados na reação em cadeia da polimerase (PCR), para detecção do DNA proviral do EIAV, em células leucocitárias a partir do sangue total dos equídeos ou detecção de RNA no plasma (Quinlivan et al., 2007; Cappelli et al., 2011; Dong et al., 2012). Devido à grande variabilidade genética do EIAV, o uso de técnicas moleculares exige informações de sequências de nucleotídeos em bancos de dados, a partir de várias partes do mundo. Esse tipo de informação tem aumentado nos últimos anos, facilitando, dessa forma, o desenho de ensaios de PCR e RT-PCR com reações mais abrangentes (Quinlivan et al., 2007; Cappelli et al., 2011; Dong et al., 2012). As técnicas moleculares utilizadas no estudo do EIAV no surto da AIE na Irlanda em 2006, foram capazes de caracterizar a sequência completa do genoma do isolado viral, então denominado de EIAV_{IRE} [Ireland]. O isolado EIAV_{IRE} é o quarto genoma completo do EIAV publicado atualmente nos bancos de dados, juntamente com as sequências dos isolados do Japão, EUA e China, informação importante que poderá contribuir para o desenvolvimento de métodos diagnóstico mais sensíveis, baseados na técnica de PCR, como também no desenvolvimento de vacinas para AIE (Bolfà et al., 2015).

Em uma nova abordagem, para aumentar a eficiência do diagnóstico da AIE na Itália, foi adotado o sistema de três etapas para o diagnóstico, que emprega primeiro o ELISA para triagem, o teste de IDGA para confirmação dos resultados positivos no ELISA e o imunoblot para elucidar resultados conflitantes entre os dois primeiros testes sorológicos (Scicluna et al., 2013). Foi observado nesse trabalho que, a frequência de amostras com resultados ELISA/imunoblot positivo e IDGA negativo foi significativamente maior em mulas do que em cavalos. Isso sugeriu que o diagnóstico pode ser muito mais problemático em muare, sendo importante o papel dessa espécie híbrida na disseminação e manutenção do EIAV em rebanhos infectados.

1.4 CÉLULAS-ALVO

O alvo primário do EIAV no hospedeiro são os monócitos, no entanto, proteínas virais não são sintetizadas nestas células, pois o vírus necessita que as células se diferenciem em macrófagos maduros para que seu ciclo viral se complete (Sellon, 1993; Maury, 1994). Replicação em macrófagos teciduais é uma característica de todos os lentivírus, primariamente,

devido a presença de fatores de transcrição nessas células (Desrosiers, 2007). Uma variedade de estudos já demonstrou que macrófagos maduros são preferencialmente responsáveis pela replicação do EIAV durante as fases clínicas e subclínicas (Harrold et al., 2000; McGuire, 1971; Maury, 1994; Oaks et al., 1998; Sellon, 1993). As maiores concentrações de antígenos virais e de DNA do EIAV foram encontradas em amostras teciduais do fígado, baço, linfonodos, medula óssea e pulmões de animais persistentemente infectados e em concentrações menores nos rins, coração, cérebro, estômago, timo, adrenais e intestino (Mc Guire, 1971; Montelaro et al., 1993; Oaks et al., 1999; Sellon, 1993). Trabalho recente demonstrou a expressão da principal proteína do capsídeo do EIAV, a p26, não apenas nos macrófagos pulmonares de cavalos positivos para AIE, como também nas células endoteliais e células epiteliais bronquiolares e alveolares dos pulmões analisados (Bolfá et al., 2013).

Macrófagos e monócitos desempenham papéis cruciais na inflamação e na resposta imune inata do hospedeiro, sendo que os macrófagos também participam da resposta imune adaptativa, como células efetoras (Geissmann et al., 2010, Sang et al., 2014). Os monócitos circulam no sangue, medula óssea e no baço, podendo se diferenciar em macrófagos ou células dendríticas durante a inflamação, dependendo da expressão de citocinas específicas e do receptor de fator de crescimento hematopoiético (Csf1r), nas suas células precursoras (Geissmann et al., 2010). Também podem circular sem se diferenciar durante estado estacionário. Já os macrófagos são residentes em tecidos linfóides e não linfóides, contribuindo para a homeostasia do organismo ao fazer *clearance* de células apoptóticas e na produção de fatores de crescimento (Ma J. et al., 2003; Geissmann et al., 2010). Os macrófagos expressam em sua superfície vários receptores de reconhecimento de padrão (PRRs), o que contribui para sua propriedade de célula fagocítica, além de induzir quimiocinas e citocinas inflamatórias importantes para a atividade antiviral dessas células (Medzhitov, 2001; Sang et al., 2014). Embora a infecção de monócitos pelo EIAV não resulte em infecção produtiva, eles podem servir como disseminadores do vírus (Harrold et al., 2000). Monócitos indiferenciados carregando o EIAV são comparados aos “cavalos de Tróia”, devido ao seu potencial de disseminar o vírus pelo corpo, com entrada em órgão-alvo sem a detecção pelo sistema imune do hospedeiro (Haase, 1986; Harrold et al., 2000; Peluso et al., 1985). Esse mesmo aspecto de restrição de replicação viral e ação como disseminadores virais dos monócitos é observado em infecções de caprinos e ovinos com SRLV (*small ruminant lentiviruses*), uma vez que a expressão desses vírus ocorre somente em macrófagos maduros (Clements et al., 1990; Gendelman et al., 1986; Narayan et al., 1983).

Em laboratórios, o EIAV teve sua replicação adaptada à vários tipos de linhagens celulares, com o objetivo de se produzir antígeno viral em larga escala para testes diagnóstico, como também para isolamento de estirpes selvagens, titulação viral e estudos de interação vírus-hospedeiro. As linhagens mais importantes são de Derme Equina - ED (Klevjer-Anderson et al., 1979; Malquist et al., 1973), Rim de Feto Equino - FEK (Kono e Yoshino, 1974), Derme de Feto de Jumento - FDD (Shen e Whang, 1985), macrófagos derivados de monócitos (Kono e Kobayashi, 1970; Maury, 1994; Raab et al., 1998), macrófagos derivados de baço (Raab et al., 1998) ou de medula óssea (Swardson et al., 1997), células fibroblásticas caninas e felinas transformadas (Benton et al., 1981, Bouillant et al., 1986, Hines e Maury, 2001). Células endoteliais renais também podem ser infectadas pelo EIAV *in vitro* (Maury et al., 1998 b). *In vivo*, o RNA e a proteína do capsídeo viral também foram detectados nas células endoteliais, no entanto, elas não parecem ser determinantes na virulência do EIAV, mas a infecção destas células pelo EIAV pode contribuir para a trombocitopenia associada a esse vírus (Oaks et al., 1999, Bolfá et al., 2013).

1.5 CICLO DE REPLICAÇÃO

A infecção das células-alvo do EIAV inicia-se quando a glicoproteína do envelope gp90 se liga ao receptor ELR-1, que é membro da família de receptores da citocina TNF (TNFR) (Zhang, et al., 2005; Lin et al., 2013). A Figura 3 é a representação esquemática do ciclo de replicação do EIAV na célula hospedeira. Após a ligação do EIAV ao ELR-1, ocorrem mudanças conformacionais, tanto na gp90, quanto na membrana celular, permitindo a fusão viral na célula hospedeira. Em seguida, após a liberação do genoma viral no citoplasma celular, ocorre a síntese de DNA viral, através da ação da transcriptase reversa. O DNA viral é exportado para o núcleo, seguindo-se da sua integração ao DNA do hospedeiro, através da ação da integrase. Baseando-se no conhecimento do ciclo dos *lentivirus*, o DNA proviral normalmente demora 24 horas pós-infecção para entrar no núcleo (Liu et al., 2015). Por conseguinte, o provírus é transcrito pela célula hospedeira, sendo a regulação da transcrição realizada pela ação da proteína Tat. Produtos da expressão dos genes virais são exportados para o citoplasma, com auxílio da proteína Rev, com consequente síntese das primeiras proteínas virais no citoplasma. A montagem de novas partículas virais infecciosas, ocorre através do acondicionamento de transcritos completos de RNA do genoma proviral pelo complexo nucleoproteína. A nucleoproteína é produto da transcrição dos genes *pol* e *gag*. Após o fechamento da nucleoproteína, o EIAV é então envelopado e passa pelo processo de brotamento e maturação, seguindo-se de liberação de novas partículas virais que podem infectar outras células-alvo (Desrosiers, 2007).

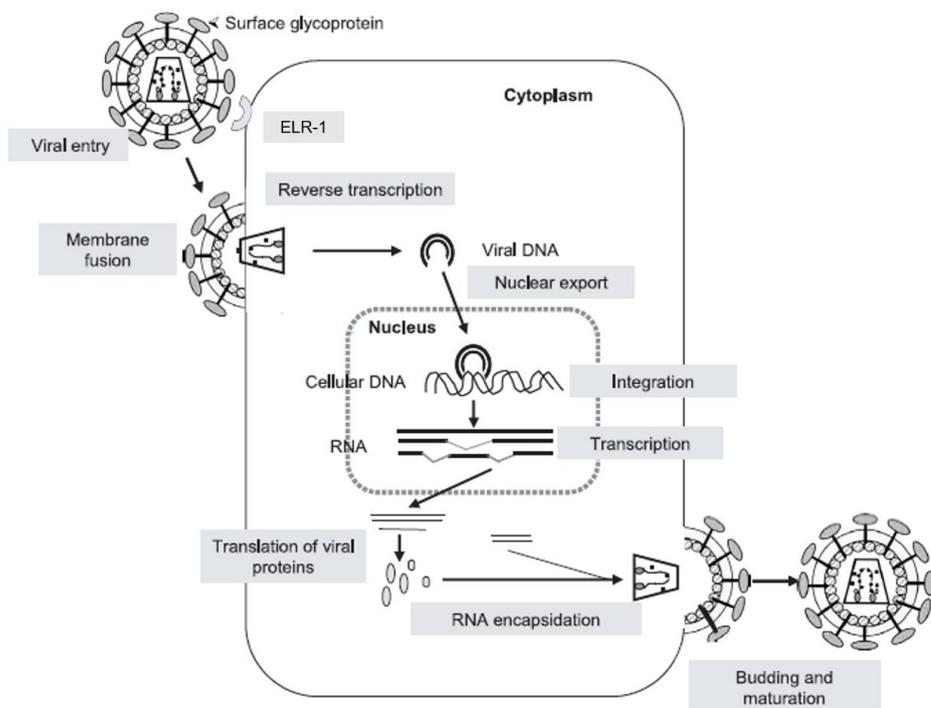


Figura 2: Representação esquemática do ciclo de replicação do EIAV na célula hospedeira (Adaptado de Leroux et al., 2004)

1.6 SINAIS CLÍNICOS DA AIE

O curso clínico da infecção pelo EIAV é bem documentado em cavalos (*Equus caballus*), sendo classicamente dividido em três fases: aguda, crônica e inaparente (Figura 3). Cavalos/pôneis infectados, seja naturalmente ou experimentalmente, podem manifestar um ou mais sinais clínicos da AIE (Russel et al., 1998), dependendo da virulência da estirpe infectante e da quantidade de vírus que é inoculada/transmitida (Cook et al., 2003). A fase inicial, ou aguda da AIE, ocorre entre 5 e 30 dias pós-infecção, sendo caracterizada por viremia e trombocitopenia (Issel e Coggins, 1979; Sellon, 1993), no entanto, estes sinais podem ser brandos ou completamente ausentes, podendo ser acompanhados de febre, letargia e inapetência. Em casos mais graves, podem surgir petéquias e anemia hemolítica (Issel et al., 2014). Após a fase aguda da doença, o animal infectado normalmente entra na fase crônica, com ciclos recorrentes de viremia, anemia, perda de peso, edema, trombocitopenia e, ocasionalmente, sinais clínicos neurológicos (Issel e Coggins 1979; Issel et al., 2014; Leroux et al., 2004; Montelaro et al., 1993). Se o animal sobrevive, os episódios progressivamente diminuem, em frequência e intensidade, em torno de um ano. Após esse período, o animal evolui para o estágio de portador inaparente, onde os sinais clínicos estão ausentes e a viremia é usualmente indetectável (Dong et al., 2012; Spyrou et al., 2003). Mais de 90% dos animais infectados com EIAV se tornam portadores inaparentes e constituem as principais fontes de infecção para animais saudáveis (Montelaro et al., 1993).

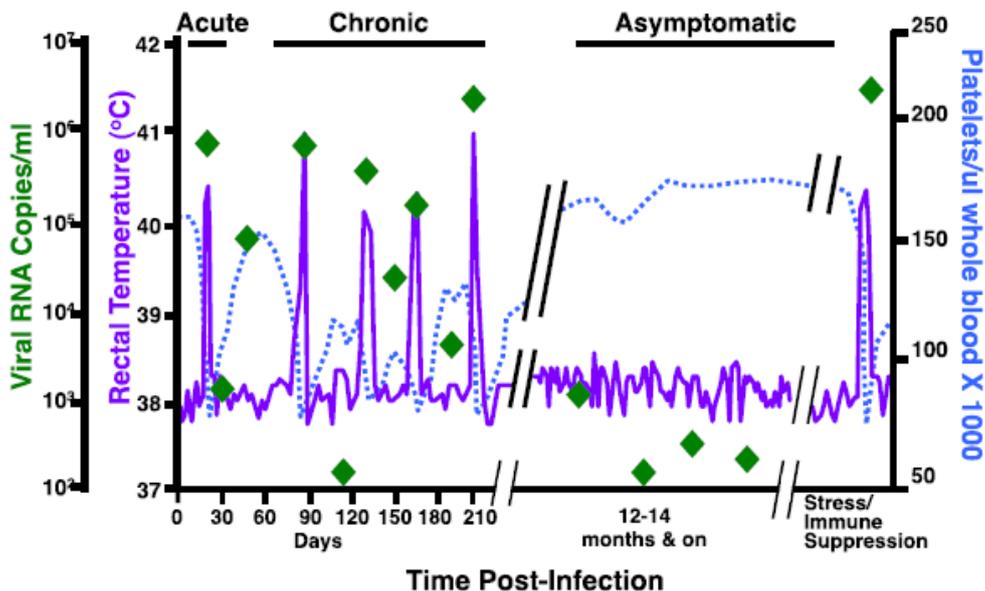


Figura 3: Representação esquemática do curso clínico da AIE correlacionando a temperatura corporal, contagem de plaquetas e número de cópias de RNA viral no plasma durante as fases da doença. Episódio febril é considerado quando temperatura retal está acima de 39°C; trombocitopenia é definida como contagens de plaquetas abaixo de 105.000/ μ L de sangue e viremia caracteriza-se pela quantidade de 10⁵ cópias de RNA de EIAV/mL de plasma. (Fonte: Craig e Montelaro, 2013).

Para os muare (cruzamento de *Equus caballus* x *Equus asinus*), os achados clínicos - patológicos e laboratoriais, mostram que esses equídeos produzem sinais clínicos semelhantes

aos observados em equinos (Spyrou et al., 2003). No entanto, os jumentos (*Equus asinus*), apesar de serem susceptíveis ao EIAV, apresentam níveis de viremia muito baixos, o que pode explicar o fato de não demonstrarem, usualmente, os sinais clínicos da enfermidade (Cook et al., 2001). Neste mesmo trabalho, foi observado que após infecção experimental de jumentos e cavalos com a estirpe patogênica do EIAV_{PV}, todos os cavalos do experimento apresentaram sinais clínicos da AIE e os jumentos permaneceram assintomáticos durante os 365 dias de observação, além de terem soroconversão mais tardia, apresentaram carga viral plasmática menor em relação aos cavalos, nas três primeiras semanas pi. Quando a infecção dos cavalos e jumentos foi realizada com a estirpe altamente virulenta, EIAV_{WYO}, a carga viral associada ao plasma detectada nos jumentos foi cerca de 10³ vezes menor.

1.7 RESPOSTA IMUNE DO HOSPEDEIRO

A infecção pelo EIAV resulta em um pico de viremia associado ao plasma no período de três semanas pi. Muitas evidências indicam que, tanto a resposta imune humoral, quanto a resposta imune celular específica contra o EIAV, são necessárias para controlar essa viremia (Leroux et al., 2004, Cook et al., 20013). A maioria dos animais infectados consegue controlar a viremia inicial e passar de um estágio agudo ou crônico para o estado de portador assintomático do EIAV, mantendo baixa carga de vírus plasmática e replicação viral somente em macrófagos associados a tecidos (Harrold et al., 2000; Oaks et al., 1998). Se esses portadores inaparentes são submetidos a estresse ou a imunossupressão medicamentosa, por administração de dexametasona por exemplo, pode ocorrer recrudescência dos sinais clínicos da doença, mesmo após décadas de infecção (Craig et al., 2007; Kono et al., 1976; Tumas et al., 1994). O primeiro controle da carga viral plasmática é exercido pelos linfócitos T citotóxicos (CTL) e por anticorpos não neutralizantes específicos contra o EIAV (McGuire et al., 2004; Mealey et al., 2005; Perryman et al., 1988; Rwambo et al., 1990). Esses primeiros anticorpos desenvolvidos são contra as glicoproteínas de superfície (gp90) e transmembrana, (gp45), e contra a proteína do core viral (Hammond et al., 1999). A detecção desses anticorpos, por métodos de diagnóstico sensíveis, como ELISA e imunoblot, pode ocorrer entre 14 e 28 dias após a infecção de animais imunocompetentes. Os anticorpos neutralizantes, específicos para a estirpe infectante, são observados nos períodos de 38-87 dpi, podendo demorar mais tempo para atingir picos máximos (90-148 dias), não sendo responsáveis por controlar a fase aguda da AIE (Kono et al., 1974; O'Rourke et al., 1988; Rwambo et al.; 1990; Ball et al., 1992; Hammond et al.; 1997). Após o controle da viremia na fase aguda da doença, o sistema imune adaptativo do hospedeiro pode exercer pressão seletiva sobre o vírus, levando a variações no gene *env* do EIAV infectante (Mealey et al., 2003). O surgimento de novas variantes do EIAV, antigenicamente distintos, pode levar ao reaparecimento do quadro clínico da AIE, porém, estes vírus não sofrem ação dos anticorpos neutralizantes gerados no episódio anterior (Hammond et al., 1997). Também tem sido observado que epítopos do EIAV são reconhecidos com diferentes graus de avidéz pelos CTLs, alterando, dessa forma, sua capacidade de ligação e *clearance* viral nessas situações (Mealey et al., 2003; Mealey et al., 2005).

Os mamíferos em geral, ao longo da evolução das espécies, desenvolveram mecanismos de defesa contra os retrovírus que vão além do sistema imune inato e adaptativo. Exemplos de fatores de restrição retroviral (FRR) incluem a apolipoproteína β (APO β EC3), que introduz mutação letal no genoma do vírus (Blanco-Melo et al., 2012; Sheehy et al., 2002), teterina, que ancora a progênie viral na superfície da célula do hospedeiro, prevenindo a liberação desses novos vírus (Neil et al., 2008). TRIM5, família de proteínas que atuam no capsídeo de novos retrovírus sintetizados (Simon et al., 2015), vem sendo atribuídos a redução da replicação viral

em diferentes espécies de macacos infectados com amostra patogênica de SIV (Zheng et al., 2012, Mir, et al., 2015). Apesar do achado de que *E. caballus* codifica seis membros diferentes da família de genes de APO β EC3, estas proteínas parecem não ser ativas (Bogerd et al., 2009), ou o EIAV é inerentemente resistente à essa proteína. Esse fato foi questionado posteriormente, sendo demonstrado que, na verdade, essas proteínas são pouco expressas em macrófagos dos equinos, o alvo primário do EIAV (Zielonka et al., 2009). Estudo recente provou que a teterina equina homóloga pode restringir a liberação do EIAV de células infectadas e que sua ação antirretroviral pode ser antagonizada pelas proteínas sintetizadas por *env* (Yin et al., 2014 a).

1.8 PATOGÊNESE DA AIE

Os sinais clínicos associados à fase aguda da AIE são mediados por citocinas pró-inflamatórias, tais como, fator de necrose tumoral (TNF- α), interleucina 6 (IL-6), IL-1 α e fator de transformação de crescimento (TGF- β), quando a quantidade de vírus associada aos tecidos atinge limiar de doença (Costa et al., 1997; Issel et al., 2014; Sellon et al., 1998; Tornquist e Crawford, 1997; Tornquist et al., 1997). Uma das maiores fontes dessas citocinas pró-inflamatórias são os macrófagos infectados, e trabalhos tem demonstrado desregulação da expressão de citocinas em infecções de macrófagos por lentivírus, tais como, vírus da imunodeficiência humana e símia (HIV e SIV, respectivamente), vírus da artrite e encefalite caprina (CAEV) e vírus maedi-visna (MVV) (Esser et al., 1996; Lecher et al., 1997). Lim et al. (2005) infectaram macrófagos equinos, *in vitro*, com amostra patogênica EIAV₁₇, demonstrando também que esse vírus desregula a expressão gênica de TNF- α , IL-6, IL-1 α e IL-1 β após a infecção. Estudos *in vivo* encontraram níveis séricos de TNF- α , IL-6 e TGF- β significativamente aumentados em animais experimentalmente infectados e em fase aguda da AIE (Costa et al., 1997; Sellon et al.; 1998; Tornquist et al., 1997). As citocinas IL-6 e TNF- α , uma vez liberadas, podem provocar o surgimento de febre, através da ativação da cascata metabólica do ácido aracdônico, com consequente aumento da produção da prostaglandina E2 (PGE2) (Cook et al., 2013). A associação dos efeitos de TNF- α e TGF- β , conhecidos por terem ação supressiva na hematogênese dos megacariócitos, podem levar a trombocitopenia (Leroux et al., 2004), podendo também contribuir para anemia. Já foi descrito que, a elevação dessas duas citocinas, precederam início de trombocitopenia (Costa et al., 1997; Tornquist et al., 1997).

Outro mecanismo para a indução de anemia e agravamento da trombocitopenia, é a destruição dos eritrócitos e plaquetas através do mecanismo de fagocitose dessas células recobertas com complemento C3 ou opsonizadas por anticorpos, respectivamente, resultando no acúmulo de grânulos de hemossiderina nos macrófagos e espessamento dos capilares glomerulares, por causa do excesso de C3 (Henson e McGuire, 1971; Perryman et al., 1971). Descrição recente demonstrou que a infecção pelo EIAV também pode acarretar desequilíbrio oxidativo, o que pode influenciar na patogênese da doença, devido à possibilidade de diminuição da proliferação de células do sistema imune (Bolfá et al.; 2012).

1.10 EVOLUÇÃO DA FAMÍLIA EQUIDAE

Estima-se que o último ancestral comum entre a espécie *E. asinus* e a espécie *E. caballus* viveu há 4 – 4,5 milhões de anos atrás (Lippold, et al., 2011; Orlando et al., 2013; Vilstrup et al.; 2013). Através de análise filogenética do DNA genômico mitocondrial, as duas espécies evoluíram de forma diferente, tendo os jumentos mais ancestrais intermediários do que os cavalos (Vilstrup et al.; 2013). Análises comparativas dos genomas completos das espécies

de equídeos, como por exemplo os cavalos selvagens Przelwalski, mostraram divergências em genes importantes que estão envolvidos no sistema imune do hospedeiro, no metabolismo, no sistema nervoso central, citoesqueleto e que podem ter sido especificamente selecionados nesta linhagem de cavalos (Orlando et al., 2013). Neste sentido, estudo recente levantou a hipótese de que a teterina dos jumentos, um fator de restrição retroviral, poderia ser diferente da expressa nos cavalos, e com isso, poderia haver uma prevenção maior na liberação da progênie viral recém-sintetizada pelas células infectadas dos jumentos. No entanto, foi provado que, as teterinas ortólogas codificadas pelo cavalo e pelo jumento, apesar de terem seis aminoácidos de diferença entre suas sequências, apresentaram a mesma atividade antirretroviral contra o EIAV e HIV-1, como também sofreram, de forma semelhante, a ação antagonista exercida pelas glicoproteínas do envelope viral (Yin et al., 2014 a e b). Outro estudo demonstrou que os genes de receptores de células natural killer (NKR), de todos os membros da família *Equidae*, possui diversidade entre as espécies de equídeos, na seleção, na complexidade e na expressão desses receptores, que são importantes na interação das células NK com os ligantes de MHC I (Futas e Horin, 2013).

1.11 ESTIRPES DE EIAV PARA ESTUDOS DE VIRULÊNCIA E PATOGÊNESE

Várias estirpes do EIAV têm sido bem caracterizadas; elas variam bastante quanto à virulência e suas habilidades de crescerem em cultivo celular. A maioria das estirpes de EIAV estudadas nos laboratórios são derivadas da estirpe altamente virulenta Wyoming, como por exemplo, EIAV_{WSU5}, EIAV_{PR} (protótipo avirulento) e EIAV_{PV} (pônei virulenta). Essas estirpes foram extensivamente utilizadas nos primeiros estudos de infecção experimental de cavalos/pôneis com EIAV e para avaliação de tropismo celular *in vitro* e *in vivo* (Carpenter e Chesebro, 1989; Harrold et al., 2000; Maury et al., 1998 b; Oaks et al., 1998; Sellon, 1993). No entanto, da mesma forma que o isolado primário, EIAV_{WYO}, estas estirpes virais contêm uma variedade de espécies genômicas denominadas *quasispecies*, o que levou muitos pesquisadores a desenvolverem clones do EIAV, com o intuito de se obter populações genômicas mais homogêneas, permitindo assim, estudos de virulência, patogênese, clonagem molecular e replicação viral (Payne et al., 1994; Cook et al., 1998). O primeiro clone viral completo do EIAV obtido foi o CL22, desenvolvido a partir da estirpe Wyoming adaptada por Malquist et al. (1973) em fibroblastos de derme equina (Whetter et al., 1990). Vírus derivados de CL22 se replicaram com sucesso em células de timo de feto canino (Cf2th) e foram capazes de estabelecer infecção persistente em cavalos inoculados, com desenvolvimento de resposta imune humoral, mas sem causar sinais clínicos da AIE (Whetter et al., 1990). A variante biológica avirulenta, EIAV_{PR} (Malquist et al., 1973), foi submetida a passagens seriadas em células FDD, sendo posteriormente designada como estirpe FDD do EIAV. Essa é uma estirpe que difere de PR em termos de efeitos citopáticos e sensibilidade a anticorpos neutralizantes (Rasty et al., 1990) e apresentou substituições em aminoácidos da proteína de superfície gp90 (Cook et al., 1995).

Clones virais recuperados de células FEK infectadas com a estirpe patogênica EIAV_{PV}, denominados pSPEIAV19 e pSPEIAV44, geraram estoques de EIAV₁₉ e EIAV₄₄, respectivamente. Esses clones foram geneticamente estáveis, capazes de se replicarem em altos títulos em células FEK e em cultivo de macrófagos (Payne et al., 1994, Payne et al., 1998). Entretanto, a caracterização dos vírus produzidos a partir do clone 44-1, demonstrou que eles são muito semelhantes à estirpe PR e não à estirpe PV em termos de perfil de neutralização, taxas de crescimento em células FEK e ausência de virulência em pôneis (Payne et al., 1994). Portanto, provavelmente o clone molecular 44-1 representa uma subpopulação semelhante a PR

(PR-like), dentro do estoque viral de PV (Cook et al., 1995). A região que codifica a glicoproteína de superfície do clone 44-1 contém quatro mudanças de aminoácidos comparadas com a sequência publicada para PR (Rushlow et al., 1986; Cook et al., 1995).

Posteriormente, Cook et al. (1998) modificaram uma versão molecular do clone 19-2, derivado do estoque de EIAV₁₉, ao substituir o fragmento de 3.3-kbp da região 3'LTR, pelo mesmo fragmento do EIAV_{PV}, em uma tentativa de se produzir um clone molecular infeccioso, com capacidade de induzir doença em cavalos e pôneis. O clone quimérico EIAV_{PV3.3} gerou estoque viral com uma mistura de cinco clones, a partir do qual foi selecionado o clone EIAV_{UK} (antes chamado de EIAV_{PV3.3#3}), uma vez que este último possuía completa homologia com a sequência consenso referente à glicoproteína de superfície do EIAV_{PV}. No entanto, o vírus derivado do clone EIAV_{UK}, teve taxa de indução de doença aguda em cavalos/pôneis de forma significativamente menor do que infecções com EIAV_{PV} (Cook et al., 1998; Li et al.; 2000). Posteriormente, outras análises dos genomas do EIAV_{UK} e do EIAV_{PV} demonstraram que esses clones virais diferiam em dois locais na sequência consenso, consistindo em uma duplicação de 68 pb na região U3 de 3' LTR, e a presença de uma arginina (R103), no lugar do triptofano (W103), na posição do aminoácido 103 na ORF S3 (Cook et al., 1998; Cook et al., 2003). O vírus derivado do clone molecular EIAV_{UK} não demonstrou ter uma boa eficiência de replicação *in vivo*, devido às evidências de mudanças seletivas na população de vírus observadas nos cavalos/pôneis infectados (Cook et al., 1998; Li et al., 2000). Com isso, modificou-se o clone molecular derivado de EIAV_{UK}, através da remoção da duplicação de 68 bp e pela substituição da arginina na posição 103 por triptofano (Cook et al., 2003). Esse novo clone molecular, denominado EIAV_{UK3}, foi capaz de induzir AIE aguda em animais da espécie *E. caballus* da mesma forma que o EIAV_{PV}; se replicou com taxas semelhantes ao EIAV_{UK} em macrófagos e células FEK e pôde ser considerado como um clone capaz de produzir populações virais semelhantes e potencialmente patogênicas, como a estirpe PV (PV-like) (Cook et al., 2003).

Nos últimos anos, os cientistas chineses têm investido e desenvolvido pesquisas para descobrir os detalhes biológicos da estirpe atenuada, conhecida como EIAV_{DLV121}, da qual foi desenvolvida na década de 70 e amplamente utilizada como vacina no controle da AIE na China (Jiang et al 2011, Lin et al., 2011; Ma et al, 2014). A seleção da estirpe EIAV_{DLV121} ocorreu após 121 passagens, *in vitro*, da estirpe virulenta derivada do EIAV_{LN40}, em culturas de leucócitos de jumentos (Shen, 1983). Trabalho recém-publicado demonstrou a capacidade da vacina atenuada em induzir proteção imune em infecções experimentais, como também em infecções naturais de cavalos (Liu et al., 2016). Porém, os mecanismos de proteção induzidos pela vacina continuam sendo investigados.

CAPÍTULO 2

Anemia Infecciosa Equina em jumentos errantes na região de Mossoró, Rio Grande do Norte, Brasil

2.1 INTRODUÇÃO

O vírus da anemia infecciosa equina (EIAV), é um lentivírus da família *Retroviridae* com distribuição mundial (Cook et al., 2013, e taxas de prevalência sorológicas em equinos (*Equus caballus*) superior a 30% em algumas regiões geográficas, tais como a região do Pantanal Mato-grossense, Brasil (Borges et al., 2013). Apesar do EIAV infectar jumentos (*Equus asinus*) e mulas (*Equus caballus* x *Equus asinus*), quase todos os estudos experimentais, incluindo inquéritos epidemiológicos, têm sido realizados em cavalos ou pôneis. O espectro clínico observado em *Equus caballus*, após exposições ao EIAV, geralmente é o surgimento de três fases clínicas distintas, embora em muitos casos, há completa ausência de sinais clínicos da doença durante toda a vida do animal. Estes sinais consistem de uma fase transitória inicial ou aguda, caracterizada por febre e trombocitopenia, seguido de uma fase crônica com duração de 12-24 meses, em que há ciclos recorrentes de febre, trombocitopenia, anemia, edema, reações de depressão neurológica e caquexia (Montelaro et al., 1993; Leroux et al., 2004; Cook et al., Issel et al., 2014). O fim dos ciclos recorrentes da doença é dependente do desenvolvimento de respostas imunes amplamente reativas que, apesar de não serem capazes de eliminar o EIAV com sucesso, podem restringir a replicação viral, reduzindo drasticamente a carga viral associada aos tecidos (Sellon, 1993; Leroux et al., 2004). Quando isso ocorre, os animais entram em uma fase prolongada (estágio de carreador inaparente), onde, apesar de não terem sinais clínicos aparentes, têm o potencial de atuar como fonte para a transmissão viral. A aparência clinicamente normal de animais portadores cria problemas significativos para o manejo da AIE, porque sem testes de diagnóstico laboratoriais específicos, eles podem ser colocados, mesmo que não intencionalmente, em situações que facilitam a transmissão do EIAV, seja naturalmente, via insetos hematófagos, ou iatrogenicamente, para outros animais não infectados.

Embora respostas clinico-patológicas de algumas mulas, após exposição ao EIAV, serem semelhantes às aquelas apresentadas pelos cavalos e pôneis (Spyrou et al., 2003), essas respostas podem ser muito diferentes em jumentos. Em estudos comparativos onde cavalos/pôneis e jumentos foram infectados com as mesmas estirpes do EIAV, observou-se que, enquanto os primeiros desenvolveram doença grave, os jumentos tiveram completa ausência de sinais clínicos da AIE. Posteriormente, foi demonstrado que os jumentos poderiam exercer um controle mais rigoroso sobre a replicação do EIAV, resultando em picos de cargas virais associados ao plasma significativamente mais baixos do que os cavalos/pôneis (Cook et al., 2001). Além disso, a resposta imune humoral dos jumentos diferiu daquela dos cavalos/pôneis, apresentando concentrações mais baixas de anticorpos específicos contra o EIAV, pelo menos durante as primeiras 12 semanas pós-infecção (Cook et al., 2001).

De acordo com o Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA), o Brasil possui aproximadamente 8 milhões de equídeos, considerada a maior população da América Latina, sendo que a indústria equídea movimenta em torno de US\$3 bilhões por ano (MAPA, 2014). Dentro desta população, aproximadamente 900.000 são jumentos e 1,2 milhões são mulas, concentradas principalmente nas regiões Nordeste e Sudeste do país (Cavararo, 2013). No passado, principalmente na região nordeste brasileira, jumentos e mulas eram vitais para o transporte de mercadorias, tais como produtos agrícolas, água, preparo de terra para

plantio, porém esse papel está sendo substituído por formas de transporte e suprimentos agrícolas mecanizados. Consequentemente, muitos desses animais têm sido abandonados por seus proprietários, passando a viver livremente em rodovias ou como animais quase selvagens. Estima-se que o estado do Rio Grande do Norte (RN) tem pelo menos 50.000 jumentos, milhares deles sem proprietários, vivendo livremente, pastando em torno de rodovias federais e estaduais e, muitas vezes, se envolvendo em acidentes com automóveis (Buainain, 2014). Esta grande população, essencialmente não regulamentada, obviamente constitui uma ameaça em potencial, em termos de possibilidade de atuar como reservatório para manutenção de doenças, tais como a AIE. Consequentemente, é importante investigar a ocorrência dessa enfermidade nessa população de jumentos errantes.

Até o presente, o controle da AIE é limitado à detecção de anticorpos específicos contra o EIAV, uma vez que não há vacina nem tratamento efetivo. Macrófagos equinos, células hospedeiras do EIAV, são inadequados para isolamento viral na rotina (Hines e Maury, 2001), enquanto os testes baseados na reação em cadeia da polimerase (PCR), para a detecção de ácidos nucleicos virais, têm sido descritos (Cappelli et al., 2011; Dong et al., 2012; Nagarajan et al., 2001; Quinlivan, et al., 2007), porém não são universalmente aceitáveis. Embora vários ensaios baseados em ELISA sejam comercialmente aprovados em vários países, tais como os Estados Unidos (Cook et al., 2013; Leroux et al., 2004), a maior parte do mundo emprega a imunodifusão em gel de ágar (IDGA), ou teste de Coggins, como teste oficial para o diagnóstico da AIE. No Brasil, recentemente, o ELISA foi aprovado para ser usado no diagnóstico da AIE; porém, todas as amostras com resultados positivos devem ser submetidas à IDGA para confirmar o resultado (BRASIL, 2014). A IDGA foi inicialmente descrita na década de 1970 (Coggins e Norcross, 1970) e ganhou uma reputação admirável devido à sua especificidade. Esse teste detecta anticorpos anti-p26, a principal proteína do capsídeo, que é um dos antígenos mais conservados entre os isolados do EIAV (Cook et al., 2013), e é o único ensaio de diagnóstico que, comprovadamente, se correlaciona positivamente com o teste de inoculação do EIAV no cavalo (Coggins et al., 1972). Por estas razões, o teste de IDGA tem sido tradicionalmente considerado como padrão ouro para o diagnóstico sorológico da AIE (Cullinane et al., 2007). Entretanto, concentrações relativamente elevadas de anticorpos são necessárias para formar linhas de precipitação visíveis no teste de IDGA, tornando-o um teste potencialmente menos sensível do que alguns métodos de detecção sorológica, mais recentemente desenvolvidos como os ensaios imunoenzimáticos. Trabalho recente indicou que o teste de IDGA tem uma propensão para produzir resultados falsos negativos e, estudos comparativos realizados, no âmbito do Programa Nacional Italiano de Vigilância da AIE, demonstrou que a adoção do sistema de triagem por ELISA resultou em aumento de 17% de detecção de infecção pelo EIAV, em relação ao uso restrito de IDGA (Issel et al., 2012; Scicluna et al., 2013). Verificação independente desses achados levantaria sérias dúvidas sobre a validade de basear os programas de controle da AIE inteiramente no teste de IDGA. Portanto, o principal objetivo deste estudo foi investigar a ocorrência da AIE em jumentos errantes que vivem livres no município de Mossoró, RN e áreas adjacentes, utilizando o tradicional teste de IDGA, conforme aprovado pelo governo brasileiro, juntamente com dois testes de ELISA: o cELISA (IDEXX) que detecta anticorpos anti-p26, teste aprovado e comercialmente disponível para o diagnóstico da AIE em vários países, e o rgp90 ELISA, desenvolvido por Reis e colaboradores (2012), baseado na detecção de anticorpos contra o antígeno de superfície, a glicoproteína gp90. Discrepâncias entre os resultados do IDGA e dos dois ELISAs foram resolvidas pelo teste de Imunoblot (IB).

2.2 MATERIAL E MÉTODOS

2.2.1 Amostras

As amostras de soro foram coletadas através da punção da veia jugular utilizando tubos à vácuo e agulhas individuais, ambos estéreis (Vacuette®, Greiner Bio One, Alemanha) de um total de 367 jumentos que foram removidos de estradas e rodovias por autoridades locais do município de Mossoró, estado do Rio Grande do Norte, Brasil. De acordo com o IBGE, 2015, Mossoró é um importante município nordestino, localizado no oeste do estado do RN estado ($05^{\circ} 11' 15''$ S, $37^{\circ} 20' 39''$ W), com extensão territorial que abrange uma área de 2.099,333 km² (Figura 1).

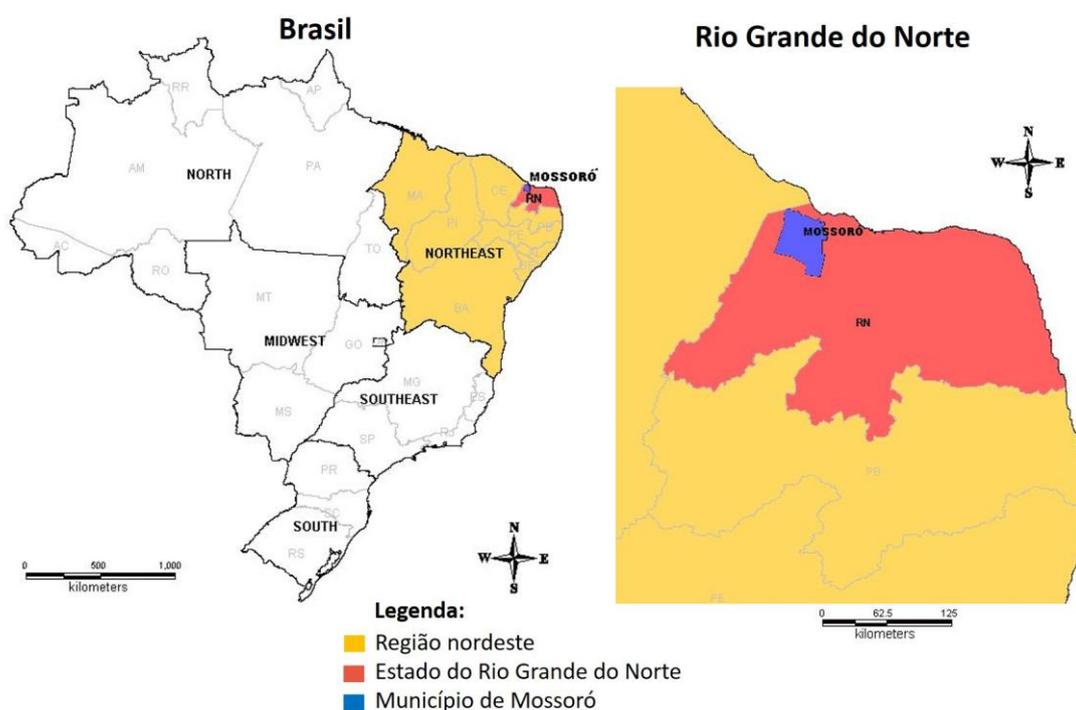


Figura 1: Localização do município de Mossoró nos mapas do Brasil e do estado do Rio Grande do Norte (Mapa obtido com o software Map Info Pro).

Avaliações clínicas no momento da coleta das amostras demonstraram que todos os animais tinham pelo menos um ano de idade e não apresentavam nenhum sinal evidente de doença, incluindo qualquer sinal que pudesse ser considerado compatível com a AIE. A idade foi estimada por exame da cavidade oral para aparência de erupção e superfície oclusal dos dentes. Números foram designados para amostras no momento da coleta de forma sequencial. Não foi possível a utilização de formas permanentes de identificação individual dos animais, uma vez que eles permaneciam 10 dias nos abrigos, aguardando o resgate por seus proprietários. Após esse prazo, as autoridades encaminhavam os animais para santuários de jumentos localizados no estado do RN.

Os testes sorológicos foram realizados de forma retrospectiva, no Laboratório de Retrovírus, Departamento de Medicina Veterinária Preventiva, Escola de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais utilizando protocolos aprovados pelo Comitê de Ética no uso de animais (UFMG/CEUA 354/2012).

2.2.2 IDGA

Todos os testes de IDGA foram realizados com as amostras de soro sem diluir, utilizando o kit comercial para o diagnóstico da AIE aprovado pelo MAPA, de acordo com as recomendações do fabricante (Laboratórios Bruch, Brasil). Resumidamente, 4,5 mL de solução de ágar noble 1% em tampão borato (pH 8.6), após aquecida em micro-ondas, foi distribuída em lâminas de microscopia (25 x 75 mm). Após a solidificação do gel, o mesmo foi perfurado com furador próprio, que contém um orifício central e seis periféricos, medindo 4 mm de diâmetro e 3 mm de distância entre os mesmos. Um volume de 25 µL dos soros a serem testados foram distribuídos, intercalados com os controles positivos e no orifício central, adicionou-se 25 µL do antígeno. As lâminas foram incubadas entre 20-25°C, por 48 h e lidas a olho nu, sob fonte de luz indireta, para verificação das linhas de precipitação identidade entre o antígeno e o soro controle positivo.

2.2.3 cELISA p26

O ELISA competitivo (cELISA – IDEXX, EUA) foi realizado de acordo com as recomendações do fabricante. O método se baseia na detecção de anticorpos anti-p26 nas amostras de soro de equídeos infectados pelo EIAV. As placas do cELISA são pré-sensibilizadas com anticorpo monoclonal específico contra a proteína do capsídeo do EIAV, p26. O antígeno p26 do kit está conjugado com a horseradish peroxidase (HRPO). Ao adicionar as amostras de soro dos equídeos e incubá-las com o conjugado HRPO-p26, ocorre competição entre os anticorpos específicos anti-p26 presentes nas amostras de soro com o anticorpo monoclonal que está na placa pelo antígeno p26. Após etapa de lavagem para remoção de solução de conjugado, adiciona-se o substrato de TMB na placa. Em amostras positivas para AIE, ocorre bloqueio da ligação dos anticorpos monoclonais anti-p26 do EIAV ao antígeno p26-HRPO, como pouca ou nenhuma formação de cor nos poços de resultados positivos. Amostras negativas para AIE desenvolvem cor azul escura no cELISA, uma vez que o conjugado p26-HRPO está livre para se ligar aos anticorpos monoclonais que estão na placa. No presente estudo, todas as leituras das absorbâncias das amostras foram realizadas em espectrofotômetro, no comprimento de onda de 650 nm (OD_{650nm}). O cELISA foi utilizado para testar todas as amostras com volumes disponíveis e que desenvolveram resultados negativos no teste de IDGA.

2.2.4 rgp90 ELISA

O rgp90 ELISA foi realizado conforme descrito previamente (Reis et al., 2012), com pequenas modificações. Resumidamente, o antígeno recombinante da glicoproteína do envelope viral (rgp90) foi produzido através da expressão do gene que codifica sua sequência em *Eschechia coli*. Posteriormente, diluiu-se o antígeno recombinante para uma concentração final de 50.0 µg/mL em tampão carbonato de sódio 0,05 mol/L, pH 9,6, com distribuição de 100 µL/poço dessa solução em placas de 96 poços (NUNC Maxisorp™, Thermo Scientific, EUA) seguindo-se de incubação por 18 h à 4°C. Após a etapa de adsorção, as placas foram lavadas duas vezes com salina tampão fosfato (pH 7,2) contendo 0.05% de Tween 20 (PBST), incubado por 1h à temperatura ambiente (ta) com PBST, contendo 5% de leite em pó desnatado como proteína

inibidora de reações inespecíficas e lavado em seguida mais duas vezes com PBST antes do uso. As amostras de soro de jumentos foram diluídas 1:50 em PBST contendo 1% de leite em pó desnatado foram adicionadas (100 µL/poço) nas placas sensibilizadas com o antígeno rgp90 e incubadas por 1h a (TA) antes de serem lavadas três vezes com PBST e, subsequente adição de conjugado de coelho anti-IgG de cavalo marcado com peroxidase (Sigma, EUA), diluído 1:14.000 em PBST contendo 1% de leite em pó desnatado. Após 1 h de incubação à (TA), as placas foram lavadas três vezes em PBST e a ligação de anticorpos foi detectada pela adição (100 µL/poço) de substrato que consistia na solução de o-phenylenediamine (0.5 mg/mL) e peróxido de hidrogênio (concentração final 0.02%) em tampão fosfato-citrato (pH 5). A reação ocorreu por 10 minutos até que a mesma foi interrompida com solução de ácido sulfúrico 3 N (40 µL/poço). A densidade ótica à 492 nm (OD_{492nm}) foi avaliada no espectrofotômetro TP-Reader (Thermo Plate, China). Baseado na distribuição de OD de 1160 amostras de soro positivas e negativas, o ELISA rgp 90 foi considerado positivo para amostras com valores de OD_{492nm} maiores que 0,225 (Reis et al., 2012).

2.2.5 Imunoblot

As membranas de imunoblot foram gentilmente cedidas pelo professor Chales J. Issel (Gluck Center, Universty of Kentucky, KY, EUA), sendo preparadas conforme descrito previamente (Issel, et al., 1993). O protocolo usado para o IB também foi seguido conforme descrito previamente (Issel et al., 2012), com exceção de que todas as amostras de soro testadas foram diluídas 1:20 e o conjugado de coelho anti- IgG de cavalo marcado com peroxidase (Sigma, EUA) foi usado na diluição de 1:5000, ambos com volume final de 1 mL. Resumidamente, as membranas de imunoblot, contendo as proteínas do EIAV separadas por eletroforese, foram bloqueadas em tampão salina fosfato (PBS) (pH 7,2) contendo 5% de leite desnatado, por 1 h à ta e sob agitação. Então a membrana foi cortada em tiras de 4 mm de largura, para serem utilizadas individualmente por amostra e controle, sendo incubadas com as amostras de soro diluídos 1:20, por 1 h à TA, sob agitação, seguido por 4 lavagens com PBS saturado com 0.85 mol/L de NaCl e acrescido de 0,05% de Tween 20 e subsequente adição de conjugado de coelho anti-IgG de cavalo marcado com peroxidase (Sigma, EUA), diluído 1:1500 em PBS contendo 1% de leite em pó desnatado. Após 1h de incubação à TA, sob agitação, as membranas foram lavadas em PBS saturado com 0.85 mol/L de NaCl acrescido de 0,05% de Tween 20, por 10 minutos, sob agitação, seguido de 10 minutos de lavagem com PBS saturado com 0.85 mol/L NaCl, sob agitação e última lavagem com PBS por 10 minutos, à TA sob agitação. A ligação de anticorpos foi detectada pela adição de substrato 3,3', 5,5'-tetramethylbenzidine – TMB (Promega Corporation, EUA), por 5 minutos, parando a reação com água destilada, após retirar o substrato. As amostras foram consideradas positivas no imunoblot quando os anticorpos se ligaram em pelo menos duas das três principais proteínas do EIAV (p26, gp45 e/ou gp90) (Issel et al., 2012; Scicluna et al., 2013).

2.3 RESULTADOS

Foram coletadas 367 amostras de soro de jumentos que viviam livres, próximos a rodovias de Mossoró-RN e região, sem sinais clínicos evidentes de doença e com idades estimadas variando de um a 20 anos (média de 5,9 +/- 4,0). Todas as amostras foram testadas em IDGA e rgp90rgp90 ELISA para a pesquisa de anticorpos anti-EIAV, sendo que, dessas amostras, seis foram positivas em ambos os testes (Tabela 1).

Tabela 1 - Identificação de jumentos soropositivos para AIE nos testes de IDGA e rgp90 ELISA em Mossoró - RN

ID Jumento	Idade (anos ¹)	IDGA	rgp90 ELISA ²	
			OD _{492nm} > 0.225	Interpretação
229	6	+	0.643	+
338	13	+	0.742	+
403	20	+	0.758	+
517	3,5	+	0.623	+
561	2	+	0.548	+
588	8	+	0.302	+
			OD _{492nm} média +/-SD ³ (0.603 +/- 0.167)	

¹Idade estimada em anos (+) positivo; (-) negativo

² Amostras consideradas positivas no rgp90 ELISA (+) quando OD_{492nm} > 0.225

³OD_{492nm} média +/- SD = média dos valores de OD_{492nm} +/- Desvio Padrão (SD)

Depois dos primeiros testes, as amostras que apresentaram resultados negativos no IDGA (aquelas que possuíam volume suficiente exceto amostra 349 e amostra 605), foram também testadas no cELISA. Das 361 amostras IDGA negativas que foram novamente testadas, 303 apresentaram resultados negativos nos dois ELISAs utilizados nesse estudo, 53 foram positivas no rgp90ELISA e 14 amostras foram positivas no cELISA. Apenas nove foram positivas em ambos ELISAs (Tabela 2 e Figura 2).

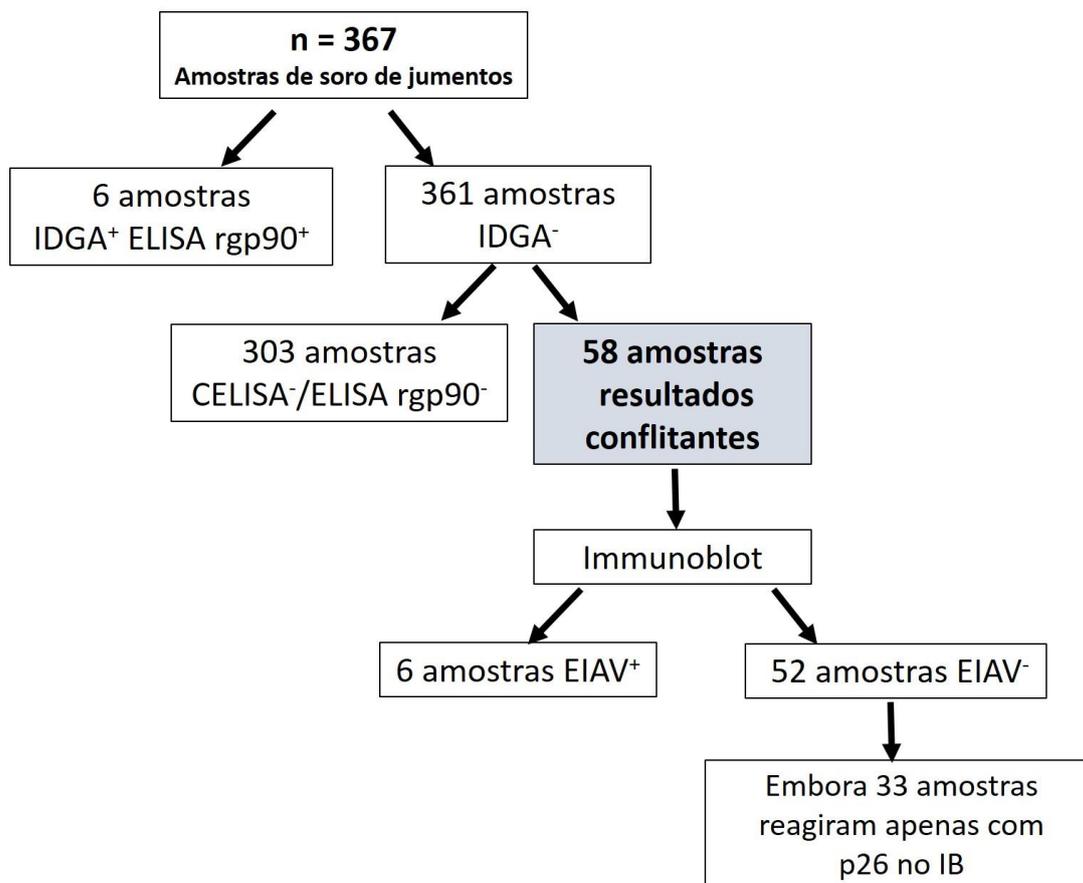


Figura 2: Fluxograma dos resultados de testes sorológicos para AIE em 367 amostras de soro de jumentos errantes do município de Mossoró – RN testadas em IDGA, rgp90 ELISA, CELISA e Immunoblot. (+) teste sorológico positivo para AIE; (-) teste sorológico negativo para AIE de acordo com as interpretações dos testes adotadas nesse estudo.

Para validar os resultados, as 58 amostras que produziram resultados positivos, em pelo menos um teste ELISA deste estudo, foram submetidas ao Imunoblot. Dessas, seis amostras (jumentos 428, 573, 326, 349, 363 e 630, destacados na Tabela 2), foram classificados como positivos para AIE pois reagiram com pelo menos duas das três proteínas imunodominantes da partícula viral (Tabela 2 e Figura 3). Embora essas seis amostras tenham apresentado resultados positivos no rgp90ELISA, apenas 2 foram também positivas no cELISA. Entretanto, a amostra do jumento 349 não pôde ser avaliada no cELISA por ter volume insuficiente para execução do teste (Tabela 2).

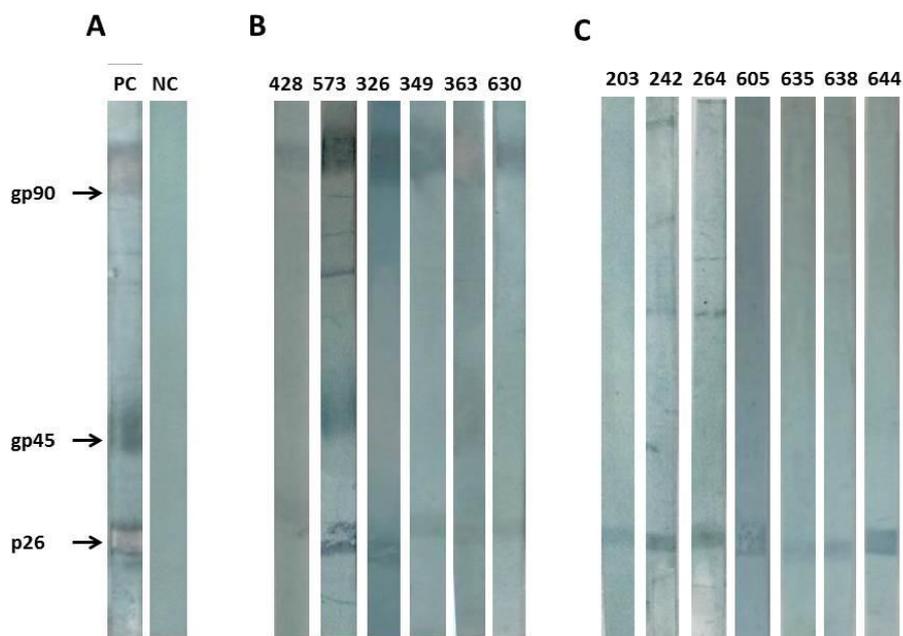


Figura 3: Análise de amostras de soro cELISA ou rgp90 ELISA positivas/IDGA negativas pelo IB. **A** **CP:** controle positivo; **CN:** controle negativo. **B** De 58 amostras testadas nos ELISAs, 6 (428, 573, 326, 349, 363, 630) foram classificadas como tendo exposição ao EIAV, com base na reatividade de pelo menos duas das três proteínas virais imunodominantes (gp90, gp45 e p26). **C** Exemplos que representam (203, 242, 264, 605, 635, 638 e 644) as 33 amostras de soro de jumentos que reagiram somente com p26 no IB.

Das 52 amostras que foram classificadas como negativas no IB, 19 não apresentaram reatividade contra nenhuma proteína do EIAV, enquanto 33 (56,9%) reagiram apenas com a proteína do core do EIAV, a p26. A Figura 1 C mostra uma seleção representativa das amostras dos jumentos que apresentaram reatividade apenas com p26.

Para os jumentos que foram diagnosticados com AIE pelo teste de IDGA, quando suas amostras foram também testadas no rgp90ELISA, as absorbâncias (OD_{492nm}) desenvolvidas no rgp90 ELISA (média 0.603 ± 0.167 – Tabela 1) foram maiores do que as OD_{492nm} daqueles jumentos que foram detectados como expostos ao EIAV apenas pelo IB (média 0.305 ± 0.053).

Tabela 2 – Análise de amostras de soro de jumentos da região de Mossoró, negativas no teste de IDGA e testadas em cELISA, rg90 ELISA e IB

ID jumento	Idade (anos) ¹	IDGA	CELISA(p26) ²	rgp90 ELISA ³	Imunoblot		
					p26	gp45	gp90
258	7	-	+	+	+	-	-
276	6	-	+	+	+	-	-
378	15	-	+	+	+	-	-
401	7	-	+	+	+	-	-
430	4,5	-	+	+	+	-	-
431	13	-	+	+	+	-	-
325	15	-	+	+	-	-	-
386	15	-	+	-	+	-	-
281	7	-	+	-	-	-	-
459	1,5	-	+	-	-	-	-
555	15	-	+	-	-	-	-
639	17	-	+	-	-	-	-
428	7	-	+	+	+	-	+
573	5	-	+	+	+	+	+
326	18	-	-	+	+	-	+
349	2,5	-	NR	+	+	-	+
363	4	-	-	+	+	-	+
630	1,5	-	-	+	+	-	+
166	6	-	-	+	+	-	-
203	4	-	-	+	+	-	-
204	6	-	-	+	+	-	-
242	6	-	-	+	+	-	-
251	1	-	-	+	+	-	-
259	9	-	-	+	+	-	-
264	5	-	-	+	+	-	-
299	3,5	-	-	+	+	-	-
379	13	-	-	+	+	-	-
391	2	-	-	+	+	-	-
393	5	-	-	+	+	-	-
397	4	-	-	+	+	-	-
416	2	-	-	+	+	-	-
436	2,5	-	-	+	+	-	-
448	7	-	-	+	+	-	-
491	4	-	-	+	+	-	-
526	10	-	-	+	+	-	-
601	6	-	-	+	+	-	-
602	4	-	-	+	+	-	-

Tabela 2 - continuação

605	15	-	NR	+	+	-	-
613	6	-	-	+	+	-	-
633	8	-	-	+	+	-	-
635	7	-	-	+	+	-	-
636	12	-	-	+	+	-	-
638	18	-	-	+	+	-	-
644	7	-	-	+	+	-	-
168	6	-	-	+	-	-	-
252	8	-	-	+	-	-	-
270	13	-	-	+	-	-	-
316	7	-	-	+	-	-	-
317	2	-	-	+	-	-	-
323	13	-	-	+	-	-	-
334	12	-	-	+	-	-	-
351	5	-	-	+	-	-	-
382	7	-	-	+	-	-	-
388	15	-	-	+	-	-	-
396	4	-	-	+	-	-	-
446	2	-	-	+	-	-	-
495	5	-	-	+	-	-	-
503	8	-	-	+	-	-	-

¹Idade estimada em anos (+) positivo; (-) negativo; (NR) não realizado

²Interpretação dos resultados do cELISA realizada conforme recomendação do fabricante.

³Amostras consideradas positivas no rpg90 ELISA (+) quando OD_{492nm} > 0.225

2.4 DISCUSSÃO

A região nordeste brasileira possui uma das maiores populações de jumentos do mundo, com uma estimativa de aproximadamente 812.000 animais, o que representa 90 % do total da espécie no Brasil (Cavararo, 2013). Embora os jumentos já tenham sido essenciais para a economia local, como principal forma de transporte de produtos, bem como, força de trabalho na lavoura, seu papel tem sido rapidamente substituído por formas de transporte mecanizado e máquinas agrícolas. Consequentemente, muitos desses animais são abandonados pelos seus proprietários, gerando o aumento do número de jumentos vivendo livremente, geralmente próximo às rodovias federais e estaduais do estado do Rio Grande do Norte. Por essa razão, teve-se como objetivo realizar um inquérito sorológico para determinar o risco representado por essa população de jumentos não regulamentada, sendo considerada um potencial reservatório para manutenção e transmissão do EIAV.

Inquéritos sorológicos para AIE anteriormente conduzidos no Brasil, incluindo estudos recentes realizados na região do Pantanal e Ilha do Marajó no Pará (Borges et al., 2013; Freitas et al., 2015), contaram exclusivamente com o uso do teste de IDGA. O uso de ELISAs para o diagnóstico e controle da AIE foi aprovado pela portaria 378 do MAPA, de dezembro de 2014, entretanto sua utilização permanece limitada, principalmente aos laboratórios de pesquisa. O

uso exclusivo de IDGA para o diagnóstico da AIE continua, dessa forma, sendo um paradigma regulatório de muitos outros países no mundo. No entanto, os resultados encontrados aqui apoiam aqueles encontrados durante o Programa Nacional Italiano de Vigilância da AIE (Issel et al., 2012; Scicluna et al., 2013), em que, enquanto o teste de IDGA para AIE é altamente específico, ele é um teste propenso a desenvolver resultados falso-negativos. De fato, a taxa de soropositivos para AIE no município de Mossoró e região, pelo teste de IDGA sozinho foi de 1,63%, metade do valor quando se utilizou a combinação dos testes ELISA e IB (3,27%).

Embora o rgp90rgp90 ELISA tenha sido uma ferramenta que contribuiu para a identificação dos jumentos AIE positivos (326, 349, 363, 428, 573 e 630), esse teste apresentou uma alta porcentagem de amostras aparentemente falso-positivas (88,7%). Em contraste, apenas < 4% de resultados falso-positivos foram observados, de um total de 1160 amostras de soro de cavalo testadas, durante a padronização deste teste (Reis et al., 2012). Investigações estão em andamento para estabelecer se esse resultado reflete apenas diferenças entre as preparações do antígeno ou se uma proporção significativa dos jumentos da região de Mossoró-RN possui reatividade com um contaminante do antígeno rgp90 não avaliado anteriormente (Reis et al., 2012). Se existir tal contaminação, provavelmente será de origem bacteriana, uma vez que a proteína rgp90 é produzida pela expressão em sistema de *Escherichia coli* (Reis et al., 2012).

Em comparação com a IDGA, o cELISA identificou 14 amostras potencialmente positivas, embora apenas duas (428 e 573) reagiram com duas ou mais proteínas do EIAV no IB. As razões para os resultados das outras 12 amostras, aparentemente falso-positivas no cELISA, são desconhecidas, foi observado também que 58 % delas (7/12) também reagiram com a p26 no IB (Tabela 2), proteína viral da qual o cELISA foi desenvolvido para detectar. Uma notável observação foi a reatividade única com a p26 presente em 33 das 58 amostras cELISA/rgp90 ELISA positivas analisadas no IB. Embora reações semelhantes tenham sido observadas anteriormente, sendo a taxa de 0,037% no Programa Nacional Italiano de Vigilância da AIE (Issel et al., 2012; Scicluna et al., 2013), elas ocorreram de forma significativamente menor do que os 8,99% observados neste estudo. Durante o surto de AIE na Irlanda em 2006, anticorpos anti-p26 foram detectados no IB após a exposição ao EIAV, antes dos anticorpos anti-gp90 e gp45 (Cullinane, et al., 2007). Além disso, estudos comparativos realizados por Cook e colaboradores em 2001 sugeriram que os jumentos demoram mais tempo para produzir resultados positivos no teste de IDGA em comparação com cavalos e pôneis após infecção experimental com o EIAV. Entretanto, uma simples explicação para a reatividade única contra a p26 seria a infecção recente pelo EIAV, em alguns equídeos essa reatividade única no IB pode persistir e anticorpos contra gp90 e/gp45 não são detectados mesmo após meses de observação (Cook et al., 2009; Issel et al., 2012; Issel C. J. observações não publicadas). Nestes casos, sugere-se que o animal pode ter sido exposto a uma estirpe do EIAV com glicoproteínas do envelope antigenicamente distintas de qualquer vírus caracterizado até o momento, ou outros vírus ou micro-organismo ainda não identificado que estimula anticorpos com reatividade cruzada com a p26. Apesar das glicoproteínas do envelope apresentarem variação significativa entre as estirpes do vírus, o IB utilizado neste estudo já detectou, com sucesso, anticorpos contra todas as principais proteínas imunogênicas do EIAV em equídeos expostos ao vírus na América do Norte, América do Sul, Ásia e Europa (Cullinane et al., 2007; Dong et al., 2012; Issel e Cook, 1993; Issel et al., 2012; Scicluna et al., 2013). De fato, a detecção de anticorpos contra gp90 foi demonstrada em situações onde há menos que 58% de identidade prevista na sequência de aminoácidos da glicoproteína do EIAV tipo selvagem e a estirpe usada no IB (Dong et al., 2012). Nesse momento, a existência de estirpes que são totalmente diferentes daquelas que já foram descritas, que possuam glicoproteínas indetectáveis no IB usado, é considerada uma

possibilidade menos provável. Em vez disso, a hipótese corrente é de que a reatividade apenas com p26 no IB dos jumentos desse estudo sugere que eles foram expostos a um membro diferente da família *Retroviridae*, uma vez que a proteína do capsídeo é o antígeno mais conservado nesta família de vírus (Cook et al., 2009).

Uma taxa de soro-prevalência para AIE de 3,27 % em jumentos da região de Mossoró/RN pode ser considerada baixa quando comparada com a alta ocorrência da AIE reportada em outras áreas do Brasil (Borges et al., 2013; Freitas et al., 2015). Entretanto, a porcentagem de soropositividade encontrada é consistente com a taxa de 1,29 % de frequência de equídeos positivos para AIE no estado do RN, relatada em estudo prévio, onde se utilizou apenas o teste de IDGA como técnica de diagnóstico (Silva et al., 2013).

Os jumentos podem constituir baixo risco de transmissão em relação aos cavalos ou pôneis se, como sugerido pelas infecções experimentais com estirpes semelhantes ao EIAV_{WYO}, eles exercerem um controle mais rigoroso sobre a replicação viral e, como resultado, apresentarem uma baixa carga viral associada ao plasma (Cook et al., 2001). Portanto, é importante a realização de estudos adicionais mais extensos para se caracterizar as estirpes virais circulantes na região de Mossoró-RN, juntamente com a determinação da cinética de replicação e patogenicidade em espécies diferentes de equídeos, para que se possa avaliar a ameaça representada pelos jumentos de livre circulação que vivem na região como reservatórios para a transmissão do EIAV com maior precisão.

2.5 CONCLUSÕES

Este foi o mais extenso inquérito sorológico realizado até o momento para investigar os riscos de manutenção e transmissão do EIAV, anteriormente não quantificados, em uma crescente população de jumentos que vivem circulando livremente pela região de Mossoró-RN. Embora tenha sido encontrada a evidência de que o EIAV está circulando entre esta população de jumentos, nenhum sinal clínico evidente da AIE foi visualizado nestes animais. As soropositividades encontradas de 1,63% , utilizando o teste de IDGA, representou a metade da taxa detectada 3,27%, quando as amostras de soro foram testadas novamente em testes ELISA em combinação com o IB. Estes resultados reforçam os dados encontrados no Programa Italiano de Vigilância da AIE, onde o teste de IDGA é propenso em fornecer resultados falsos-negativos, e como tal, não é sugerido para ser usado com exclusividade em programas de diagnóstico e controle da AIE. Embora o uso de testes ELISA tenha aumentado a taxa de detecção em 100 %, ambos CELISA e rgp90 ELISA, apresentaram resultados falso-positivos, como determinado pelo IB. No caso do rgp90 ELISA, a potencial taxa de resultados falso-positivos com as amostras de jumentos foi três vezes maior do que a observada previamente com amostras de soro de cavalos. De forma interessante, um grande número de amostras de soro (33/58), reagiram com o antígeno p26 no IB. Até o momento, não se sabe se esses jumentos foram recentemente infectados ou se foram expostos a uma estirpe do EIAV com envelope viral antigenicamente distinto ou ainda, se há um agente, ainda não identificado, capaz de induzir produção de anticorpos com reação cruzada com a p26 do EIAV. São necessários estudos adicionais para distinguir entre essas possibilidades.

CAPÍTULO 3

Estudo de resposta celular *in vitro* de PBMC de cavalos e jumentos e de macrófagos de jumentos infectados com EIAV

3.1 INTRODUÇÃO

A infecção pelo EIAV na espécie asinina é pouco estudada, apesar de levantar questões importantes quanto aos efeitos seletivos que suas células promoveram na origem da vacina viva atenuada, amplamente utilizada na China na década de 80. Essa vacina foi obtida após 121 passagens sucessivas de uma estirpe altamente patogênica, isolada de células de cavalos, em células leucocitárias de jumentos (Shen, 1983) e o efeito protetor dessa vacina vem sendo investigado na última década (Lin, et al., 2011; Jiang et al., 2011; Ma et al., 2013; Ma et al., 2014; Liu et al., 2016). O trabalho pioneiro de infecção *in vivo* de jumentos com amostras patogênicas do EIAV, realizado por Cook e colaboradores (2001), demonstrou que os três animais infectados não apresentaram os sinais clínicos da AIE durante o período de um ano de observação. Foi avaliada resposta sorológica, carga viral plasmática, contagem de plaquetas e acompanhamento da temperatura corporal, todavia, não se avaliou parâmetros como por exemplo, níveis séricos das citocinas TNF- α e IL-6 após a infecção experimental dos jumentos com as amostras EIAV_{PV} e EIAV_{wyo}.

Diferenças na expressão de citocinas e quimocinas podem ser responsáveis pelas diferenças observadas no surgimento de sinais clínicos em infecções causadas por *lentivírus* (Villinger et al., 1996; Pereira et al., 2009; Altfeld e Gale Jr., 2015; Liu, et al, 2016). Por exemplo, TNF- α , interferon-gama (IFN- γ), IL-1, IL-2, IL-6 e IL-10 são algumas das citocinas que sofrem alterações na sua expressão durante a infecção pelo HIV (Williams et al., 2013). Dados sobre a desregulação de citocinas placentárias durante gestação de gatas infectadas com FIV, demonstrou correlação positiva entre a expressão de IL-6 e replicação de FIV com risco de aborto (Scott et al., 2011). A desregulação de citocinas coincide com sinais clínicos da AIE, como febre, anorexia, hemorragia, petéquias, letargia, anemia e trombocitopenia (Lim et al., 2005; Montelaro et al., 1993; Sellon, 1998; Tornquist et al., 1997). As citocinas IL-1 α , IL-6 e TNF- α podem contribuir para a anemia na AIE, através da ativação de macrófagos e neutrófilos, depois aumentando a fagocitose de eritrócitos ligados com complemento C3, e também pela possibilidade de diminuição da eritopoiese, através da desregulação do metabolismo do ferro (Swardson et al., 1992, Sellon et al., 1994; Sellon, 1998, Reis e Cook, 2014). O TNF- α tem efeitos supressivos sobre a medula óssea e ação inibitória comprovada sobre o crescimento de megariócitos *in vitro* (Geissler et al., 1991; Tornquist et al., 1997). Informação importante dentro da patogênese da AIE em cavalos e jumentos pode ser fornecida ao se investigar a desregulação gênica de citocinas, tais como TNF- α , IL-6 e IL-1 α secretadas por macrófagos infectados com estirpes de diferentes patogenicidades do EIAV.

Pela primeira vez, foi conduzido um estudo de infecções *in vitro* de células de jumentos (PBMC e macrófagos) com amostras patogênicas e não patogênica do EIAV, para avaliar a expressão de citocinas importantes na patogênese da AIE com objetivo de correlacionar os achados com a ausência de sinais clínicos *in vivo* normalmente observados nos asininos em contraste ao observado nos equinos.

3.2 MATERIAL E MÉTODOS

Os experimentos descritos no presente capítulo foram realizados no Laboratório de Retrovírus (RetroLab), do Departamento de Medicina Veterinária Preventiva, da Escola de Veterinária da UFMG e no Laboratório de Biologia Molecular (LBM), do Laboratório Nacional Agropecuário (LANAGRO/MG).

Projeto aprovado junto ao comitê de ética no uso de animais CEUA - UFMG, nº processo 354/2012 (Anexo 1).

3.2.1 Células de Derme Equina Persistentemente Infectadas com EIAV_{wyo}

A estirpe altamente patogênica do EIAV, EIAV_{wyo}, foi propagada em células de derme equina persistentemente infectadas por esse vírus (ATCC CL-57), em meio de cultura MEM (Sigma), suplementado com 10 % de soro fetal bovino (Gibco), 4 U/mL de estreptomicina, 4 µg/mL de penicilina e 0,05 µg/mL de Fungizon, com incubação à 37 °C em estufa de atmosfera de 5 % de CO₂. Os sobrenadantes celulares foram coletados após três passagens celulares. Preparou-se pool dos sobrenadantes coletados e após serem divididos em alíquotas, foram estocados à -70 °C até a sua utilização.

3.2.2 Efeito da infecção pelo EIAV_{wyo} em PBMC de cavalos e jumentos

Nesse experimento, foram utilizados três cavalos (2 machos e 1 fêmea) e três jumentos (2 machos e 1 fêmea), como doadores de sangue, todos provenientes da Fazenda Modelo da Escola de Veterinária da UFMG, município de Pedro Leopoldo, Minas Gerais. Os seis animais eram soronegativos para AIE nos testes de IDGA (Bruch) e cELISA (IDEXX) e tinham idade superior a dois anos. Um volume de 200 mL de sangue, de cada animal, foi coletado em bolsas de coleta contendo anticoagulante citrato dextrose (Fresenius). Seguiu-se a separação de PBMC com o reagente Histopaque®-1077 (Sigma), conforme recomendações do fabricante. Resumidamente, o sangue total coletado foi diluído em igual volume de PBS 1X (Lifetechnologies), seguindo-se de montagem de gradiente de Histopaque®-1077 (Sigma) em tubos de fundo cônico de 50 mL novos (20 mL de Histopaque®-1077 (Sigma) e 30 mL de sangue total diluído em PBS 1X), com posterior centrifugação por 40 minutos em velocidade de 400 g a 20 °C. Coletou-se o anel de PBMC formado com pipetas de Pasteur estéreis e descartáveis e transferindo as células para novos tubos de fundo cônico de 50 mL, seguindo-se de diluição em igual volume de PBS 1X (Lifetechnologies). Seguiu-se por nova centrifugação dos tubos em velocidade de 400 g, por 10 minutos a 4 °C. Após descartar o sobrenadante, o sedimento celular obtido foi ressuspensão em PBS 1X até completar o volume de 50 mL, seguindo-se de nova centrifugação a 400 g por 10 minutos a 4°C. Nova lavagem do sedimento celular foi executado em volume final de 50 mL de PBS 1 X, seguindo-se de centrifugação a 400 g por 10 minutos a 4°C. Após etapa de lavagem, o sedimento celular obtido foi ressuspensão em 1 mL de meio RPMI (Sigma), seguindo-se de contagem das células obtidas com azul de Tripán. Dessa forma, suspensões de PBMC foram ajustadas para concentração de 10⁶ cels/mL de meio RPMI (Sigma) contendo 10% de soro fetal bovino (Gibco), 4 U/mL de estreptomicina, 4 µg/mL de penicilina e 0,05 µg/mL de Fungizon e, posteriormente distribuídas 1 mL/poço, em placas de 24 poços (Sarstedt). O inóculo de EIAV_{wyo} adicionado foi de aproximadamente 6,0 x 10² cópias de RNA por poço. Lipopolissacarídes (LPS - Sigma), na concentração de 10 ng/mL de meio, foi adicionado ao sistema do cultivo como controle positivo de resposta inflamatória. Meio de cultura foi utilizado como controle negativo de estímulo.

Após os tempos de 24 h e 96 h de estímulo, os sobrenadantes celulares foram coletados para a avaliação da replicação viral do EIAV. Os mesmos ficaram armazenados a -70°C até os procedimentos de extração de RNA viral, utilizando o kit de extração de QIAmp Viral mini Kit (Qiagen, EUA), de acordo com as recomendações do fabricante, seguindo-se de OneStep qRT-PCR (protocolo descrito no item 3.2.5). Em paralelo, o RNA total celular foi extraído com kit de extração SV Total RNA Extraction (Promega), conforme recomendações do fabricante. Os RNAs obtidos foram tratados com DNase RQ1 RNase-free DNase (Promega) para posterior transcrição reversa em cDNA utilizando enzima M-MLV (Promega), ambos procedimentos seguindo as recomendações do fabricante. Para verificar a expressão dos mRNAs de TNF- α , IL-1 α , IL-6, IL-10 e IFN- β nos PBMC dos cavalos e jumentos, foi utilizada PCR em tempo real. Foram utilizados 2 μL do cDNA obtido na transcrição reversa (diluído 1:3), 0,4 μM de cada iniciador, direto e reverso, em reações individuais para cada gene, e 10 μL de SYBR Green PCR Master Mix (Applied Biosystems), em um volume final de reação de 20 μL . As sequências dos iniciadores utilizados estão relacionadas na Tabela 1. O sistema de PCR em tempo real utilizado foi o ABI 7500 (Applied Biosystems). As reações foram feitas com as seguintes temperaturas e tempos: 95°C , 30' seguido de 40 ciclos de 95°C , 15''; 60°C , 1'. A curva de dissociação foi realizada nas temperaturas e tempo: 95°C , 15''; 60°C , 1'; 95° , 30''; 60° 15''. A quantificação relativa do alvo em cada amostra foi realizada utilizando como referência a expressão do gene normalizador GAPDH. Os dados foram analisados usando o método da curva-padrão relativa (Applied Biosystems, User Bulletin #2, 2001). Os resultados foram apresentados como variação da expressão de mRNA de citocinas nas células infectadas com EIAV_{Wyo} e estimuladas com LPS, em relação ao controle de células onde só ocorreu adição de meio de cultivo (CC). Todas as PCRs foram feitas em duplicatas.

Uma alíquota de 2 μL do cDNA obtido na transcrição reversa foi separada para posterior avaliação de transcritos virais por Nested PCR, de acordo com Oaks et al. (1998). O protocolo está descrito no item 3.2.6.

Tabela 1 – Iniciadores utilizados na PCR em tempo real para citocinas pro e anti- inflamatórias em PBMC de cavalos e jumentos infectados pelo EIAV_{WYO}

GENES		Iniciadores (5' – 3')	Amplicon (pb)	Tm (°C)	Nº ACESSO (Seq. Ref.)	REFERÊNCIA
TNF- α	F R	TTCTCGAACCCCAAGTGACAAG CTGGAGCTGCCCTCGGCTT	≤ 150	80,4	M64087, AB035735	Allen et al., 2007
IL-6	F R	TGCTGGCTAAGCTGCATTCA GGAAATCCTCAAGGCTTCGAA	81	78,4	ECU64794	Figueiredo, 2008
IFN- β	F R	CCCCGAGGACACAATGAACT ACCAATGCAGCATCCTCTT	81	79,5	AF134227	Figueiredo, 2008
IL-10	F R	GCCTTGTCGGAGATGATCCA TTTTCCCCCAGGGAGTTCAC	81	82,2	U38200	Figueiredo, 2008
IL-1 α	F R	CAGTTCAATATCTTGCGACTGCTGC TGGGCACTCACAACAGTCGAG	141	77,5	NM 0010825001	Lim et al., 2011
GAPDH	F R	AAGTGGATATTGTCGCCATCAAT AACTTGCCATGGGTGGAATC	87	76,5	AF097178. 1	Retrolab (dados não publicados)

Seq. Ref.: Sequência de Referência para a obtenção dos oligonucleotídeos

3.2.3 Produção dos estoques de EIAV estirpes UK3 (EIAV_{UK3}) e 44-1 (EIAV₄₄₋₁)

3.2.3.1 Transfecção de células ED com clones moleculares do EIAV

Os DNAs plasmidiais dos clones virais patogênico, EIAV_{UK3}, e não patogênico, EIAV₄₄₋₁, cedidos pelo professor Dr. R. Frank Cook (Gluck Center, University of Kentucky, KY, EUA), foram preparados conforme descrito anteriormente (Cook et al., 1998; Cook et al., 2003; Payne et al., 1994). Esses DNAs foram eluídos de papel filtro estéril em 50 μ L de água ultrapura, em microtubos estéreis, seguindo-se de incubação por 10 minutos em termobloco a 94 °C. Os DNAs plasmidiais eluídos, de aproximadamente 13 kb, foram utilizados para transformar bactérias *Escherichia coli* Stbl3™ (Invitrogen, EUA), de acordo com as recomendações do fabricante, com a finalidade de aumentar as quantidades de DNAs plasmidiais dos clones virais. Essa bactéria foi escolhida para ser utilizada nessa etapa por ser recomendada para clonagens de insertos instáveis, tais como os DNA plasmidiais contendo insertos de lentivírus (One Shot® Stbl3™ Chemically Competent *E. coli* Manual, Invitrogen). As colônias positivas que cresceram em meio LB contendo 10 μ g/ μ L de ampicilina (Sigma), foram purificadas utilizando Midiprep (Qiagen, EUA). Os DNAs obtidos foram quantificados em espectrofotômetro Nanovue (GE Healthcare) no comprimento de onda de 260 nm. Dessas preparações, alíquotas contendo 50 ng/ μ L de cada DNA plasmidial foram submetidas à digestão enzimática com a enzima Mlu, para gerar fragmentos de 7,9 e 5,1 kb. Também foi realizada digestão dupla com ECORI e NCOI, para gerar os fragmentos de 3,3 kb e 9,7 kb, conforme recomendações do fabricante das enzimas (Invitrogen). Os fragmentos resultantes das digestões enzimáticas dos plasmídios foram submetidos a corrida eletroforética em gel de agarose 0,9% para conferência de possibilidades de rearranjos e/deleções durante os procedimentos das transformações bacterianas com os plasmídios dos clones virais (Anexo 3).

Após as conferências, 2 µg das preparações de DNA plasmidial de cada clone de EIAV foram utilizados para transfectar células ED, previamente cultivadas em placas de cultivo de 6 poços (distribuídas 5 x 10⁵ células/poço em placa de 6 poços) utilizando o reagente de transfecção lipídico, policatiônico, Lipofectamine (Invitrogen, EUA), conforme as recomendações do fabricante.

Após o período de três semanas (aproximadamente 21 dias) de incubação pós-transfecção, iniciou-se a propagação celular, com coleta dos sobrenadantes dos cultivos de ED transfectados com as duas estirpes virais (EIAV_{UK3} e EIAV_{44.1}), com intuito de verificar a eficiência das transfecções por PCR em tempo Real. O RNA viral foi extraído de alíquotas dos sobrenadantes, utilizando o kit de extração de RNA viral QIAmp Viral mini Kit (Qiagen, EUA), de acordo com as recomendações do fabricante. Os RNAs obtidos foram tratados com DNase RQ1 RNase-free DNase (Promega) para posterior síntese de cDNA utilizando enzima M-MLV (Promega), ambos procedimentos seguindo as recomendações do fabricante. Os cDNAs sintetizados foram utilizados como amostras nas PCRs em tempo Real para EIAV. Foi realizada amplificação de um fragmento de 227 pb do EIAV_{UK3} e EIAV_{44.1}, a partir dos cDNAs obtidos dos sobrenadantes de ED transfectadas, utilizando os iniciadores e sonda descritos por Cook e colaboradores (2002) - Tabela 3 do item 3.2.5. As reações de 25 µL foram preparadas com 0,2 µM de cada primer, 0,2 µM de sonda, 2 µL de cada amostra de cDNA não diluído e 12,5 µL de Taqman Universal Master Mix (Applied Biosystems). As condições da reação foram 50°C, 2'; 95°C, 10'; seguido de 40 ciclos de 95°C, 15''; 60°C, 1'; utilizando o sistema de PCR em tempo real ABI 7500.

3.2.3.2 Titulação viral (TCID₅₀)

Os títulos dos estoques de EIAV_{UK3} e EIAV_{44.1} foram determinados através da infecção de células ED com diluição seriada (log₁₀) do pool dos sobrenadantes celulares obtidos após transfecção de cada clone viral. O protocolo foi adaptado a partir do trabalho de Ma e colaboradores (2014) associado ao protocolo de TCID₅₀ descrito no Virology Methods Manual (Hierholzer; Killington, 1996). Em placas de 96 poços (TPP), foram adicionadas 5 x 10⁴ células ED por poço, mantidas em meio MEM (Sigma) acrescido de 10% de soro fetal bovino, mais 4 U/mL de penicilina e 4 µg/mL de estreptomicina. Foram feitas as diluições dos vírus (log₁₀), a partir de 10⁻² até 10⁻⁶, em meio MEM puro, em placa estéril de fundo em U (Costar). Removeu-se o meio dos poços das placas de 96 poços com ED em cultura e acrescentou-se 100 µL de cada diluição viral em 8 replicatas. Para o controle, foi acrescido apenas meio de cultura MEM. Após 1h de incubação, homogeneizando a placa a cada 15 minutos, adicionou-se mais 100 µL de meio suplementado de forma a perfazer a concentração final de 10% de soro fetal bovino, 4 U/mL de penicilina e 4 µg/mL de estreptomicina. As placas foram monitoradas por 14 dias, quando os sobrenadantes foram recolhidos para avaliação da atividade de transcriptase reversa, utilizando o kit Reverse Transcriptase Assay, Colorimetric, (Roche-Applied-Science), de acordo com as recomendações do fabricante. Valores médios de densidades óticas 405 nm (OD_{405nm}) maiores que duas vezes o valor médio da OD_{405nm} do controle negativo, foi considerado como indicativo de replicação viral. A TCID₅₀ foi determinada pelo método de Reed-Muench (1938).

3.2.4 Efeito da infecção de macrófagos de jumentos pelas estirpes virais EIAV_{UK3} e EIAV₄₄₋₁

Nesse experimento, foram utilizados 4 jumentos doadores de sangue (dois machos e duas fêmeas), provenientes da Fazenda Olhos D'Água, localizada na região de Cacôco de Cima, no município de Divinópolis, Minas Gerais. Todos os jumentos eram soronegativos para EIAV nos testes de IDGA (Bruch) e CELISA (IDEXX) e tinham idade superior a dois anos. Foram realizadas seis coletas de sangue, pois um macho e uma fêmea tiveram sangue coletado para repetição do experimento duas vezes. Volumes de 300 mL de sangue foram coletados em anticoagulante citrato dextrose (ACD). Todo o processo de diferenciação dos macrófagos foi testado e ajustado conforme descrito nos ANEXOS 3 e 4. A separação de PBMC foi realizada com o reagente Histopaque®-1077 (Sigma), conforme recomendações do fabricante e descrições no item 3.2.2.

Os PBMC's obtidos foram então divididos e colocados em frascos de Teflon de 125 mL (Thermo Fisher) previamente lavados com E-toxa Clean (Sigma) e autoclavados (ANEXO 5), contendo um volume final de 15 mL de meio RPMI (Lifetechnologies) acrescido de 20 % de soro fetal bovino (Gibco), 2 µg/mL de estreptomicina, 2 U/mL de penicilina, 0,08 µg/mL de Gentamicina, 0,025 mg/mL de Glutamina. Após um período de incubação de 4 h, em atmosfera de 5 % de CO₂ a 37 °C, a monocamada celular foi lavada duas vezes com meio RPMI puro (Lifetechnologies), para remoção das células não aderentes. Em seguida, realizou-se a eluição das células que permaneceram aderentes, maioria monócitos, ao colocar os frascos de teflon no gelo por 20 minutos. Após esse tempo, lavagens sucessivas com RPMI puro e gelado, auxiliavam a remoção das células que ainda permaneceram aderentes. Suspensões de células eluídas eram preparadas na concentração de 10⁶ cels/mL e distribuídas 100 µL/poço em placas de 96 poços (TPP). Em cada poço era acrescido 100 µL de meio RPMI (Lifetechnologies) suplementado de 20 % de soro fetal bovino (Gibco), 2 µg/mL de estreptomicina, 2 U/mL de penicilina, 0,08 µg/mL de Gentamicina, 0,025 mg/mL de Glutamina. As placas contendo as células foram incubadas por 60 h em atmosfera de 5% de CO₂ a 37 °C, até os procedimentos de infecção pelo EIAV de diferentes patogenicidades.

Após 60 h de incubação, para permitir a diferenciação de monócitos em macrófagos (Ma et al., 2014), o meio foi removido das placas seguindo-se de lavagem por duas vezes com RPMI puro (Lifetechnologies). Os inóculos de EIAV foram adicionados (título de 1 x 10³ TCID₅₀) para ambas estirpes patogênica (EIAV_{UK3}) e não patogênica (EIAV₄₄₋₁), o que representou uma m.o.i. de 0,01.

Para o estudo de replicação viral, os sobrenadantes foram coletados nos tempos zero, um, dois, três, quatro, cinco, seis e sete dias pós-infecção (dpi) e congelados a -70°C até os procedimentos de extração do RNA viral com o kit Qiamp Viral RNA mini Kit (Qiagen) e posterior qRT-PCR para EIAV (descrito no item 3.2.6). Os sedimentos celulares também foram coletados e armazenados a -70°C, para posterior extração de DNA com kit Tissue and Blood DNA mini kit (Qiagen) e Nested PCR para EIAV (descrito no item 3.2.7).

O LPS foi incluído como controle positivo de resposta pró-inflamatória para avaliar se as células do cultivo, após etapas de enriquecimento e maturação de monócitos, iriam responder aos estímulos dos indutores de liberação de citocinas. 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) após ser sonificado por 5 minutos, com frequência do pulso a cada 5 segundos, na amplitude 100 hertz (SONICS VIBRA CELL). A etapa de sonicação possibilita uma melhor solubilização do LPS e com isso, efetiva ação na ativação da resposta pró-inflamatória dos monócitos/macrófagos (Weber et al., 1992). Meio de cultura foi utilizado como controle negativo de infecção. Tanto a adsorção viral, quanto o estímulo com LPS foram realizados por 1h, seguidos de remoção dos inóculos e lavagem das células com meio puro. Adicionou-se 200 μ L/poço de meio RPMI (Lifetechnologies) acrescido de 10 % de soro fetal bovino (Gibco), 2 μ g/mL de estreptomicina, 2 U/mL de penicilina, e iniciou-se os registros dos tempos de incubação pós estímulos indutores.

Para o estudo da resposta celular a infecção viral, os sobrenadantes celulares foram removidos nos tempos uma, duas, 12 e 24 horas pós-infecções, e o RNA celular total extraído com reagente Qiazol (Qiagen), conforme recomendações do fabricante, para os estudos de cinética de expressão de citocinas. Os RNAs obtidos foram tratados com DNase RQ1 RNase-free DNase (Promega) para posterior síntese de cDNA com o kit High Capacity cDNA Synthesis (Applied Biosystems), conforme instruções do fabricante. A expressão das citocinas IL-6, IL-1 α , TNF- α e TGF- β , foram avaliadas por qPCR em tempo Real, utilizando iniciadores e sondas desenhados, customizados e validados pela Applied Biosystems, para experimentos de expressão gênica, utilizando Sistema TaqMan (Tabela 2). A quantificação relativa de cada alvo, em cada amostra, foi realizada utilizando o sinal do gene normalizador β -GUS. Os dados foram analisados pelo método comparativo de CT ($2^{-\Delta\Delta CT}$) (Applied Biosystems, User Bulletin #2, 2001). Os resultados foram apresentados como variação da expressão mRNA de citocinas nas células infectadas com EIAV_{UK3}, EIAV₄₄₋₁, e estimuladas com LPS, em relação ao controle de células (CC) onde ocorreu apenas a adição de meio de cultivo.

Tabela 2 - Iniciadores utilizados PCR em tempo real para citocinas do estudo de infecção de macrófagos de jumentos com EIAV₄₄₋₁ e EIAV_{UK3}

GENES	Identificação Applied Biosystems	Amplicon	Espécie	ReporterDye e Sonda	ID UniGene
TNF- α	Ec03467871_m1	84	<i>Eqqus caballus</i>	FAM_MGB	Eca.13019
IL-6	Ec03468678_m1	83	<i>Eqqus caballus</i>	FAM_MGB	Eca.12956
IL-1 α	Ec03468697_m1	95	<i>Eqqus caballus</i>	FAM_MGB	Eca.13125
TGF- β	Ec03468030_m1	130	<i>Eqqus caballus</i>	FAM_MGB	Eca.6371
β GUS	Ec03470630_m1	73	<i>Eqqus caballus</i>	FAM_MGB	Eca.13373

3.2.5 One step qRT-PCR em tempo real para quantificação do EIAV

Para quantificação do EIAV nos sobrenadantes dos cultivos celulares durante o período de infecções com as três estirpes virais utilizadas nesse estudo, com intuito de se avaliar a replicação viral, foi utilizada uma OneStep qRT-PCR em tempo real para o EIAV com os iniciadores e sonda descritos por Cook et al. (2002) (Tabela 3). A reação foi realizada com o kit Real Time ready RNA vírus Master mix (Roche), segundo as recomendações do fabricante, porém com modificação, referente ao acréscimo de 0,6 mM de MgCl₂ na reação. As amostras de RNA extraídas, foram quantificadas no equipamento Qubit (Qiagen) e as concentrações ajustadas para 1 ng/ μ L. Utilizou-se 5 μ L da diluição da amostra, para um volume final de reação de 25 μ L, realizadas em triplicata. O equipamento utilizado foi o Rotor Gene (Qiagen), com as seguintes condições de reação: 50°C, 8'e 95°C, 30''; seguido de 40 ciclos de 95°C, 30''; 60°C, 1'. Os controles positivos e os plasmídeos para a curva de quantificação absoluta da reação foram obtidos conforme descrito no Anexo 4.

Tabela 3 - Iniciadores utilizados na PCR em tempo real para região gag do EIAV

GENE	Iniciadores (5' – 3')	Amplicon	REFERÊNCIA
gag	F GGA GCC TTA AAA GGA GGG CCA CTA AAA	227	Cook et al., 2002
	R TTG TTG TGC TGA CTC TTC TGT TGT ATC GGG		
sonda	FAM ACG GGA AGC AAG GGG CTC AAG GGA GGC C BHQ-1		

RNAs sintéticos de EIAV produzidos foram utilizados como controle positivo de todas as qRT-PCR para quantificação viral. As curvas padrões da reação foram todas feitas com diluições seriadas na base 10, partindo de 10^{-3} até 10^{-9} , do plasmídeo linearizado pGEM-gag 520, que estava na concentração inicial de 10 ng/ μ L, estimada no equipamento Qubit (Thermo Fischer Scientific). Para determinação das eficiências da qRT-PCR, como também para permitir a quantificação absoluta do número de cópias de RNA do EIAV em cada amostra de sobrenadante de cultivo de ED infectada com EIAV_{WYO} (item 3.2.1), PBMC de cavalos e jumentos infectados com EIAV_{WYO} (item 3.2.2), como também em macrófagos infectados com EIAV₄₄₋₁ e EIAV_{UK3} (item 3.2.4).

3.2.6 Nested PCR

A presença do genoma do EIAV através do cDNA obtido de RNA celular total de PBMC e DNA total de pellets celulares de macrófagos foi verificada através da Nested PCR para o gene viral conservado *gag*, conforme descrito por Oaks e colaboradores (1998). Na primeira reação, utilizou-se 2 μ L de cDNA ou DNA, em uma mistura de reação de volume final de 25 μ L, contendo 0.02 UI de Go Taq Flexi DNA polimerase (Promega), 1.5 mM MgCl₂, 0.2 μ mol/L de cada primer (Tabela 4) e 2 mmol/L de cada dNTP. A amostra da segunda reação foi o volume de 1 μ L da primeira reação. As condições de temperatura, tanto do primeiro estágio da PCR, quanto da nested foram idênticas, seguindo a as condições de temperatura e tempo: a 94°C; 3'; seguido de 35 ciclos de 94°C, 30''; 56°C, 30''; 72°C, 30''; 72°C, 7'. Os amplicons da segunda reação foram submetidos a corrida eletroforética em gel de agarose 1,5 %.

Tabela 4 – Iniciadores utilizados na Nested PCR para região gag do EIAV

GENE	Iniciadores (5' – 3')	Amplicon	REFERÊNCIA
Gag 1ª reação	F CCA TTG CTG GAA GAT GTA AC	782	Oaks et al., 1998
	R TGC GTT CTG AAT AGT CAG TG		
Gag 2ª reação	F GGC TGG AAA CAG AAA TTT TA	427	
	R TAG GTT TTC CAA TCA TCA CT		

3.2.7 Análise estatística

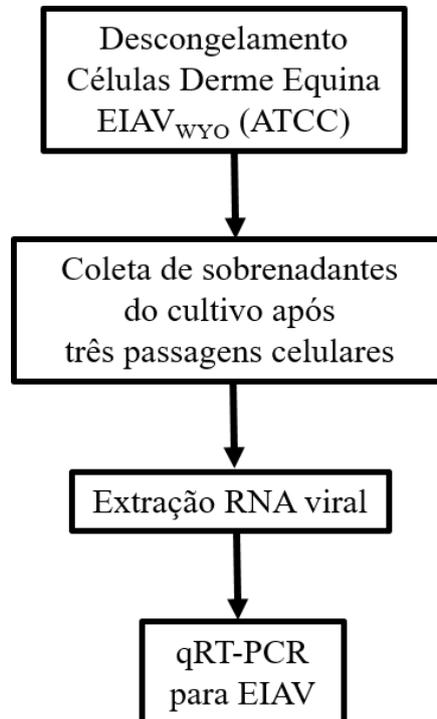
A expressão de mRNA de cada citocina foi normalizada pela transformação em log₂, antes das análises estatísticas (os dados não possuíam distribuição normal). Os dados transformados foram analisados usando o modelo de efeito misto (Mixed Effects), conforme realizado por Lim et al. (2005) e Covalada et al. (2010). Nesta análise, o efeito do animal foi

considerado aleatório. As variações dos dados transformados, em relação ao controle de célula, correspondem à variação da resposta. Além disso, foram realizadas comparações das médias dos dados de EIAV versus cultura de célula sem infecção e LPS versus cultura de célula por teste de Tukey, para determinar as diferenças que ocorreram nos tratamentos em cada tempo de infecção. Os dados foram analisados pelo programa SAS/STAT Versão 8 (1999) e SISVAR, Versão 5.0, (UFLA, Lavras, 2007). Os resultados foram considerados significativamente diferentes quando $p < 0,05$.

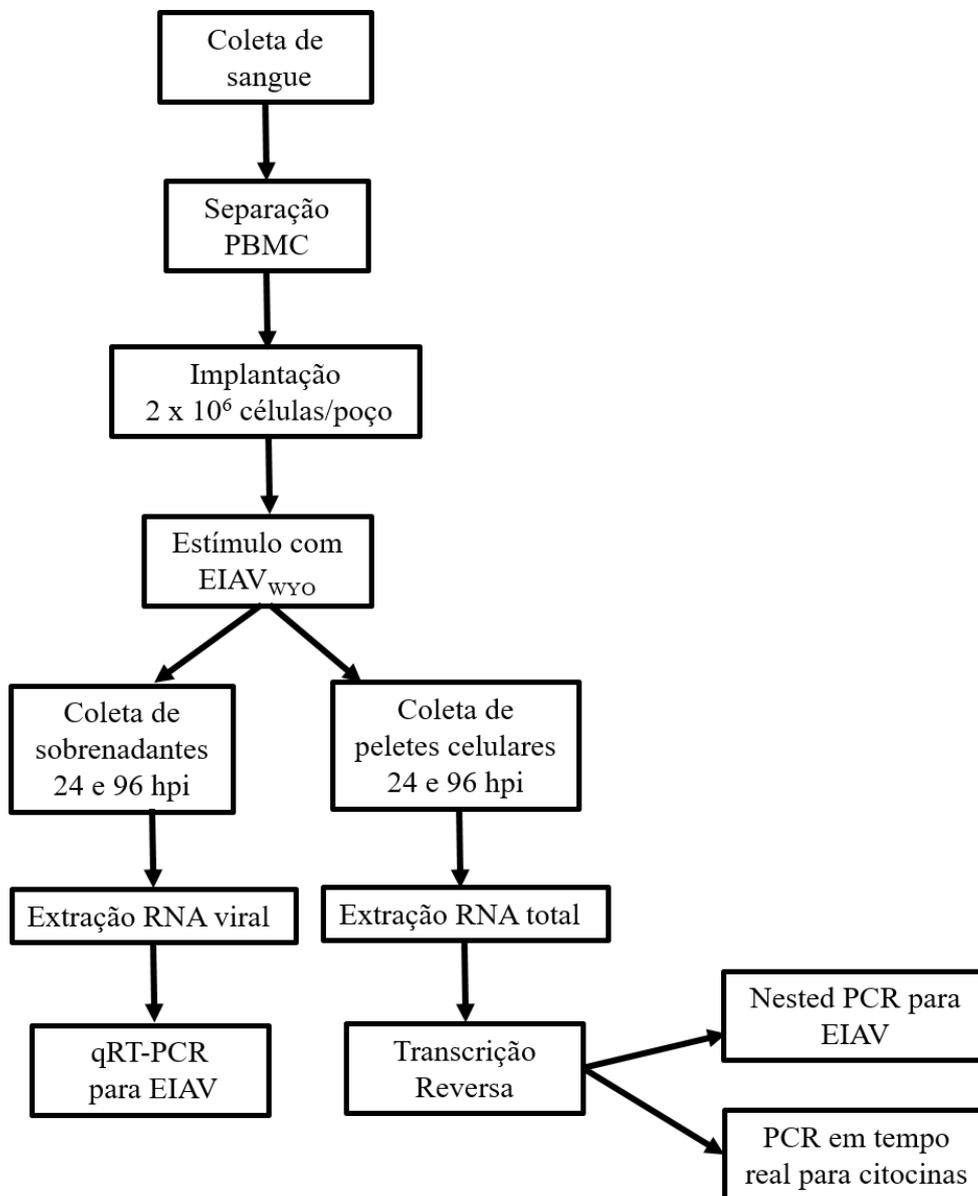
Todos os gráficos foram gerados no programa GraphPad Prism Software, versão 5.0 (Informer Technologies, Inc.).

3.2.8 Resumo do material e métodos em fluxogramas

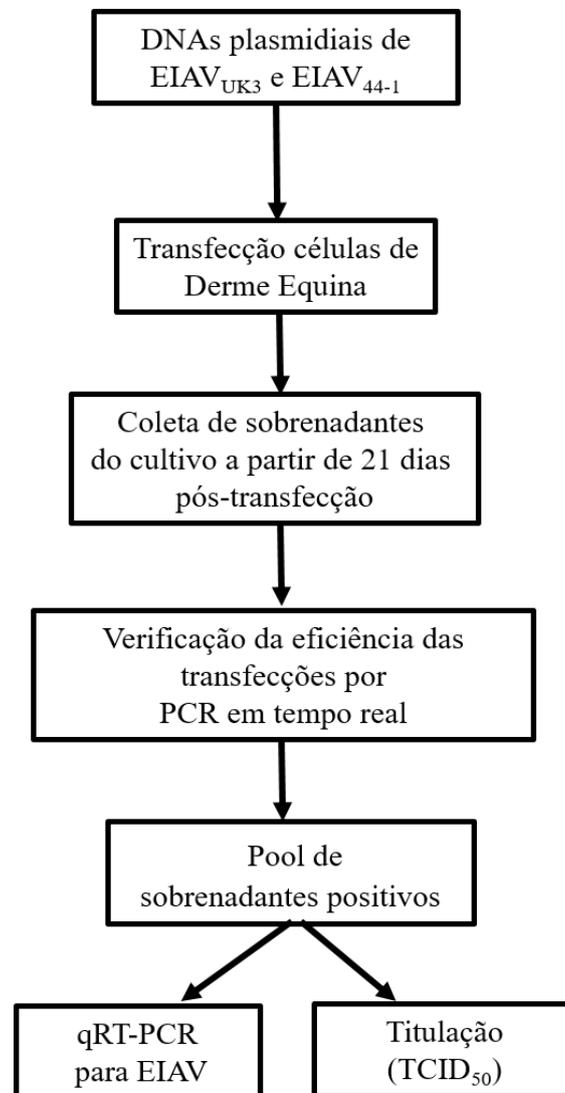
3.2.8.1 Produção de estoque de EIAV, estirpe Wyoming (EIAV_{WYO})



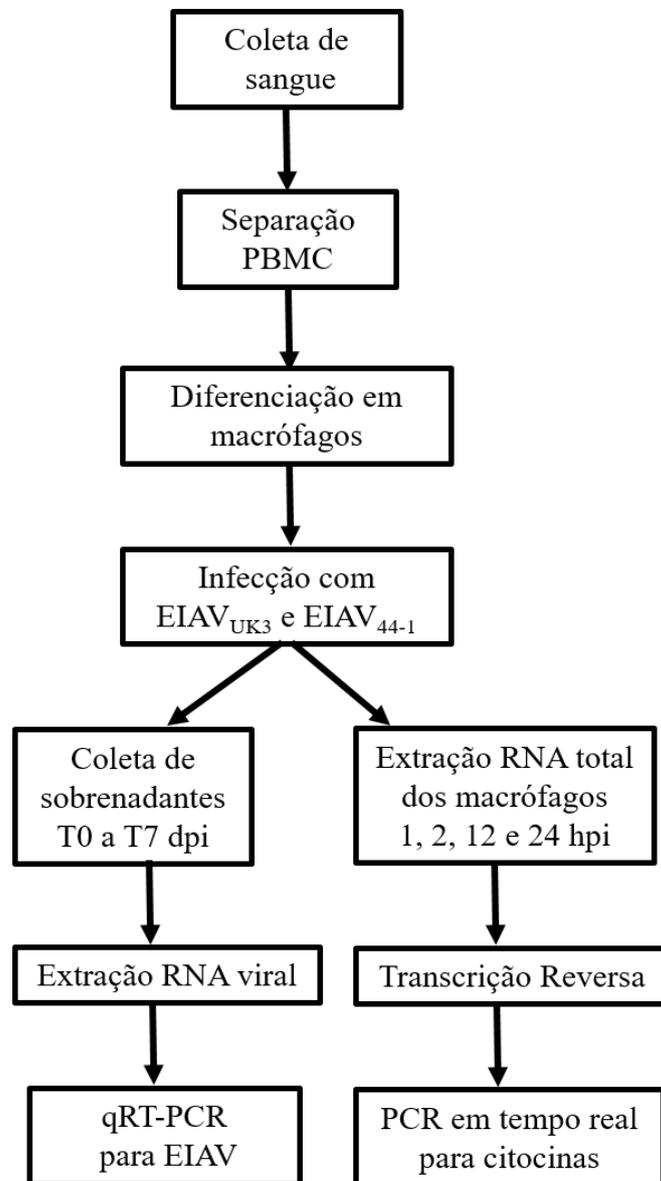
3.2.8.2 Efeito da infecção pelo EIAV_{wyo} em PBMC de cavalos e jumentos



3.2.8.3 Produção de estoques de EIAV estirpe UK3 (EIAV_{UK3}) e estirpe 44-1 (EIAV₄₄₋₁)



3.2.8.4 Efeito da infecção de macrófagos de jumentos pelas estirpes virais EIAV_{UK3} e EIAV₄₄₋₁



3.4 RESULTADOS

3.4.1 Células de Derme Equina Persistentemente Infectadas com EIAV_{WYO}

A estirpe altamente patogênica EIAV_{WYO}, foi propagada durante três passagens de células de derme equina persistentemente infectadas por esse vírus (ATCC CL-57). O número de cópias de RNA viral do pool do estoque de EIAV_{WYO} foi de 6×10^5 cópias de RNA/mL de sobrenadante de cultivo, determinado por One Step qRT-PCR em tempo real.

3.4.2 Efeito da infecção pelo EIAV_{WYO} em PBMC de cavalos e jumentos

3.4.2.1 Avaliação da replicação viral

PBMC de três cavalos e três jumentos foram infectados com 6×10^2 cópias de RNA do EIAV_{WYO} por poço. Pesquisou-se RNA viral nas células em cultura por Nested PCR. Conforme demonstrado na Tabela 5, foi detectado RNA do EIAV nos PBMC dos três jumentos, sendo que dois foram positivos 24 hpi (J1 e J3) e um foi positivo apenas 96 hpi (J2). Para os cavalos, dois foram positivos 24 hpi (C1 e C3). Não foi detectado material genético do EIAV no RNA total extraído dos PBMC do cavalo 2 (C2), nos tempos 24 e 96 hpi. As fotos dos géis de agarose 1,5 % dos resultados resumidos na Tabela 5 estão no Anexo 6.

Tabela 5 – Pesquisa de RNA do EIAV em PBMC de cavalos e jumentos 24 e 96 hpi

Cultivo de PBMC	RNA EIAV em PBMC	
	24 hpi	96 hpi
Cavalo 1	+	NR
Cavalo 2	ND	ND
Cavalo 3	+	NR
Jumento 1	+	NR
Jumento 2	ND	+
Jumento 3	+	NR

(+) indica detecção do RNA do EIAV; ND: não detectado; NR: não realizado

Adicionalmente, o monitoramento da replicação viral do EIAV_{WYO} nos cultivos de PBMC dos cavalos e dos jumentos foi realizado através da quantificação da carga viral nos sobrenadantes dos cultivos por One Step qRT-PCR em tempo real para o EIAV, 24 e 96 hpi. Como demonstrado na Figura 1, o EIAV_{WYO} se replicou em ambos cultivos de PBMC de cavalos e jumentos ao ser detectado em sobrenadantes dos cultivos de todos os animais utilizados. Ao considerar que a quantidade de vírus inoculado foi de aproximadamente 6×10^2 cópias de RNA de EIAV por mililitro de sobrenadante, o EIAV_{WYO} aumentou sua carga viral em 10 vezes no cultivo de PBMC equino, 96 hpi ($5,38 \times 10^3$ cópias/mL). No PBMC de jumentos, a carga viral no sobrenadante celular aumentou aproximadamente 45 vezes ($2,79 \times 10^4$ cópias de RNA/mL).

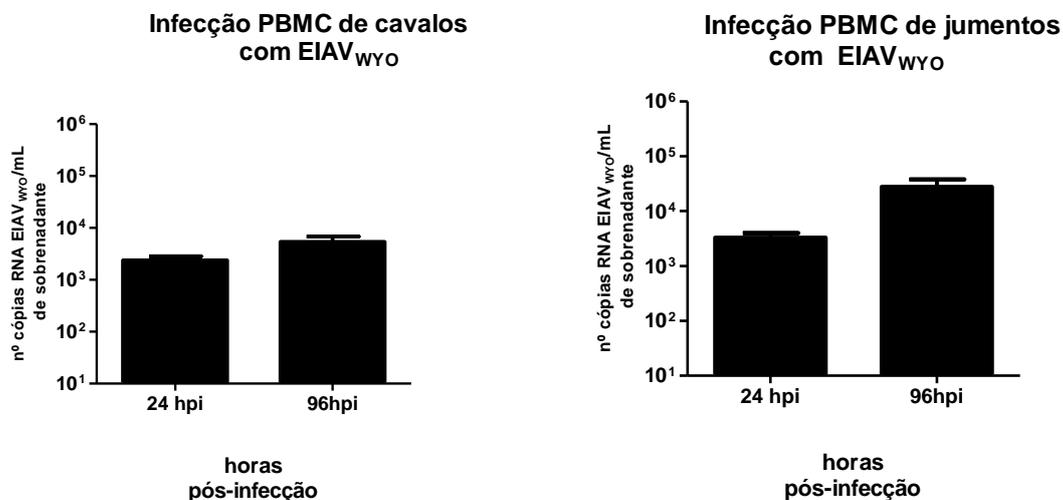


Figura 1: Avaliação da replicação do EIAV_{WYO} a partir da análise do sobrenadante de cultivo de PBMC de cavalos e jumentos por qRT-PCR para EIAV.

3.4.2.2 Análise da expressão de citocinas em PBMC de cavalos e jumentos

O estudo da resposta de PBMC (linfócitos e monócitos) ao estímulo/infecção com EIAV, estirpe Wyoming (EIAV_{WYO}), foi realizado para avaliar a expressão de citocinas pró-inflamatórias importantes na patogênese da AIE (TNF- α , IL-1 α e IL-6), como também citocinas anti-inflamatória (IL-10) e anti-viral (IFN- β), em comparação com o controle de células (CC), onde foi adicionado apenas meio de cultivo. Como demonstrado na Figura 2, foi possível verificar que ocorreu variação na expressão das citocinas avaliadas após estímulo/infecção com o EIAV_{WYO}. Os gráficos são as representações das médias transformadas em log₂, obtidas do perfil da expressão de mRNA das citocinas pró-inflamatórias TNF- α , IL-1 α , IL-6, IL-10 e IFN- β nos tempos de 24 h e 96 h pós-infecção, nos PBMC dos três cavalos e três jumentos que foram utilizados nesse experimento.

Mesmo que diferenças significativas não tenham sido observadas, devido a limitação do número de animais utilizados como doadores no estudo, nota-se uma tendência de os jumentos apresentarem maior expressão de IL-1 α e IL-6 24 hpi com EIAV_{WYO} em relação aos cavalos (Figura 2B e 2C). Todavia, observou-se tendência da expressão de TNF- α ser menor em jumentos do que cavalos, 24 hpi com EIAV_{WYO} (Figura 2A). No tempo de 96 hpi com EIAV_{WYO}, nota-se tendência dos cavalos em diminuir a expressão tanto de TNF- α , quanto de IL-1 α , comparada aos jumentos (Figura 2A e 2B), exceto a citocina IL-6, que apresentou aumento em relação aos jumentos neste tempo de infecção (Figura C).

Nesse estudo, após a análise qualitativa do gráfico de IL-10, cavalos e jumentos apresentaram o mesmo perfil de expressão dessa citocina anti-inflamatória após estímulo/infecção com EIAV_{WYO} nos tempos observados (Figura 2D). A mesma tendência de semelhança foi observada para a expressão da citocina anti-viral IFN- β 24 hpi com EIAV_{WYO}, embora tenha sido possível observar que os cavalos expressaram mais interferon do que os jumentos 96 hpi (Figura 2E).

O LPS foi utilizado como controle positivo de indução de resposta imune. Este indutor estimulou a expressão das citocinas IL-1 α e IL-6 dos cavalos e dos jumentos 24 h e 96 h após o estímulo (Figura 2B e 2C), como também estimulou TNF- α 24 hpi e IL-10 96 hpi somente para a espécie equina.

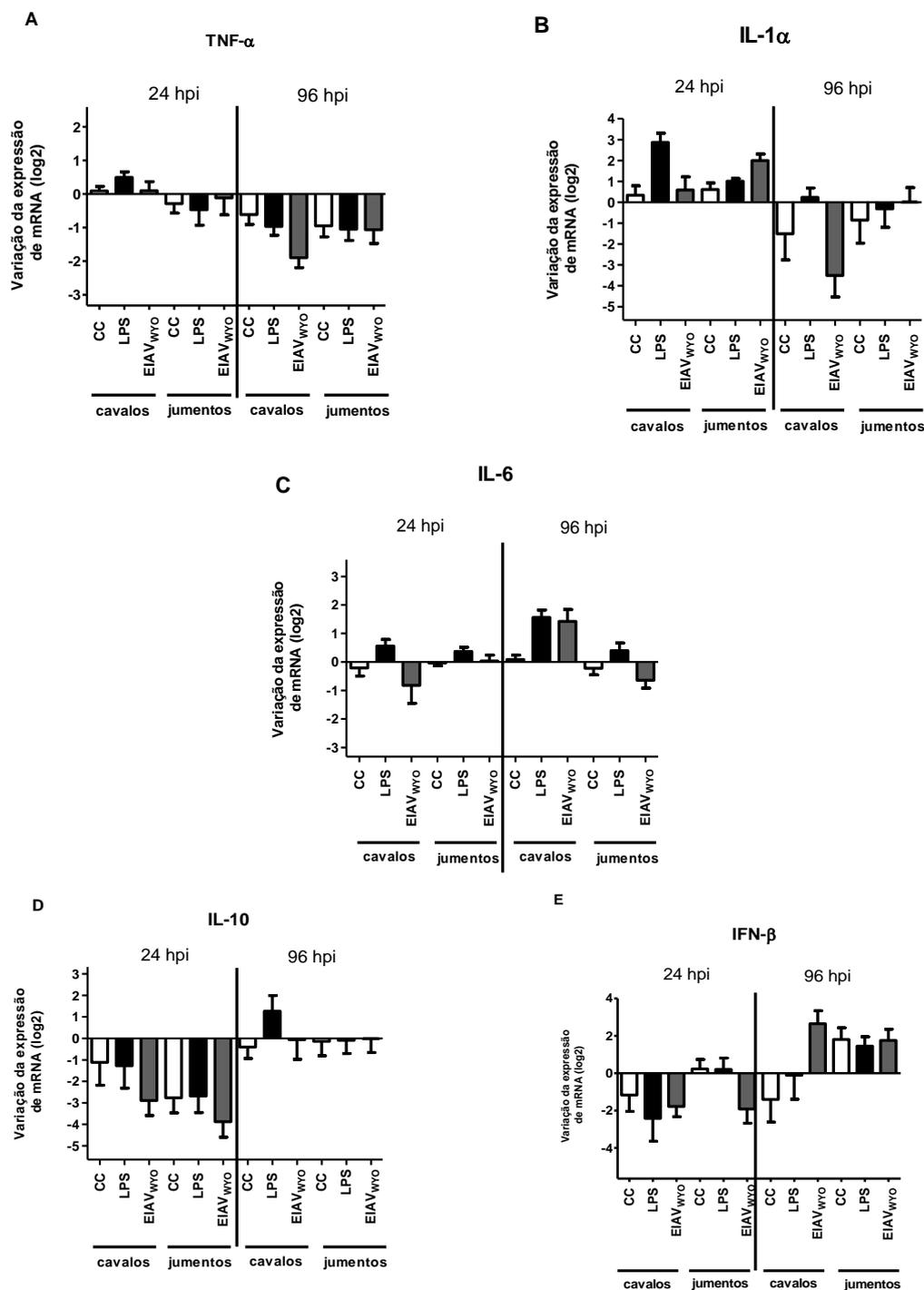


Figura 2: Representação gráfica da expressão média de mRNA de citocinas provenientes de três cavalos e três jumentos, infectados com EIAV_{wyo}, tratados com LPS ou meio de cultivo (controle de células). O eixo x representa o tempo pós-infecção (24 e 96 hpi) e o eixo y indica expressões relativas do mRNA (log2) das citocinas TNF- α (A), IL-1 α (B), IL-6 (C), IL-10 (D) e IFN- β (E) em relação à expressão de mRNA de GAPDH, através de qPCR.

3.4.3 Produção de estoques de EIAV estirpe UK3 (EIAV_{UK3}) e estirpe 44-1 (EIAV₄₄₋₁)

3.4.3.1 Transfecção de células ED com clones moleculares do EIAV

Para avaliar se as transfecções dos DNAs plasmidiais de EIAV_{UK3} e EIAV₄₄₋₁ foram capazes de produzir vírus nas células ED, pesquisou-se o RNA viral através de PCR em tempo Real para EIAV em alíquotas dos sobrenadantes de cada passagem celular, coletadas semanalmente, a partir de três semanas após a transfecção. Foi possível detectar a presença de ambos os vírus nos sobrenadantes após o 23º dia do procedimento, até a última passagem celular antes da finalização do experimento, que se deu 70 dias após a transfecção (Tabela 6).

Tabela 6 – PCR em tempo Real para detecção de EIAV (CT) em sobrenadantes de cultivos de ED transfectados com clones plasmidiais de EIAV₄₄₋₁ e EIAV_{UK3}

Dias pós-transfecção	CT	
	PCR em tempo Real para EIAV	
	EIAV ₄₄₋₁	EIAV _{UK3}
23	31,8	NR
29	29,2	27,6
35	28,1	27,3
42	26,8	28,5
49	26,0	28,4
56	26,3	28,9
63	29,1	26,4
70	24,8	29,7

NR: não realizado

3.4.3.2 Titulação viral (TCID₅₀)

Com a confirmação da presença do RNA do EIAV após as transfecções, preparou-se um pool dos sobrenadantes e procedeu-se a titulação viral de cada estoque. O título do EIAV₄₄₋₁ foi de 10^{4,8} TCID₅₀/mL e do EIAV_{UK3} de 10^{4,3} TCID₅₀/mL.

3.4.4 Efeito da infecção de macrófagos de jumentos pelas estirpes virais EIAV_{UK3} e EIAV₄₄₋₁

Na primeira etapa desse estudo, PBMC's de quatro jumentos doadores foram incubados em frascos de Teflon, para seleção inicial de células aderentes que, majoritariamente, são compostas por monócitos. Por conseguinte, as células eluídas foram implantadas em placas e incubadas durante um tempo adicional de 60 h para permitir a diferenciação dos monócitos em macrófagos. Ao final da incubação, as células aderentes estavam prontas para os procedimentos de infecções virais (Figura 2 A). As infecções virais foram feitas com o inóculo de 1×10^3 TCID₅₀ de EIAV₄₄₋₁ ou EIAV_{UK3} (MOI 0,01), com incubação por outros sete dias após infecção, para avaliar os perfis de replicação das duas estirpes nos sobrenadantes dos cultivos de monócitos/macrófagos de jumentos utilizando qRT-PCR, para EIAV. Na Figura 2C e 2D, estão as imagens de monócitos/macrófagos de jumentos um dia pós-infecção com EIAV₄₄₋₁ e EIAV_{UK3}, respectivamente. Foi observada diminuição da quantidade de células nos poços infectados com a amostra não patogênica EIAV₄₄₋₁ (Figura 2C), de forma mais perceptível naqueles poços com células infectadas com a amostra patogênica EIAV_{UK3} (Figura 2D), ambas as observações em relação ao controle de células, do qual foi adicionado apenas meio de cultura (Figura 2B). No tempo sete dias pós-infecção, observou-se efeito citopático na maior parte das células dos poços infectados por ambas as estirpes de EIAV (dados não demonstrados).

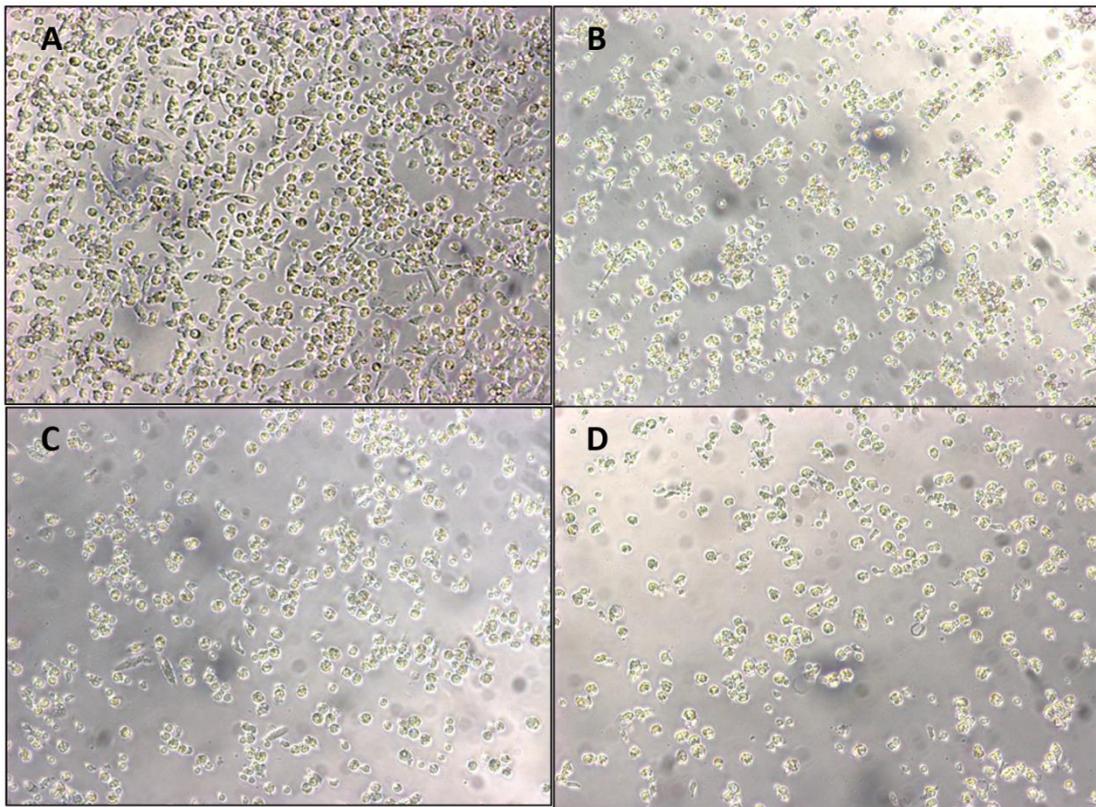


Figura 3: Cultivo de monócitos/macrófagos aderentes de jumentos (Aumento 200X). **A:** células aderentes após 60 h de incubação, imediatamente após procedimento de lavagem de monocamada celular. As imagens de **B, C, e D** foram obtidas um dia após os procedimentos de infecção viral. **B:** controle de células (CC), onde foi adicionado somente meio de cultivo; **C:** células infectadas com EIAV₄₄₋₁; **D:** células infectadas com EIAV_{UK3}.

Para o estudo da replicação viral do EIAV₄₄₋₁ e EIAV_{UK3} nos cultivos de monócitos/macrófagos de jumentos, realizou-se a quantificação da carga viral nos sobrenadantes pela One Step qRT-PCR em tempo real para o EIAV nos tempos zero, dois, quatro, seis e sete dias pós-infecção. A figura 4 representa a média da quantificação do número de cópias de RNA viral/mL de sobrenadante entre quatro experimentos independentes, em cada tempo pós-infecção. Foi utilizada uma MOI de 0,01 para infecção (correspondente a 1×10^3 TCID₅₀ em 100 μ L), o que correspondeu a $1,08 \times 10^3$ número de cópias do EIAV₄₄₋₁ e $8,1 \times 10^5$ número de cópias do EIAV_{UK3}/mL quando avaliados os inóculos virais por qRT-PCR. Após a etapa de adsorção viral, procedeu-se a lavagem da monocamada celular, 1x com meio de cultivo, porém, pelos resultados, nota-se que no tempo zero (logo após a adsorção e lavagem) o vírus inoculado não foi totalmente removido com esse procedimento (Figura 4A e 4B). De uma forma geral, as duas estirpes mantiveram a carga viral estável ao longo do período de incubação de sete dias, permanecendo com quantidade de vírus na escala de 10^3 cópias de RNA de EIAV₄₄₋₁ e de 10^5 cópias de RNA de EIAV_{UK3}.

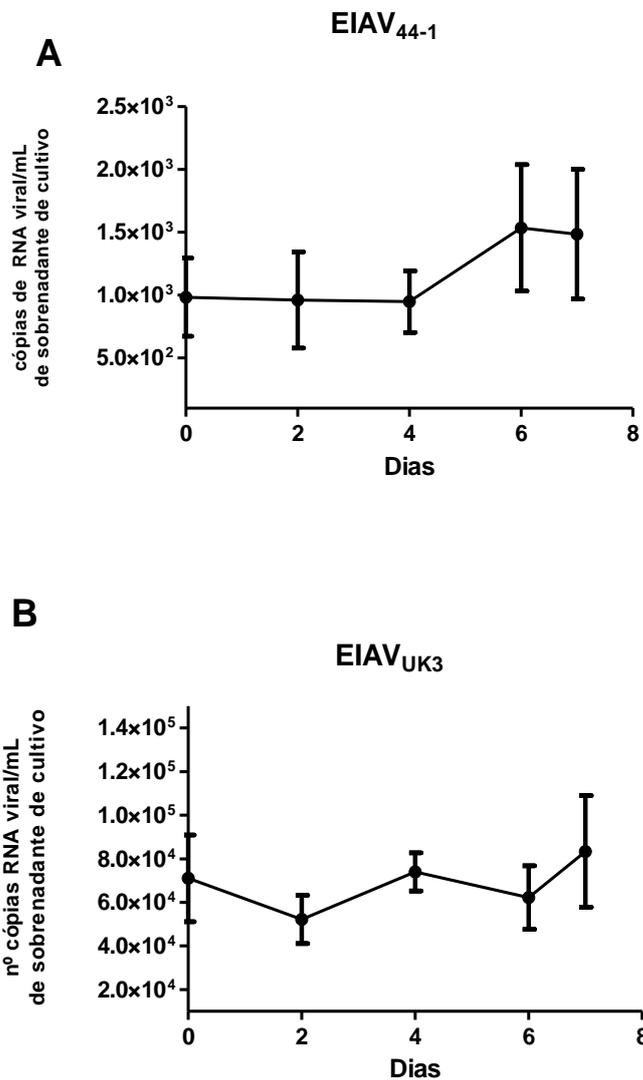


Figura 4: Avaliação da replicação do EIAV₄₄₋₁ (A) e EIAV_{UK3} (B) a partir da análise dos sobrenadantes dos cultivos de macrófagos de jumentos no período de sete dias de infecção, através por qRT-PCR para EIAV

Foi detectado DNA proviral de EIAV nas amostras de DNA de macrófagos de jumentos testadas um e dois dias pós infecção com EIAV₄₄₋₁ e EIAV_{UK3} (Tabela 5). No caso de infecções com o vírus 44-1, não foi possível detectar DNA no tempo zero de infecção. No entanto, para as infecções dos macrófagos dos jumentos com o EIAV_{UK3}, o DNA viral foi detectado no tempo zero pós-infecção (Anexo 8).

Tabela 7 – Pesquisa de DNA proviral do EIAV em monócitos/macrófagos de jumentos um e dois dpi por Nested PCR

Cultivo de macrófago	DNA proviral do EIAV			
	EIAV ₄₄₋₁		EIAV _{UK3}	
	1 dpi	2 dpi	1 dpi	2 dpi
Jumento 1	+	+	+	+
Jumento 2	+	+	+	+
Jumento 3	+	+	+	+
Jumento 4	NR	+	NR	+

(+) indica detecção do DNA proviral do EIAV; NR: não realizado

A infecção de monócitos/macrófagos de jumentos com EIAV₄₄₋₁ e EIAV_{UK3} foi realizada para avaliar a expressão de citocinas pró-inflamatórias, TNF- α , IL-1 α , IL-6 e TGF- β , durante o período de 24 hpi, em comparação ao controle de células, onde foi adicionado apenas meio de cultivo. Os resultados demonstrados na Figura 5 mostram que ocorreram variações na expressão das citocinas avaliadas após a infecção com as duas estirpes de EIAV. Os gráficos são as representações das médias transformadas em log₂, obtidas do perfil da expressão de mRNA das citocinas TNF- α , IL-1 α , IL-6 e TGF- β nos tempos uma, duas 12 e 24 horas pós-infecção, dos macrófagos derivados de monócitos de sangue periférico dos quatro jumentos que foram utilizados como doadores nesse experimento, sendo que dois animais foram avaliados duas vezes.

Os resultados demonstraram que ambos os vírus, apesar do fato de possuírem patogenicidades diferentes, não alteraram de forma significativa ($p \leq 0,05$) a expressão dessas citocinas, nas condições do experimento, em comparação com os respectivos controles de células (CC).

LPS, previamente sonificado, foi utilizado como controle positivo para estimular a resposta imune. Nestas condições, notou-se aumento significativo na expressão de TNF- α e IL-1 α nos tempos de 1 h, 2 h e 24 h de estímulo em relação ao controle (Figura 5A e 5B). A expressão de IL-6 aumentou significativamente nos tempos de 2 h e 24 h pós-estímulo com LPS. Contudo, não foi observado aumento significativo da expressão das citocinas TNF- α , IL-1 α e IL-6 12 h após o mesmo estímulo com LPS. Em relação a citocina TGF- β , pode-se observar tendência de aumentar a expressão nos tempos de 1 h e 24 h de estímulo com LPS, quando comparado ao CC, enquanto nos tempos de 2 h e 12 h observou-se tendência a diminuição no perfil de expressão dessa citocina em resposta ao mesmo estímulo (Figura 5D).

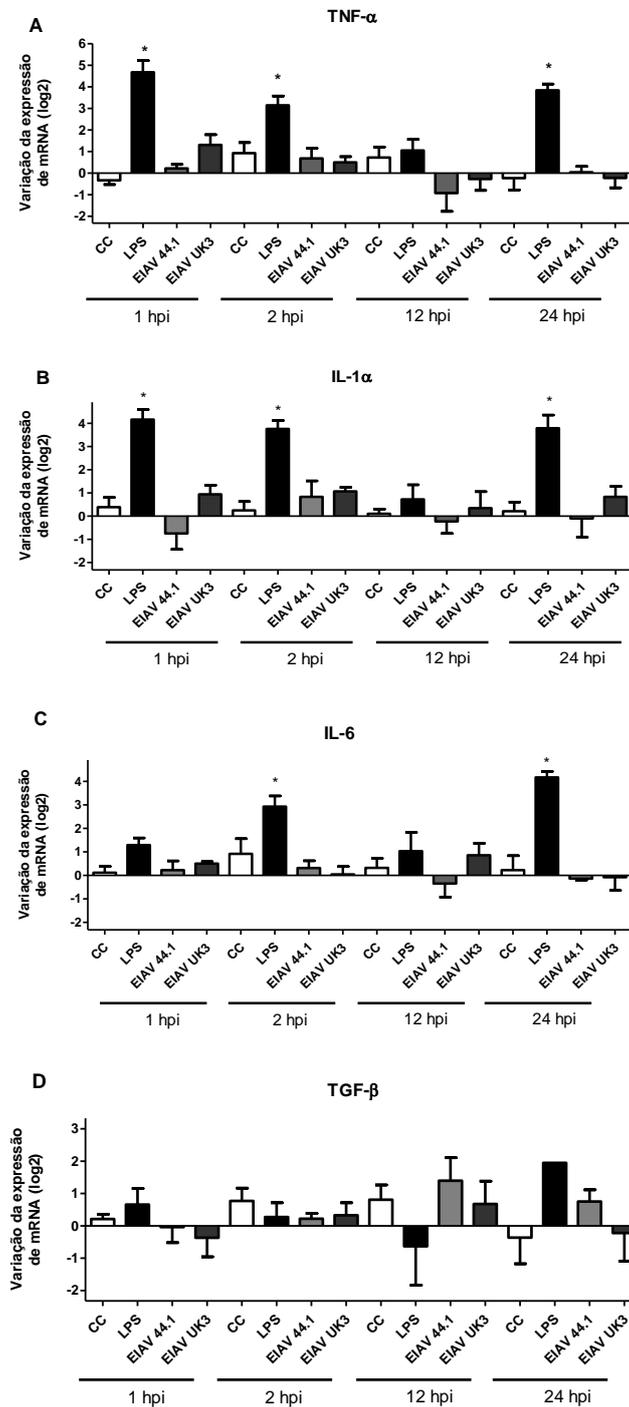


Figura 5: Representação gráfica da expressão de mRNA de citocinas pró-inflamatórias em macrófagos de jumentos infectados com EIAV₄₄₋₁ e EIAV_{UK3}, como também estimulados com LPS ou meio de cultivo (controle de células - CC). O eixo x representa o tempo pós-infecção (1, 2, 12 e 24 hpi) e o eixo y indica expressões relativas do mRNA (log2) das citocinas TNF- α (A), IL-1 α (B), IL-6 (C) e TGF- β (D) em relação à expressão de mRNA de β -GUS, através de qPCR (Taqman). * indica que houve diferença significativa ($p \leq 0.05$) do estímulo com LPS ou com os vírus 44-1 e UK3, comparado ao CC.

3.5 DISCUSSÃO

As características biológicas das lentivirose e as interações entre os vírus e seus hospedeiros, estão em constante estudo por diversos grupos de pesquisa com objetivo de aprimorar os conhecimentos sobre a patogenicidade e imunogenicidade causadas por esses patógenos (VandeWoude, et al., 2010; Lin, et al. 2011; Ma et al., 2013; Sang 2014; Liu et al., 2016). Muitos trabalhos têm relacionado as infecções pelos lentivírus HIV, FIV e SIV com desregulação da expressão de citocinas e quimiocinas e modulação da replicação viral, como também com a progressão de doença em seus hospedeiros (Kedzierska et al. 2001; Kamat et al. 2010; Genesca, et al., 2012; Worsley et al., 2010). O EIAV é capaz de induzir expressão de diversas citocinas, das quais aumento sérico de TNF- α , TGF- β , IL-1 α e IL-6 foram associadas com sinais clínicos típicos da AIE, na fase aguda da doença, em pôneis *in vivo*, e variações na expressão de citocinas e quimiocinas ocorreram em macrófagos de cavalos derivados de PBMC, *in vitro*, após infecções com diferentes amostras do EIAV (Tornquist et al., 1997, Sellon, 1998, Lim et al., 2005, Lin et al., 2011 Ma et al., 2014; Q. Liu. et al, 2016). A maioria dos estudos *in vivo* e *in vitro* com o EIAV, foram conduzidos em cavalos/pôneis ou em células derivadas de cavalos (*Equus caballus*). Dessa forma, pouco se sabe sobre a infecção por esse vírus nos jumentos, hospedeiros naturais do EIAV, embora não tenham apresentado sinais clínicos da AIE após infecções experimentais com amostras patogênicas (Cook et al., 2001). Devido à escassez de informações acerca da patogênese da AIE em jumentos, o intuito desse trabalho foi principalmente avaliar a alterações na expressão gênica de citocinas pró-inflamatórias nas principais células alvo da infecção pelo EIAV *in vitro* que são os macrófagos, tais como TNF- α , IL-6 e IL-1 α , secretadas após infecção dessas células por estirpes do EIAV de diferentes patogenicidades, e correlacionar com os achados prévios *in vivo*.

Os estudos iniciais do presente trabalho, referente ao estímulo de PBMC de cavalos e jumentos, com amostra altamente patogênica de EIAV_{WYO}, demonstraram que ocorreram variações nas expressões das citocinas avaliadas. Os jumentos apresentaram tendência em aumentar expressão da citocina pró-inflamatória IL-1 α , no tempo de 24 hpi, tendência que não foi mantida 96 hpi, apesar da confirmação de que o EIAV_{WYO} atuou não só como estímulo das células em cultivo, mas também foi capaz de se replicar nas células dos jumentos, através da detecção de transcritos virais no sobrenadante do cultivo e no RNA total celular. A IL-1 α é uma citocina que, geralmente, atua na resposta inflamatória potencializando os efeitos sobre proliferação, diferenciação e ativação de outras células do sistema imune (Akdis et al., 2011).

De acordo com os nossos resultados, os cavalos mostraram a tendência mais notável de aumentar a expressão da citocina pró-inflamatória IL-6 96 hpi com EIAV_{WYO}. Assim como foi observado em nosso trabalho, o aumento de IL-6 já foi demonstrado em infecções *in vitro* de macrófagos de cavalos com amostras patogênicas do EIAV, EIAV_{WSU5} e EIAV₁₇ (Swardson et al., 1997; Lim et al., 2005). A IL-6 é uma citocina multifuncional, envolvida na regulação de resposta imune, resposta de fase aguda, hematopoiese e inflamação (Murphy et al., 2010; Akdis et al., 2011). Em 1998, Sellon demonstrou que níveis séricos de IL-6 aumentam em infecções *in vivo* de cavalos com EIAV_{WYO}, sendo essa citocina importante para a patogênese da AIE, uma vez que seu aumento está muito relacionado ao surgimento de trombocitopenia e febre (Tornquist e Crawford, 1997; Tornquist, et al., 1997). Como resultado da análise de pesquisa de transcritos virais nos cultivos de PBMC dos cavalos e jumentos, pode-se notar que apenas um cultivo de células equinas provavelmente não se infectou pelo EIAV_{WYO} nos tempos avaliados. Dessa forma, considerou-se que o vírus atuou apenas como estímulo nestas células em cultivo.

A citocina TNF- α , que possui papel relevante na patogênese da AIE, ao ser avaliada em nosso estudo de estímulo de PBMC de cavalos e jumentos com EIAV_{WYO}, demonstrou tendência de ser mais expressa pelas células dos cavalos em comparação com as células dos jumentos 24 hpi, enquanto que 96 hpi, o perfil de redução da expressão dessa citocina foi semelhante para ambas as espécies. TNF- α é uma citocina moduladora de resposta inflamatória local e sistêmica, com expressão precoce após os estímulos e conhecida como citocina de fase aguda (Murphy et al., 2008). Elevados níveis séricos de TNF- α foram positivamente correlacionados com viremia e severidade dos sinais clínicos na fase aguda da AIE em cavalos e pôneis (Costa et al., 1997). Os seus efeitos, associados aos efeitos de IL-1, podem ativar macrófagos e neutrófilos, aumentando, dessa forma, a fagocitose de eritrócitos sensibilizados por componentes do sistema do complemento. Ainda nestas condições, TNF- α pode contribuir para a supressão da eritropoiese pela desregulação da eritropoietina e do metabolismo do ferro (Felli, et al; 2005; Reis e Cook, 2014).

Foi observado que a citocina antiviral IFN- β apresentou maior tendência de ser expressa no PBMC dos cavalos em relação aos jumentos desse estudo no tempo de 96 h após estímulo com EIAV_{WYO}. Os transcritos de IFN- β são decorrentes da via de sinalização desencadeada após estímulo ou ocorrência de infecções virais (Kawai e Akira, 2010; Ma et al., 2013). A ativação do receptor semelhante a *toll 3* (TLR3) nas células do hospedeiro leva a produção de IFN- $\alpha/\beta/\delta$ e outros fatores antivirais importantes no controle das infecções virais (Altfeld e Gale Jr., 2015). Além disso, já foi demonstrado que algumas estirpes do EIAV foram capazes de ativar TLR3 com consequente aumento da produção de IFN- β em estudos de infecções de macrófagos derivados de monócitos de sangue periférico *in vitro* (Ma et al., 2013; Sang et al., 2014; Ma et al. 2014).

Foi observado em nosso estudo o mesmo perfil de expressão da citocina anti-inflamatória IL-10, para cavalos e jumentos, de forma aparentemente reduzida. A ação anti-inflamatória de IL-10 ocorre pela modulação da expressão de outras citocinas pró-inflamatórias, quimiocinas, receptores de quimiocinas, como também pela regulação da ação de linfócitos T e diferenciação de linfócitos B (Akdis et al., 2011). No trabalho de Covalada e colaboradores (2010), a expressão de IL-10 também se apresentou reduzida após infecção com amostra patogênica do EIAV, em relação aos controles de células, sendo atribuída a infecção *in vitro* pelo EIAV, somente a indução de resposta pró-inflamatória nos tempos avaliados.

Em resumo, nas infecções de PBMC de cavalos e jumentos, as citocinas TNF- α (24 hpi), IL-6 e IFN- β (96 hpi) apresentaram maior expressão em relação aos PBMCs de jumentos, sugerindo que os cavalos sofrem maior alteração na expressão gênica das citocinas analisadas nesse estudo em resposta a infecção pelo EIAV_{WYO} do que os asininos.

Novos experimentos de infecções *in vitro* foram realizados para avaliar a cinética de expressão das citocinas pró-inflamatórias em macrófagos de jumentos, o principal alvo do EIAV, conforme mencionado anteriormente, com o intuito de confrontar os dados obtidos nos nossos estudos iniciais de estímulo de PBMC de cavalos e jumentos com EIAV_{WYO} e os dados da literatura. No entanto, foram utilizados clones do EIAV cujas patogenicidades eram conhecidas (Payne et al, Cook et al., 1998, Cook et al., 2003), macrófagos derivados de monócitos de jumentos (Maury et al.; 1994; Maury, 1998 a; Raab et al., 1998; Ma et al., 2014;) e tempos mais curtos de infecção. (Lim et al., 2005; Lin et al., 2011). Foi demonstrado que não ocorreram expressões significativas das citocinas pró-inflamatórias TNF- α , IL-1 α , IL-6 e TGF- β nos macrófagos de jumentos estimulados durante os períodos de uma, duas, 12 e 24 horas com a

amostra EIAV_{UK3}, patogênico e a amostra EIAV₄₄₋₁, não patogênico. No entanto, já foram demonstradas variações nas citocinas pró-inflamatórias, tais como TNF- α , IL-1 α , IL-1 β , expressas precocemente, entre os tempos de 30 minutos e duas horas, após infecções de macrófagos de equinos com amostras virulentas do EIAV (Lim et al., 2005; Lin et al., 2011). Na análise de replicação viral, constatou-se pequena variação na contagem do número de cópias de RNA/mL de sobrenadante, nos tempos avaliados, no período de sete dias de infecção dos macrófagos de jumentos, embora tenha sido detectado DNA proviral 24 hpi com ambas as estirpes EIAV₄₄₋₁ e EIAV_{UK3} nas células infectadas. No nosso estudo inicial de infecções de PBMC, tanto as células dos cavalos quanto as células dos jumentos que se infectaram com o EIAV_{WYO}, apresentaram replicação viral aparentemente semelhante. A mesma observação foi feita por Cook et al. (2001), em seu trabalho de infecções experimentais de jumentos com EIAV, ao demonstrar que o EIAV_{PV} infectou e se multiplicou de maneira muito semelhante em macrófagos de jumentos e cavalos após infecções *in vitro*.

Uma das hipóteses para explicar o fato das expressões das citocinas avaliadas nos macrófagos dos jumentos terem sido consideradas iguais entre si e iguais ao controle de células, após desafios com os clones do EIAV, pode ser atribuída à quantidade de vírus utilizada nos estímulos (MOI 0,01). Em nosso estudo inóculos virais utilizados foram baseados na referência de Ma e colaboradores (2014) que, não somente utilizaram o EIAV_{UK3} em seus experimentos de infecção de macrófagos equinos para avaliação da expressão de TLR3 e IFN- β nas células previamente infectadas com estirpe atenuada EIAV_{FDDV13}, mas também utilizaram o mesmo kit comercial de determinação de atividade de RT na titulação (TCID₅₀) das estirpes virais avaliadas. Estudos adicionais são necessários para avaliar a influência da quantidade de vírus inoculada na indução da expressão de citocinas pelos macrófagos dos jumentos. Para testar essa hipótese, devem ser utilizadas outras multiplicidades de infecção (por exemplo, 0,1 e 1) e as expressões das citocinas novamente avaliadas.

Nos nossos experimentos, o LPS foi incluído como controle positivo de estímulo das células em cultivo. As diferenças observadas quando comparadas a expressão de mRNA das citocinas pró-inflamatórias de PBMC de cavalos e jumentos com a dos macrófagos de jumentos, após estímulo por LPS, possivelmente foi decorrente do processo de sonicação prévia às inoculações, que ocorreu apenas no experimento realizado com macrófagos. Este procedimento facilita o contato desta molécula com os receptores celulares que ativam a resposta imune.

A modulação das expressões das citocinas relacionadas à patogênese das infecções pelo EIAV, como também em outras lentivirose, apesar do fato de amplamente estudadas nos últimos anos, possuem diversas limitações. Essas limitações se referem às variações das condições experimentais, principalmente relativas ao preparo e maturação das células que são infectadas, neste caso monócitos/macrófagos; variações individuais (animal) dos doadores das células leucocitárias; a utilização de diferentes estirpes virais em cada infecção; a determinação de quantidades equivalentes de vírus que estão sendo adicionados e, por último, a determinação de infectividade de todas as células em cultivo, após adição dos inóculos virais (Lin, et al. 2011; Ma et al., 2013; Ma et al., 2014; Liu et al., 2016). Todas essas limitações devem ser levadas em consideração ao realizar as comparações entre os resultados obtidos nesse estudo com outros resultados de trabalhos realizados *in vitro*. Apesar disso, pesquisas de patogênese viral trazem informações que podem contribuir no entendimento de características da resposta imune de diferentes hospedeiros e virulência de algumas estirpes virais.

Os nossos resultados de expressão de citocinas nas células dos jumentos após infecções *in vitro* com diferentes estirpes do EIAV sugerem que a ausência de manifestação clínica da AIE nessa espécie (redução na contagem de plaquetas, febre e viremia) nas infecções experimentais *in vivo* (Cook et al., 2001) provavelmente estão associadas a menor desregulação de citocinas pelos macrófagos dos jumentos. No entanto, outros fatores que afetam a resposta imune podem estar associados a maior resistência dessa espécie ao EIAV, como por exemplo, atividade do CTL (Mc Guire et al., 2004; Tagmyer et al., 2007), modulação da resposta imune pelos linfócitos (Zhang et al.; 2007), expressão de genes de Fatores de Restrição Retroviral (FRR) (Zielonka et al., 2009; Zheng et al., 2012; Cook et al., 2013; Simon et al., 2015) e expressão de isoformas do receptor do EIAV ELR-1 (Lin et al.; 2013, Ma et al.; 2014) que ainda não foram avaliados.

Diferenças evolucionárias entre os jumentos e os cavalos podem estar relacionadas às diferenças nas respostas imunes e aparecimento de sinais clínicos de ambos após infecção pelo EIAV, mesmo que as duas espécies sejam suscetíveis à infecção. Estima-se que o último ancestral comum entre a espécie *Equus asinus* e a espécie *Equus caballus* viveu há 4 – 4,5 milhões de anos atrás (Orlando et al., 2013; Vilstrup et al.; 2013). Não se conhece até o momento se tanto genes de FRR quanto o gene do receptor ELR-1 podem ser mais ativos ou expressos em asininos. Exceto a teterina, um dos FRR recém descobertos, e que foi investigada em cavalos e jumentos, demonstrando que ambas possuem ação semelhante anti-EIAV (Yin et al., 2014 a e b). Os PBMCs de equinos expressam cinco tipos de genes A3, da família de proteínas com atividades antirretrovirais, APO β EC3, contudo, investigações adicionais são necessárias para determinar se os genes ativos dessas proteínas são conservados em outras espécies do gênero *Equus* (Zielonka et al., 2009). TRIM- α , diferentemente de outros FRR, normalmente não inibe retrovírus isolado a partir das mesmas espécies hospedeiras (Nisole et al., 2004). Por exemplo, TRIM- α de humano possui pouca atividade contra HIV-1, mas inibe fortemente EIAV e N-MLV; TRIM- α de macacos Rhesus não inibe estirpes de SIV adaptadas em macacos, mas inibe outras estirpes de SIV (Zheng et al., 2012). Para os equídeos, não se sabe até o momento se o EIAV é inerentemente resistente a essa proteína ou se o gene é totalmente funcional (Cook et al., 2013), nem se há diferenças na expressão desse gene entre as espécies de equídeos. Outros estudos com lentiviruses, já determinaram que gatos domésticos são suscetíveis a infecção por FIV originários de pumas e leões, entretanto, apesar do vírus demonstrar replicação no início das infecções, a viremia é controlada e se torna indetectável na maioria dos animais (WoudeVande, et al., 2010). Já foi evidenciado que diferentes espécies de macacos, originários da China e da Índia, apresentam sinais clínicos e progressão de doença com intensidades diferentes após infecções com amostra patogênica de SIV (Tian, et al., 2015). Um trabalho recente demonstrou que em infecções de duas espécies de macacos por SIV (Sooty Mangabeys e Macacos Rhesus), houve menor replicação viral nos macrófagos dos primeiros devido a maior expressão de FRR pelas células infectadas (Mir et al., 2015).

O receptor ELR-1 é o único receptor reconhecido até o momento, associado a entrada do EIAV nas células alvo do hospedeiro (Zhang et al., 2005). A sua isoforma solúvel, ELR-IN, identificada por Lin et al., (2013), inibiu a infecção de células alvo pelo EIAV em infecções *in vitro*. Até o momento não se sabe se o papel dessa isoforma do receptor está mais associado à infectividade viral, ou à resposta do hospedeiro às infecções pelo EIAV. Trabalho subsequente demonstrou que o ELR-IN contribuiu para o desenvolvimento de resistência de macrófagos equinos, pré-infectados com estirpe vacinal adaptada, contra infecções subsequentes com EIAV_{UK3}, enquanto a estirpe patogênica ativou menos a expressão dessa isoforma do receptor

(Ma et al., 2014). Apesar disso, há outros relatos de que a quantidade de ELR1 ligado à membrana não reduz a infecção por EIAV (Brindley, et al., 2008; Lin et al.; 2013).

3.6 CONCLUSÕES

O presente trabalho foi o primeiro estudo que avaliou a expressão de citocinas em infecções *in vitro* de PBMC e macrófagos de jumentos com diferentes estirpes do EIAV, incluindo clones virais bem caracterizados. Nossos resultados, analisados em conjunto, corroboram com as observações de que os jumentos provavelmente não manifestam os sinais clínicos da AIE devido ao fato de não apresentarem os mesmos mecanismos de patogênese até o momento reconhecidos para a espécie equina, caracterizados pela associação entre o aumento de citocinas pró-inflamatórias após infecção com EIAV e o aparecimento de doença, uma vez que as células dos jumentos não apresentaram aumento na expressão da maioria das citocinas avaliadas, e os PBMC dos cavalos tenderam a ter um aumento em TNF- α , IL-6 e IFN- β . É necessário aprofundar os estudos da resposta imune celular de jumentos ao EIAV, realizando comparação com a resposta imune celular de equinos nas mesmas condições experimentais, bem como pesquisar outros fatores relacionados ao hospedeiro, como por exemplo receptores ELR e FRR, que podem contribuir para o aparecimento dos sinais clínicos da AIE e que não estão diretamente ligados a desregulação da expressão de citocinas pelos macrófagos. Assim como, estudos adicionais são necessários para se avaliar, em maior profundidade, o papel da cooperação entre as células do sistema imune inato e adaptativo na indução da resposta imune dos jumentos às infecções pelo EIAV.

4 CONSIDERAÇÕES FINAIS

A AIE é uma importante doença infecciosa que acomete os equídeos, porém amplamente estudada somente na espécie equina. Até os dias de hoje, apenas uma vacina foi utilizada na China em larga escala, na década de 80. Esta vacina foi obtida a partir da passagem de estirpe altamente patogênica em células de jumentos, porém os mecanismos de proteção induzida por essa vacina ainda estão sendo investigados.

A maior parte dos inquéritos sorológicos realizados até o momento, avaliaram a AIE em populações de maioria equina. Já foi evidenciada dificuldades em se realizar o diagnóstico da AIE em muares (burros e mulas) da Itália, e no nosso trabalho, pode-se verificar que o diagnóstico da AIE em jumentos também é mais complexo, com índice de falso negativo em 50 % e alta ocorrência de reação somente contra a proteína p26 no imunoblot. A associação de testes permitiu detectar mais jumentos AIE positivos da região de Mossoró-RN. Jumentos geralmente apresentam menores títulos de anticorpos do que os equinos, para os quais os testes foram desenvolvidos e validados. Acredita-se que possa existir outros retrovírus ainda não identificados ou EIAV antigenicamente distinto que esteja estimulando a reação cruzada com p26 nessa população de jumentos avaliada. Estudos adicionais são necessários para avaliar essas hipóteses.

Foi observada maior desregulação das citocinas TNF- α , IL-6 e IFN- β nos PBMC dos cavalos em relação aos jumentos após infecções com EIAV_{WYO}. Nas infecções posteriores de macrófagos de jumentos com EIAV patogênico e não patogênico, não ocorreu expressão significativa de TNF- α , IL-1 α , IL-6 e TGF- β , resultado que sugere que as células dos jumentos não sofrem desregulação de citocinas após infecções pelo EIAV com mesmo perfil do que já foi estabelecido para os equinos. Esses achados corroboram com os estudos *in vivo* de que os jumentos não apresentam os sinais clínicos da AIE, dos quais foram associados desregulação de citocinas pró-inflamatórias por diversos autores. Porém, estudos adicionais são necessários para determinar se outros fatores relacionados ao hospedeiro, que atuem em conjunto, possam ser responsáveis pela maior resistência natural dos jumentos ao EIAV, como por exemplo, receptor ELR e fator de restrição retroviral.

5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABBAS, A. K.; LICHTMAN, A. H.; PILLAI, S. *Imunologia Celular e Molecular*. 6. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2008.

AKDIS, M.; BURGLER, S.; CRAMERI, R. Interleukins, from 1 to 37, and interferon-g: Receptors, functions, and roles in diseases. *J ALLERGY CLIN IMMUNOL*, v.127, n.3, p.701-721, 2011.

ALMEIDA, V. M. A.; GONÇALVES, V. S. P.; MARTINS, M. F. et al. Anemia infecciosa equina: prevalência em equídeos de serviço em Minas Gerais. *Arq. Bras. Med. Vet. e Zoo.*, v.58, p.141-148, 2006.

ALTFELD, M.; GALE, M. Innate immunity against HIV-1 infection 16. *Nat. Immunol.*; v. 16, n. 6, p. 554 – 562, 2015.

AMILL, V. R.; KUMAR, R.; NOEL, R. J. et al. Short Communication: Lack of Immune Response in Rapid Progressor Morphine-Dependent and SIV/SHIV-Infected Rhesus Macaques Is Correlated with Downregulation of TH1 Cytokines. *AIDS Res. And Hum. Retrov.*; v. 26, n. 8, p. 919 – 922, 2010.

APPLIED BIOSYSTEMS, User Bulletin #2. ABI PRISM 7700 Sequence Detection System. Disponível em: <http://www3.appliedbiosystems.com/cms/groups/mcb_support/documents/generaldocuments/cms_040980.pdf> . Acesso em: Julho de 2015.

BENTON, C.V.; BROWN, B.L. HARSHMAN, J.S. et al. In vitro host range of equine infectious anemia virus. *Intervirology* 16, 225-232, 1981.

BLANCO-MELO, D.; VENKATESH, S.; BIENIASZ, P.D. Intrinsic cellular defenses against human immunodeficiency viruses. *Immunity*, v.37, p.399-411, 2012.

BOLFA, P. F.; LEROUX, C.; PINTEA, A. et al. Oxidant-antioxidant imbalance in horses infected with equine infectious anaemia virus. *Vet*, v.192, n.3, p.449–54, 2012.

BOLFA, P. F.; NOLF, M.; CADORE, J. L. et al. Interstitial lung disease associated with Equine Infectious Anemia Virus infection in horses. *Vet Res*, v. 44, n.113, 2013.

BOLFA, P.; BARBUCEANU, F. LEAU, S.-E et al. Equine infectious anaemia in Europe: Time to re-examine the efficacy of monitoring and control protocols? *Equine Veterinary Journal*, p. 1-3, 2015.

BORGERD, H. P.; TALLMADGE, R. L.; OAKS, J. L. et al. Equine infectious anemia virus resists the antiretroviral activity of equine APOBEC3 proteins through a packaging-independent mechanism. *J. of Virology*, v. 82, p. 11889 – 11901, 2008.

BORGES, A. M.; SILVA, L. G.; NOGUEIRA, M. F. et al. Prevalence and risk factors for Equine Infectious Anemia in Pocone municipality, northern Brazilian Pantanal. *Research in veterinary science*, 95(1):76-81, 2013.

BOUILLANT A. M.; NIELSEN, K.; RUCKERBAUER, G. M. et al. The persistent infection of a canine thymus cell line by equine infectious anaemia virus and preliminary data on the production of viral antigens, *J. Virol. Methods*, v.13, p. 309–321, 1986.

BRASIL. Instrução Normativa Nº 45, de 15 de junho de 2004. Aprova as normas para a prevenção e o controle da anemia infecciosa equina – AIE. *Diário oficial da República Federativa do Brasil, Secretaria de Defesa Agropecuária*, Brasília, DF 07 jul. 2004. Seção 1, p. 7-9.

BRASIL. Portaria Nº 378, de 17 de dezembro de 2014. Anexo – Normas para credenciamento e monitoramento de laboratórios de diagnóstico de anemia infecciosa equina. *Diário oficial da República Federativa do Brasil, Secretaria de Defesa Agropecuária*, Brasília, DF 19 dez. 2014. Seção 1, p. 136.

BRINDLEY, M. A.; ZHANG, B.; MONTELARO, R. C.; MAURY, M. Na Equine infectious anemia virus variant superinfects cells through novel receptor interactions. *J. Virol*, v. 82, p. 9425 – 9432, 2008.

BUAINAIN, M. Era uma vez... o jumento. Natal: EDUFRN; 80p.; 2014.

BURGLER, S.; CRAMERI, R.; EIWEGGER, T. et al. Current perspectives Interleukins , from 1 to 37 , and interferon- g : Receptors , functions , and roles in diseases. *J. ALLERGY. CLIN. IMMUNO.*; v. 127, n. 3, p. 701 - 721, 2011.

BURK, J.; BADYLAK, S.F.; KELLY, J. et al. Equine Cellular Therapy22From Stall to Bench to Bedside? *Cytometry*, v. 83A, p.103-113, 2013.

CAPPELLI, K.; CAPOMACCIO, S.; COOK, R.F. et al. Molecular detection, Epidemiology, and genetic characterization of novel European field isolates of Equine Infectious Anemia Virus. *L. Clin. Microbiol.* V.49, n.1, p.27-33, 2011.

CARPENTER, S.; CHESEBRO, B. Change in host cell tropism associated with in vitro replication of equine infectious anemia virus, *J. Virol.* v.63, p.2492–2496, 1989.

CAVARARO, R. *Produção da Pecuária Municipal.* v. 40. Rio de Janeiro: Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística - IBGE; 2013.

CLEMENTS, J. E.; GABUZDA, D. H.; GDOVIN, S. L. Cell type specific and viral regulation of visna virus gene expression, *Virus Res.* v.16, p.175–183, 1990.

COGGINS, L.; NORCROSS, N. L. Immunodiffusion reaction in equine infectious anemia. *Cornell Vet*, n.60, p.330, 1970.

COGGINS, L.; NORCROSS, N. L.; NUSBAUM S. R. Diagnosis of equine infectious anemia by immunodiffusion test. *American Journal of Veterinary Research*, v.33, n.1, p.11-18, 1972.

COOK, R. F.; BERGER, S. L.; RUSHLOW, K. E. et al. Enhanced Sensitivity to Neutralizing Antibodies in a Variant of Equine Infectious Anemia Virus Is Linked to Amino Acid Substitutions in the Surface Unit Envelope Glycoprotein. *J. of Virology*, v. 69, n. 3, p. 1493 – 1499, 1995.

COOK, R. F.; LEROUX, C.; COOK, S. J. et al. Development and Characterization of an In Vivo Pathogenic Molecular Clone of Equine Infectious Anemia Virus. *Journal of Virology.* v.72, n.2, p.1383-1393. 1998.

COOK, S. J.; COOK, R. F.; MONTELARO, R. C.; ISSEL, C. J. Differential responses of *Equus caballus* and *Equus asinus* to infection with two pathogenic strains of equine infectious anemia virus. *Vet. Microbiol.*; v.79, n.2, p.93-109, 2001.

COOK, R. F.; COOK, S. J.; Li, F. et al. Development of a multiplex real-time reverse transcriptase-polymerase chain reaction for equine infectious anemia virus (EIAV). *J. Virol Meth.*; v.105, p.171-179, 2002.

COOK, R. F.; COOK, S. J.; BERGER, S. L. et al. Enhancement of equine infectious anemia virus virulence by identification and removal of suboptimal nucleotides. *Virology*, n. 313, p. 588-603, 2003.

COOK, R. F.; COOK S. J.; ISSEL, C. J. Infectious diseases of the horse: Equine Infectious Anaemia. In: MAIR, T.S. and HUTCHINSON R.E. *Eq. Vet. J. Cambridgeshire*, p. 56-70, 2009.
COOK, R. F.; LEROUX C.; ISSEL, C. J. Equine infectious anemia and equine infectious anemia virus in 2013: A review. *Vet. Microbiol.* v.167 n. 1-2, p.181-204, 2013.

COSTA, L. R.; SANTOS, I. K.; ISSEL, C. J. et al. Tumor necrosis factor-alpha production and disease severity after immunization with enriched major core protein (p26) and/ or infection with equine infectious anemia virus. *Vet Immunol Immunopathol*, v.57, n. 1-2, p.33-47, 1997.

COVALEDA, L.; FULLER, F. J.; PAYNE, S. L. EIAV S2 enhances pro-inflammatory cytokine response in infected macrophages. *Virology*, v. 397, p. 217 – 223, 2010.

CRAIGO, J. K.; MONTELARO, R. C. Lessons in AIDS vaccine development learned from studies of equine infectious, anemia virus infection and immunity. *Viruses*, v. 5, n. 12, p. 2963–2976, 2013.

CRAIGO, J. K.; DURKIN, S.; STURGEON, T. J. et al. Immune suppression of challenged vaccinates as a rigorous assessment of sterile protection by lentiviral vaccines. *Vaccine*, v.25, n.5, p.834–45, 2007.

CULLINANE, A.; QUINLIVAN, M.; NELLY, M. et al. Diagnosis of equine infectious anaemia during the 2006 outbreak in Ireland. *Vet. Rec.*; v.161, p. 647-652, 2007.

DESROSIERS, R. C. Nonhuman lentiviruses. In: Knipe, D.M.; Howley, P.M. (Eds.), *Fields Virology*, vol. 2. Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, p. 2215, 2007.

DONEHOWER, L. A.; BOHANNON, R. C.; FORD, R. J. et al. The use of primers from highly conserved *pol* regions to identify uncharacterized retroviruses by the polymerase chain reaction. *J. Virol Meth.*; v.28, p.33-46, 1990.

DONG, J. B.; ZHU, W, COOK, R. F. et al. Development of a nested PCR assay to detect equine infectious anemia proviral DNA from peripheral blood of naturally infected horses. *Arch. Virol.*; v.157, n.11, p.2105-2111, 2012.

DURÁN, M.C.; WILLENBROCK, S.; CARLSON, R. et al. Enhanced protocol for CD14+ cell enrichment from equine peripheral blood via anti-human CD14 mAb and automated magnetic activated cell sorting. *Equine Veterinary Journal*, v. 45, p. 249–253, 2013.

ELJAAFARI, A.; DUPERRIER, K.; MAZET, S. et al. Generation of Stable Monocyte-Derived Dendritic Cells in the Presence of High Concentrations of Homologous or Autologous Serum: Influence of Extra-Cellular pH. *Human Immunology*, v.59, p. 625–634, 1998.

ESSER, R.; GIENKE, W.; BRIESEN, H. V. et al. Differential Regulation of Proinflammatory and Hematopoietic Cytokines in Human Macrophages After Infection With Human Immunodeficiency Virus. *Blood*, v.88, n.9, p.3474-3481, 1996.

FELLI, N.; PEDINI, F.; ZEUNER, A.; et al. Multiple members of the TNF superfamily contribute to IFN-gamma-mediated inhibition of erythropoiesis. *J. of Immunol.*; v. 175, p. 1464 – 1472, 2005.

FIDALGO-CARVALHO, I.; CRAIGO, J.; BARNES, S. et al. CHARACTERIZATION OF AN EQUINE MACROPHAGE CELL LINE: APPLICATION TO STUDIES OF EIAV INFECTION. *Vet Microbiol.*, v.14; n. 136 (1-2), p.8–19, 2009.

FOIL, L. D; ADAMS, W. V; MCMANUS, J. M.; ISSEL, C. J. Bloodmeal residues on mouthparts of *Tabanus fuscicostatus* (Diptera: Tabanidae) and the potential for mechanical transmission of pathogens. *Journal of Medical Entomology*, 24(6):613-616, 1987.

FREITAS, N.; OLIVEIRA, C.M.C.; LEITE, RC.; et al. Equine infectious anemia on Marajo Island at the mouth of the Amazon river. *Pesq. Vet. Bras.* 35(12):947-950, dezembro 2015.

FUTAS, J.; HORIN, P. Natural Killer Cell Receptor Genes in the Family *Equidae*: not only Ly49. *Plos One*, v.8, n.5, 2013.

GADIENT, R. A.; PATTERSON, P. H. Leukemia inhibitory factor, interleukin 6, and other cytokines using the GP130 transducing receptor: roles in inflammation and injury. *Stem Cells* 17, 127, 1999.

GEISLER, R. G.; OTTMANN, O. G.; EDER, M. et al. Effect of recombinant human transforming growth factor beta and tumor necrosis factor alpha on bone marrow progenitor cells of HIV-infected persons. *Ann. Hematol.* 62, 151, 1991.

GEISSMANN, F.; MANZ, M. G.; JUNG, S. et al. Development of Monocytes, Macrophages, and Dendritic Cells. *Science* 327, 656 -661, 2010.

GELMAN, I. H.; ZHANG, A.; HAILMAN, E. et al. Identification and evaluation of new primer sets for the detection of lentivirus proviral DNA. *AIDS Res. Hum. Retroviruses*, v.8, n.12, p.1981-1989, 1992.

GENDELMAN, H. E.; NARAYAN, O.; KENNEDY- STOSKOP, F. S. et al. Tropism of sheep lentiviruses for monocytes: susceptibility to infection and virus gene expression increase during maturation of monocyte to macrophages, *J. Virol.* n.58, p. 67–74, 1986.

GENESCA, M.; MA, Z. M.; WANG, Y. et al. Live-Attenuated Lentivirus Immunization Modulates Innate Immunity and Inflammation while Protecting Rhesus Macaques from Vaginal Simian Immunodeficiency Virus Challenge. *J. of Virology*, v. 86, n. 17, p. 9188 – 9200, 2012.

HAASE, A. T. Pathogenesis of lentivirus infections, *Nature*, v.322, p.130–136, 1986.

HAMMOND, S. A.; COOK, S. J.; LICHTENSTEIN, D. L. et al. Maturation of the Cellular Anemia Virus Is a Complex and Lengthy Process. *Journal of Virology*. v.71, n.5, p.3840-3852, 1997.

HAMMOND, S. A.; COOK, S. J.; FALO, L. D. et al. A Particulate Viral Protein Vaccine Reduces Viral Load and Delays Progression to Disease in Immunized Ponies Challenged with Equine Infectious Anemia Virus. *Virology*. n.254, p.37-49, 1999.

HAMMOND, S. A.; RAABE, M. L.; ISSEL, C. J. et al. Evaluation of antibody Parameters as Potential Correlates of Protection or Enhancement by Experimental Vaccines to Equine Infectious Anemia Virus. *Virology*. n.262, p.416-430. 1999.

HAMMOND, S. A.; LI, F.; MCKEON, B.M. et al. Immune Responses and Viral Replication in Long-Term Inapparent Carrier Ponies Inoculated with Equine Infectious Anemia Virus. *Journal of Virology*, v. 74, n. 13, p. 5968-5981, 2000.

HARROLD, S. M.; COOK, S.; COOK, F. 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. *Journal of Virology*, v.74, n.7, p. 3112-3121, 2000.

HENSON, J. B.; MCGUIRE, T. C. Immunopathology of equine infectious anemia. *Am J Clin Pathol*, v.56, n.3, p.306–13, 1971.

HIERHOLZER, J.C.; KILLINGTON, R.A. *Virology Methods Manual: Virus isolation and quantitation*. Cambridge: *Academic Press*, 1996, p. 25-46.

HINES, R.; MAURY, W. DH82 cells: a macrophage cell line for the replication and study of equine infectious anemia virus, *J. Virol. Methods* v.95, p.47–56, 2001.

HUGGETT, J.; DHEDA, K.; BUSTIN, S.; ZUMLA, A. Real-time RT-PCR normalisation; strategies and considerations. *Genes and Immunity*, v. 6, p. 279 – 284, 2005.

IBRAHIN, S.; SAUDERS, K; KYDD, J.H. et al. Screening of anti-human leukocyte monoclonal antibodies for reactivity with equine leukocytes. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, n. 119, p. 63–80, 2007.

ISSEL, C. J.; COGGINS, L. Equine infectious anemia: current knowledge. *J. Am. Vet. Med. Ass*, v.174, n.7, p. 727-733, 1979.

ISSEL, C. J; ADAMS, W. V. J. Detection of equine infectious anemia virus in a horse with an equivocal agar gel immunodiffusion test reaction. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, v. 180, n.3, p. 276-278, 1982.

ISSEL, C. J.; FOIL, L. D. Studies on equine infectious anemia virus transmission by insects. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, v. 184, n. 3, p.293-297, 1984.

ISSEL, C. J.; COOK, R. F. A review of techniques for the serologic diagnosis of equine infectious anemia. *J. Vet. Diag. Invest.* v.5, p. 137-141, 1993.

ISSEL, C. J.; COOK, S. J.; COOK, R. F. et al. Optimal paradigms for the serologic diagnosis of equine infectious anemia. *J. Eq. Vet. Sci.*; n.19, v.11, p.728-732, 1999.

ISSEL, C. J.; SCICLUNA, M. T.; COOK, S. J. et al. Challenges and proposed solutions for more accurate serological diagnosis of equine infectious anaemia. *Vet. Rec.*; v. 172 n.8 210, 2012.

ISSEL, C. J.; COOK, R. F.; MEALEY, R. H. et al. Equine Infectious Anemia in 2014: Live with it or eradicate it? *Vet Clin Equine*, v.30, p.561-577, 2014.

ISSEL, C. J.; FOIL, L. D. Equine infectious anaemia and mechanical transmission: man and the wee beasts. *Rev. Sci. Tech. Off. Int. Epiz.*; v. 34, n. 2, p. 513-523, 2015.

JIANG, C. G.; GAO, X.; MA, J. et al. C-terminal truncation of the transmembrane protein of an attenuated lentiviral vaccine alters its *in vitro* but not *in vivo* replication and weakens its potential pathogenicity. *Virus Research*, v. 158, p. 235 – 245, 2011.

JOCHEMS, S. P.; PETITJEAN, G.; KUNKEL, D. et al. Modulation of Type I Interferon-Associated Viral Sensing during Acute Simian Immunodeficiency Virus Infection in African Green Monkeys. *Journal Virology*, v. 86, n. 1, p. 751 – 762, 2015.

KABITHE, S.; HILLEGAS, J.; STOKOL, T. et al. Monoclonal antibodies to equine CD14. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, v. 138, p. 149–153, 2010.

KAMAT, A.; MISRA, V.; CASSOL, E.; ANCUTA, P.; YAN, Z.; LI, C. et al. A plasma biomarker signature of immune activation in HIV patients on antiretroviral therapy. *PLoS One* 2012.

KAWAI, T. e AKIRA, S. The role of pattern-recognition receptors in innate immunity: update on Toll-like receptors. *Nat Immunol*, v.11, n.5, p.373-383, 2010.

KEDZIERSKA, K.; CROWE, S. M. Cytokines and HIV-1: interactions and clinical implications. *Antivir Chem Chemother*, v. 12, p. 133–150, 2001.

KLEVJER-ANDERSON, P.; CHEEVERS, W. P.; CRAWFORD, T. B. Characterization of the infection of equine fibroblasts by equine infectious anemia virus, *Arch. Virol.* v.60, p.279–289, 1979.

KONO, Y.; KOBAYASHI, K. Changes in pathogenicity of equine infectious anemia virus during passages in horse leukocyte cultures. *Natl. Inst. Anim. Health Q.* v.10, p.106–112, 1970.

KONO, Y.; YOSHINO, T. Propagation of equine infectious anemia virus in horse kidney cell cultures, *Natl. Inst. Anim. Health Q.* (Tokyo) 14, 155–162, 1974.

KONO, Y.; HIRASAWA, K.; FURUNAGA, Y. et al. Recrudescence of Equine Infectious Anemia by treatment with immunosuppressive drugs. *Nat. Inst. Anim. Hlth Quart.*; v.16, p. 8-15, 1976.

LECHNER, F.; MACHADO, J.; BERTONI, G. et al. Caprine arthritis encephalitis virus dysregulates the expression of cytokines in macrophages. *J. Virol.* v.71, p.7488, 1997.

LEROUX, C.; CADORE, J. L.; MONTELARO, R. C. Equine Infectious Anemia Virus (EIAV): what has HIV's country cousin got to tell us? *Veterinary research*. v. 35, n.4, p.485-512, 2004.

LI, F.; LEROUX, C.; CRAIGO, J. K. et al. The S2 gene equine infectious anemia virus is a highly conserved determinant of viral replication and virulence properties in experimentally infected ponies. *Journal of Virology*, v. 74, n.1, p. 573-579, 2000.

LI, F.; PUFFER, B. A.; MONTELARO, R. The S2 Gene of Equine Infectious Anemia Virus Is Dispensable for Viral Replication In Vitro. *Journal of Virology*. v.72, n.10. 1998.

LIM, W. S.; PAYNE, S. L.; EDWARDS, J. F.; KIM, I.; AND BALL, J. M. Differential effects of virulent and avirulent equine infectious anemia virus on macrophage cytokine expression. *Virology* 332, 295-306, 2005.

LIN, Y. Z.; CAO, X. Z.; LI, L. et al. The pathogenic and vaccine strains of equine infectious anemia virus differentially induce cytokine and chemokine expression. And apoptosis in macrophages. *Virus Research*, v. 160, p. 274 – 282, 2011.

LIN, Y.Z.; YANG, F.; ZHANG, S.Q. et al. The soluble form of the EIAV receptor encoded by an alternative splicing variant inhibits EIAV infection of target cells. *Plos one*. v.8, n.11, 2013.

LIPPOLD, S.; KNAPP, M.; KUZNETSOVA, T. et al. Discovery of lost diversity of paternal horse lineages using ancient DNA. *Nat. Commun.*; DOI:10.1038/ncomms1447, 2011.

LIU, Q.; MA, J.; WANG, X. F. et al. Infection with equine infectious anemia virus vaccine strain EIAV DLV121 causes no visible histopathological lesions in target organs in association with restricted viral replication and unique cytokine response. *Vet. Immunol. And Immunopathol.*; v. 170, p. 30 – 40, 2016.

LIU, Q.; WANG, X. F.; MA, J. et al. Characterization of Equine Infectious Anemia Virus Integration in the Horse Genome. *Viruses*, v. 7, p. 3241 – 3260, 2015.

MA, J.; CHEN, T.; MANDELIN, J. et al. Regulation of macrophage activation. *CMLS, Cell. Mol. Life Sci.* Vol. 60, 2334–2346, 2003.

MA, J.; WANG, S. S.; LIN, Y. et al. An attenuated EIAV strain and its molecular clone strain differentially induce the expression of Toll-like receptors and type-I interferons in equine monocyte-derived macrophages. *Vet. Microbiol.*; v. 166, p. 263- 269, 2013.

MA, J.; WANG, S. S.; LIN, Y. 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. *Veterinary Research*, v. 45, n.82, 2014.

MALQUIST, W. A.; BARNETT, D.; BECVAR, C. S. Production of equine infectious anemia antigen in a persistently infected cell line, *Arch. Ges. Vir*, v.42, p. 361-370, 1973.

MAURY, W. Monocyte maturation controls expression of equine infectious anemia virus, *J. Virol.* v.68, p.6270–6279, 1994.

MAURY, W. Regulation of Equine Infectious Anemia Virus Expression. *Journal of Biomedical Science.* n.5, p.11-23. 1998. (a)

MAURY, W.; OAKS, J. L.; BRADLEY, S. Equine Endothelial Cells Support Productive Infection of Equine Infectious Anemia Virus. *Journal of Virology.* v.72, n.11, p.9291-9297. 1998. (b)

MC GUIRE, T. C.; CRAWFORD, T. B.; HENSON, J. B. Immunofluorescent localization of equine infectious anemia virus in tissue, *Am. J. Pathol.* v.62, p. 283–294, 1971.

MC GUIRE, T. C.; FRASER, D. C.; MEALEY, R. H. Cytotoxic T lymphocytes in protection against equine infectious anemia virus. *Animal Health Research Reviews*, v.5, n.2, p.271-276, 2004.

MEALEY, R. H.; ZHANG, B.; LEIB, S. R.; LITCKE, M. H & MCGUIRE, T. C. Epitope specificity is critical for high and moderate avidity cytotoxic T lymphocytes associated with control of viral load and clinical disease in horses with equine infectious anemia virus. *Virology*, v.313, p.537-552, 2003.

MEALEY, R. H.; SHARIF, A.; ELLIS, S. A. et al. Early detection of dominant Env-specific and subdominant Gag-specific CD81 lymphocytes in equine infectious anemia virus-infected horses using major histocompatibility complex class I/peptide tetrameric complexes. *Virology*; v.339, n.1, p.110–26, 2005.

MEDZHITOV, R. Toll-like receptors and innate immunity. *Nature Reviews Immunology*, v.1, p. 135-145, November, 2001.

MIR, K.D.; MAVIGNER, M.; WANG, C. et al. Reduced Simian Immunodeficiency Virus Replication in Macrophages of Sooty Mangabeys is Associated with Increased Expression of Host Restriction Factors. *J. Virol*, v.89, n.20, 2015.

MONTELARO, R. C.; BALL, J. M.; RUSHLOW, K. E. Equine retroviruses. In: LEVY (Ed.). *The retroviridae. New York: Plenum Press*, v.2, Cap.5, p.257-359, 1993.

MONTELARO, R. C.; COLE, K. S.; HAMMOND, S. A. Maturation of Immune Responses to Lentivirus Infection: Implications for AIDS Vaccine Development. *AIDS Research and Human Retroviruses*. v.14, s.3, 1998.

MONTELARO, R. C.; PAREKH, B.; ORREGO, A. et al. Antigenic variation during persistent infection by equine infectious anemia virus, a retrovirus, *J. Biol. Chem.*; v.259, p.10539–10544, 1984.

MURPHY, K.; TRAVERS, P.; WALPORT, M. *Imunobiologia de Janeway*. 7.ed. Porto Alegre: Artmed, 2008, 899p.

MURRAY, J. M.; KELLEHER, A. D.; COOPER, D. A. Timing of the Components of the HIV Life Cycle in Productively Infected CD4 T Cells in a Population of HIV-Infected Individuals. *Jornal of Virology*, v. 85, n. 20, p. 10798 – 10805, 2011.

NAGARAJAN, M. M.; Simard, C. Detection of horses infected naturally with equine infectious anemia virus by nested polymerase chain reaction. *J Virol Methods*, v.94 n.1-2p. 97-109, 2001.

NARAYAN, O.; KENNEDY-STOSKOPF, S.; SHEFFER, D.; GRIFFIN, D. E.; CLEMENTS, J. E. Activation of caprine arthritis-encephalitis virus expression during maturation of monocytes to macrophages, *Infect. Immun.* v.41, p.67–73, 1983.

NEIL, S. J.; ZANG, T.; BIENIASZ, P. D. Tetherin inhibits retrovirus release and is antagonized by HIV-1 Vpu. *Nature*, v.451, p.425-430, 2008.

NISOLE, S.; LYNCH, C.; STOYE, J.P. et al. A TRIM5-cyclophilin A fusion protein found in owl monkey kidney cells can restrict HIV-1. *PNAS*, n. 101, p.13324-13328, 2004.

OAKS, J. L.; MCGUIRE, T. C.; ULIBARRI, C. et al. Equine infectious anemia virus is found in tissue macrophages during subclinical infection, *J. Virol.* v.72, p.7263–7269, 1998.

OAKS, J. L.; ULIBARRI, C.; CRAWFORD, T. B.; Endothelial cell infection in vivo by equine infectious anaemia virus, *J. Gen. Virol.* v.80, p.2393– 2397, 1999.

ORLANDO, L.; GINOLHAC, A.; ZHANG, G. et al. Recalibrating *Equus* evolution using the genome sequence of an early Middle Pleistocene horse. *Nature*, v. 499, p.74-80, 2013.

O'ROURKE, K.; PERRYMAN, L. E.; MCGUIRE, T. C. Antiviral, anti-glycoprotein and neutralizing antibodies in foals with equine infectious anaemia virus, *J. Gen. Virol.* v.69, p.667–674, 1988.

PAYNE, S. L.; QI, X.; SHAO, H. et al. Disease Introduction by Virus Derived from Molecular Clones of Equine Infectious Anemia Virus. *Journal of Virology.* v.72, n.1, p.483-487, 1998.

PAYNE, S. L.; RAUSCH, J.; RUSHLOW, K.; MONTELARO, R. C. et al. Characterization of infectious molecular clones of equine infectious anaemia virus, *J. Gen. Virol.* v.75, p.425–429, 1994.

PELUSO, R.; HAASE, A.; STOWRING, L. et al. Trojan Horse mechanism for the spread of visna virus in monocytes, *Virology*, v.147, p.231–236, 1985.

PEREIRA, L. E.; ANSARI, A. A. A case for innate immune effector mechanisms as contributors to disease resistance in SIV-infected sooty mangabeys. *Curr. HIV Res.*; v. 7, p. 12-22, 2009.

PERRYMAN, L. E.; MCGUIRE, T. C.; BANKS, K. L. et al. Decreased C3 levels in a chronic virus infection: equine infectious anemia. *J Immunol*, v.106, n.4, p.1074–8, 1971.

PERRYMAN, L.E.; O'ROURKE, K.I.; MCGUIRE, T.C. Immune responses are required to terminate viremia in equine infectious anemia lentivirus infection. *J Virol*, v. 62, n.8, p.3073–6, 1988.

QUINLIVAN, M.; COOK, R. F.; CULLINANE, A. Real-time quantitative RT-PCR and PCR assays for a novel European field isolate of equine infectious anaemia virus based on sequence determination of the gag gene. *The Veterinary record*, p.160, n.18, p.611-618, 2007.

RAABE, M. R.; ISSEL, C. J.; MONTELARO, R. C. Equine monocyte-derived macrophage cultures and their applications for infectivity and neutralization studies of equine infectious anemia virus. *Journal of Virological Methods.* n.71, p.87-104. 1998.

REED, L. J.; MUENCH, H. A simple method of estimating fifty percent endpoints. *Am J Hyg*, v. 27, p. 493–497, 1938.

REIS, J. K. P.; DINIZ, R. S.; HADDAD, J. P. et al. Recombinant envelope protein (rgp90) ELISA for equine infectious anemia virus provides comparable results to the agar gel immunodiffusion. *J. Virol Meth.*; v. 180, n. 1-2, p. 62-67, 2012.

REIS, J. K. P.; COOK, R. F. Anemia Infecciosa Equina: um problema ainda a ser resolvido. *Revista Vez em Minas. Ano XXIII, v.23, Out./Nov./Dez.*; 2014.

RUSHLOW, K.; OLSEN, K.; STIEGLER, G. et al. Lentivirus genomic organization: the complete nucleotide sequence of the env gene region of equine infectious anemia virus. *Virology*, v.155, p.309-321, 1986.

RUSSELL, K. E.; WALKER, K. M.; MILLER, R. T.; SELLON, D. C. Hyperglobuliemia and lymphocyte subset changes in naturally infected, inapparent carriers of equine infectious anaemia virus. *Amer. J. of Vet. Res.* v.59, 1009, 1998.

RWAMBO, P. M.; ISSEL, C. J.; ADAMS, W. V. et al. Equine infectious anemia virus (EIAV) humoral responses of recipient ponies and antigenic variation during persistent infection. *Arch Virol*, v.111, n. 3–4, p.199–212, 1990.

RWAMBO, P. M.; ISSEL; C. J.; HUSSAIN, K. A. et al. In vitro isolation of a neutralization escape mutant of equine infectious anemia virus (EIAV). *Arch Virol*, v. 111(3–4), 275–80, 1990.

SANG, M.; LIU, J. B.; DAI, M. et al. Toll-like receptor 3 signaling inhibits simian immunodeficiency virus replication in macrophages from rhesus macaques. *Antiviral Research*, v. 112, p. 103 – 112, 2014.

SCICLUNA, M. T.; ISSEL, C. J.; COOK, R. F. et al. Is a diagnostic system based exclusively on agar gel immunodiffusion adequate for controlling the spread of equine infectious anaemia? *Vet. Microbiol.* v. 165, n. 1-2, p.123-34, 2013.

SCOTT, V. L.; BOUDREAUX, C. E. B. S.; LOCKERTT, N. N. M. S. et al. Cytokine Dysregulation in Early- and Late-Term Placentas from Feline Immunodeficiency Virus (FIV)-infected Cats. *Am. J. Reprod. Immunol.*; v. 65, n. 5, p. 480 – 491, 2011.

SELLON, D.C. Equine infectious anemia. *Vet. Clin. N. Am. Equine Practice.*; v.9, n.2, p.321-336, 1993.

SELLON, D.C.; FULLER, F.J.; MCGUIRE, T.C. The immunopathogenesis of equine infectious anemia virus. *Virus Res.* v.32, 111, 1993.

SELLON, D.C.; RUSSELL, K.E.; MONROE, V.L.; et al. Increased interleukin-6 activity in the serum of ponies acutely infected with equine infectious anaemia virus. *Res.Vet. Sci.* v.66, 77, 1998.

SENTSUI, H.; KONO, Y. Phagocytosis of horse erythrocytes treated with equine infectious anemia virus by cultivated horse leukocytes. *Arch Virol*, v.95, n.1-2, p.67-78, 1987.

SHEEHY, A.H.; GADDIS, N.C.; CHOI, J.D. Isolation of a human gene that inhibits HIV-1 infection and is suppressed by the viral Vif protein. *Nature*, v. 418, p.646-650, 2002.

SHEN, R.X. Development and use of an equine infectious anemia Donkey leucocyte attenuated vaccine. *Proceedings of the international symposium on immunity of equine infectious anemia*, 1983.

SHEN, R.; WANG, Z. Development and use of an equine infectious aneamia donkey leukocyte attenuated vaccine. EIAV: a national review of policies, programs, and future objectives. American Quarter Horse Association, Amarillo, pp 135-148, 1985.

SILVA, C. F.; PEQUENO, N. F.; CLEMENTINO, I. J. et al. Frequency of equine infectious anemia in equine in the states of Paraíba, Rio Grande do Norte and Ceará, Northeastern Brazil during 2010. *Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science*, v.50, n.1, p.12-17, 2013.

SIMON, V.; BLOCH, N.; LANDAU, N. R. Intrinsic host restrictions to HIV-1 and mechanisms of viral escape. *Nat Immunol.*; v. 16, n. 6, p. 546 – 553, 2015.

SPYROU, V.; PAPANASTASSOPOULOU, M.; PSYCHAS, V. et al. Equine infectious anemia in mules: virus isolation and pathogenicity studies. *Vet. Microbiol.*; v.95, p.49-59, 2003.

STEINBACH, F.; SAUDERS, K.; KYDD, J.H. et al. Further characterization of cross-reactive anti-human leukocyte mAbs by use of equine leukocyte cell lines EqT8888 and eCAS. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, n. 119, p. 100-105, 2007.

SVENDSEN, E. D.; HADRILL, D. (Ed.). The Professional Handbook of the Donkey. 4. ed. Wiltshire: Whittet Books, 2008. 438p.

SWARDSON, C. J.; KOCIBA, G. J.; PERRYMAN, L. E. Effects of equine infectious anemia virus on hematopoietic progenitors in vitro. *Am. J. Vet. Res.* v. 53, 1176, 1992.

TAGMYER, T.L.; CRAIGO, J.K.; COOK, S.J. et al. Envelope-specific T-helper and cytotoxic T-lymphocyte responses associated with protective immunity to equine infectious anemia virus. *J Gen Virol*, v.88, p. 1324-1336, 2007.

TAYLOR, S. D.; LEIB, S. R.; WU, W. et al. Protective effects of broadly neutralizing immunoglobulin against homologous and heterologous equine infectious anemia virus infection in horses with severe combined immunodeficiency. *J Virol*, v.85, n.13, 6814–8, 2011.

TIAN, R. R.; ZHANG, M. X.; ZHANG, L. T. et al. High immune activation and abnormal expression of cytokines contribute to death of SHIV89.6-infected Chinese rhesus macaques. *Arch. Virol.*; DOI: 10.1007/s00705-015-2455-6, 2015.

TORNQUIST, S. J.; CRAWFORD, T. B. Suppression of megakaryocyte colony growth by plasma from foals infected with equine infectious anemia virus. *Blood*, v.90, n.6, p.2357–63, 1997.

TORNQUIST, S. J.; OAKS, J. L.; CRAWFORD, T. B. Elevation of cytokines associated with the thrombocytopenia of equine infectious anaemia. *J Gen Virol*, v.78, n.10, p.2541–8, 1997.

TUMAS, D. B.; HINES, M. T; PERRYMAN, L. E. et al. Corticosteroid immunosuppression and monoclonal antibody-mediated CD51 T lymphocyte depletion in normal and equine infectious anaemia virus-carrier horses. *J Gen Virol*, v.75, p.959–68, 1994.

VANDEWOUDE, S.; TROYER, J.; POSS, M. Restrictions to cross species transmission of lentiviral infection gleaned from studies of FIV. *Vet Immunol Immunopathol*, v.134, n.1-2, p.1-13, 2010.

VILLINGER, F.; FOLKS, T. M.; LAURO, S.; et al. Immunological and virological studies of natural SIV infection of disease-resistant nonhuman primates. *Immunol Lett* v. 51, p. 59-68, 1996.

VILSTRUP, J. T.; SEGUIN-ORLANDO, A.; STILLER, M. et al. Mitochondrial Phylogenomics of Modern and Ancient Equids. *PlosOne*, v. 8, n.2, 2013.

WEBER, G.; HECK, D.; BARTLETT, R.R. et al. Modulation of effects of Lipopolysaccharide on macrophages by a major outer membrane protein of *Proteus mirabilis* as measure by a chemiluminescence assay. *Infection and Immunity*, v.60, n.3, p.1069-1075, 1992.

WHETTER, L.; ARCHAMBAULT, D.; PERRY, S. et al. Equine infectious anemia virus derived from a molecular clone persistently infects horses, *J. Virol.* v.64, p.5750–5756, 1990.

WILLIAMS, A.; STEFFENS, F.; REINECKE, C. et al. The Th1/Th2/Th17 cytokine profile of HIV-infected individuals: A multivariate cytokinomics approach. *Cytokine*, n. 61, p. 521–526, 2013.

WORLD ORGANIZATION FOR ANIMAL HEALTH (OIE). Equine Infectious Anaemia In: *Manual of Diagnostic Test and Vaccines for Terrestrial Animals (mammals, birds and bees)*. Paris: OIE, 2008. Vol.2. Chapter 2.5.6, p. 866-870.

WORSLEY, C. M.; SUCHARD, M. S.; STEVENS, W. S.; VAN RIE, A.; MURDOCH, D. M. Multi-analyte profiling of ten cytokines in South African HIV-infected patients with immune reconstitution inflammatory syndrome (IRIS). *AIDS Res Ther*, v. 7, n. 36, 2010.

WU, W.; BLYTHE, D. C.; LOYD, H. et al. Decreased Infectivity of a Neutralization-Resistant Equine Infectious Anemia Virus Variant Can Be Overcome by Efficient Cell-to-Cell Spread. *J. Virol.*; v. 85, n. 19, p. 10421 – 10424, 2011.

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*; v.88, n.2, p.1259–70, 2014. (a)

YIN, X.; GUO, M.; GU, Q. et al. Antiviral potency and functional analysis of tetherin orthologues encoded by horse and donkey. *Virology Journal*, v.11, n. 151, 2014. (b)

YOUNG GO, Y; ZHANG, J.; TIMONEY, P.J. et al. Complex Interactions between the Major and Minor Envelope Proteins of Equine Arteritis Virus Determine Its Tropism for Equine CD3⁺ T Lymphocytes and CD14⁺ Monocytes. *Journal of Virology*, v. 84, n.10, p. 4898–4911, 2010.

ZHANG, B.; JIN, S.; JIN, J. et al. A tumor necrosis factor receptor family protein serves as a cellular receptor for the macrophage-tropic equine lentivirus. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, v.102, n.28, p.9918–23, 2005.

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.* v. 82, p. 1204-13, 2008.

ZHENG, Y. Q.; JEANG, K. T.; TOKUNAGA, K. Host restriction factors in retroviral infection: promises in virus-host interaction. *Retrovirology*, v. 9, n. 112, 2012.

ZHENG, Y.H.; SENTSUI, H.; NAKAYA, T. et al. In vivo dynamics of equine infectious anemia viruses emerging during febrile episodes: insertions/duplications at the principal neutralizing domain. *J Virol*, v.71, n.7, 5031–9, 1997.

ZIELONKA, J.; BRAVO, I. G.; MARINO, D. et al. Restriction of equine infectious anemia virus by equine APOBEC3 cytidine deaminases. *Journal of virology*; v.83, p.7547-7559, 2009.

ZIELONKA, J.; MÜNK, C. Cellular Restriction Factors of Feline Immunodeficiency Virus. *Viruses*, v. 3, p. 2005, 2011.

6 ANEXOS

ANEXO 1 – Certificado da Comissão de Ética no uso de animais

	<p>UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS CEUA COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS</p>
<p>CERTIFICADO</p>	
<p>Certificamos que o Protocolo nº. 354 / 2012, relativo ao projeto intitulado "Estudo in vitro da infecção do vírus da anemia infecciosa equina (EIAV) em macrófagos de equinos e asininos", que tem como responsável Jenner Karlisson Pimenta dos Reis, está de acordo com os Princípios Éticos da Experimentação Animal, adotados pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA/UFMG), tendo sido aprovado na reunião de 01/04/2013. Este certificado expira-se em 01/04/2018.</p>	
<p>CERTIFICATE</p>	
<p>We hereby certify that the Protocol nº. 354 / 2012, related to the Project entitled "In vitro studies of macrophages from equines and donkeys infected with equine infectious anemia virus (EIAV)", under the supervision of Jenner Karlisson Pimenta dos Reis, is in agreement with the Ethical Principles in Animal Experimentation, adopted by the Ethics Committee in Animal Experimentation (CEUA/UFMG), and was approved in 01/04/2013. This certificate expires in 01/04/2018.</p>	
<p>FRANCISNETE GRACIANE ARAUJO MARTINS Coordenador(a) da CEUA/UFMG Belo Horizonte, 01/04/2013.</p>	
<p>Atenciosamente.</p>	
<p>Sistema CEUA-UFMG https://www.ufmg.br/bioetica/cetea/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) 3499-4516 – Fax: (31) 3499-4592 www.ufmg.br/bioetica/cetea - cetea@prpq.ufmg.br</p>	

ANEXO 2 – Análise de digestão de clones plasmidiais de EIAV



Figura 1: DNA plasmidial de clones moleculares de EIAV_{UK3} obtidos em midiprep (Colunas 1, 5, 8, 11, 14, 17 e 20) submetidos à digestão enzimática com a enzima Mlu, para gerar fragmentos de 7,9 e 5,1 kb (Colunas 2, 6, 9, 11, 12) e digestão dupla com ECORI e NCOI, para gerar os fragmentos de 9,7 kb e 3,3 kb (Colunas 3, 7, 10, 13, 16, 19, 22). PM: padrão molecular 1 kb plus

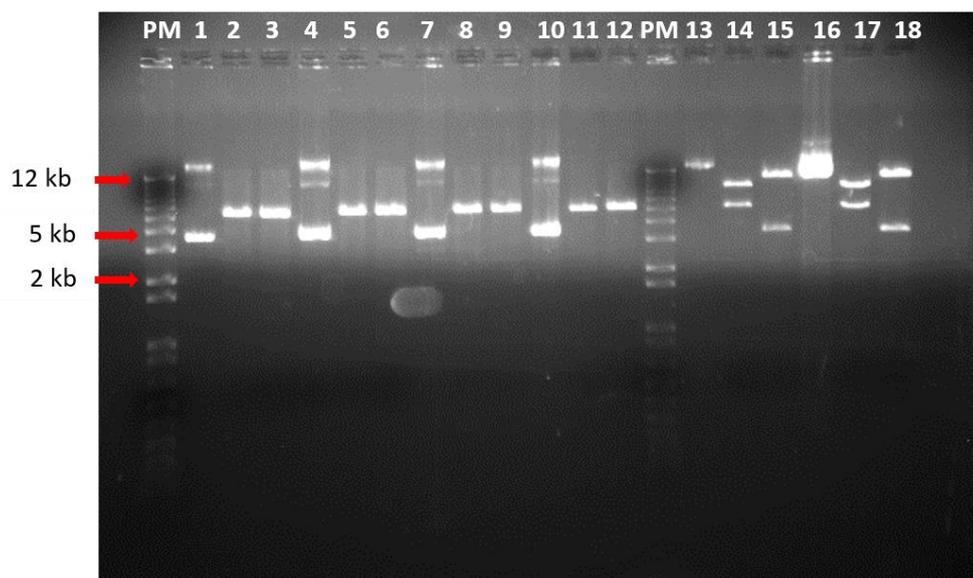


Figura 2: DNA plasmidial dos clones moleculares de EIAV₄₄₋₁ obtidos em midiprep (Colunas 13 e 16) submetidos à digestão enzimática com a enzima Mlu, para gerar fragmentos de 7,9 e 5,1 kb (Colunas 14 e 17) e digestão dupla com ECORI e NCOI, para gerar os fragmentos de 9,7 kb e 3,3 kb (Colunas 15, e 18). As colunas 1, 4, 7 e 10 se referem a DNA plasmidial de clone EIAV_{UK3} obtido em uma primeira bateria de midipred, após crescimento de colônias positivas em meio LB com ampicilina. Colunas 2, 3, 5, 6, 8 e 9 são produtos de digestão enzimática. Esses DNA's foram descartados, uma vez que não foram obtidos os produtos da análise de digestão enzimática. PM: padrão molecular 1 kb plus

ANEXO 3 – Padronização de cultivo de macrófagos

Mauray (1994) e Raab et al., (1998) constituem as duas principais referências para o cultivo primário de macrófagos de equinos, diferenciados a partir de monócitos, para estudos *in vitro* da infecção pelo EIAV. Diversas tentativas, sem sucesso, foram realizadas, baseando o cultivo de macrófagos, a partir e PBMC obtido de sangue periférico, nos protocolos descritos nestas duas referências. O tempo de diferenciação/maturação dos monócitos em macrófagos é de 7 dias, de acordo com ambas referências, no entanto, problemas de reprodutibilidade foram observados, principalmente no que concerne sobre a aderência dos macrófagos diferenciados, após o quinto dia de incubação. As células anteriormente aderidas, se soltavam da superfície das placas de cultivo e apresentavam características morfológicas de células em apoptose, restando poucas células viáveis para os estudos de infecção viral (Tabela 1).

Tabela 1 – Média \pm Desvio Padrão da porcentagem de células viáveis em cultivo de macrófagos a partir de PBMC obtidos a partir de três experimentos independentes

	Dia 0	Dia 6	Dia 7
% células viáveis	90,9 \pm 3,5	45,8 \pm 5,8	7,5 \pm 1,6

Dessa forma, após extensa pesquisa bibliográfica sobre o cultivo de macrófagos a partir da diferenciação de monócitos obtidos de sangue periférico (Tabela 2), foi proposto um novo protocolo utilizando frascos de teflon, com o intuito de aumentar a aderência dos monócitos, nas primeiras horas de incubação do cultivo de PBMC. Também foi proposto realizar as infecções com EIAV após 48-60 h de cultivo das células aderentes, pois estudo demonstraram que esta população de células, após esse tempo de incubação, nas condições adequadas de cultivo, é predominantemente de macrófagos diferenciados (Young Go et al., 2010; Ma et al., 2014).

Tabela 2 - Revisão bibliográfica de protocolos/condições para cultivo de macrófagos a partir de monócitos

Opção	Referência	Espécie	PBMC	Solução de lavagem PBMC	Meio de cultura	SFB (%)	Soro Eq. (%)	Soro autólogo (%)	P/S	Gluta.	HEPES	Aminoácido não essenciais	MCSF	Avaliação das populações celulares	Plástico	Tempo para aderência/cultivo
1	Maury, 1994	Equino	Lymphocyte Separation Medium		DMEM	15	15	-	-	-	-	-	-	Esterase não específica	Frascos e placas com gelatina e fibronectina	40 min/ cultivo por 40 min a 2h
2	Raab et al., 1998	Equino	Ficoll	PBS Ca ²⁺ /Mg ²⁺ free	MEM α	-	10	-	100UI e 100 μ g	Sim, mas não informa a conc.	-	-	-	Avaliada por citospin corado c/ Giemsa	Placa c/ 75 cm ² tratada com colágeno 2% nas primeiras 24 h	24 h/ 7 dias
3	Lim et al., 2005	Equino	Ficoll	PBS (4x)	MEM α + 1mM piruvato de sódio	-	10	-	100UI e 100 μ g	2mM	25 mM	0.1 mM	-	Acetato esterase assay	Garrafas	24 h/ 7 dias
4	Allen et al., 2007	Equino	Ficoll	PBS Ca ²⁺ /Mg ²⁺ free +5% de soro de eq. +1% S/P (4x)	MEM α	-	10	-	Não informa	Não informa	Não informa	-	-	Avaliada por citospin corado c/ Giemsa	Garrafas A25 e Placas de 12 poços c/ Poly D lisina	24 h/ 7 dias
5	Fidalgo-Carvalho et al., 2010	Equino	Ficoll	Hanks Sol. (4x)	DMEM	10	10	-	-	-	-	-	-	MHCII; CD86; CD68, MHCI; ELR-1; NSE; NO; Ativ. De fagócitos	Placa 10 cm	18 h/ 2 a 7 dias

Tabela 2 (continuação) – Resumo de revisão bibliográfica de protocolos/condições para cultivo de macrófagos a partir de monócitos

Opção	Referência	Espécie	PBMC	Solução de lavagem PBMC	Meio de cultura	SFB (%)	Soro Eq. (%)	Soro autólogo (%)	P/S	Gluta.	HEPES	Aminoácido não essenciais	MCSF	Avaliação das populações celulares	Plástico	Tempo para aderência/cultivo
6	Moore et al., 2003	Equino	Ficoll	PBS? (3x) e depois congelou a -80°C c/ 90% SFB e 10% DMSO	RPMI 1640	10	-	-	Sim [?]	2 mM	-	Sim [?]	-	CD3; CD21; MHCII	Placa de 6 poços	2h /4 dias
7	Go et al., 2010	Equino	Ficoll	PBS pH 7.4 (2x)	RPMI 1640 55 µM de 2-mercaptoetanol	10 inativ.	-	-	100 UI de cada	2 mM	-	-	-	CD14 (?); CD3; CD21; CD4; CD8	100 mm tissue dishes (Corning)	4h / 4 dias (cultivou as cels aderentes e as não aderentes)
8	Odemuyia et al., 2012	Equino	Não separa PBMC com gradiente de Ficoll. Seleção com beads a partir de sangue total	-	RPMI 1640	-	-	20	100UI e 100 µg	-	-	-	-	CD14 (clone big 10); CD163; CD206	Placa de 12 poços	4 h/ overnight culture

(continuação) – Resumo de revisão bibliográfica de protocolos/condições para cultivo de macrófagos a partir de monócitos

Opção	Referência	Espécie	PBMC	Solução de lavagem PBMC	Meio de cultura	SFB (%)	Soro Eq. (%)	Soro autólogo (%)	P/S	Gluta.	HEPES	Aminoácido não essenciais	MCSF	Avaliação das populações celulares	Plástico	Tempo para aderência/cultivo
9	Buckner, 2011	Humano	Ficoll e beads para separar os monócitos CD14 ⁺	RPMI (1x) e PBS (1x)	RPMI 1640	5 Inativ.	-	10	1%	-	-	-	10 ng/mL	Cd14; CD19; CD56; CD3	Teflon	Cultivo de 3 a 6 dias. Mantiveram os monócitos CD14 ⁺ que não se aderiram bem em cultivo paralelo
10	Durán, 2013	Equino	Ficoll e beads magnético	PBS (2x)	AIM V Medium até separar as céls CD14 ⁺ . Depois RPMI1640	10 inativ.	-	-	100UI e 100 µg	292 mg/mL	-	-	GM-CSF humano e IL-4 eq. para diferenciar em DCs	CD14 (clone big 10)	Não informa	2 h para aderir e depois seleção das céls CD14 ⁺ a partir das céls eluidas. Cultivo por 4 dias para gerar DCs
11	Ma et al., 2014	Equino	Obtido por sedimentação espontânea do sangue	PBS (2x)	RPMI 1640	40	10	-	100 UI penicilina	2mM	-	-			Placas 24 e 96 poços (Costar. Corning)	24 h para aderência/ 48 h de cultivo em meio com 10 % de soro equino inativado para diferenciar em MØ

ANEXO 4 – Citometria de fluxo para avaliação das populações celulares do cultivo de macrófagos

Para a caracterização das populações celulares do cultivo de macrófagos a partir de PBMC, realizou-se a técnica de citometria de fluxo. No entanto, foram encontradas dificuldades para aquisição de anticorpos com reatividade para marcadores específicos de macrófagos e linfócitos no Brasil. Extensas buscas na literatura foram realizadas (Ibrahim et al. 2007; Steinbach et al., 2007; Fidalgo-Carvalho et al., 2009; Kabithe et al, 2010; Young Go et al., 2010; Burke et al., 2013, Durán et al., 2014), como também testes com anticorpos cedidos por professores do DMVP-EV, e anticorpos adquiridos com recursos do projeto. Sucesso foi conseguido apenas com marcadores para linfócitos (CD3 e CD86). O anticorpo específico para CD14 de equinos (marcador de linhagem monocítica), clone 105, desenvolvido na Universidade de Cornell, EUA, é de acesso restrito, não disponível comercialmente via empresas, não sendo possível colocá-lo em nossos testes (Kabithe et al, 2010). Uma alternativa para a marcação de células na linhagem monócito/macrófago, é utilizar o anticorpo anti CD14 humano (clone Big 10) (Young Go et al., 2010, Durán et al., 2014). Em testes preliminares, a marcação de células de equinos e asininos com o clone Big 10 foi bem-sucedida, no entanto, foi observada algumas interferências nos controles celulares sem marcação do tipo *background*. Dessa forma, foi necessário adquirir reagentes do Citômetro Guava (Merck Millipore) para repetir os testes, reagentes dos quais ainda não foram entregues pelo fornecedor antes da defesa da presente tese, uma vez que os mesmos são importados e possuem um extenso prazo de entrega. A Tabela 1 demonstra todos os anticorpos que foram utilizados na avaliação das populações celulares do cultivo de macrófagos por citometria de fluxo no presente projeto.

Tabela 1 – Anticorpos utilizados para avaliação das populações celulares do cultivo de macrófagos por citometria de fluxo

Epítopo	Fornecedor	Clone	Especificidade	Reatividade com células de equídeos
CD3	Serotec	MCA 1477F	Anti-humano	SIM
CD86	Abcam	Ab42813-500	Anti-humano	SIM
	Serotec	MCA2678F	Anti-bovino	NÃO
	Becton Dickinson	RMC5-3	Anti-mouse	NÃO
	Becton Dickinson	M5E-2	Anti-humano	NÃO
CD14	E-Bioscience	61D3	Anti-humano	NÃO
	ENZO	biG 10	Anti-humano	SIM
	BD Pharmingen	A85-1	Anti-mouse IgG1	Não se aplica
Anticorpo secundário				

ANEXO 5 – Protocolo de lavagem e desinfecção dos frascos de Teflon para cultivo de macrófagos com E-TOXA CLEAN (Sigma)

Primeiramente, os frascos de Teflon eram colocados em solução de detergente alcalino E-TOXA CLEAN (código E9029, Sigma), preparada na concentração de 1%, por 18 a 24 h. Após esse tempo, os frascos eram enxaguados 10 vezes em água destilada e deixados para secar ao ar. Os tubos eram então autoclavados por 15 min a 120°C e pressão de 1 atm.

ANEXO 6 – Obtenção de controles positivos para One Step qRT-PCR EIAV

Foram produzidos plasmídeo e RNA sintético que foram utilizados como controles na OneStep qRT-PCR para quantificação do EIAV desse estudo. Foram desenhados iniciadores para amplificação de um fragmento da região conservada de *gag* do vírus, utilizando o programa Primer3Plus, baseado na sequência de nucleotídeos da estirpe EIAV_{PV} (Tabela 4.1). Os iniciadores desenhados para amplificar 520 pb da região gênica conservada *gag*, foram testados em PCR de gradiente de temperatura (56, 58 e 60°C) e duas concentrações de primer (0,4 e 0,8 µM). A melhor temperatura de anelamento encontrada foi de 56°C e concentração de primer de 0,4 µM. As condições da PCR para amplificar 520 pb da região *gag* ficaram definidas como: 95°C, 2'; 30 ciclos de 95°C, 30''; 56°C, 30''; 72°C, 1'; 72°C, 7'.

Uma alíquota do amplicom purificado foi enviado para sequenciamento no Laboratório de Genética do Departamento de Zootecnia da UFMG. A outra alíquota foi utilizada para fazer ligação em pGEM-T- easy vector (Promega), de acordo com procedimentos do fabricante. Em seguida, foi realizada a transformação de bactérias eletrocompetentes DH5- α (Invitrogen) com o plasmídeo pGEM-T easy vector ligado ao amplicon de 520 pb. Tanto o preparo das bactérias DH5- α , quanto o procedimento de transformação, foram realizados de acordo com o protocolo recomendado pela Bio-Rad (Electroprotocols manual- www.bio-rad.com).

As sequências obtidas foram alinhadas e editadas nos programas Bioedit 7.2.0 e MEGA 5.2, e comparadas com sequências disponíveis no GenBank através do programa BLAST. O resultado do sequenciamento demonstrou que o amplicom correspondia à região de interesse.

Tabela 1 – Sequência dos iniciadores desenhados para gerar o plasmídeo e RNA de EIAV controles para a OneStep qRT-PCR

GENE		Iniciadores (5' – 3')	Amplicon	REFERÊNCIA
gag	F	TTC AGA ACG CAA ATG AGG AA	520	Retrolab e LBM (dados não publicados)
	R	TGT TAC TCC CAC AAA CTG TCC A		

Retrolab: Laboratório de Retrovírus, EV-UFMG; LBM: Laboratório de Biologia Molecular, LANAGRO/MG

Para confirmar se os clones que cresceram no LB ágar com ampicilina continham o plasmídeo pGEM-gag 520, realizou-se miniprep (Promega) seguida de PCR (Tabela 1). A Figura 1 demonstra o gel de agarose com as bandas correspondentes aos clones positivos na PCR.

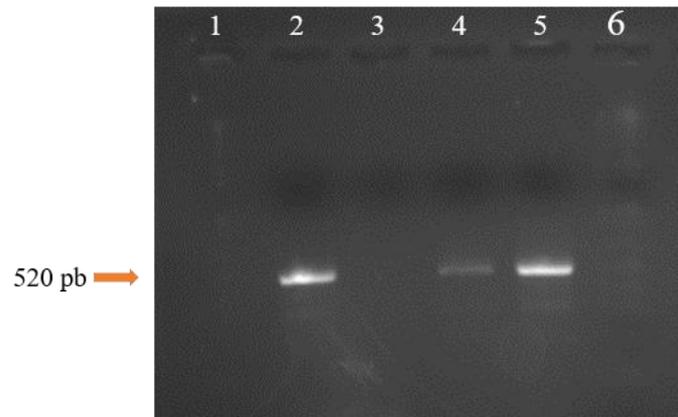


Figura 1: PCR para região gag 520 para confirmação de clones positivos após miniprep de colônias que cresceram em meio LB com ampicilina. **Colunas 1 e 6:** padrão molecular de 1 kb; **Coluna 2:** Controle positivo - DNA plasmidial EIAV_{UK3}; **Coluna 3:** controle negativo água ultrapura. **Colunas 4 e 5:** clones positivos para gag denominados de pGEM-gag 520 A2A e pGEM-gag 520 A2B.

Os clones positivos pGEM-gag 520 foram cultivados em meio LB líquido contendo 10 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ de ampicilina (Sigma), com subsequente realização de midiprep, utilizando o Kit Qiagen Midi Kit (Qiagen, EUA), de acordo com o protocolo para *high copy plasmidis*. Os DNAs plasmidiais obtidos na midiprep foram ressuspendidos em 100 μL de tampão TE pH 8,0 e suas quantificações foram estimadas em 10 ng/ μL em gel de agarose 2% (10 μL de cada amostra de DNA), utilizando como marcador comparativo, 4 μL de Low Mass (Invitrogen). Após quantificação dos produtos das midipreps em gel de agarose 2%, alíquotas de 50 ng do DNA pGEM-gag 520 plasmidial foi submetido a linearização com a enzima PSTI (Invitrogen), de acordo com as recomendações do fabricante (Figura 2). DNAs plasmidiais linearizados foram submetidos ao protocolo de remoção de restos de enzima e tampão com o kit Wizard Clean up System (Promega) e eluídos em 50 μL de água ultrapura. O processo da linearização foi verificado em gel de agarose 1% com uma pequena alíquota do DNA obtido, para posterior procedimento de síntese do RNA.

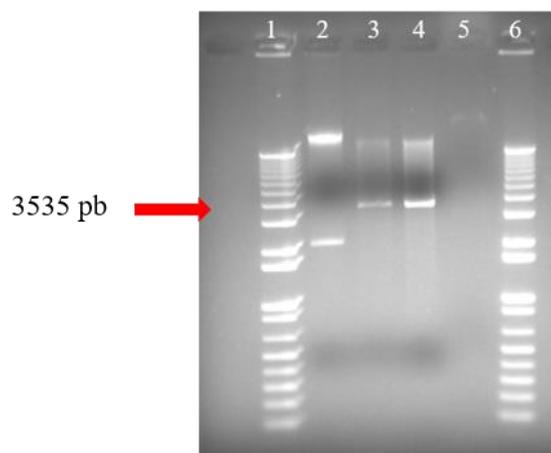


Figura 2 - Gel de agarose 1% para verificação do processo da linearização (4 uL de amostra). **Colunas 1 e 6:** Padrão molecular 1 kb plus; **Coluna 2:** pGEM-gag 520 não linearizado; **Coluna 3:** pGEM-gag 520 linearizado com PSTI; **Coluna 4:** pGEM-gag 520 linearizado e purificado em Clean up; **Coluna 5:** pGEM-gag 520 digerido com ECORI

O RNA foi sintetizado a partir de 100 ng do produto da linearização, duas sínteses em paralelo, utilizando o kit T7 Ribomax Express Large Scale RNA Production System (Promega), de acordo com as recomendações do fabricante. Os RNAs recém-sintetizados foram tratados com DNase (Ambiom), também de acordo com as recomendações do fabricante. Os sobrenadantes contendo os RNAs sintéticos foram purificados em coluna do kit RNeasy mini kit (Qiagen), seguido de quantificação realizada no equipamento Qubit (Thermo Fischer Scientific) – Tabela 2.

Tabela 2 – Quantificação RNA EIAV sintéticos recém obtido no equipamento Qubit

ID RNA recém-sintetizados	Dosagem em ng/uL
RNA EIAV sintético 1	164,10
RNA EIAV sintético 2	63,10

Após a síntese dos RNAs sintéticos para a região *gag* do EIAV, foi realizada uma RT-PCR convencional com Qiagen OneStep RT-PCR kit (Qiagen) e os iniciadores desenhados para o alvo de 520 pb, com a finalidade de verificar se não haveria falha na transcrição reversa dos RNAs obtidos de acordo com as recomendações do fabricante. Na Figura , pode-se observar a imagem gerada pelo equipamento QIAxel (Qiagen), com a corrida eletroforética, por capilaridade, dos produtos da RT-PCR.

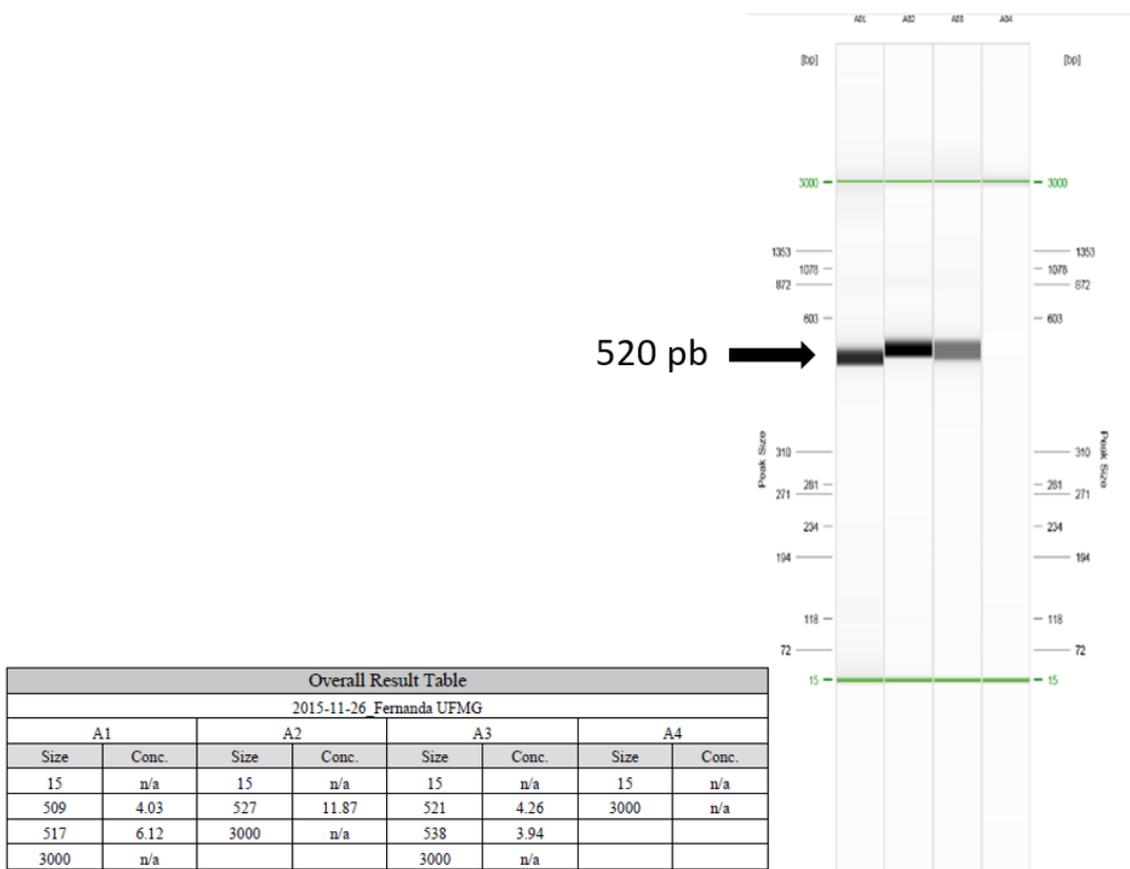


Figura 3: Imagem gerada pelo equipamento Qiaxcel após corrida eletroforética por capilaridade dos produtos da RT-PCR com alvo de 520 pb para teste dos RNA sintéticos para EIAV recém-sintetizados. A1 corresponde a RNA EIAV sintético amostra 1, A2 corresponde a RNA EIAV sintético amostra 2, A3 corresponde ao controle positivo que foi o plasmídeo pGEM-gag 520 e A4 é controle negativo da reação com água ultrapura.

A One Step qRT-PCR em tempo real para o EIAV foi padronizada com o kit Real Time ready RNA vírus Master mix (Roche), segundo as recomendações do fabricante, porém com uma modificação, que foi o acréscimo de 0,6 mM de MgCl₂ na reação e os iniciadores e sonda da (Anexo 2). O equipamento utilizado foi o Rotor Gene (Qiagen), com as seguintes condições de reação: 50°C 8 minutos e 95°C 30s seguido de 40 ciclos de 95°C por 30s e 1 minutos a 60°C. Primeiramente, preparou-se a curva padrão a partir da diluição seriada (log₁₀), 10⁻⁴ até 10⁻⁹, do DNA plasmidial pGEM-gag 520, em triplicata, que estava na concentração inicial de 10 ng/μL, estimada no equipamento Qubit (Thermo Fischer Scientific). Em paralelo, foi realizado o teste de amplificação das amostras de RNA EIAV sintéticos obtidos. A eficiência da reação, com a curva padrão utilizando o DNA plasmidial pGEM-gag520 foi de 95% e r² igual a 0,997. A Figura 4.5A representa as curvas de amplificação da curva padrão do DNA plasmidial e 4.5B a representação esquemática da curva padrão contendo os pontos das diluições em log 10 do DNA plasmidial (azul).

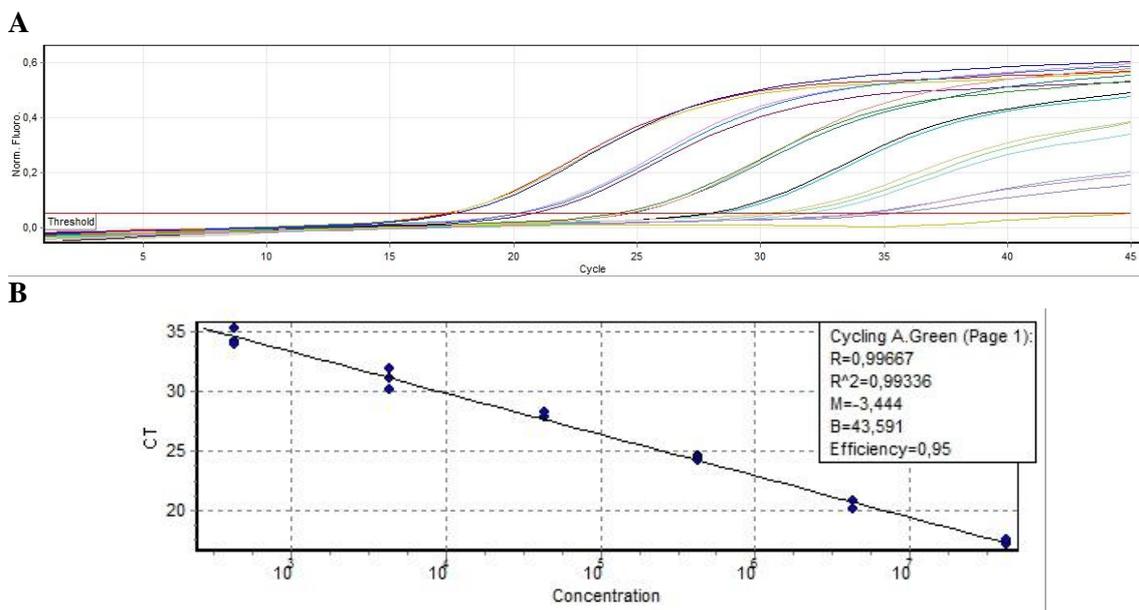


Figura 4: A Curvas de amplificação da curva padrão do DNA plasmidial pGEM-gag520. B Representação esquemática da curva padrão contendo os pontos das diluições em log 10 do DNA plasmidial (azul)

Também foi realizada a avaliação da eficiência da reação da OneStep qRT-PCR em tempo real, utilizando para a construção da curva padrão, o RNA EIAV sintético amostra 2 (Tabela 2), a partir da diluição seriada (\log_{10}), 10^{-3} até 10^{-7} , em triplicata. A eficiência da reação alcançada foi de 106%, com r^2 de 0,981. Em conjunto com o teste anterior, esse resultado demonstra que a One-Step qRT-PCR em tempo real apresentou boa eficiência, transcrevendo e amplificando tanto os RNAs de EIAV sintéticos obtidos quanto dos DNAs plasmidiais pGEM-gag520.

ANEXO 7 – Fotos de géis de agarose 1,5% correspondentes aos resultados que estão resumidos na Tabela 5 do item 3.4.2.1

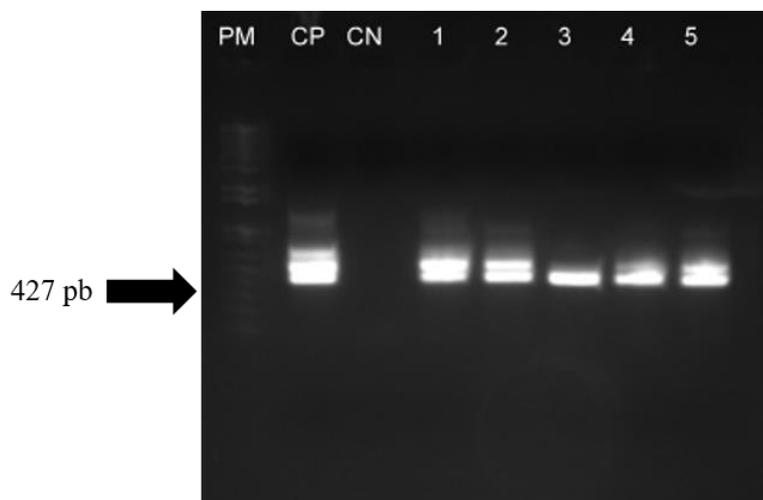


Figura 1: Avaliação da infectividade de PBMCs de cavalos e jumentos após infecção com EIAV_{WYO} por Nested PCR para região gag do EIAV (Oaks et al., 1998) **PM:** padrão molecular de 1kb. **CP:** Controle positivo – DNA plasmidial EIAV_{UK3} **CN:** controle negativo - água ultrapura. **Colunas 2 e 4:** cultivo de PBMC dos jumentos 1 e 2 (J1 e J2) positivos 24 hpi com EIAV_{WYO}. **Coluna 3:** cultivo de PBMC do jumento 3 (J3) positivo 96 hpi com EIAV_{WYO}. **Colunas 1 e 5:** cultivos de PBMC de cavalos 1 e 3 (C1 e C3) 24 hpi com EIAV_{WYO}.

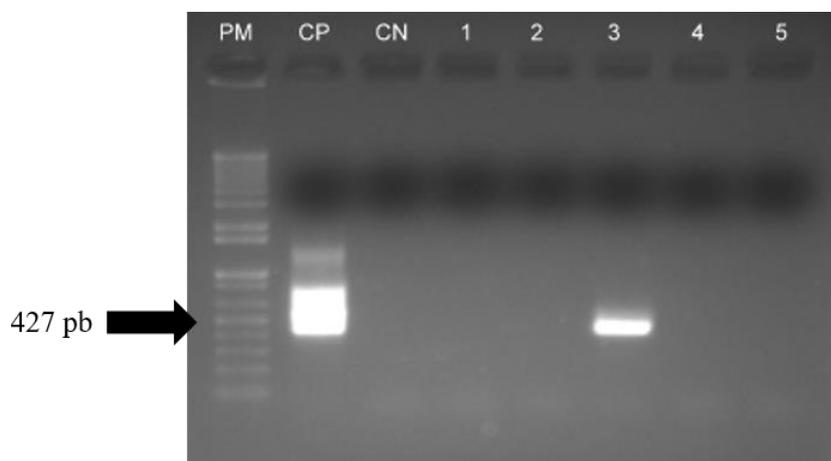


Figura 2: Avaliação da infectividade de PBMCs de cavalos e jumentos após infecção com EIAV_{WYO} por Nested PCR para região gag do EIAV (Oaks et al., 1998) **PM:** padrão molecular de 1kb. **CP:** Controle positivo – DNA plasmidial EIAV_{UK3} **CN:** controle negativo água ultrapura. **Coluna 1:** cultivo de PBMC de jumento 3 (J3) negativo 24 hpi com EIAV_{WYO} e positivo 96 hpi (**Coluna 3**). **Colunas 2, 4 e 5:** cultivo de PBMC de cavalo 2 (C2) negativo 24 hpi e 96 hpi, respectivamente, com EIAV_{WYO}.

ANEXO 8 – Eficiência qRT-PCR para citocinas

Tabela 1 - Médias dos coeficientes de correlação e eficiências de amplificação das qPCR SYBR para citocinas

Citocina	R ²	Eficiência
IL-6	0,998	93,4 %
IL-1 α	0,988	103,2 %
TNF- α	0,991	97,3 %
IL-10	0,987	92,5 %
IFN- β	0,998	98,7 %
GAPDH	0,993	96,6 %

Os resultados apresentados são derivados da diluição dos produtos de amplificação de cada alvo que foram utilizados como template para obtenção das curvas padrões

ANEXO 9 – Nested PCR para pesquisa de EIAV em macrófagos de jumentos experimentalmente infectados

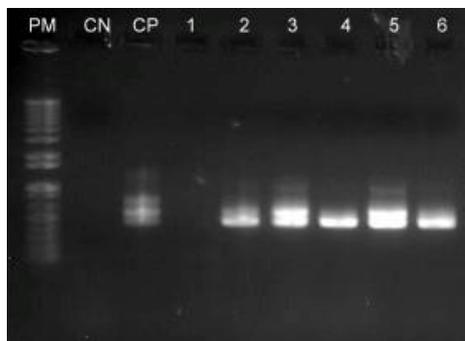


Figura 1: Gel de agarose 1,5% de produtos de Nested PCR para pesquisa de DNA proviral de EIAV em macrófagos de jumentos experimentalmente infectados com EIAV₄₄₋₁ e EIAV_{UK3}. Jumento A: colunas 1, 2 e 3, infecção com EIAV₄₄₋₁ nos tempos 0, 1 e 2 dpi; colunas 4, 5 e 6 infecção com EIAV_{UK3} nos tempos 0, 1 e 2 dpi.

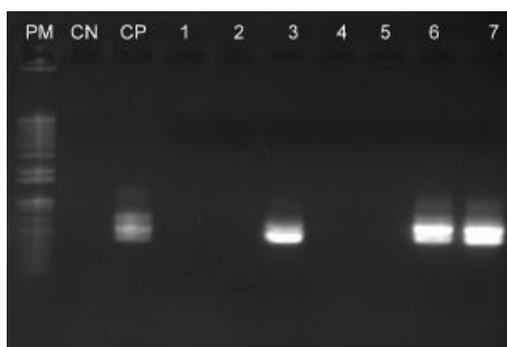


Figura 2: Gel de agarose 1,5% de produtos de Nested PCR para pesquisa de DNA proviral de EIAV em macrófagos de jumentos experimentalmente infectados com EIAV₄₄₋₁ e EIAV_{UK3}. Jumento B: coluna 1, controle células; colunas 2, 3, 4 e 5 infecção com EIAV₄₄₋₁ nos tempos 0, 1, 2 e 3 dpi; colunas 6 e 7 infecção com EIAV_{UK3} nos tempos 0, 1 e 2 dpi

ANEXO 9 (continuação) – Nested PCR para pesquisa de EIAV em macrófagos de jumentos experimentalmente infectados

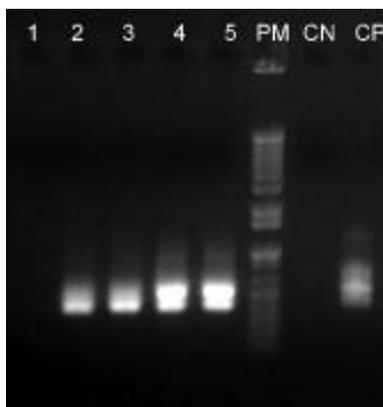


Figura 3: Gel de agarose 1,5% de produtos de Nested PCR para pesquisa de DNA proviral de EIAV em macrófagos de jumentos experimentalmente infectados com EIAV₄₄₋₁ e EIAV_{UK3}. Jumento C: coluna 1, controle células; colunas 2 e 3: infecção com EIAV₄₄₋₁ nos tempos 1 e 2 dpi; colunas 4 e 5: infecção com EIAV_{UK3} nos tempos 1 e 2 dpi.

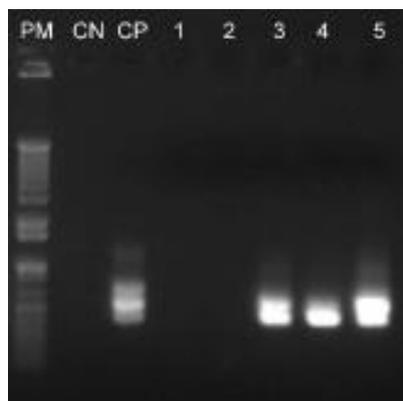


Figura 4: Gel de agarose 1,5% de produtos de Nested PCR para pesquisa de DNA proviral de EIAV em macrófagos de jumentos experimentalmente infectados com EIAV₄₄₋₁ e EIAV_{UK3}. Jumento D: coluna 1, controle células; colunas 2, 3 e 4: infecção com EIAV₄₄₋₁ nos tempos 0, 1 e 2 dpi; colunas 4 e 5: infecção com EIAV_{UK3} nos tempos 0 e 2 dpi.