

**Bruna Lopes Bueno**

**CARACTERIZAÇÃO IMUNO-HISTOQUÍMICA E MOLECULAR  
DE EQUÍDEOS NATURALMENTE INFECTADOS PELO VÍRUS  
DA ANEMIA INFECCIOSA EQUINA**

Trabalho de conclusão apresentado à Escola de Veterinária da Universidade Federal de Minas Gerais como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Ciência Animal, na área de concentração Medicina Veterinária Preventiva.

**Orientador:** Dr. Jenner Karlisson Pimenta dos Reis

**Belo Horizonte – MG  
Escola de Veterinária da UFMG 2019**

B928c Bueno, Bruna Lopes, 1992-  
Caracterização imuno-histoquímica e molecular de equídeos naturalmente infectados pelo vírus da anemia infecciosa equina / Bruna Lopes Bueno. – 2019.  
68 p. : il.

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

1. Equino – Doenças – Teses. 2. Anemia infecciosa equina – Teses. 3. Imunohistoquímica – Teses. I. Reis, Jenner Karlisson Pimenta dos. II. Universidade Federal de Minas Gerais. Escola de Veterinária. III. Título.

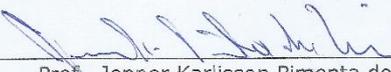
CDD – 636.108 969 2

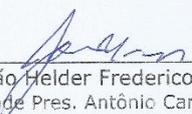
**FOLHA DE APROVAÇÃO**

**BRUNA LOPES BUENO**

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

Aprovada em 08 de Fevereiro de 2019, pela banca constituída pelos membros:

  
\_\_\_\_\_  
Prof. Jenner Karlisson Pimenta dos Reis  
Presidente - Orientador

  
\_\_\_\_\_  
Prof. João Helder Frederico de Farias Naves  
Faculdade Pres. Antônio Carlos - Uberlândia

  
\_\_\_\_\_  
Dr. Izabelle Silva Rehfeld  
Escola de Veterinária - UFMG

**Este trabalho é dedicado aos meus pais, que garantiram  
que eu nunca desistisse.**

## AGRADECIMENTOS

Foram dois longos anos de muita persistência, noites de estudos, fins de semana de experimentos, discussões, aprendizados, choros, risos, derrotas, mas também de muitas vitórias. Chegou o momento de encerrar esse ciclo e dar início a um novo, é hora de olhar para trás, sentir um pouco de orgulho por todo caminho percorrido e de agradecer.

Primeiramente a Deus, que me permitiu viver essa experiência. Nos momentos de total desespero, nunca me desamparou. Obrigado Senhor, pela Tua graça infinita e por todo cuidado.

Aos meus pais Nilson e Luciana, que sempre batalharam comigo, se dedicaram, abdicaram de tempo e de muitos projetos pessoais para que eu tivesse a oportunidade de estudar e de ter uma boa formação profissional. Eu devo tudo o que sou a vocês.

Ao meu irmão Matheus, que me rendeu bons momentos de muitas risadas, mesmo sem entender o que eu faço até hoje.

Ao meu noivo (e futuro marido) Everson, obrigado por toda compreensão, por todo carinho, por ficar feliz em ver meu entusiasmo quando falo de artigos, vírus, doenças, cavalos, filogenia (...) mesmo sem nunca entender nada, por aguentar minhas crises existências acopladas a um mar de ansiedade, meus choros compulsivos e meu mal humor naqueles dias que os experimentos não saíram como eu esperava.

A minha família (avós, tios, primos, sogros, cunhadas e sobrinho de coração) eu agradeço pelo amor incondicional, pela ausência compreendida, pelas palavras de carinho e por cada vitória comemorada (sempre, com muito churrasco). E em especial, a minha prima Dra. Kátia, sou muito grata por todo aprendizado e por tudo que você me ajudou profissionalmente.

As minhas amigas e madrinha queridas, Val, Carol, Day e Amandinha, o presente que a biologia me deixou, agradeço pela paciência de vocês em me ouvir, pelos conselhos recebidos, por entender todas as vezes que eu não aparecia nas festas, bares e baladas e ainda vibrarem pelos rumos que a minha vida tomou.

A célula LINK, obrigado pelo carinho, pelas risadas, pela troca de experiências. Bárbara e Luan, obrigado por me acolherem no meio de vocês quando eu me encontrava totalmente perdida, pelas palavras de conforto, pelos momentos de ensinamento e reflexão.

Ao Laboratório de Retrovírus, ou melhor dizendo, a família *Retrolabiridae*, Beca, Breno, Cláudia, Emília, Fran, Gabriel, Ju, Mari, Priscila, Rapha e Thiago, sou muito grata por todo o ensinamento recebido, por todas as dicas, por toda ajuda nos experimentos, por todas as correções de resumos e artigos, tanto no português, como no inglês (não é, Ju e Rapha). A Rebeca, que passou horas ao meu lado na patologia, me ajudou em inúmeras PCRs, que saía tarde da noite do laboratório para não me deixar sozinha e acima de tudo me deu a Célula LINK de presente.

Agradeço a Fernanda e a Telissa pela paciência em me ensinar as mais diversas técnicas sorológicas e moleculares e pelas dicas que fizeram os experimentos acontecerem. Em especial, obrigado Fernanda por tudo o que você me ensinou sobre a AIE.

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

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

As técnicas da patologia veterinária (Leimar, Valéria e Natália), obrigado por compartilharem comigo o espaço de vocês e os reagentes, por me ensinarem a mexer em um micrótomo, parafinizar um tecido e por todas as gargalhadas que vocês me proporcionaram.

A professora Roselene Ecco e demais membros do laboratório de Patologia Clínica, assim como as professoras Érica, Maria Isabel e aos pesquisadores do LPVA, obrigado por me acolherem no meio de vocês, por todos os ensinamentos, pela abertura da porta de suas salas e laboratórios, empréstimos de reagentes e compartilhamento de experiências.

Agradeço imensamente ao Matheus do laboratório de patologia clínica por todas as dicas, por dividir comigo não só as suas experiências, mas todos os equipamentos necessários, sou muito grata por todas as vezes que você se colocou à disposição em me ajudar, pela paciência em analisar (todas) as minhas lâminas, emblocar meu material e me ensinar um pouquinho sobre o universo da patologia, se não fosse sua ajuda esse trabalho não sairia.

A Mari (do LPVA), agradeço por ouvir os meus desabafos e por torcer para que meus experimentos desse certo.

Ao Professor Sidnei Sakamoto, da Universidade Federal Rural do Semi-Árido (UFERSA), pela parceria e por disponibilizar o material para a execução dos experimentos.

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

*“Suba o primeiro degrau com fé.  
Não é necessário que você veja toda a escada.  
Apenas dê o primeiro passo.”  
(Martin Luther King)*

---

## SUMÁRIO

---

	<b>LISTA DE ABREVIATURAS</b> .....	11
	<b>RESUMO</b> .....	13
	<b>ABSTRACT</b> .....	14
1	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	15
2	<b>OBJETIVO</b> .....	15
3	<b>REVISÃO DE LITERATURA</b>	
3.1.	Origem dos equídeos .....	16
3.2.	Importância dos equídeos .....	17
3.3.	Etiologia da AIE .....	17
3.4.	Replicação Viral .....	19
3.5.	Epidemiologia .....	20
3.6.	Sinais Clínicos .....	21
3.7.	Resposta Imune do Hospedeiro .....	22
3.8.	Patogênese da doença .....	22
3.9.	Diagnóstico da AIE .....	22
3.10.	Normas para trânsito de animais .....	23
3.11.	Tropismo viral .....	25
3.11.	Definição da técnica imuno-histoquímica .....	25
3.12.	Caracterização da técnica imuno-histoquímica .....	26
4	<b>MATERIAL E MÉTODOS</b>	
4.1.	Implicações éticas .....	28
4.2.	Obtenção das amostras .....	28
4.3.	Diagnóstico molecular dos tecidos .....	29
4.4.	Caracterização molecular da estirpe circulante nos animais infectados .....	30
4.5.	Histopatologia .....	30
4.6.	Produção do anticorpo policlonal .....	31
4.7.	Padronização da imuno-citoquímica .....	31
4.8.	Padronização da imuno-histoquímica .....	32
5	<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO</b>	
5.1.	Diagnóstico Molecular dos tecidos .....	32

5.2.	Caracterização molecular da estirpe circulante nos animais infectados .....	34
5.3.	Histopatologia .....	36
5.4.	Padronização da diluição dos reagentes na imuno-citoquímica .....	42
5.5.	Imuno-histoquímica dos animais infectados pelo EIAV .....	43
6	<b>CONCLUSÃO</b> .....	51
7	<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....	51
8	<b>ANEXOS</b> .....	64

---

*LISTA DE TABELAS*

---

Tabela 1	Identificação dos animais quanto a raça, sexo e os resultados dos testes diagnósticos. Informações cedidas pelo grupo de pesquisa coordenado pelo Professor Dr. Sidnei Miyoshi Sakamoto (UFERSA) .....	28
Tabela 2	Iniciadores utilizados da Nested PCR para a região gag do EIAV .....	28
Tabela 3	Iniciadores utilizados da Nested PCR para a região env do EIAV .....	29
Tabela 4	Análise das imunomarcações geradas ao utilizar diluições variadas do anticorpo primário, secundário e as concentrações de DAB 1,5% e 3%, por 2, 4, 6 e 8 minutos .....	41
Tabela 5	Análise das imunomarcações geradas na imuno-histoquímica ao se utilizar diluições variadas do anticorpo primário, secundário e as concentrações de DAB 1%, 1.5% e 2%, por 2, 3 e 4 minutos .....	44

---

*LISTA DE FIGURAS*

---

Figura 1	Árvore filogenética do gênero <i>Equus</i> , com inferência filogenética baseado em máxima verossimilhança (GTR + G + I) e análise bayesiana (GTR + G + I) com 500 bootstraps .....	16
Figura 2	Representação esquemática (A) da partícula do EIAV e (B) das proteínas não estruturais e estruturais do EIAV .....	18
Figura 3	Representação esquemática do ciclo de replicação do EIAV na célula hospedeira .....	19
Figura 4	Cinética do curso clínico da AIE, correlacionando a temperatura corporal, contagem de plaquetas e a carga de RNA viral no plasma durante as fases da doença. ....	21
Figura 5	Fluxograma do protocolo estabelecido pelo Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento (MAPA), para controle e prevenção da AIE em animais destinados a trânsito interestadual .....	24
Figura 6	Desenho esquemático demonstrando a recuperação antigênica realizada em (A) proteínas nativas e em (B) peptídeos in vitro sob ação de fixadores químicos que causam mascaramento dos epítomos .....	27
Figura 7	Ilustração do sistema de detecção por imuno-histoquímica indireta (A) simples e utilizando (B) polímeros .....	28

Figura 8	Confirmação da presença do EIAV nos tecidos do animal .....	33
Figura 9	Confirmação da presença do EIAV no sangue dos animais positivos para AIE .....	34
Figura 10	Relações filogenéticas entre sequências env do EIAV isolado dos animais positivos para AIE .....	35
Figura 11	Histopatologia do baço .....	38
Figura 12	Histopatologia do fígado .....	39
Figura 13	Histopatologia do pulmão .....	40
Figura 14	Histopatologia do rim .....	41
Figura 15	Presença de marcações intracitoplasmáticas nas células ED infectadas com o EIAV, após a imuno-citoquímica .....	43
Figura 16	Marcações imuno-histoquímicas encontradas no baço .....	45
Figura 17	Marcações imuno-histoquímicas encontradas no fígado .....	46
Figura 18	Marcações imuno-histoquímicas encontradas no pulmão .....	47
Figura 19	Marcações imuno-histoquímicas encontradas no rim .....	48

---

*LISTA DE ANEXOS*

---

Anexo 1	Ofício circular 001/17, emitido pelo CEUA/UFMG, sobre a manipulação de animais não vivos .....	64
Anexo 2	Documento de doação das amostras .....	66
Anexo 3	Fluxograma demonstrando o destino dos fragmentos coletados .....	67
Anexo 4	Resumo das lesões histopatológicas em cada animal positivo para AIE .....	68

## LISTA DE ABREVIATURAS

AIDS: Síndrome da imunodeficiência adquirida  
AIE: Anemia infecciosa equina  
AP: Fosfatase alcalina  
BALT: Tecido linfoide associado aos bronquíolos  
CEUA: Comissão de ética no uso de animais  
Csfr11: Receptor de fator de crescimento hematopoiético  
CTL: Linfócitos T citotóxicos  
DAB: 3,3 diaminobenzidina tetrahidroclorato  
EAV: Vírus da arterite equina  
eCT1: Ciclina tipo T1  
ED: Células de derme equina (*equine dermal*)  
EIAV: Vírus da anemia infecciosa equina  
ELISA: Ensaio de imun absorção enzimática  
ELISA rgp45: ELISA com proteína recombinante rgp45  
ELR-1: Receptor de lentivírus equino tipo 1  
ELR-IN: Receptor de lentivírus equino forma solúvel  
EUA: Estados Unidos da América  
FDD: Células de derme de feto de jumento (*fetal donkey derm cells*)  
FEK: Células de rim de feto equino (*fetal equine kidney cells*)  
FIV: Vírus da imunodeficiência felina  
GAPDH: Gliceraldeído -3- fosfato desidrogenase  
H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>: Peróxido de hidrogênio  
HE: Hematoxilina e eosina  
HIV-1: Vírus da imunodeficiência humana tipo 1  
HRP: Peroxidase de rábano silvestre (*Horseradish peroxidase*)  
IDGA: Imunodifusão em gel de ágar  
IgG: Imunoglobulina tipo G  
IgM: Imunoglobulina tipo M  
IHQ: Imuno-histoquímica

IL6: Interleucina tipo 6  
JSRV: Retrovírus ovino Jaagsiekte  
MAc: Anticorpos monoclonais  
MAPA: Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento  
ML: Máxima verossimilhança  
MVV: Vírus Maedi-Visna  
nPCR: *Nested* PCR  
ORF: Janela de leitura aberta  
Pac: Anticorpo policlonal  
PBS: Tampão fosfato salino (phosphate buffered saline pH 7.2)  
PCR: Reação em cadeia de polimerase  
PIB: Produto interno bruto  
RN: Rio Grande do Norte  
SIV: Vírus da imunodeficiência símia  
SRLV: Lentivírus de pequenos ruminantes  
SU: Região de superfície  
TCD4: Linfócitos T CD4  
TGF- $\beta$ : fator de crescimento tumoral  
TM: Região de transmembrana  
TNF- $\alpha$ : Fator de necrose tumoral  
UFERSA: Universidade Federal Rural do Semi-Árido  
UFMG: Universidade Federal de Minas Gerais  
USDA: Departamento de Agricultura dos Estados Unidos

## RESUMO

A anemia infecciosa equina (AIE), doença causada pelo vírus da anemia infecciosa equina (*Equine infectious anemia virus* - EIAV), é considerada um obstáculo para o desenvolvimento da equideocultura. O EIAV é transmitido por insetos hematófagos, principalmente da família Tabanidae e também pela forma iatrogênica. A AIE não tem tratamento, nem vacina e a patogênese, assim como a resposta imune do hospedeiro contra o vírus não são totalmente compreendidas. Além disso, o desempenho do diagnóstico laboratorial por testes sorológicos é questionado. Nesse sentido, o método imunohistoquímico tem sido utilizado para aumentar o conhecimento sobre o tropismo e a patogenicidade de vários agentes infecciosos. Portanto, o objetivo deste trabalho foi o desenvolvimento de um ensaio imunohistoquímico para detecção de antígenos virais em tecidos e órgãos de equídeos naturalmente infectados pelo EIAV. Fragmentos de órgãos de equídeos (n = 6) de Apodi - RN, Brasil, diagnosticados como positivos para AIE em testes sorológicos foram fixados em formalina tamponada a 10% e embebidos em parafina histológica. Cortes histológicos foram aderidos em lâminas de vidro polarizadas e a antigenicidade recuperada pelo calor, utilizando tampão citrato (pH = 6). Estas secções foram incubadas com anticorpo policlonal anti-EIAV overnight e, mais tarde, com anticorpo secundário anti-IgG equino conjugado com peroxidase (Sigma - Aldrich) durante 50 minutos. A reação antígeno/anticorpo foi revelada com o kit ImmPACT™ DAB Peroxidase Substrate (Vector Laboratories), contrastado com hematoxilina de Mayer (Sigma-Aldrich). Antígenos do EIAV foram observados na região intracitoplasmática do baço, fígado, rins e células pulmonares. Marcações imunohistoquímicas estavam presentes principalmente na polpa vermelha do baço, uma região com abundância de macrófagos, e nos sinusóides hepáticos, onde as células de Kupffer (macrófagos hepáticos) se encontram. As imunomarcações também estavam presentes no epitélio bronquiolar e no septo alveolar, assim como no epitélio dos túbulos distal e proximal dos rins. A maior quantidade de EIAV foi observada no baço e no fígado, locais normalmente repletos de macrófagos, confirmando o tropismo viral pelos fagócitos mononucleares. No entanto, a presença de EIAV em células epiteliais do pulmão e rim indica que o vírus também pode infectar outros tipos de células além dos macrófagos, possibilitando a eliminação do mesmo na urina e nas secreções oronasais, propiciando novos mecanismos de transmissão que devem ser investigados.

**Palavras-Chave:** Anemia Infecciosa Equina, EIAV, tecido, tropismo, patogenia, imunohistoquímica.

## ABSTRACT

Equine infectious anemia (EIA), a disease caused by *Equine infectious anemia virus* (EIAV), is considered an obstacle to the development of horse industry. EIAV is transmitted by hematophagous insects mainly of the Tabanidae family and also iatrogenically. EIA has no treatment or vaccine and pathogenesis, as well as immune response against the virus are not fully understood. Also, the performance of laboratorial diagnosis by serological tests can be poor or limited. In this sense, the immunohistochemistry method has been used to enhance the knowledge about tropism and pathogenicity of several infectious agentes, such as viruses. Therefore, the objective of this work was the development of an immunohistochemical assay for detection of viral antigens in tissues and organs of naturally EIAV infected equids. Fragments of organs of equids (n=6) from Apodi – RN, Brazil, diagnosed as positive for EIA by serological tests were fixed in 10% buffered formalin and paraffin-embedded. Histological sections were collected on polarized slides and antigenicity recovered by heat, using citrate buffer (pH=6). These sections were incubated with polyclonal antibody overnight, and later, with peroxidase-conjugated secondary antibody (Sigma – Aldrich) for 50 minutes. Antigen/antibody reaction was revealed with the ImmPACT™ DAB Peroxidase Substrate (Vector Laboratories) kit counterstained with hematoxylin (Sigma-Aldrich). EIAV antigens were observed in intracytoplasmic region of spleen, liver, kidneys and lungs cells. Immunohistochemical marks were present mainly in red pulp of the spleen, a region with plenty of macrophages, and in hepatic sinusoids, where Kupffer cells (liver macrophages) lies. In addition, marks were found in bronchiolar epithelium and alveolar septum, as well as in epithelium of distal and proximal tubule of kidneys. The highest amount of EIAV was observed in spleen and liver, sites normally full of macrophages, confirming viral tropism to the mononuclear phagocytes. However, presence of EIAV in epithelial cells of lungs and kidneys indicates that the virus may also infect other types of cells besides macrophages, making possible elimination of virus in urine and in oronasal secretions, and facilitating new transmission mechanisms that must be investigated.

**Keywords:** Equine Infectious Disease, EIAV, tissue, tropism, pathogenesis, immunohistochemistry.

## 1. INTRODUÇÃO

A equideocultura vem sendo nos últimos anos, uma atividade de grande importância no crescimento econômico não só no Brasil, como em vários países do mundo. Devido a isso essa atividade tem estado em constante ascensão. No entanto, um grande entrave que pode limitar seu crescimento são as enfermidades que acometem os equídeos e trazem grandes prejuízos para os criadores (Almeida et al, 2006).

Uma das principais enfermidades que atua como obstáculos ao desenvolvimento e amplificação da equideocultura no mundo é a Anemia Infecciosa Equina (AIE). A AIE é uma doença, de distribuição cosmopolita, transmissível, incurável e de difícil controle, que acomete os equinos (cavalos), asininos (jumentos) e muars (burros e mulas), considerada de notificação obrigatória pela Organização Mundial de Saúde Animal (OIE) (OIE, 2019).

A AIE é causada pelo *Equine infectious anemia virus* (EIAV), um retrovírus classificado dentro do gênero *Lentivirus*. Sua transmissão ocorre através da inoculação do sangue de um animal infectado para um animal sadio, que pode ocorrer de duas formas: através de repastos realizados por vetores mecânicos ou iatrogênica sendo, neste caso, o homem atuando como principal vetor.

O EIAV tem tropismo, *in vivo*, por monócito/macrófago. Nessa linhagem celular foi descrito a presença do *Equine lentivirus receptor* (ELR-1), que está diretamente associado a entrada do vírus na célula do hospedeiro (Lin et al., 2013). Entretanto, estudos recentes demonstraram a presença de material genético e expressão de proteínas virais em células endoteliais do baço, fígado, intestino, pulmões e rins e em células epiteliais bronquiolares e alveolares de cavalos soropositivos para AIE (Oaks et al., 1999; Bolfa et al., 2013), sugerindo que o EIAV possa infectar outras linhagens celulares além dos macrófagos.

No entanto, estudos sobre a patogênese do vírus ainda são restritos devido à falta de sistemas confiáveis de propagação viral *in vitro*, pois o cultivo primário a partir de monócitos e macrófagos, são dificilmente mantidos e estirpes adaptadas em fibroblastos imortalizados não desenvolvem quaisquer efeitos citopáticos (Malquist et al., 1993).

Sabendo que a AIE apresenta elevada importância econômica para a equideocultura, por se tratar de uma doença incurável e que comumente obriga a eutanásia dos equídeos diagnosticados como positivos ou exige estratégias de segregação e monitoramento desses animais (Issel et al., 2014), a compreensão da patogenia do EIAV é essencial para o desenvolvimento de métodos de diagnósticos, vacinas e medicamentos que possam ser utilizados no controle e prevenção da doença.

Neste sentido, os ensaios imuno-histoquímicos vêm sendo amplamente utilizados para esclarecer os tropismos teciduais de agentes infecciosos, durante a progressão da doença. Recentemente, essa técnica foi utilizada para elucidar a patogênese de bactérias como *Clostridium novyi* em pôneis (Davies et al., 2017) e do *Bovine herpesvirus type 5* em bovinos experimentalmente infectados (Cagnini et al., 2015). As principais vantagens do método são o custo baixo, a rapidez em gerar resultados e a alta sensibilidade. Além disso, a detecção de antígenos nos tecidos pode ser associada a alterações histopatológicas, o que permite uma análise espacial com maior precisão (Capper et al., 2011; Guirado et al., 2018).

## 2. OBJETIVOS

Os objetivos desse trabalho foram:

- Caracterizar a estirpe do EIAV circulante nos equídeos naturalmente infectados, com base na região de *env*.
- Padronizar um ensaio imuno-histoquímico para detecção do EIAV nos tecidos dos equídeos diagnosticados como positivos por testes sorológicos.
- Identificar os tecidos-alvo do EIAV em equídeos naturalmente infectados pelo vírus.
- Definir utilizando o método imuno-histoquímico o tropismo celular do EIAV nos órgãos dos animais infectados.

### 3. REVISÃO DE LITERATURA

#### 3.1. Origem dos equídeos

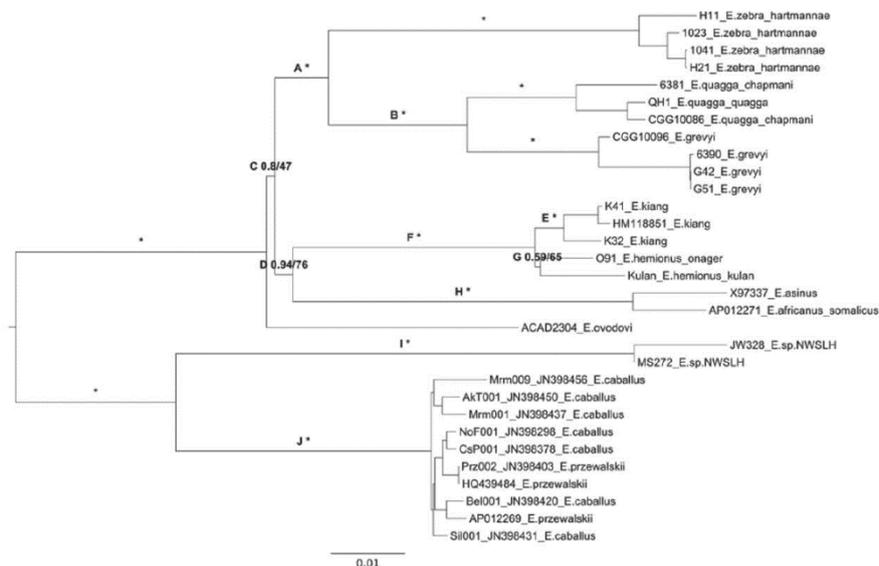
A família Equidae, assim como as famílias Rhinocerotidae e Tapiridae, representados respectivamente pelos rinocerontes e antas, formam um grande grupo de mamíferos terrestres ungulados, classificados na ordem Perissodactyla (Rose et al., 2014)

Os equídeos são ricamente representados no registro fóssil e sua origem foi datada em aproximadamente 55 milhões de anos atrás (MacFadden, 1986; Vilstrup et al, 2013).

Entretanto, durante o Pleistoceno (5 milhões de anos a 10 mil anos atrás), os equídeos experimentaram sucessivos episódios de radiações e extinções, tornando-se adaptado a uma ampla variedade de ambientes com variações notáveis no tamanho corporal (MacFadden, 2005). Nos primeiros 35 milhões de anos atrás, os equídeos eram relativamente pequenos, mas nos últimos 20 mil anos, como resultado da variação climática e domesticação do animal para uso no transporte, foi introduzido uma alimentação variada, que induziu a uma grande diversificação no tamanho do corpo (MacFadden, 1986).

Atualmente, todas as espécies de equídeos existentes são classificadas no gênero *Equus* (Figura 1). Com base nas diferenças morfológicas (MacFadden 2005) e mapeamento completo do DNA mitocondrial de todas as espécies existentes, o gênero *Equus* é separado em três clados distintos, o *Equus ferus* que inclui os cavalos domésticos (*Equus f. caballus*), *Equus quagga* representado pelas zebras (*Equus q. burchellii*) e o *Equus asinus* contendo os jumentos (*Equus a. asinus*) e outras espécies puras relacionadas (Vilstrup et al, 2013).

Estima-se que a origem dos muares seja concomitante ao encontro dos *Equus a. asinus* selvagens com os *Equus f. caballus* selvagens, uma vez que há facilidade de acasalamento devido principalmente à libido e alta fecundidade do jumento, além da passividade da égua para recebê-lo (Miranda et al, 2017). Até hoje, não se sabe qual o tempo exato da origem dos muares, entretanto, o mais antigo fóssil de híbridos equídeos foi datado em 2800 a.C. (Araújo, 2010).



**Figura 1:** Árvore filogenética do gênero *Equus*, com inferência filogenética baseado em máxima verossimilhança (GTR + G + I) e análise bayesiana (GTR + G + I) com 500 bootstraps. \* Corresponde a bootstraps superiores a 1/100. (Fonte: Vilstrup et al, 2013).

### 3.2. Importância dos equídeos

A população mundial de equídeos é de aproximadamente 103 bilhões de animais, onde, 112 milhões estão concentrados em países em desenvolvimento (FAO, 2014). Estima-se que cerca de 600 milhões de pessoas em todo o mundo, utilizam estes animais como meios de subsistência, para fins domésticos e comerciais em uma ampla gama de setores, incluindo agricultura, construção, turismo, mineração e transporte público (Valette, 2015).

No entanto, a importância primária desses animais, está diretamente relacionada a movimentação econômica gerada pela indústria equídea, que envolve desde setores ligados a nutrição e ao desenvolvimento de fármacos, até ao comércio e utilização dos animais para trabalho, cultura, esporte, turismo, entre outros (Lima e Cintra, 2015), tornado a equideocultura um importante componente do agronegócio mundial.

Nos Estados Unidos, o país com a maior população de cavalos do mundo, a indústria de equídeos produz um valor agregado de 34,5 bilhões de dólares por ano, sendo responsável por aproximadamente 445 mil empregos diretos (AHCF, 2017). Na Austrália, a movimentação econômica gerada por essa área corresponde a mais de 6 bilhões de dólares do produto interno bruto (PIB) do país (RIRDC, 2004). A indústria equídea canadense contribui para a economia nacional com mais de 19 bilhões de dólares anuais e suporta mais de 154 mil empregos (Equine Canada, 2011). No continente Europeu, a indústria equídea movimenta mais de 100 bilhões de euros por ano (Orlando, 2015). Já no Brasil, a equideocultura está em fase de crescimento, com um rebanho de aproximadamente 7,5 milhões de animais (IBGE, 2012), o país vem movimentando cerca de R\$ 16,15 bilhões de reais por ano (Lima e Cintra, 2015).

Apesar da importância econômica gerada pelos equídeos no mundo todo, as enfermidades que acometem os animais, atuam como um grande entrave na expansão da equideocultura por trazerem prejuízos aos proprietários e aos criadores interessados na melhoria das raças e impedir o acesso ao mercado internacional (Almeida et al, 2006). Uma das principais enfermidades que atua como obstáculos ao desenvolvimento e amplificação da equideocultura no mundo é a Anemia Infecciosa Equina (AIE). A AIE é uma doença, de distribuição cosmopolita, transmissível, incurável e de difícil controle, que acomete os equinos, asininos (jumentos) e muares (burros e mulas), considerada de notificação obrigatória pela Organização Mundial de Saúde Animal (OIE) (OIE, 2019).

### 3.3. Etiologia da AIE

Os sinais clínicos da AIE foram relatados pela primeira vez em 1843, sendo a primeira doença descrita em equinos, associada à etiologia viral (Valleé & Carré, 1904; Montelaro et al., 1993). A AIE é causada pelo *Equine infectious anemia virus* (EIAV), um retrovírus, classificado dentro da subfamília *Orthoretrovirinae* e do gênero *Lentivirus*.

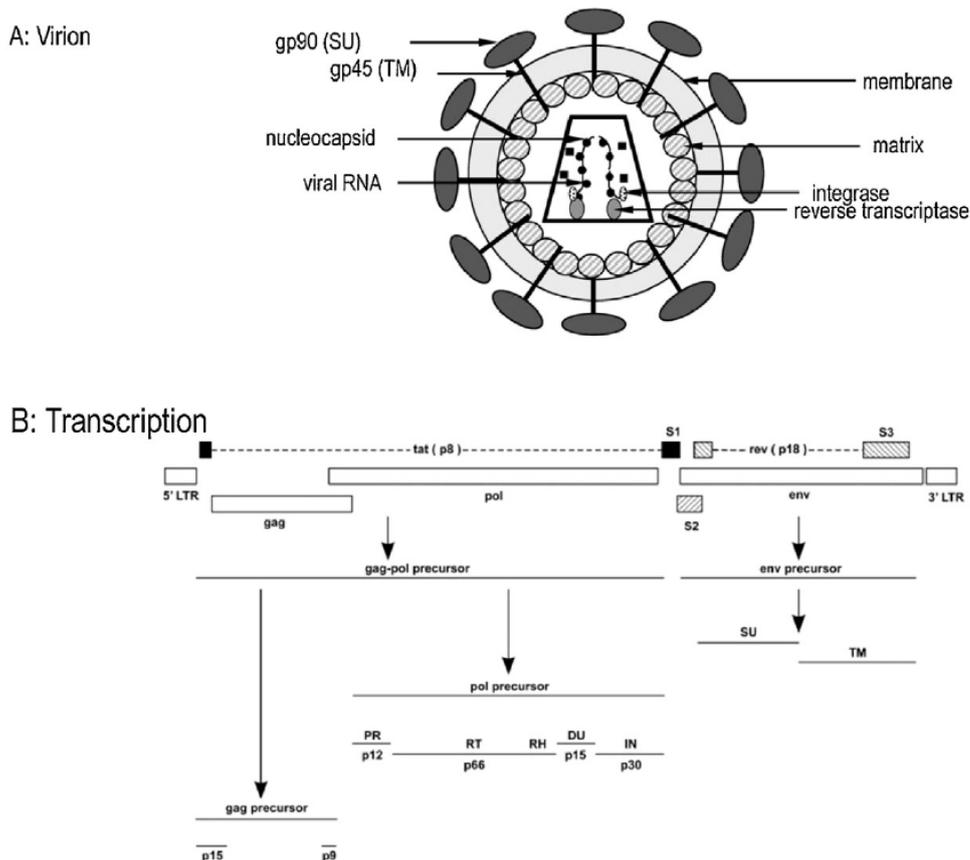
Os equídeos são os únicos membros da ordem *Perissodactyla* susceptíveis ao EIAV, sugerindo que a primeira infecção ocorreu após a sua divergência dos rinocerontes e das antas entre 40 a 55 milhões de anos atrás (Cook et al, 2013).

O EIAV apresenta uma partícula viral cilíndrica com aproximadamente 115nm de diâmetro e um capsídeo icosaedro envolvendo duas cópias não complementares do genoma de RNA (Figura 2A). Após a entrada do vírus na célula do hospedeiro, o genoma viral na forma de RNA sentido positivo, sofre transcrição reversa, mediante a ação da enzima transcriptase reversa, codificada pelo próprio vírus, produzindo DNA de cadeia dupla que se integra ao genoma da célula do hospedeiro, formando provírus (Poltronieri et al., 2015).

O DNA proviral do EIAV possui 8,2 kpb (Dong et al., 2012; Cook et al, 2013), sendo responsável por codificar três proteínas estruturais: *gag*, *pol* e *env*. Os genes *gag* e *pol* são sintetizados a partir de um único quadro de leitura aberto (*ORF*), gerando uma poliproteína, posteriormente clivada em proteínas individuais. O gene *gag* é responsável por codificar as proteínas do core viral p26, p15, p11 e p9; o gene *pol* codifica a transcriptase reversa que atua na síntese de DNA a partir de RNA; a integrase, necessária para a integração do provírus ao genoma do hospedeiro e a protease que é responsável pela clivagem da poliproteína *gag* e *gag-pol*. O gene *env*, codifica as glicoproteínas transmembrana (gp45) e de superfície (gp90), requeridas para a ligação e penetração do vírus na célula hospedeira e que atuam também

como potentes imuno-estimulantes (Li et al., 2005). Inicialmente, o gene *env* é traduzido em uma única poliproteína e subsequentemente é clivado por endoproteínas celulares (Cook et al, 2013).

Além dos genes estruturais, o genoma do vírus codifica três proteínas acessórias: *Tat*, *Rev* e *S2* que desempenham respectivamente funções reguladoras, de proteção do vírus contra as defesas do hospedeiro e aumento da patogenicidade. (Covaleda, et al., 2009). O genoma viral é ainda flanqueado nas extremidades por regiões de repetição (*LTRs*) contendo sequências regulatórias (Cook et al., 2009) (Figura 2B).



**Figura 2:** Representação esquemática (A) da partícula do EIAV e (B) das proteínas não estruturais e estruturais, produzidas a partir de poliproteínas precursoras que são clivadas por protease (Gag / Pol) ou por endoproteínas (SU / TM), assim como a região de repetição terminal longa (LTR). (Fonte: Cook et al., 2013)

Embora o EIAV seja endêmico em todo o mundo, a diversidade e distribuição dos isolados globais são mal caracterizados, e relativamente pouco se sabe sobre a origem e disseminação pandêmica do vírus (Cook et al., 2001; Capomaccio et al., 2012).

Apesar de alguns genomas completos de estirpes do EIAV estarem disponíveis nos bancos de dados de sequências genéticas (GenBank), apenas quatro deles são provenientes de isolados de campo. O EIAV<sub>Liaoning</sub>, isolado na China (nº de acesso no GenBank AF327877) (Tu et al., 2007), o EIAV<sub>Ireland</sub>, isolados na Irlanda (nº de acesso no GenBank JX480631) (Quinlivan et al., 2013), o EIAV<sub>Miyazaki-2011A</sub>, isolado no Japão (nº de acesso no GenBank JX003263) (Dong et al., 2012) e o EIAV<sub>Wyoming</sub>, isolado nos Estados Unidos (nº de acesso no GenBank AF033820) (Petropoulos, 1997).

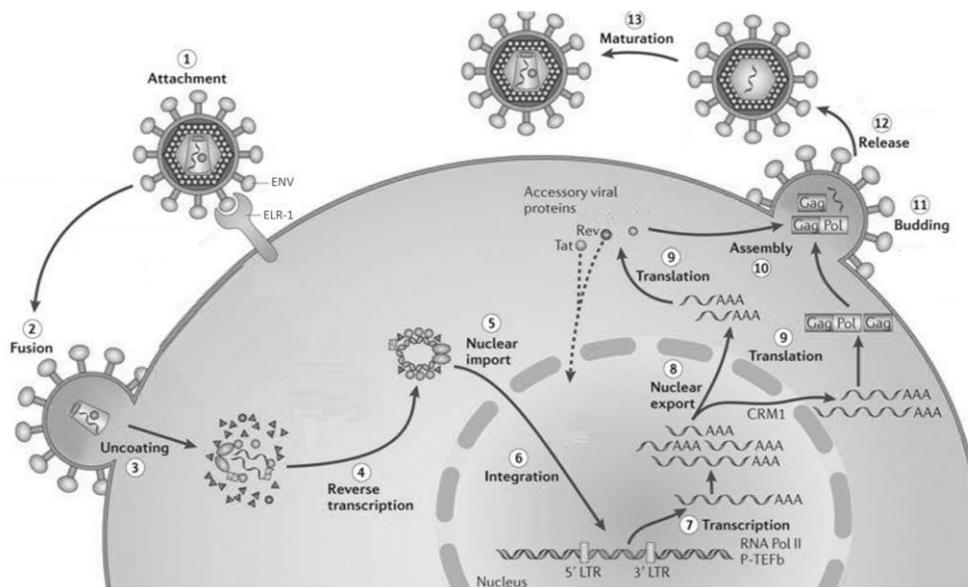
Os estudos envolvendo a caracterização molecular das estirpes do EIAV disponíveis, apontam um grau de identidade entre as sequências de nucleotídeos de  $\geq 80\%$ . Porém, mesmo com um grau de similaridade elevado, as análises filogenéticas agrupam as estirpes em quatro clados monofiléticos distintos,

sugerindo que elas evoluíram independentemente a partir de um ancestral em comum (Liang et al., 2006; Dong et al., 2013; Quinlivan et al., 2013). Entretanto, a maioria dos estudos de caracterização molecular e filogenia são baseados em clones do EIAV<sub>Wyo</sub> adaptados *in vitro* ou *in vivo* e variantes vacinais (Kono et al., 1970; ; Cook et al., 1998; Leib et al., 2000; Leroux et al., 2001; Wang et al., 2016), sugerindo que a epidemiologia molecular do EIAV é provavelmente muito mais complexa do que se pensava.

### 3.4. Replicação viral

A infecção retroviral, inicia-se quando as glicoproteínas de superfície do vírus (SU) são reconhecidas e se ligam aos receptores ELR-1 na superfície das células-alvo (Figura 3, nº 1) (Leroux et al., 2004). Após a ligação, ocorrem mudanças conformacionais tanto no receptor celular como na superfície viral, permitindo a fusão, seguindo do desnudamento do material genético do vírus no citoplasma da célula hospedeira, onde ocorre a síntese de DNA a partir do RNA viral, sob a ação da enzima transcriptase reversa, que vem acoplada ao vírion (Figura 3, nº 2, 3 e 4) (Kuritzkes, 2004). Cerca de 24 horas pós-infecção, o DNA viral é encaminhado para o núcleo celular, onde se integra ao genoma da célula do hospedeiro, formando provírus (Figura 3, nº 5 e 6) (Liu et al., 2016).

Em seguida, o DNA proviral é transcrito pela RNA polimerase II da célula hospedeira, produzindo mRNAs virais de diferentes tamanhos (Figura 3, nº 7). Os mRNAs destinados a síntese das proteínas *Tat*, *Rev* e *S2* são exportados para o citoplasma (Figura 3, nº 8 e 9), onde são traduzidas, a proteína *Tat* retorna ao núcleo celular para regular a transcrição dos demais genes. Enquanto isso, os mRNAs destinados a síntese das poliproteínas estruturais *env* e *gag-pol* por serem moléculas muito grandes, ficam retidas no núcleo celular, sua migração para o citoplasma só é permitida via receptor CRM1, que envolve gasto de energia (Desrosiers, 2007; Musumeci et al., 2015). Para isso, a proteína *Rev* recém-sintetizada, retorna ao núcleo e através do seu domínio rico em arginina se liga ao receptor CRM1, permitindo a liberação dos mRNAs maiores para o citoplasma, onde são traduzidos em proteínas estruturais e atuam na montagem de novas partículas infecciosas (Pollard e Malin, 1998). O RNA genômico é incorporado ao complexo nucleoproteína, produto da transcrição dos genes *gag-pol* e após o fechamento da nucleoproteína, o EIAV é envelopado passando pelo processo de brotamento e maturação, seguido de liberação de novas partículas virais que, após maturação, podem infectar novas células-alvo (Figura 3, nº 10, 11, 12 e 13) (Desrosiers, 2007).



**Figura 3:** Representação esquemática do ciclo de replicação do EIAV na célula hospedeira. Adaptado de Musumeci e colaboradores, (2015).

### 3.5. Epidemiologia

A AIE é considerada uma doença de variável morbidade e mortalidade, uma vez que fatores como: a presença de insetos vetores, a densidade populacional de equídeos, as práticas de manejo e as condições ecológicas ambientais, atuam diretamente na epidemiologia da doença (Richeter, 1999).

O EIAV possui distribuição mundial, mas a sua prevalência é bem variada em diversas regiões do mundo. Como o índice de prevalência da doença é baseado nos resultados dos testes de diagnóstico, que na maioria das vezes é aplicado em animais destinados a comercialização, participação em eventos agropecuários e exposições (Oliveira, 2016), acredita-se que os dados que refletem a presença da AIE no mundo estejam subestimados.

Estudos demonstram que a prevalência média da AIE na América do Sul varia de 2 a 3%. Em algumas fazendas na Argentina e nos haras brasileiros que abrigam equídeos de alto valor zootécnico, esses valores são ainda menores (Reis e Cook, 2014; Almeida et al., 2017).

No entanto, em regiões do Brasil, como o Pantanal Mato-grossense, a Ilha de Marajó, no Pará e o norte do Estado de Minas Gerais, a AIE é considerada endêmica. O último levantamento epidemiológico apontou uma soroprevalência de 38,6% no Pantanal (Nogueira et al., 2017), 24,06% na Ilha de Marajó (Freitas et al., 2015) e 7,4% no norte de Minas Gerais (Almeida et al., 2006). A elevada prevalência da doença nessas regiões é reflexo das condições geoclimáticas dos locais que são favoráveis a sobrevivência dos insetos vetores que propagam o vírus entre os equídeos (Franco e Paes, 2011).

Ao considerar que a AIE é uma doença infecciosa entre os equídeos, Scott (1919), citado por Knowles (1984) sugeriu que os animais diagnosticados como soropositivos fossem imediatamente eutanasiados. Entretanto, em áreas endêmicas como o Pantanal sul mato-grossense, dos animais infectados, cuja maior parte do efetivo são de serviço, inviabilizaria a pecuária extensiva que é a principal atividade econômica da região. Essa realidade levou ao surgimento de um programa de prevenção e controle da AIE, que se baseia na identificação através dos testes de diagnóstico, segregação dos animais positivos dos negativos e monitoramento periódico desses animais por meio de exames sorológicos (Issel e Foil, 1984; Silva et al., 2001).

A transmissão do EIAV ocorre pela inoculação do sangue de um animal infectado em um animal sadio (OIE, 2013). Na natureza, a disseminação do vírus ocorre através dos repastos sanguíneos realizados por vetores mecânicos, especialmente do gênero *Tabanus* (Hamkins, 1976). Para que a transmissão ocorra, a alimentação inicial deve ser interrompida, e a mosca deve encontrar um segundo hospedeiro a menos de 50 metros de distância (Issel e Foil, 1984). Entretanto, o volume de sangue retido no aparelho bucal dos insetos, o tempo necessário para encontrar um segundo hospedeiro e as cargas virais associadas ao sangue do animal infectado são fatores limitantes dessa via de transmissão (Reis e Cook, 2014). Portanto, para que a disseminação do EIAV realizada por vetores mecânicos seja eficiente, é necessário a presença de um hospedeiro inicial com altos títulos virais e um local que possui tanto uma alta densidade de insetos vetores como de equídeos susceptíveis (Cook et al., 2013; Issel et al., 2014).

Contudo, uma outra forma de disseminação viral muito importante ocorre pelo compartilhamento de agulhas, instrumentos cirúrgicos ou acessórios equinos contaminados sendo, nestes casos, o homem atuando como vetor principal. (Mealey, 2007). Esse mecanismo de transmissão, vem sendo associado aos recentes surtos da doença em países onde a ocorrência da AIE era baixa, devido a hábitos deficientes em biossegurança no manejo dos animais (Oliveira et al., 2017).

Enquanto no volume de sangue retido no aparelho bucal de insetos hematófagos que corresponde a aproximadamente  $1 \times 10^{-5}$  mL, a viabilidade do EIAV é de até 4 horas, o volume de sangue mantido em uma agulha hipodérmica pós-coleta, pode variar de 0,05 a 0,1 mL e a viabilidade do vírus dura em média 96 horas (Reis e Cook, 2014). Logo, a transmissão via iatrogênica é cerca de 1 a 10 mil vezes mais eficiente quando comparada a forma natural de transmissão da doença.

No ano de 2006, em um hospital veterinário da Irlanda, 13 cavalos e 2 potros inicialmente diagnosticados como negativos para AIE, se soroconverteram após entrarem em contato com uma égua infectada pelo EIAV, que apresentava um quadro de hemorragia intensa (Cullinane et al., 2007). Além disso, um estudo realizado com 77 cavalos romenos diagnosticados como positivos para AIE, identificou a presença de lesões pulmonares, condizentes com uma pneumonia intersticial linfóide associada à expressão

de proteínas do EIAV em macrófagos, células endoteliais e em células epiteliais no pulmão dos animais infectados (Bolfa et al., 2013). A partir desses dados, levantou-se a possibilidade da transmissão do EIAV ocorrer por outras vias que vão além da inoculação do sangue de um animal infectado em um animal sadio, como pela inalação de partículas virais aerossolizadas, entretanto tais suspeitas ainda se encontram sobre investigação.

### 3.6. Sinais clínicos

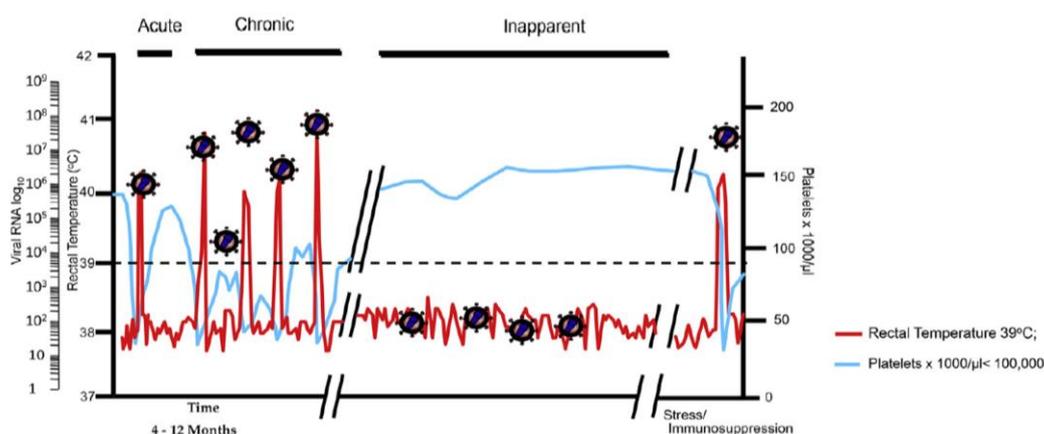
O curso clínico da infecção pelo EIAV é bem elucidado em equinos (*Equus caballus*), e a intensidade dos sinais clínicos podem variar de acordo com a quantidade de vírus que é transmitida de animal para animal e a virulência da estirpe infectante (Cook et al., 2003).

Em geral, uma vez, que o animal é infectado pelo EIAV, o curso clínico da doença se desenvolve em três fases: fase aguda, fase crônica e fase inaparente (Figura 4).

A fase aguda inicial, pode ocorrer de 7 a 30 dias pós-infecção, onde ocorre um pico de viremia associado ao plasma, desenvolvendo no animal um quadro clínico de febre, trombocitopenia, letargia e inapetência (Issel e Coggins, 1979; Sellon, 1993). No entanto, estes sinais podem estar completamente ausentes ou limitados apenas a sintomas febris leves. Em casos mais graves, o animal pode desenvolver petéquias, anemia hemolítica e epistaxe (Issel et al., 2014).

A fase crônica da doença pode ocorrer até 12 meses pós-infecção, e desenvolve no hospedeiro uma viremia recorrente e ciclos de anemia com perda de peso, edema, trombocitopenia e, eventual desenvolvimento de sinais clínicos neurológicos como ataxias ou encefalites (Issel e Coggins, 1979; Montelaro et al., 1993; Leroux et al., 2014).

Com o passar do tempo, os episódios de viremia referente a fase crônica, diminuem progressivamente e os animais evoluem para um estágio inaparente da doença, onde a viremia é dificilmente detectável e a replicação viral ocorre somente em macrófagos associados a tecidos, com ausência de sinais clínicos. (Oaks et al., 1998; Harrold et al., 2000; Dong et al., 2012). Mais de 95% dos animais infectados com EIAV se tornam portadores inaparentes e constituem as principais fontes de infecção para animais sadios (Montelaro et al., 1993).



**Figura 4:** Cinética do curso clínico da AIE correlacionando a temperatura corporal (vermelho), contagem de plaquetas (azul) e a carga de RNA viral no plasma durante as fases da doença. \*Episódio febril: temperatura retal maior que 39°C; trombocitopenia: valores abaixo de 105.000 plaquetas/ $\mu$ L de sangue e viremia: quantidades maiores que  $10^5$  cópias de RNA/mL de plasma. (Fonte: Issel et al., 2014).

### 3.7. Resposta imune do hospedeiro

O primeiro controle da carga viral plasmática é exercido por linfócitos T citotóxicos (CTL) e anticorpos não neutralizantes contra as glicoproteínas de superfície (gp90), transmembrana (gp45) e proteína do core viral (p26) (Hammond et al., 1999), que conseguem controlar a replicação inicial do vírus e tornar ausente os sinais clínicos.

Com o controle da viremia inicial, o sistema imune adaptativo do hospedeiro exerce uma pressão seletiva sobre o vírus induzindo a mutações na região SU do gene *env*, que corresponde ao grupo imunodominante responsáveis por ativar a resposta imune do hospedeiro (Cervantes et al., 2016). Nesse caso, passa a surgir novas variantes do EIAV antigenicamente distintas que não são mais reconhecidas pela resposta imune gerada no episódio anterior, obrigando o animal a entrar em um constante ciclo de 'atualização', para que o seu sistema imunológico responda ao surgimento de cada nova variante (Hammond et al., 1999; Mealey et al., 2007).

Entretanto, este ciclo é rompido pela maturação e amplificação da resposta imune. Os linfócitos CTL passam a reconhecer uma maior quantidade de epítomos, os anticorpos neutralizantes adquirem uma especificidade mais genérica e os anticorpos não neutralizantes desenvolvem interações com alta avidéz frente a epítomos predominantemente conformacionais (Hammond et al., 1999; Reis e Cook, 2014). Com isso torna-se extremamente difícil escapar da vigilância imunológica do hospedeiro (Cook et al., 2013). Nesse caso, o animal não consegue eliminar o vírus por completo, mas restringe sua replicação aos tecidos, abaixo do limiar de provocar doença clínica.

### 3.8. Patogênese da doença

Os sinais clínicos da AIE são mediados por citocinas pró-inflamatórias, como o fator de necrose tumoral -  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ), interleucina - 6 (IL-6) e o fator de transformação de crescimento -  $\beta$  (TGF- $\beta$ ), quando as cargas virais associadas ao tecido atingem o limiar crítico de  $5 \times 10^7$  a  $1 \times 10^8$  cópias/mL (Cook et al., 2003).

Uma vez liberadas, a IL-6 e o TNF- $\alpha$  ativam a cascata do ácido araquidônico promovendo o aumento da Prostaglandina E2, além disso o TNF- $\alpha$  regula negativamente o processo de eritropoiese, esse conjunto de fatores induz um quadro febril e anêmico no hospedeiro (Dufour et al., 2003; Felli et al., 2005). Já o TGF- $\beta$  é capaz de suprimir o crescimento de megacariócitos equinos, gerando uma queda na quantidade de plaquetas circulantes (Tornquist e Crawford, 1997).

Embora as citocinas pró-inflamatórias ocupem um papel de destaque no desenvolvimento de sinais clínicos da AIE em equídeos infectados, a presença de imunoglobulinas também está diretamente envolvida na patogênese da doença, isso porque a trombocitopenia induzida pela expressão de TGF- $\beta$ , causa o aumento dos IgGs e IgMs associado as plaquetas, causando a deposição de imunocomplexos e subsequente destruição das plaquetas por fagócitos mononucleares, principalmente no baço e no fígado induzindo a esplenomegalia e hepatomegalia (Clabough et al., 1991). Além disso, proteínas do complemento C3 se ligam a subunidades de hemaglutinina viral depositadas na superfície dos eritrócitos, induzindo a fagocitose celular, causando o agravando do quadro de anemia gerado pela expressão de TNF- $\alpha$  e o depósito de hemossiderina em macrófagos dos gânglios linfáticos, fígado e baço (Cheevers e McGuire, 2016).

A longo prazo, equídeos persistentemente infectados podem desenvolver glomerulopatias ocasionadas pela deposição de imunoglobulinas e proteínas do complemento C3 nas membranas basais e áreas mesangiais dos rins (Henson e McGuire, 1971; Cook et al., 2013).

### 3.9. Diagnóstico da AIE

O diagnóstico laboratorial assume um papel decisivo no controle e prevenção da doença, uma vez que a AIE não tem nem tratamento e nem vacina eficaz, portanto, seu controle ocorre basicamente pela identificação, segregação e/ou eutanásia dos animais diagnosticados como positivos (OIE, 2013).

O método oficial para o diagnóstico da AIE é o teste de Coggins ou Imunodifusão em Gel de Ágar (IDGA) que detecta anticorpos anti-p26 (Brasil, 2004; OIE, 2013). Um teste altamente específico e o único que já provou estar correlacionado com a presença do vírus no animal (Coggins et al., 1972). Porém, apesar de altamente específico o IDGA é pouco sensível, o que eleva o número de diagnósticos com resultados falso-negativos.

Visto isso, para melhorar a acurácia do diagnóstico, desde 1980, o USDA (*United States Department of Agriculture*) aprovou o uso dos Ensaios de Imunoabsorção Enzimáticas (ELISAs) (Suzuki et al., 1982), como teste de triagem, devido a sua alta sensibilidade. Estudos demonstraram que o número de animais positivos para a AIE aumentou em 17% quando as amostras de soro foram inicialmente testadas por ELISA ao invés do IDGA (Sciocluna et al., 2013).

Nesse sentido, no Brasil, o Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA), aprovou em 2014 a portaria nº 378, revogada em 2018 pela instrução normativa 52, que autoriza o uso do ELISA para o diagnóstico de AIE (Brasil, 2018). Alguns testes de ELISA descritos já mostraram maior sensibilidade do que o IDGA para o controle eficiente da AIE no Brasil (Reis et al., 2012; Neves et al., 2018). No entanto, o mesmo deve ser utilizado apenas como método de triagem e todas as amostras com resultados positivos devem ser novamente testadas pelo IDGA. Em caso de desacordo entre ambos os testes, o resultado obtido no IDGA prevalece (Cursino et al., 2018).

Países como os Estados Unidos, a Irlanda e a Itália, adotaram para AIE o diagnóstico em três níveis, onde todas as amostras são inicialmente rastreadas por testes de ELISA e aquelas com resultados positivos são confirmados por IDGA, em casos de desacordo entre os resultados do ELISA e do IDGA é utilizado o ensaio de immunoblot, como um teste suplementar, para fechar o diagnóstico final (Issel et al., 2014). O teste de immunoblot provou ser altamente sensível e capaz de detectar anticorpos dirigidos contra os três principais antígenos do EIAV (p26, gp90, gp45) (Issel et al., 2013).

Mesmo com a alta acurácia gerado pelo emprego do diagnóstico em três níveis, a utilização de técnicas sorológicas ainda possui a desvantagem do atraso entre a exposição a um patógeno e o desenvolvimento de respostas humorais detectáveis. Como as taxas iniciais de replicação do EIAV são frequentemente altas, os equídeos infectados podem representar um eminente risco de transmissão muito antes de se tornarem soropositivos (Cook et al., 2013).

Na tentativa de solucionar esse problema, vários métodos moleculares baseados na reação em cadeia da polimerase (PCR) para detecção do RNA viral ou DNA proviral no sangue total dos equídeos, foram descritos e avaliados como um possível método de diagnóstico promissor (Quinlivan et al., 2007; Cappelli et al., 2011; Dong et al., 2012), entretanto o uso destas técnicas foi restringido pela necessidade de iniciadores e sondas destinados a regiões altamente conservadas do genoma viral. Contudo, não se conhece ainda toda a extensão da variação genética entre os isolados de campo do EIAV (Craig e Montelaro, 2013). Além disso, alguns portadores inaparentes mantêm as cargas virais abaixo do limite de detecção dos ensaios baseados em PCR atualmente descritos (Cook et al., 2013), devido a isso, o uso dos métodos moleculares para o diagnóstico de animais positivos para a AIE é inviável até o presente momento.

### **3.10. Normas para trânsito de animais**

O transporte dos animais muitas vezes é responsável pela incidência ou reincidência de doenças em um rebanho. Devido a isso, para trânsito de aves, animais aquáticos, bovinos, bubalinos, caprinos, ovinos, suínos e equídeos, o condutor deve, obrigatoriamente, estar de posse da Guia de Trânsito Animal (GTA).

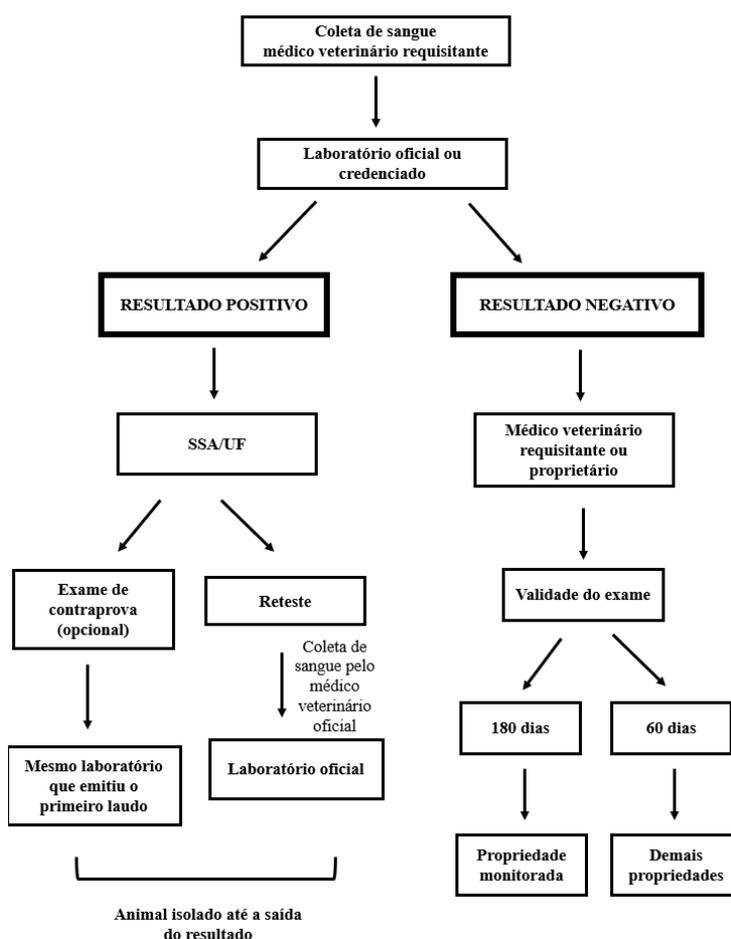
A GTA é um documento oficial e de emissão obrigatória exigido para circulação de animais intradistrital e/ou interestadual para qualquer finalidade, seja reprodução, exposição, feira, leilões, esporte entre outros e deve ser emitida por médicos veterinários oficiais responsáveis pela assistência aos rebanhos de onde se originam os animais, registros do estabelecimento de procedência e cumprimento das exigências de ordem sanitária estabelecidas para os equídeos (Facin, 2011).

A emissão da GTA para trânsito de equídeos é condicionada à apresentação do resultado do teste sorológico de IDGA com o resultado negativo para AIE, emitido por laboratórios oficiais ou credenciados. Se o trânsito dos animais for de forma permanente, o teste diagnóstico deve ser realizado 30 dias antes do embarque, caso a importação seja de forma temporária, o prazo para realização dos exames é de 90 dias antes do transporte dos mesmo, além disso, os animais não devem apresentar nenhum sinal clínico

característico da AIE, nas 48 horas que antecedem o embarque. Ademais, todos os equídeos importados devem ter um Certificado Oficial de Inspeção Veterinária, constando a ausência de casos de AIE, associado a quaisquer instalações onde os animais foram mantidos durante os três meses anteriores ao embarque (OIE, 2018).

No Brasil, a validade do resultado negativo do exame para AIE em equídeo originados de uma propriedade controlada é em média 180 (cento e oitenta) dias, entretanto, em caso de trânsito ou permanência do animal em propriedades não controladas, a validade do teste diagnóstico poderá ser reduzida para 60 (sessenta) dias, a contar da data de coleta da amostra. Inicialmente a coleta de sangue é realizada por médicos veterinários requisitantes, responsáveis pelo animal e encaminhado a laboratórios oficiais ou credenciados. O resultado negativo é encaminhado ao médico veterinário requisitante ou ao proprietário do animal. Todavia, caso o equídeo apresente resultado positivo no teste sorológico de IDGA, o laudo é imediatamente encaminhado ao Serviço de Sanidade Animal (SSA) da Delegacia Federal de Agricultura (DFA) da Unidade Federativa (UF), que se torna responsável pelo reteste do animal, realizado em laboratório oficial, com amostra coletada pelo serviço oficial. O proprietário também pode exigir um contraprova no mesmo laboratório responsável pelo primeiro exame (Figura 5). Até a classificação final o animal permanece isolado. Com o diagnóstico positivo na contraprova, a eutanásia do equídeo infectado é comumente adotada (Brasil, 2004).

Animais destinados ao abate estão isentos da apresentação de exame negativo para AIE, devendo ser transportados em veículo lacrado, com lacre numerado afixado pelo veterinário emissor ou pelo serviço veterinário oficial do estado de origem e conferido pelo serviço veterinário no abatedouro de destino (Migon et al, 2017).



**Figura 5:** Fluxograma do protocolo estabelecido pelo Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento (MAPA), para controle e prevenção da AIE em animais destinados a trânsito interestadual.  
\*SSA/UF: Serviço de Sanidade Animal da Unidade Federativa.

### 3.11. Tropismo viral

Uma vez no hospedeiro, o EIAV infecta a linhagem tecidual monócito/macrófago, que são células permissíveis e susceptíveis ao vírus. Até o momento, essa é a única linhagem celular dos equídeos descrita que possui o *Receptor de Lentivírus Equino - 1* (ELR-1), diretamente associado a entrada do EIAV nas células-alvo do hospedeiro (Leroux, et al., 2004).

Uma vez no animal, o alvo primário do EIAV são os monócitos disponíveis na corrente sanguínea, medula óssea e baço. Apesar de permitir a entrada do vírus, os monócitos não possuem todos os fatores de transcrição que são necessários para a replicação viral (Desrosiers, 2007). Então, induzido por um processo inflamatório, que causa expressão de citocinas específicas e de receptor de fator de crescimento hematopoiético (Csf1), os monócitos migram para os tecidos onde se diferenciam em macrófagos ou em células dendríticas, células capazes de sintetizar as proteínas virais e gerar novas partículas infecciosas (Sellon, 1993; Maury, 1994; Geissmann et al., 2010).

A maior quantidade de antígenos virais e de material genômico do EIAV foi encontrado em órgãos com quantidades consideráveis de macrófagos teciduais, como: baço, medula óssea, fígado, pulmões e linfonodos (Montelaro et al., 1993; Sellon, 1993; Oaks et al., 1999; Harrold et al., 2000). Entretanto, um estudo realizado por Bolfa e colaboradores (2013) identificou uma grande expressão de proteínas virais em células epiteliais bronquiolares, alveolares e em células endoteliais dos pulmões de cavalos infectados com o EIAV, na Romênia. Um outro estudo, detectou a presença de material genético e de proteínas estruturais do EIAV em células endoteliais do fígado, baço, rins e intestino de cavalos infectados experimentalmente, sugerindo que ocorre replicação produtiva do vírus em outras linhagens celulares além dos monócitos/macrófagos (Maury et al., 1998; Oaks et al., 1999), mas, a importância da infecção das células endoteliais para a patogenia ou persistência do EIAV no hospedeiro ainda não foi esclarecida.

Apesar da AIE ser a primeira doença viral descrita, associada a família Equidae, a patogênese do vírus ainda é mal elucidada, pois o cultivo primário a partir de monócitos e macrófagos é dificilmente mantido *in vitro* e as estirpes do EIAV que foram adaptadas em linhagens contínuas como de Derme Equina - ED (Malquist et al., 1973), de Rim de Feto Equino - FEK (Kono e Yoshino, 1974), de Derme de Feto de Jumento - FDD (Shen e Whang, 1985) e de células fibroblásticas caninas e felinas transformadas (Benton et al., 1981; Bouillant et al., 1986; Hines e Maury, 2001) não desenvolvem quaisquer efeitos citopáticos (Malmquist, 1973). Além disso, a utilização de métodos moleculares como os ensaios de PCRs e de hibridizações *in-situ*, para estudos acerca da patogenia da doença tornam-se inviáveis pela falta de conhecimento acerca da variabilidade genética do vírus que aparentemente sofrem variações significativas de acordo com sua distribuição geográfica (Capomaccio, et al., 2012).

Contudo, sabendo dos impactos econômicos que a AIE gera na equideocultura, por se tratar de uma doença incurável e que comumente obriga a eutanásia dos equídeos diagnosticados como positivos ou exige estratégias de segregação e monitoramento desses animais (Issel et al., 2014), a compreensão do mecanismo de interação vírus-hospedeiro é essencial para o desenvolvimento de métodos de diagnósticos, vacinas e medicamentos que possam ser utilizados no controle e prevenção da doença.

Neste sentido, os ensaios imuno-histoquímicos vêm sendo amplamente utilizados para esclarecer os tropismos teciduais de agentes infecciosos, durante a progressão da doença. Recentemente, essa técnica foi utilizada para elucidar a patogênese de bactérias como *Clostridium novyi* em pôneis (Davies et al., 2017) e de vírus como o *Bovine herpesvirus type 5* em bovinos experimentalmente infectados (Cagnini et al., 2015).

### 3.12. Definição da técnica imuno-histoquímica

O conceito de usar anticorpos marcados com enzimas, capazes de liberar uma coloração quando submetidas a uma reação insolúvel, para localizar antígenos teciduais, foi primeiramente descrito por Coons e colaboradores (1941) e marcou o nascimento da técnica de imuno-histoquímica (IHQ).

Embora a IHQ, tenha sido inicialmente utilizada apenas para a caracterização de neoplasias, o desenvolvimento de reagentes sensíveis, juntamente com a introdução da recuperação de antígenos induzida pelo calor (Leong e Leong, 2006), rapidamente estendeu a utilização da IHQ para diagnóstico (Njaa et al., 2000; Ruiz et al., 2005), prognóstico (Hagenbeek et al., 2009; Hans et al., 2004), tomada de decisões terapêuticas (Gown et al., 2008) e na compreensão da patogênese de diversas doenças (Cagnini et al., 2015; Davies et al., 2017), preenchendo a lacuna entre a histopatologia clássica e a patologia molecular.

As principais vantagens do método são o custo baixo, a rapidez em gerar resultados e a alta sensibilidade (Capper et al., 2011). Além disso, a detecção de antígenos nos tecidos pode ser associada a alterações histopatológicas, o que permite uma análise espacial com maior precisão (Guirado et al., 2018).

Ao contrário da medicina humana, a aplicação da técnica de IHQ na medicina veterinária ainda é restrita devido a disponibilidade reduzida de marcadores celulares e de anticorpos específicos contra agentes infecciosos. Especialmente no diagnóstico de tumores, a maioria dos laboratórios utilizam de anticorpos desenvolvidos para tecidos humanos que são insuficientemente validados para espécies animais de pequeno e grande porte (Ramos-Vara et al., 2008). Com isso, os protocolos e os anticorpos utilizados na execução da técnica não são uniformes entre os laboratórios.

### 3.13. Caracterização da técnica imuno-histoquímica

A técnica de IHQ é dividida em três fases: a primeira fase é chamada de pré-analítica, seguindo da fase analítica e finalizando com a fase pós-analítica.

Na *fase pré-analítica*, as amostras são coletadas, por biopsias, necropsias ou punções e imediatamente colocadas em soluções contendo fixadores químicos, desidratadas em xilol, seguindo de banhos em crescentes concentrações de álcool e emblocadas em parafina histológica.

Os fixadores químicos, interrompem a degeneração, a autólise e o deslocamento de constituintes celulares causados pela remoção do tecido de sua fonte original.

(Ramos-Vara e Miller, 2014). A formalina é o fixador químico mais utilizado e os tecidos são na maioria das vezes armazenados em blocos de parafina, que apesar de manter os antígenos estáveis durante anos, afetam negativamente a detecção de nucleotídeos por técnicas moleculares (Seidu et al., 2013).

Os tecidos emblocados são subsequentemente seccionados e colocados sobre lâminas polarizadas, garantindo a sua aderência (Sánchez-Cordón et al., 2010).

Posteriormente, se inicia a *fase analítica* que envolve todos os procedimentos realizados até a etapa de contra coloração das secções. Primeiramente todo o resquício de parafina é retirado dos tecidos pela ação do calor, submetendo as secções a temperaturas de 90°C, seguindo de banhos de xileno e hidratação dos tecidos, após diversos banhos em concentrações decrescentes de álcool.

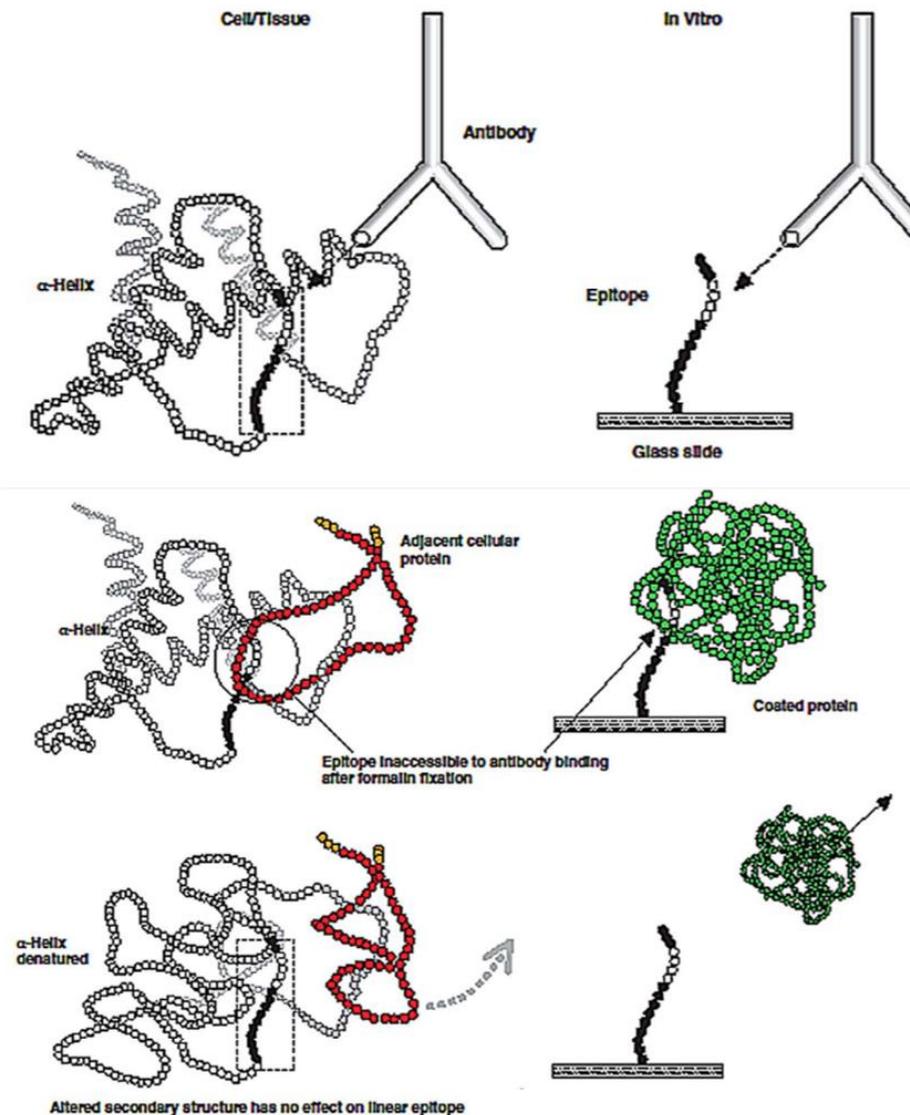
Apesar de conservar a estrutura tecidual, os fixadores químicos reagem com os antígenos teciduais e induzem modificações físico-químicas, “camuflando” os epítomos que passam a não ser identificados pelos anticorpos (Scalia et al., 2017) (Figura 6). Sendo assim, deve ser realizado a recuperação antigênica que atua no desmascaramento dos antígenos de interesse. Essa etapa pode ser realizada por clivagem proteolítica mediante a adição de proteases (Battifora e Kopinski, 1986) ou por aquecimento das secções mergulhadas em tampões salinos, capazes de reverter as modificações tridimensionais sofrida pelas proteínas e inibir a ação de íons de cálcio ligados aos tecidos que podem esconder algum outro antígeno durante a fixação (Morgan et al., 1994).

Após a recuperação antigênica, segue-se com a etapa de bloqueio das ligações inespecíficas e de enzimas endógenas, evitando as imunocolorações de segundo plano que podem ocorrer por interações iônicas e hidrofóbicas dos anticorpos secundários a sítios aniônicos teciduais ou pela presença de enzimas endógenas, principalmente peroxidases, que reagem com anticorpos conjugados com a enzima horseradish peroxidase (HRP). A utilização de detergentes não iônicos (Triton X-100 a 0,5%) ou de proteínas inertes tais como soro fetal bovino, albumina bovina e caseína competem com os sítios de ligação e reduzem as absorções inespecíficas. Da mesma forma, a adição de peróxido de hidrogênio (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) sobre as secções, resulta na inativação irreversível da peroxidase endógena (Vieira et al., 1998; Boenisch, 2001; Kim et al., 2003; Renshaw, 2006).

A etapa subsequente, envolve a adição de anticorpo primário, que se liga especificamente ao antígeno na amostra de interesse. Os anticorpos utilizados podem ser monoclonais (mAc), derivados de um

único clone de células B, produzidos pela técnica de hibridoma (Köhler e Milstein, 1976) ou policlonais (pAc), produzidos mediante a imunização de coelhos, ratos, cavalos, burros, entre outros, com o antígeno purificado ou com o próprio agente infeccioso (Hanly et al., 1995).

Os mAbs possuem maior especificidade quando comparado aos pAbs, no entanto, a sua produção é extremamente dispendiosa e cara, por isso, é comum utilizar pAbs, que além de serem mais baratos, são capazes de amplificar a detecção de antígenos por reconhecer múltiplos epítopos (Ramos-Vara e Miller, 2014).



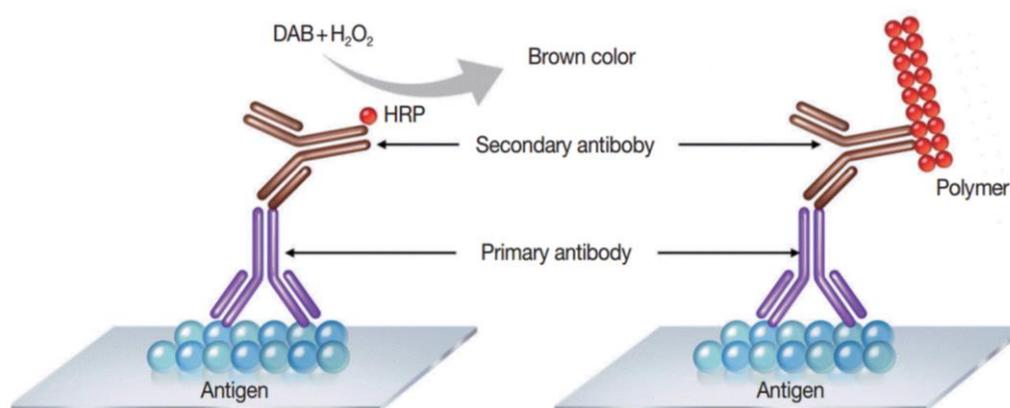
**Figura 6:** Desenho esquemático demonstrando a recuperação antigênica realizada em (A) proteínas nativas e em (B) peptídeos *in vitro* sob ação de fixadores químicos que causam mascaramento dos epítopos. (Fonte: Sompuram et al., 2006)

Em seguida, adiciona-se o conjugado (anticorpos secundários marcados com uma enzima), com especificidade para os anticorpos primários. Os marcadores enzimáticos mais utilizados são a fosfatase alcalina (AP) e horseradish peroxidase (HRP), que pode estar ligado aos anticorpos secundários de uma forma simples (uma enzima conjugada a um anticorpo), na forma de polímeros (grande quantidade de enzimas e anticorpos ligados a uma macromolécula central) ou acoplado a um complexo avidina-biotina.

As enzimas oxidam diretamente os cromógenos que são adicionados posteriormente, causando alterações na coloração do sistema. O cromógeno mais utilizado é o 3,3 - diaminobenzidina tetrahidrocloro (DAB) que combinado ao peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ), gera um precipitado castanho/bronze insolúvel em álcool e em outros solventes orgânicos (Ferro, 2013) (Figura 7). Após a coloração do antígeno alvo, as secções, são submetidas a uma coloração secundária com hematoxilina, para fornecer contraste que ajuda na identificação da coloração primária mais distinta (Ramos-Vara e Miller, 2014).

A realização de lavagens completas entre todas as etapas da IHQ é fundamental para garantir a qualidade do teste, pois nesse processo ocorre a remoção do excesso de reagentes não ligados, reduzindo o *background*. As lavagens devem ser realizadas com tampão fosfato-salino (PBS) em pH entre 7,2 e 7,4, por serem soluções isotônicas, onde sua concentração de íons e sua osmolaridade se iguala a dos fluidos dentro das células, evitando os processos osmóticos que causaria destruição celular e inviabilizaria a utilização dos tecidos.

A fase pós-analítica inclui a análise dos resultados e avaliação dos controles positivos e negativos (Ramos-Vara e Miller, 2014).



**Figura 7:** Ilustração do sistema de detecção por imunohistoquímica indireta (A) simples e utilizando (B) polímeros. \*DAB: 3,3 - diaminobenzidina tetrahidrocloro; HRP: horseradish peroxidase. (Fonte: Kim et al., 2016)

## 4. MATERIAL E MÉTODOS

### 4.1. Implicações Éticas

Conforme o ofício circular 001/17, emitido pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal de Minas Gerais (CEUA/UFMG), não existe necessidade de obter a autorização da CEUA para a manipulação de animais não vivos (Anexo 1). Os espécimes teciduais assim como as amostras de sangue utilizadas nos experimentos seguintes, pertenciam ao banco de amostras do Departamento de Ciência Animal da Universidade Federal Rural do Semiárido (UFERSA), Mossoró – RN, sob responsabilidade do Professor Dr. Sidnei Miyoshi Sakamoto, que assinou um termo de doação das amostras, tornando-se ciente de sua participação no estudo (Anexo 2).

### 4.2. Obtenção das amostras

Amostras teciduais do baço, fígado, linfonodo, medula óssea, pulmões, rins e testículos, assim como amostras de sangue total, de seis equídeos, provenientes da fazenda de recolhimento do município de Apodi, Rio Grande do Norte, Brasil, foram cedidos pelo Professor Dr. Sidney Miyoshi Sakamoto da Universidade Federal Rural do Semiárido (UFERSA) para o desenvolvimento do ensaio imunohistoquímico.

Dos 6 animais, 5 (1 cavalo e 4 mulas) foram diagnosticados como positivos para AIE pelos testes sorológicos ELISA rgp45 (Naves et al., 2018) e IDGA (Laboratórios Bruch) e 1 égua foi diagnosticada como negativa (Tabela 1). Conforme informado pelos pesquisadores responsáveis pelo diagnóstico dos animais, apenas o cavalo se encontrava com manifestações clínicas da doença, parte dos fragmentos teciduais do mesmo, foram armazenados em RNA later para futura análise molecular e o restante foi fixado em formalina 10% para análises histológicas futuras.

Todos os tecidos coletados dos demais animais positivos para AIE, mas sem sinais clínicos, assim como do animal negativo, foram imediatamente fixados em formalina a 10% por 72 horas. Após este intervalo, os tecidos foram transferidos para tubos falcon de 50 mL contendo álcool 70% para garantir a melhor preservação dos fragmentos.

**Tabela 1:** Identificação dos animais quanto a raça, sexo e resultado dos testes diagnósticos. Informações cedida pelo grupo de pesquisa coordenado pelo Professor Dr. Sidnei Miyoshi Sakamoto (UFERSA).

Id.	Espécie	Sexo	Diagnóstico para AIE	
			ELISA rgp45	IDGA p26
FAZ	Equino	Macho	Positivo	Positivo
PO	Equino	Fêmea	Negativo	Negativo
03	Muar	Macho	Positivo	Positivo
07	Muar	Fêmea	Positivo	Positivo
12	Muar	Fêmea	Positivo	Positivo
13	Muar	Fêmea	Positivo	Positivo

### 4.3. Diagnóstico molecular dos tecidos

As amostras teciduais que estavam armazenadas em RNA later, foram submetidas a extração do RNA total, utilizando o reagente trizol, seguindo de PCR, para detecção do vírus nos tecidos.

Os fragmentos coletados, foram excisados e macerados na proporção de 1:9 em solução salina/tampão fosfato (PBS), e posteriormente foi adicionado 600 µL de Trizol (Invitrogen) e 300µL de clorofórmio (Merck-Milipore), intercalados por centrifugação. Após o processo, a fase líquida transparente foi retirada e 500 µL de isopropanol (Merck-Milipore) foi acrescentado, o produto foi armazenado a -20°C, *overnight*, após centrifugado, o sobrenadante foi descartado e o pellet ressuspenso em 1 mL de etanol 75% (Sigma-Aldrich), após uma nova centrifugação, o líquido foi descartado e o RNA total resultante, foi diluído em 50 L de água ultrapura (Sigma-Aldrich).

O produto da extração dos tecidos, após síntese de cDNA, foi submetido a PCR convencional para o gene normalizador gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase (GAPDH), a fim de comprovar a eficiência da extração, utilizando os iniciadores e o protocolo descrito por Harrold e colaboradores (2000).

Para verificar a presença do genoma do EIAV no produto da extração, as amostras foram submetidas a uma *nested* PCR (nPCR) para a região *gag*, conforme descrito por Cappelli e colaboradores (2011) (Tabela 2).

**Tabela 2:** Iniciadores utilizados na nPCR para região *gag* do EIAV.

Gene	Iniciadores (5'-3')	Amplicon	Referência
Gag 1ª reação	F GACATGGAGCAAAGCGCTCA	547pb	Cappelli et al., 2011
	R CTGCCAGGCACCACATCTA		
Gag 2ª reação	F GTGGGCGCTAAGTTTGGTG	313pb	
	R TTTCTGTTTCCAGCCCCATC		

Na primeira reação, utilizou-se 5 µL de cDNA em um volume final de 25 µL, contendo 1,25 UI de Go Taq Flexi DNA polimerase (Promega), 1,5 mM de MgCl<sub>2</sub>, 0,2 µM de cada primer e 0,2 mM de cada dNTP. Para a segunda reação utilizou-se o volume de 3 µL da primeira reação, seguindo com as mesmas concentrações de reagentes utilizados na etapa anterior. As condições de temperatura e tempo, tanto do

primeiro estágio da PCR, quanto na *nested* foram idênticas, sendo: 94°C; 3'; 30 ciclos de 94°C, 20''; 62°C, 30''; 72°C, 30'' e 72°C, 7'. Os amplicons da primeira e da segunda reação foram submetidos a corrida eletroforética em gel de agarose a 1,0 %. As bandas foram recortadas e purificadas, utilizando o kit GenElute™ Extraction Kit (Sigma Aldrich), seguindo o protocolo descrito pelo fabricante e encaminhadas para sequenciamento. O resultado do sequenciamento foi analisado no programa BioEdit Sequence Alignment Editor 7.2.1.

#### 4.4. Caracterização molecular da estirpe do EIAV circulante nos animais infectados

Para detectar a presença de material genético viral no sangue dos animais e compreender a diversidade molecular da estirpe circulante no hospedeiro, o sangue total coletado foi submetido a extração de DNA proviral utilizando o “DNeasy Blood e tissue kit” (Qiagen), seguindo o protocolo estabelecido pelo fabricante.

Uma *nested* PCR (*nPCR*) foi padronizada para a região *env*. Os iniciadores foram desenhados utilizando o software Primer3plus (Untergasser et al., 2007) (Tabela 2), tendo como referências as sequências genômicas EIAV<sub>Liaoning</sub> (nº de acesso no GenBank AF327877) (Tu et al., 2007), EIAV<sub>Ireland</sub> (nº de acesso no GenBank JX480631) (Quinlivan et al., 2013), EIAV<sub>Miyazaki-2011A</sub> (nº de acesso no GenBank JX003263) (Dong et al., 2012) e o EIAV<sub>Wyoming</sub>, (nº de acesso no GenBank AF033820) (Petropoulos, 1997).

**Tabela 3:** Iniciadores utilizados na *nPCR* para região *env* do EIAV.

Gene	Iniciadores (5'-3')	Amplicon
<b>Env</b> 1ª reação	F CACAATGGGATGACTGGGTA	917pb
	R AGGCATTGATACATGAGATGT	
<b>Env</b> 2ª reação	F TACTAACCTCTTCGCCTAAG	392pb
	R YCTTCTTGCGGTTTAATRCA	

Para a primeira reação, foi utilizado 4 µL do DNA total extraído e um volume final de 50 µL, contendo 2 UI de Platinum Taq DNA polimerase (Invitrogen), 1,5 mM de MgCl<sub>2</sub>, 0,4 µM de cada primer (Tabela 5) e 0,2 mM de cada dNTP. Para a segunda reação utilizou-se 2 µL do produto da primeira reação e os demais reagentes nas mesmas concentrações da etapa anterior. As condições de temperatura e tempo no primeiro estágio da PCR, foram: 94°C; 2'; 35 ciclos de 94°C, 30''; 56°C, 30''; 72°C, 1' e 72°C, 3'. Para a segunda reação, a temperatura de anelamento ideal foi de 52°C por 30'' com uma rampa de anelamento de 70%. Após a PCR, 10 µL do produto da segunda reação foi submetido a corrida eletroforética em gel de agarose a 1,0%.

O restante do produto da PCR com resultado positivo, foi submetido a um processo de purificação e concentração do material genético, utilizando o kit DNA Clean & Concentrator™ (Zymo Research), conforme o protocolo estabelecido pelo fabricante. Subsequentemente, as amostras foram encaminhadas para sequenciamento. O resultado do sequenciamento foi analisado no software BioEdit Sequence Alignment Editor 7.2.1. As sequências de nucleotídeos foram alinhadas pelo método de ClustalW e o melhor modelo de substituição de nucleotídeos, assim como a árvore filogenética foram respectivamente analisados e construídos no software MEGA X 10.0.5., empregando o método estatístico de máxima verossimilhança com 1000 repetições.

Em paralelo, na tentativa de detectar partículas virais livres no sangue do hospedeiro, foi realizada a extração de RNA viral das amostras utilizando o “Quiamp Viral RNA kit” (Quiagen), conforme o protocolo estabelecido pelo fabricante, seguindo de transcrição reversa utilizando o kit M-MLV (Promega) e *nPCR* para o gene *env*.

#### 4.5. Histopatologia

Os tecidos foram armazenados em cassetes e mantidos em formalina a 10% na proporção de 1 cm de espessura para cada 9 mL de solução por 72h. Posteriormente, os mesmos foram desidratados em concentrações crescentes de etanol 70%, 80% e 90% por 5 minutos, seguindo de duas passagens em álcool absoluto por 10 minutos e duas passagens em xilol por 15 minutos cada. Parafina granulada (Synth) foi derretida sob altas temperaturas e colocadas sobre os cassetes, após a sua solidificação, os blocos foram seccionados em micrótomos a uma espessura de 5 µm, colocados sobre lâminas de microscopia polarizadas e corados com hematoxilina e eosina (HE), para análise histopatológica dos tecidos.

O protocolo utilizado, foi pré-estabelecido na rotina do Laboratório de Patologia da Escola de Veterinária da UFMG, que consiste em desparafinização das secções em estufa a 90°C por 30 minutos, seguindo de dois banhos de xilol por 15 minutos e hidratação dos tecidos em concentrações decrescentes de álcool etílico 100%, 90% e 80% por 5 minutos cada e água destilada por 3 minutos. As lâminas foram então coradas com hematoxilina, deixadas em água corrente por 15 minutos e posteriormente contra coradas com eosina.

As lâminas foram submetidas a rápidos mergulhos em água corrente e em álcoois nas concentrações decrescentes de 80% e 90%. Subsequentemente, as lâminas foram deixadas em álcool absoluto, seguindo de xilol por 5 minutos cada. As lâminas foram montadas com Bálsamo do Canadá (Synth) e lamínulas 24x50 mm (Kasvi). A análise foi feita 24 horas após todo o processo descrito, em microscópio óptico.

#### **4.6. Produção do anticorpo policlonal**

Os anticorpos primários utilizados na execução da técnica de imuno-histoquímica, foram produzidos a partir de um *pool* de soros de equídeos positivos para AIE, provenientes do banco de soros do Laboratório de Retrovírus (RetroLab) da UFMG.

O *pool* de soros positivos foi submetido ao método de precipitação e purificação com ácido caprílico e sulfato de amônio a 50% (McKinney e Parkinson, 1987), conforme descrito a seguir.

Inicialmente o *pool* de soros foi submetido a um aquecimento inicial de 56°C por 20 minutos, seguindo de centrifugação, o sobrenadante foi coletado e misturado em tampão acetato (60 mM), na proporção de 1:5. Posteriormente, a cada 1 mL da solução final foi adicionado 25 µL de ácido caprílico, mantido sob agitação por 30 minutos, seguindo de centrifugação. O sobrenadante foi coletado e filtrado, para a remoção das partículas não sedimentadas durante a centrifugação. A cada 1 mL do sobrenadante, foi acrescentado 9 mL de PBS. Em seguida, foi adicionado uma solução de sulfato de amônio a 50%, em ambiente refrigerado, na proporção volume/volume, onde foi deixado sob agitação por 30 minutos e depois centrifugado.

O sobrenadante foi descartado, o *pellet* foi coletado, ressuscitado com PBS em 10% do volume inicial e submetido a diálise por 24h a 4°C.

O produto da diálise foi coletado e o título de anticorpos anti-p26 do EIAV foi estimado por IDGA (Laboratórios Bruch) utilizando diluições na base 2.

#### **4.7. Padronização da Imuno-citoquímica**

Considerando a pouca quantidade de tecidos disponíveis, os testes de viabilidade e padronização da melhor diluição dos anticorpos primário e secundário, foram estabelecidos em cultivo de células ED (Equine Dermal Cells – ATCC CCL-57) persistentemente infectadas com a estirpe altamente patogênica EIAV<sub>WYO</sub> (Oaks et al., 1999; Oliveira, 2016), utilizando como controle negativo, células ED livres de infecção. Ambos os cultivos foram realizados sob lamínulas distribuídas em placas de petri contendo 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, incubadas à 37 °C em atmosfera com 5 % de CO<sub>2</sub>. Quando a confluência de 70% foi atingida o sobrenadante foi retirado, as placas foram lavadas com PBS estéril e as células foram fixadas com acetona pura durante 30 minutos. As lamínulas foram montadas sobre lâminas utilizando o meio de montagem aquoso CC/Mount™ (Sigma-Aldrich) e armazenados a -20°C.

Para o bloqueio da peroxidase endógena e das ligações inespecíficas, foram utilizados água oxigenada (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) a 3% a temperatura ambiente em local com ausência de luz e 0,30% de leite em pó

desnatado em estufa a 37°C, ambas as etapas por intervalos de 30 minutos, intercaladas por duas lavagens com PBS.

Os anticorpos primários foram testados nas diluições de 1:100, 1:200, 1:300 e 1:500, mantidos a 4°C, *overnight*, seguindo de duas lavagens com PBS e aplicação do segundo anticorpo, anti IgG de cavalo, conjugado com HRP, produzido em coelhos (Sigma Aldrich) nas diluições de 1:300, 1:500, 1:700 e 1:900.

O substrato utilizado foi o DAB (ImmPACT™ DAB Peroxidase Substrate Kit - Vector Laboratories), deixado sob as lâminas nos intervalos de 2, 4, 6 e 8 minutos, nas concentrações de 1,5% e 3%. Posteriormente as lâminas foram lavadas em água destilada corrente por 10 minutos.

As lâminas foram contra coradas com hematoxilina de Mayer, respeitando o tempo pré-determinado pela rotina do Laboratório de Patologia Clínica da Escola de Veterinária da UFMG, e novamente lavadas em água destilada corrente por 10 minutos.

As montagens das lâminas foram feitas, com cola permanente aquosa CC/Mount™ (Sigma-Aldrich) e lamínulas 24x24mm (Kasvi). Após o intervalo de 24 horas, as lâminas foram observadas em microscopia óptica para análise da qualidade, melhor diluição e tempo ideal dos reagentes.

#### 4.8. Padronização da Imuno-histoquímica

Os tecidos emblocados em parafina, foram seccionados em micrótomo a uma espessura de 3 µm e transferidos para lâminas de microscopia polarizadas (EasyPath) (Sánchez-Cordón et al., 2010).

Posteriormente, as secções dos tecidos foram desparafinizados por 20 minutos em estufa a 90°C e duas passagens pelo xilol durante 15 minutos e hidratados em concentrações decrescentes de etanol a 100%, 90%, 80% e 70% durante 5 minutos cada, seguindo de lavagem em água destilada corrente por 10 minutos.

Para a etapa de recuperação antigênica, foram testados os métodos: enzimático e pelo calor. A recuperação enzimática, foi realizada, mediante a adição de 1 µg de proteinase K (Sigma-Aldrich) em 1 mL de cloreto de cálcio (20 mM) e tris-HCL (20 mM) nas secções dos tecidos, por 8 minutos (Sellon et al., 1992). Na recuperação antigênica pelo calor, as lâminas foram mergulhadas em tampão citrato 0,05M e pH 6, pré-aquecido a 96°C em panela de vapor, onde foram mantidos por 40 minutos. O tampão citrato contendo as lâminas foi deixado esfriando por aproximadamente 25 minutos em temperatura ambiente (Jackson e Blythe, 2013).

Posterior a recuperação antigênica as lâminas foram lavadas três vezes com PBS filtrado pH 7,4, em seguida, foi feito o bloqueio da peroxidase endógena e de ligações inespecíficas, adicionando H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> a 3% nas secções dos tecidos, deixados a temperatura ambiente em local com ausência de luz por 40 minutos, e após duas lavagens com PBS foi adicionado 0,30% de leite em pó desnatado, deixados por 60 minutos sobre as lâminas em estufa a 37°C (Singh et al., 2011).

Sobre as secções foi adicionado, o anticorpo primário policlonal produzido conforme descrito acima, na diluição de 1:200 em PBS. As lâminas foram incubadas a 4°C, *overnight*. Após duas lavagens com PBS, foi adicionado o anticorpo secundário anti IgG de cavalo, conjugado com HRP, produzido em coelhos (Sigma Aldrich), na concentração de 1:400, deixados sobre as secções por 50 minutos em local com ausência de luz e a temperatura ambiente (Bolfá et al., 2013).

Após a retirada do segundo anticorpo e duas lavagens com PBS, foi acrescentado o substrato DAB (ImmPACT™ DAB Peroxidase Substrate Kit - Vector Laboratories), na concentração de 1,5% por 2 minutos e após uma lavagem com água destilada corrente por 10 minutos, a obtenção de contraste foi realizada por imersão das lâminas em hematoxilina de Mayer conforme o tempo determinado pela rotina da patologia do Hospital Veterinário da UFMG.

As lâminas foram lavadas em água destilada corrente por 10 minutos e submetidas a desidratação em concentrações crescentes de álcool 70%, 80%, 90% e 100% por 5 minutos e duas passagens pelo xilol por 10 minutos.

Foi utilizado para montagem das lâminas o meio sintético à base de polímeros Erv-Mount (EasyPath) e lamínulas 24x50 mm (Kasvi). Após o intervalo de 24 horas, as lâminas foram observadas em microscopia óptica para análise da presença de antígenos do EIAV nos tecidos.

## 5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1. Diagnóstico molecular dos tecidos

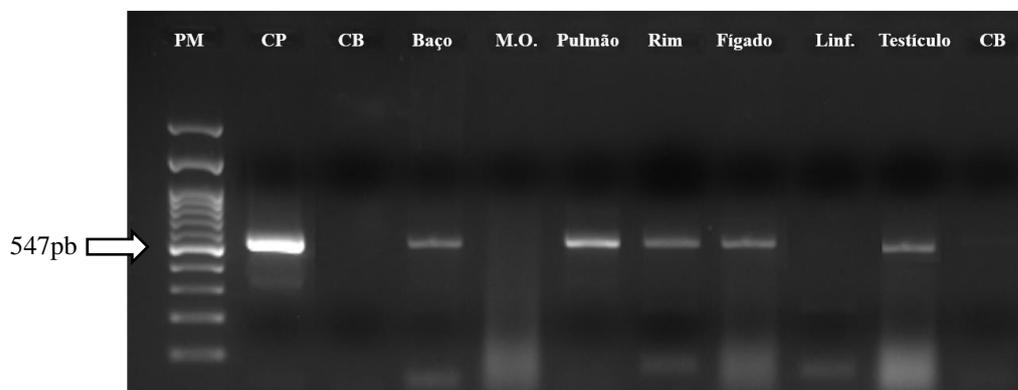
Dos 5 animais positivos para AIE, sendo 1 cavalo e 4 mulas, apenas o cavalo (FAS) apresentava os sinais clínicos característicos da doença, e parte dos fragmentos teciduais recolhidos foram armazenados em RNA later. Esse animal foi tratado como controle positivo para os demais experimentos e os fragmentos recebidos, foram submetidos a extração de RNA viral com uma posterior *n*PCR para o gene *gag* (Cappelli et al., 2011), objetivando esclarecer quais eram os órgãos-alvo do vírus (Anexo 3). O animal diagnosticado como negativo para AIE foi utilizado como controle negativo nos experimentos subsequentes.

O produto da extração dos tecidos, submetido a PCR convencional para o gene GAPDH, comprovou a eficiência da extração. Todos os tecidos geraram uma banda na altura de 452pb, (dado não demonstrado), garantindo que a extração do RNA total foi eficiente (Harrold et al., 2000).

O RNA do EIAV foi detectado no baço, fígado, rins, pulmões e testículos (Figura 8). Entretanto, apenas a primeira reação do gene *gag* descrito por Cappelli (2011) foi eficiente para as amostras de campo. Quando os amplicons da primeira reação eram submetidos a *nested*, a banda tornava-se indetectável, esse mesmo dado já foi observado anteriormente em outras amostras de campo brasileiras, processadas no Laboratório de Retrovirose da Escola de Veterinária da UFMG (dados não publicados). Visto isso, foi encaminhado para sequenciamento apenas o produto da PCR proveniente da primeira reação, que comprovou a presença do genoma do EIAV, disponível no tecido.

A detecção de RNA viral em tecidos de cavalos infectados indica replicação viral ativa. Durante períodos febris, o vírus replica predominantemente em macrófagos de tecidos maduros do baço, fígado, gânglios linfáticos, pulmão, rim e glândula adrenal (Sellon et al., 1992).

Entretanto é possível que a expressão do genoma viral nos linfonodos tenha sido restringida por fatores específicos do tecido durante o processo de diferenciação dos macrófagos, uma vez que a expressão é dependente de imunoglobulinas, resultando na eliminação do vírus (Gillies et al., 1984; Gendelman et al., 1985) e conseqüentemente a não detecção no ensaio de PCR.



**Figura 8:** Confirmação da presença do EIAV nos tecidos do animal FAS. Apenas o baço, pulmão, fígado, testículo e rim gerou bandas na altura esperada de 547pb. Na medula óssea (M.O) e no linfonodo (Linf.) não foi detectado material genético viral. (CP) Controle positivo – Cultivo de células ED persistente infectadas. (CB) Controle branco contendo água ultrapura. (PM) padrão de tamanho molecular DNA Ladder 100pb (Invitrogen).

A ausência de RNA viral na medula óssea, já foi observada em outras infecções por retrovírus como *Maedi-visna virus* (MVV), *Simian immunodeficiency virus* (SIV) e *Human immunodeficiency virus type 1* (HIV-1) (Clerici e Shearer, 1996; Langemeier et al., 1996). Apesar de não haver replicação ativa do vírus, as células menos diferenciadas da medula óssea podem servir como reservatório viral na forma latente. (Gendelman et al., 1985; Embretson et al., 1993; Pantaleo et al., 1993; Clements e Zink, 1996; Harrold et al., 2000).

Os tecidos dos animais diagnosticados como positivos para AIE, mas assintomáticos, foram recebidos, após fixação em formalina 10%. Na tentativa de recuperar algum material genético viável e detectar o vírus nos tecidos desses animais, alguns fragmentos foram seccionados a partir do tecido emblocado e submetidos a extração de DNA utilizando o kit Quick-DNA FFPE kit (Zymo Research), seguindo o protocolo determinado pelo fabricante.

Entretanto, nenhum resultado foi obtido dessa extração, isso porque o formaldeído induz processos de reticulações no DNA, RNA e em proteínas, gerando ácidos nucléicos altamente fragmentadas com amplicons em torno de 100 pares de bases (Seiler et al., 2016), além disso, os ácidos nucléicos tendem a se fragmentar ainda mais em situações em que a solução fixadora não é tamponada, já que o pH da solução é extremamente baixo (Gilbert et al., 2007). E isso justifica, a ineficiência da extração e consequentemente da detecção do EIAV nos tecidos dos animais que se encontravam na fase inaparente da infecção.

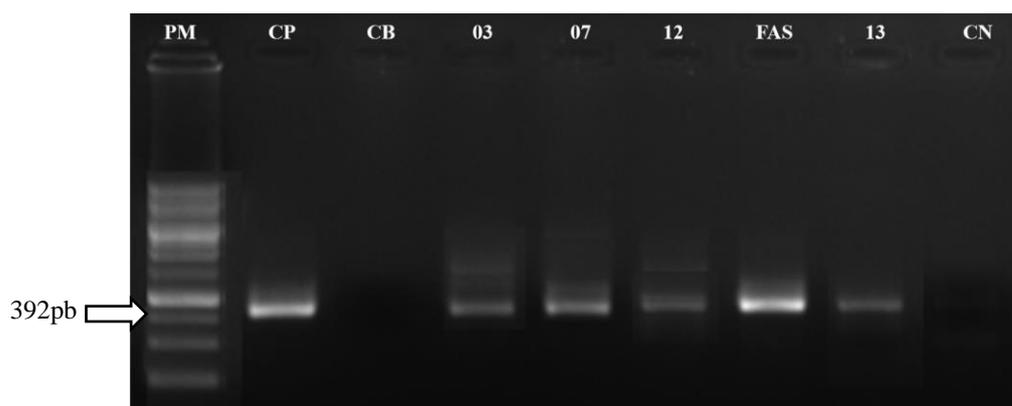
## 5.2. Caracterização molecular da estirpe circulante do EIAV nos animais infectados

Para detectar o DNA proviral do EIAV e caracterizar a estirpe circulante no sangue dos animais positivos, foi padronizada uma *nested* PCR para a região de *env*.

Após extração do material genético e PCR, todas as amostras amplificaram uma banda na altura de aproximadamente 390 pares de bases (Figura 9). As amostras foram encaminhadas para o sequenciamento dos nucleotídeos e a presença do DNA proviral do EIAV foi comprovada.

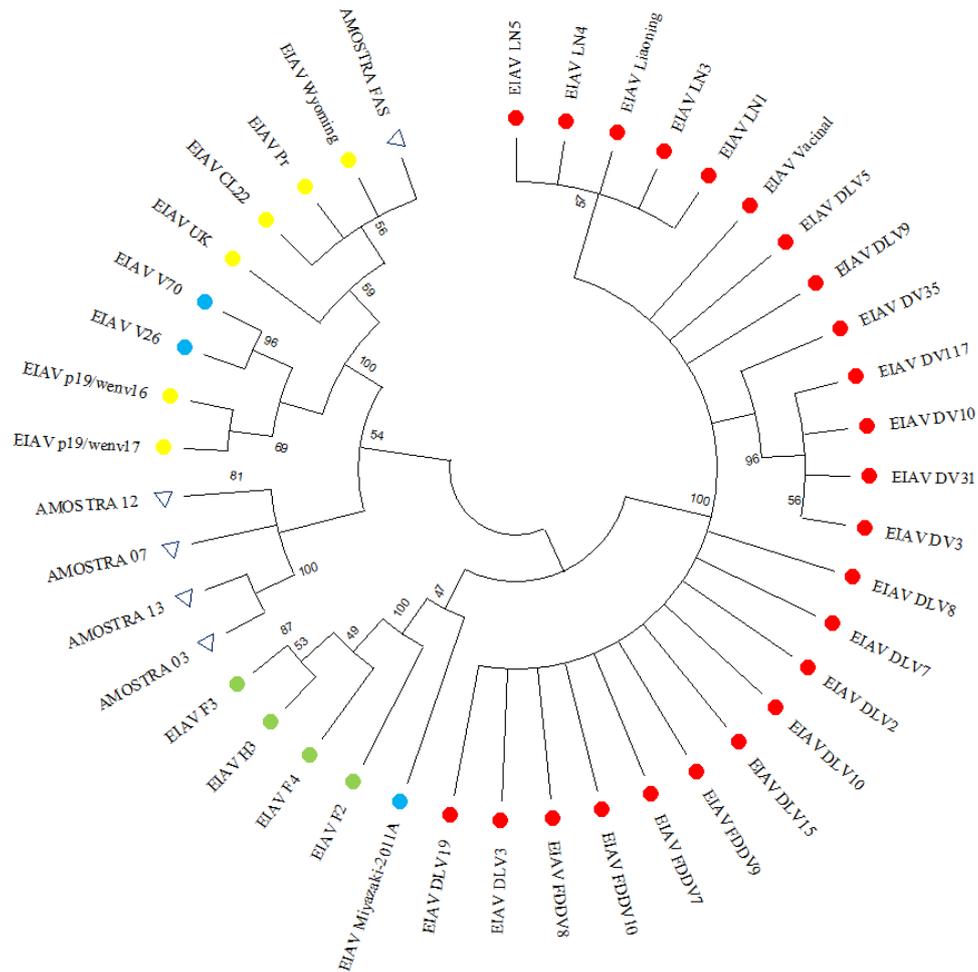
Com o resultado do sequenciamento, as amostras foram alinhadas juntamente com todos os genomas completos do EIAV disponíveis no GenBank pelo método de ClustalW. O melhor modelo de substituição de nucleotídeos determinado pelo programa MEGAX 10.0.5. foi o HKY85, com distribuição *gamma*, onde as mutações de transição e transversão ocorrem em proporções diferentes, assim como a frequência com que elas acontecem (Hasegawa, Kishino e Yano, 1985), levando em consideração as regiões que estão mais e menos dispostas a sofrerem variações.

A árvore filogenética foi construída, utilizando o método probabilístico de Máxima Verossimilhança (ML), com 1000 repetições (Figura 10). As estirpes do EIAV circulantes no sangue dos 5 equídeos foram agrupadas em dois clados distintos. Enquanto as amostras provenientes dos equídeos assintomáticos se alinharam em um mesmo clado, com um *bootstrap* variando de 83 a 100, a amostra FAS (controle positivo) foi agrupada, com um *bootstrap* de 56, no clado corresponde aos isolados americanos. Ao que tudo indica, a estirpe circulante nos equídeos assintomáticos foi originada de um ancestral comum a estirpe EIAV<sub>WYO</sub>, isolado nos Estados Unidos.



**Figura 9:** Confirmação da presença do EIAV no sangue dos animais positivos para AIE. Todos os animais (03, 07, 12 FAZ e 13) gerou uma banda na altura de 392pb. (CP) Controle positivo – Cultivo de células ED persistente infectadas. (CB) Controle branco contendo água ultrapura. (CN) Controle negativo, potro diagnosticado como negativo para AIE nos testes sorológicos. (PM) padrão de tamanho molecular DNA Ladder 100pb RTU (Kasvi).

As proteínas sintetizadas a partir do gene *env*, são extensivamente glicosiladas, acumulando ao longo do tempo, inúmeras mutações que atuam como um mecanismo de proteção do vírus, frente ao sistema imune do hospedeiro (Leroux et al., 2001; Reis et al., 2012). Entretanto, mesmo com a alta variabilidade da região *env*, a caracterização molecular e as análises filogenéticas desse gene podem contribuir para o conhecimento da estirpe do EIAV circulante no Brasil, além de fornecer novas informações acerca da diversidade genética e epidemiologia da doença. Isso porque, apesar de ser a primeira doença de etiologia viral descrita em equídeos, no Brasil, ainda não existe nenhuma sequência completa disponível em bancos de dados públicos, e até o presente momento, os conhecimentos acerca da variedade molecular do EIAV circulante no país são baseadas no sequenciamento parcial da região *gag* e *LTR* (Tigre et al., 2017; Cursino et al., 2018). Sendo assim, essa é a primeira caracterização parcial da região *env* do EIAV circulante em amostras de campo brasileiras.



**Figura 10:** Relações filogenéticas entre sequências *env* do EIAV. (vermelho) Isolados da China - Liaoning (AF327877.1), Vaccine (AF327878), e demais clones DVs e DLVs (HM141923.1 a HM141909.1), LNs e FDDVs (GU385364.1 a GU385357.1), (verde) isolados da Europa - F2 a H3 (JX480631.1 a JX480634.1), (amarelo) isolados dos Estados Unidos - Wyoming (AF033820.1), UK (AF016316.1), p19/wenv16 e wenv17 (AF028231.1 e AF028232.1), CL22 (M87581.1), PR (AF247394.1), (azul) isolados dos Japão - estirpe de campo Myiazaki 2011A (JX003263.1) e clones derivados da estirpe WYO, utilizado para infecção experimental em cavalos japoneses: V26 (AB008197.1) e V70: (AB008196.1), (triângulo roxo) amostras de estudos.

Cervantes e colaboradores (2016), realizaram um estudo de caracterização molecular do EIAV, proveniente de 55 cavalos diagnosticados como positivo no Texas, EUA. Os resultados filogenéticos demonstraram que para os genes *env* e *LTR*, as estirpes do EIAV circulante foram agrupadas em dois clados distintos, em contraste com os resultados obtidos para a região de *pol*, que alinhou todas as amostras em um único clado. Isso sugere que os cavalos de uma região em comum, são infectados pela mesma estirpe do EIAV, e devido a fatores que envolvem a susceptibilidade da espécie e a pressão seletiva gerada pela resposta imune do hospedeiro, as regiões mais variáveis do genoma viral acumulam mutações ao longo do tempo, e acabam se divergindo da estirpe infectante inicial.

Além disso, o fato das amostras 03, 07, 12 e 13 serem provenientes de animais na fase inaparente da doença, também justificaria o agrupamento em clados distintos. No período assintomático, o sistema imune do hospedeiro consegue controlar a infecção restringindo a replicação do vírus a níveis teciduais, por consequência, as taxas de mutações também diminuem consideravelmente (Spyrou et al., 2003). Já o animal FAS, aparentemente estava na fase crônica da doença, mantendo a replicação viral ativa em altos títulos, devido a reincidência de viremia, em resposta ao surgimento de novas variantes antigenicamente distintas que surgem devido a pressão seletiva gerada pelo sistema imune do hospedeiro (Cook et al., 2013).

Como resultado da extração do RNA viral no sangue dos animais, apenas em duas amostras (FAS e 07) foi possível a detecção de material genético. Um estudo quantitativo, realizado com animais experimentalmente infectados demonstrou que, equídeos na fase inaparente da doença mantém uma média de 0 a 100 cópias de RNA por mL de plasma, em contraste animais na fase aguda, a viremia girava em torno de  $10^7$  a  $10^8$  cópias de RNA por mL de plasma (Harrold et al., 2000). Issel e Adams (1982), comprovaram que a quantidade de partículas virais que circulam no sangue de animais assintomáticos é muito pequena, após realizar seis testes de inoculação do sangue de um animal sem sinais clínicos para AIE em um animal sadio e obter apenas uma transmissão bem-sucedida.

### 5.3. Histopatologia

Foram observadas discretas alterações histopatológicas nos tecidos dos animais (Anexo 4).

Uma leve deposição de hemossiderina, um complexo heterogêneo, composto principalmente de ferro, apoferritina, glicídios e lipídios que são depositadas sobre o citoplasma dos macrófagos, foi a principal observação encontrada no baço dos animais (Figura 11B-F), além de uma discreta hiperemia associada a polpa vermelha. A polpa branca, possuía um padrão celular normal. No muar 07 (Figura 11D), ainda foi observado uma deposição mínima de amiloides nos folículos linfoides. Em contrapartida, o cavalo FAS (Figura 11B) apresentou um quadro de hemossiderose intensa, uma hiperplasia discreta com leve diferenciação linfoplasmocitária e um acúmulo de amiloides nos folículos linfoides, podendo estar associados a casos de esplenomegalias uniformes.

Discretas lesões hepáticas, foram encontradas apenas no cavalo FAS, que apresentou uma marginação leucocitária discreta e uma leve presença de células inflamatórias via portal (Figura 12B). Nos demais animais houve ausência de qualquer tipo de anomalia histopatológica associada ao fígado.

Nos animais assintomáticos, as estruturas brônquicas e alveolares se encontravam normais. No tecido pulmonar dos muares 03 e 07 (Figura 13 C e D), foi encontrado uma hiperemia e um mínimo aumento do tecido linfóide associado aos bronquíolos (BALT). Já, o cavalo FAS, apresentou lesões leves associadas a uma pneumonia intersticial, com infiltração branda de linfócitos e células mononucleares, causando um espessamento dos septos alveolares (Figura 13B).

Foi encontrado a presença de uma discreta nefrite tubulointersticial linfo-histiocítica multifocal, nos rins dos equídeos 03 e 07, além de uma hiperemia cortical branda, associada aos glomérulos e túbulos (Figura 14 C e D). No cavalo FAS, além das lesões suprarenais, foi observado a presença de uma hemorragia focal na região adjacente aos grandes vasos córtico-medulares (Figura 14B).

A gravidade das lesões histopatológicas depende da cronicidade da doença, mas geralmente o local com maior significância é o baço, predominantemente influenciadas pelo elevado número e pelas atividades dos macrófagos, em reflexo a duração da doença e da frequência dos episódios hemolíticos. Macrófagos com hemossiderina persistem por muito tempo, portanto um grande número dessas células é

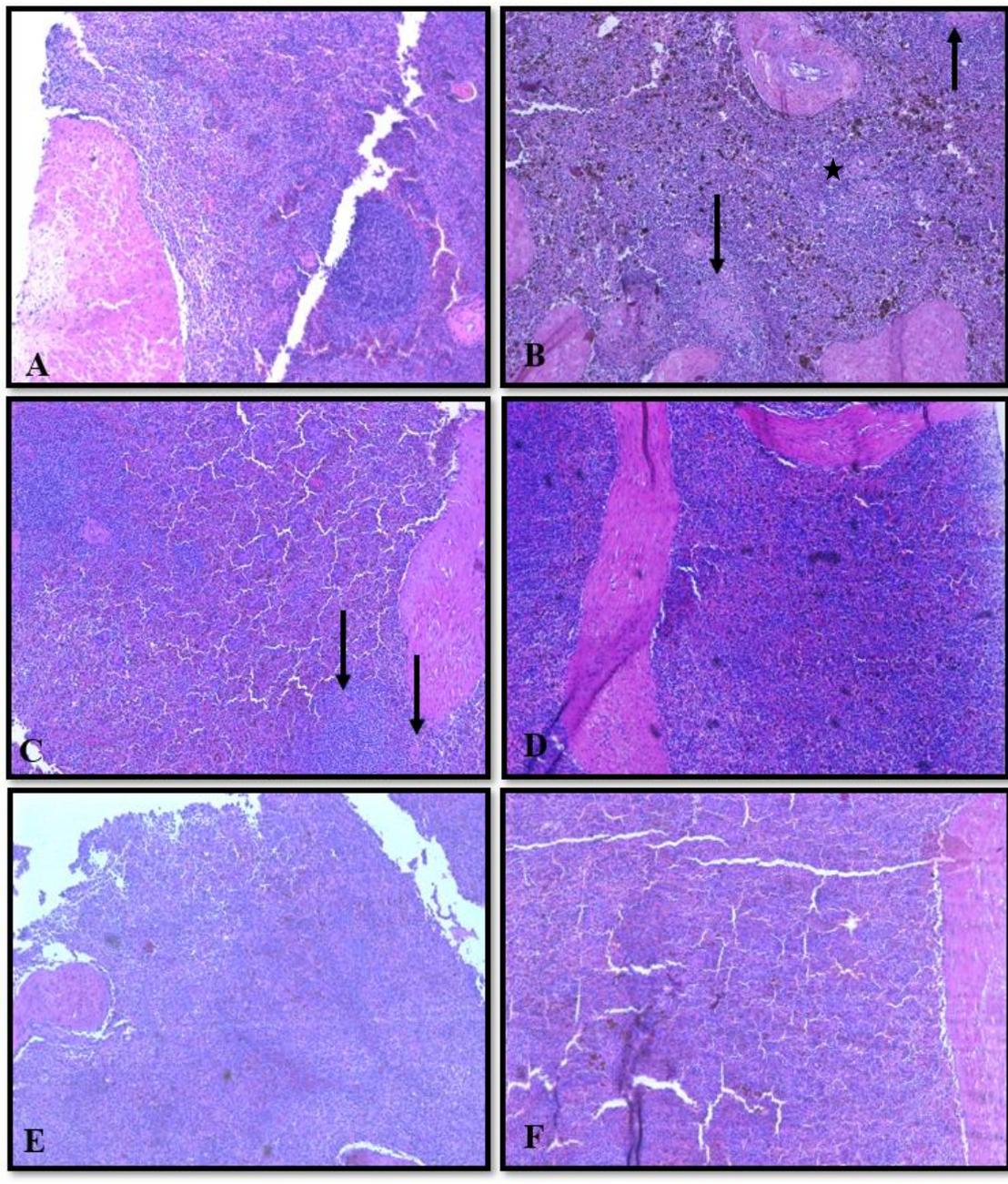
consistente com a cronicidade da doença. Os granulócitos são menos numerosos e a quantidade de plasmócitos é elevada (Zachari e McGavin, 2016).

Apesar de estar diretamente associada a perda de peso crônica que é um dos sinais clínicos característicos da AIE, o depósito de amiloidose nunca havia sido descrito para equídeos infectados com o EIAV. Entretanto, após uma infecção experimental com uma estirpe altamente virulenta do SIV em sete macacos Rhesus e três macacos fasciculares, foi observado que apenas um dos animais infectados desenvolveu o acúmulo de amiloide esplênico (Baskerville et al., 1990), sugerindo que, assim como o SIV nos primatas, as variações histopatológicas estão diretamente relacionadas a susceptibilidade do hospedeiro. Cada equídeo quando acometido pelo EIAV desenvolve uma resposta individual frente a infecção lentiviral que pode estar associada a patologias mais brandas ou mais graves (Hammond et al., 2000).

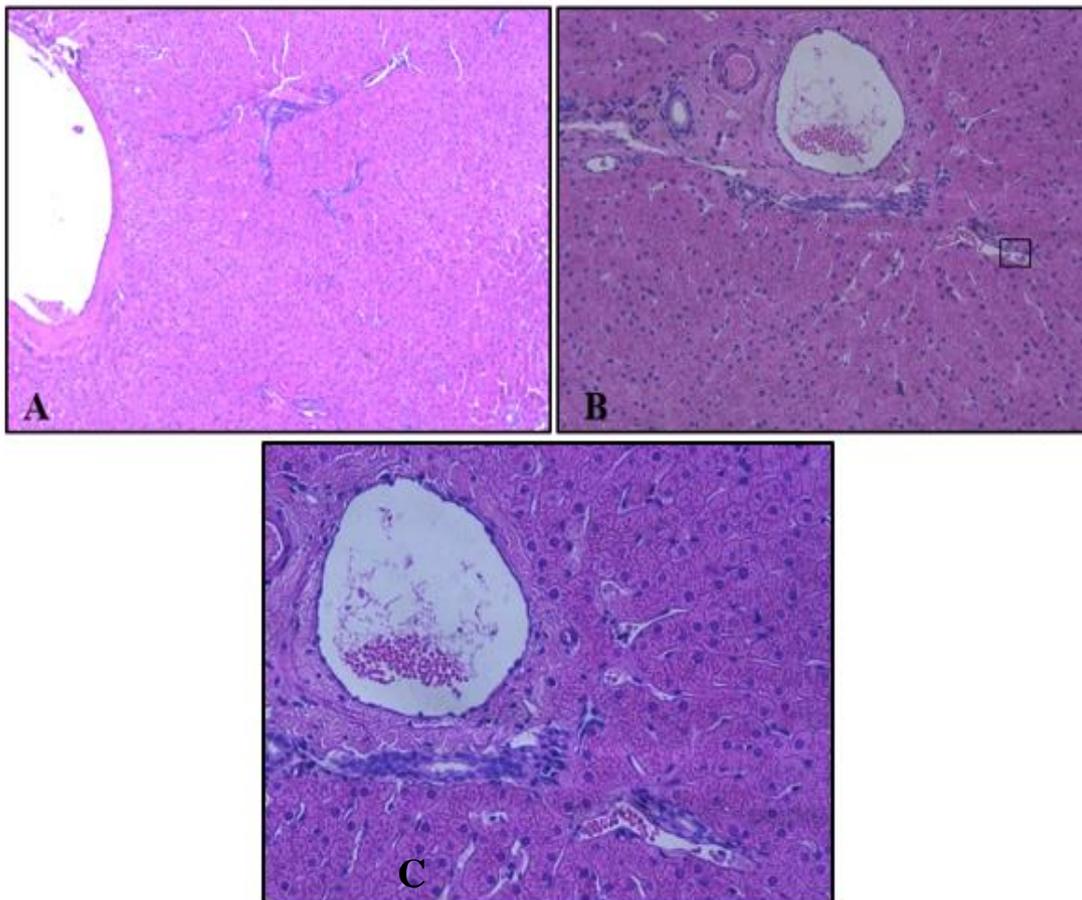
No fígado, a discreta presença de células inflamatórias portais assim como uma leve migração leucocitária foi encontrada apenas no animal sintomático. Os demais equídeos positivos para AIE, obtiveram a disposição celular normal e completa ausência de patologias. Isso pode ser explicado pela falta de replicação ativa do vírus no tecido que não induz o processo inflamatório no órgão. Um estudo realizado com pacientes diagnosticados com a Síndrome da imunodeficiência adquirida (AIDS), demonstrou que as células de Kupffer eram infectadas pelo HIV-1 de forma latente e não produziam vírus (Hufert et al., 1993). Alternativamente, as vias de degradação do fígado podem não permitir a integração viral e / ou replicação em células de Kupffer, resultando em uma infecção não produtiva (Ahsan et al., 2013).

Lesões pulmonares associada a pneumonia intersticial linfoide, já havia sido descrito em cavalos naturalmente e experimentalmente infectados com EIAV (Bolfà et al., 2013; Liu et al., 2016), assim como em crianças infectadas por HIV-1 (Travis et al., 1992), gatos infectados por FIV (Cadoré et al., 1997) e ovinos infectados pelo *Small ruminant lentiviruses* (SRLV) (Lairmore et al., 1996). Entretanto, a gravidade e a presença das lesões estão diretamente associadas a carga viral e a virulência da estirpe infectante (Brodie et al., 1992; Liu et al., 2016). De acordo com os resultados descritos para camundongos infectados experimentalmente com *Mycoplasma pulmonis*, a quantidade de sangue aumentada nos vasos, em reflexo a um processo de inflamação, induz a linfangiogênese nos pulmões, em resposta a uma estimulação antigênica por células dendríticas nos folículos linfóides, causando a diferenciação celular no centro germinativo e um leve aumento do BALT (Baluk et al., 2014), que pode desempenhar um papel protetor durante a lesão pulmonar (Jordan et al., 2013).

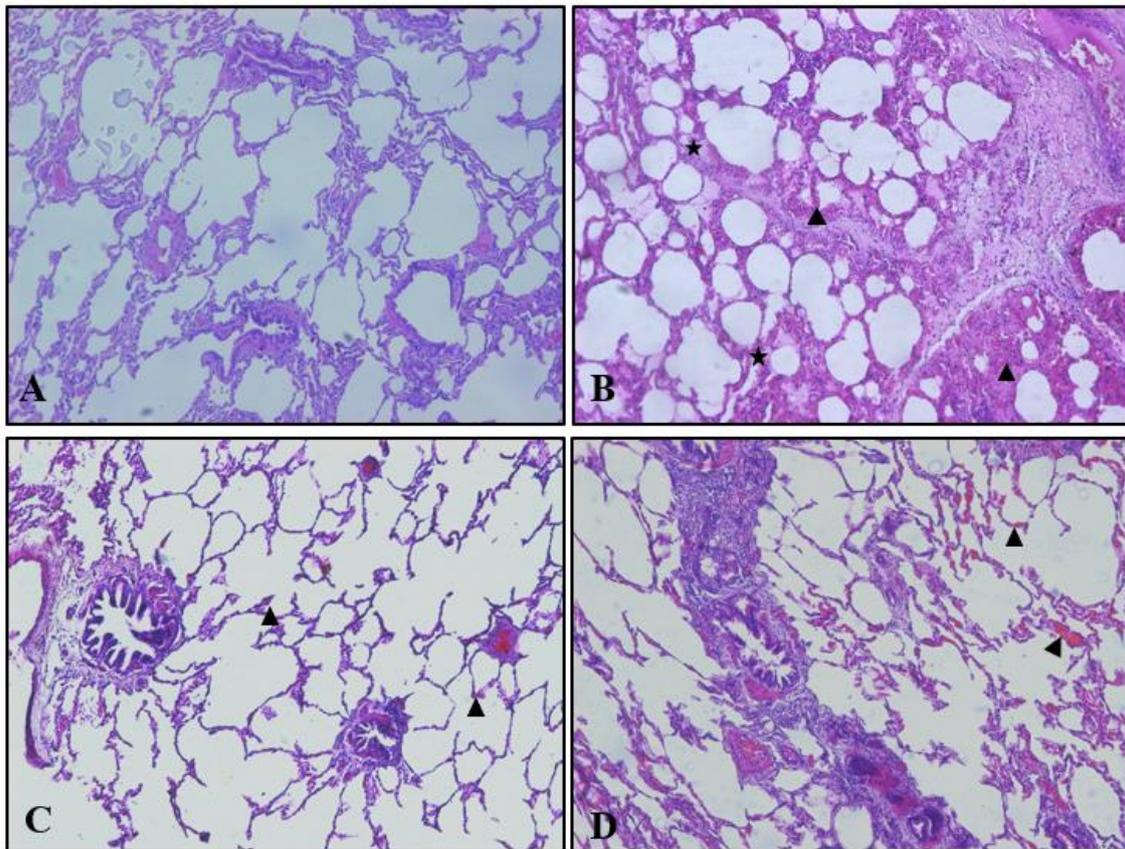
O depósito de imunocomplexos na membrana basal tubular pode ser responsável pelo início de uma lesão tubulointersticial. Em animais infectados com o EIAV, a deposição de imunoglobulinas e proteínas do complemento C3 ligados aos eritrócitos e plaquetas podem resultar no desenvolvimento de nefrite tubulointersticial (Cook et al., 2013). Esse tipo de lesão já foi encontrado em pacientes infectados com o HIV-1, entretanto 80% das infecções são induzidas pela toxicidade das drogas antivirais administradas nos pacientes e 20% estão associadas a coinfeções com *Mycobacterium avium* e *M. tuberculosis* (Zaidan et al., 2013). Curiosamente, glomerulosclerose, lesões tubulointersticiais e / ou alargamento mesangial devido ao depósito de IgM, IgG e C3 foram observados em gatos naturalmente e experimentalmente infectados com FIV, sugerindo uma relação causativa entre a infecção pelo lentivírus e o desenvolvimento de anormalidades renais (Poli et al., 2012; Asproni et al., 2013). Em equídeos, infecções pelo *Equine arteritis virus* (EAV), desenvolvem quadros crônicos de nefrite tubulointersticial linfo-histiocitária multifocal com edemas intersticiais, devido a infecção das células epiteliais tubulares (Del Piero, 2000).



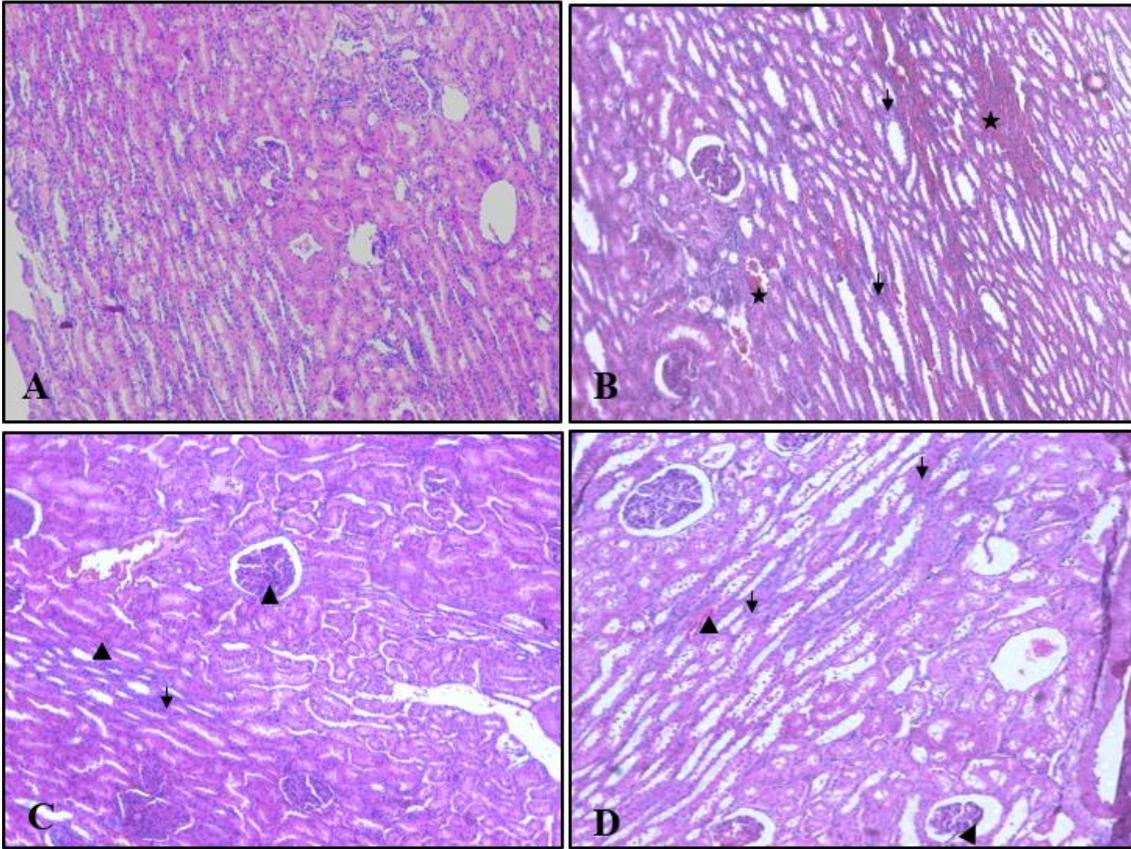
**Figura 11:** Histopatologia do baço. Deposição de hemossiderina de leve a moderada nos equídeos assintomáticos para AIE (C - F). Muar 07 (D) com presença leve de amiloides (★) nos folículos linfoides. Equino FAS (B) com intensa deposição de hemossiderina, amiloidose (★) e diferenciação linfoplasmocitária (★). Equino negativo para AIE (A). Amplificação de 20x. Coloração HE.



**Figura 12:** Histopatologia do fígado. (A) Equino negativo para AIE. Cavalos FAS, em destaque, a presença de uma marginação leucocitária discreta (B) em menor aumento, (C) em maior aumento. Amplificação de 20x e 40x. Coloração HE.



**Figura 13:** Histopatologia do pulmão. Hiperemia (▲) encontrada nos equídeos 03 e 07 (C e D). Cavalo FAS (B), com infiltração branda de linfócitos e células mononucleares (★), causando um espessamento dos septos alveolares, presença de hiperemia (▲). (A) Equino negativo para AIE. Amplificação de 20x. Coloração HE.



**Figura 14:** Histopatologia do rim. Presença de nefrite tubulointersticial linfo-histiocitária multifocal discreta (↘). Hiperemia (▲) encontrada nos equídeos 03 e 07 (C e D). Cavallo FAS (B), com hemorragia focal (★). (A) Equino negativo para AIE. Amplificação de 20x. Coloração HE.

#### 5.4. Padronização da diluição dos reagentes na imuno-citoquímica

A fim de testar a viabilidade dos reagentes e elucidar as melhores diluições dos anticorpos primário e secundário, foi padronizada uma imuno-citoquímica, utilizando cultivo de células ED persistentemente infectadas com a estirpe altamente patogênica EIAV<sub>WYO</sub> (Oaks et al., 1999; Oliveira, 2016) como controle positivo e células ED livres de infecção, como controle negativo.

A dosagem de anticorpos primários pelo método de IDGA, obteve reatividade até a diluição de 1:128, entretanto para gerar precipitações visíveis pelo teste de IDGA é necessário concentrações relativamente elevadas de anticorpos (Oliveira, 2016), sendo assim, acreditamos que o título real de anticorpos era superior à do resultado obtido.

Com o resultado do IDGA, a padronização da imuno-citoquímica, partiu de uma diluição dos anticorpos primários de 1:100 até 1:500 em PBS. Os anticorpos secundários, partiram de uma diluição de 1:300 até 1:900. A diluição ideal do mesmo, foi descrita como sendo de 1:500, para marcações imuno-histoquímicas dos pulmões e baço (Liu et al., 2016).

O substrato utilizado foi o DAB (ImmPACT™ DAB Peroxidase Substrate Kit - Vector Laboratories), e conforme descrito pelo fabricante, o seu tempo de incubação sobre os tecidos pode variar de 2 a 10 minutos, considerando esse dado, foi testado os intervalos de 2, 4, 6 e 8 minutos, sob as concentrações de 1,5% e 3%.

Conforme demonstrado na Tabela 4, quando utilizávamos a diluição do anticorpo primário em 1:500, sob quaisquer diluições dos anticorpos secundários, as imunomarcações eram ausentes, em contrapartida, quando era aplicado os anticorpos primários a uma diluição de 1:100, sob quaisquer diluições de anticorpos secundários, inúmeras marcações de fundo apareciam. Consideramos que as diluições de anticorpos primários de 1:200 e 1:300 eram as ideais, sendo que um *background* menor foi encontrado nos experimentos que utilizou a diluição de 1:300 dos anticorpos primários, seguindo de anticorpos secundários em 1:500.

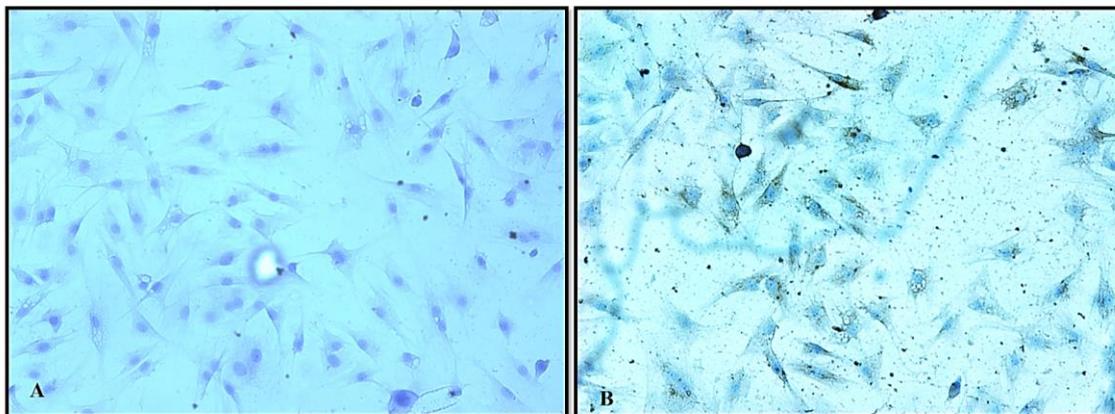
**Tabela 4:** Análise das imunomarcações geradas ao se utilizar diluições variadas do anticorpo primário, secundário e as concentrações de DAB 1,5% e 3%, por 2, 4, 6 e 8 minutos.

Diluições do AC1°	Concentrações de DAB								Diluições do AC2°
	3%				1,5%				
	2min	4min	6min	8min	2min	4min	6min	8min	
1:100	Bg	Bg	Bg	Bg	Bg	Bg	Bg	Bg	1:300
	Bg	Bg	Bg	Bg	Bg	Bg	Bg	Bg	1:500
	Bg	Bg	Bg	Bg	Bg	Bg	Bg	Bg	1:700
	Bg	Bg	Bg	Bg	Bg	Bg	Bg	Bg	1:900
1:200	Bg	Bg	Bg	Bg	Bg	Bg	Bg	Bg	1:300
	++	++	Bg	Bg	+	++	Bg	Bg	1:500
	+	+	++	++	-	+	+	++	1:700
1:300	-	-	+	+	-	-	-	+	1:900
	++	++	Bg	Bg	+	+	++	++	1:300
	+	+	++	++	+++	++	++	++	1:500
	+	+	+	++	-	-	+	+	1:700
1:500	-	+	+	+	-	-	-	+	1:900
	-	-	-	-	-	-	-	-	1:300
	-	-	-	-	-	-	-	-	1:500
	-	-	-	+	-	-	-	-	1:700
1:500	-	-	+	+	-	-	-	+	1:900

A intensidade da marcação imunológica foi classificada como: (-), nenhuma; (+) pouca reação positiva com marcação de fundo leve; (++) muita reação positiva com marcação de fundo mediano; (+++) muita reação positiva com marcação de fundo leve; (Bg), muita inespecificidade com marcação intensa do fundo.

Com relação ao tempo e a concentração ideal de DAB, foi observado, que quanto maior a diluição e o tempo do substrato sobre as lâminas maior eram as marcações de fundo, nesse caso, concluímos que o tempo de 2 minutos para o DAB na concentração de 1,5% era suficiente para gerar uma coloração marrom específica sob os locais onde estavam presentes os antígenos do EIAV.

As imunomarcações foram encontradas na região intracitoplasmática celular (Figura 15), onde ocorre a síntese de proteínas virais. Semelhante ao HIV-1, que após a entrada do vírus na célula-alvo, transcrição reversa do material genético e integração, o DNA proviral é transcrito pela RNA polimerase II do hospedeiro gerando um produto de transcrição que é encaminhado para o citoplasma, onde ocorre a tradução de proteínas e montagem de novas partículas virais (Ohlmann et al., 2014).



**Figura 15:** Presença de marcações intracitoplasmáticas (A) nas células ED infectadas com o EIAV, após a imuno-citoquímica. A ausência de marcação nas (B) células ED não infectadas, demonstra que os anticorpos produzidos são eficientes em detectar antígenos do EIAV. Em ambos os cultivos de células, foram utilizadas as mesmas concentrações dos reagentes: anticorpos primários (1:300); anticorpo secundário (1:500) e DAB 1,5% por 2 minutos. Ampliação de 20x.

### 5.5. Imuno-histoquímica dos animais infectados pelo EIAV

Depois que a viabilidade dos reagentes assim como a melhor diluição dos anticorpos e substrato foi padronizada na imuno-citoquímica, o próximo passo foi a detecção do EIAV nos tecidos dos equídeos diagnosticados como positivo para a AIE.

A recuperação antigênica, foi realizada por dois métodos distintos, o método enzimático (Sellon et al., 1992) e pelo calor utilizando tampão citrato (Hussaini et al., 2013). Pelo método enzimático, a recuperação antigênica não obteve uma resposta satisfatória em nenhum dos tecidos, visto que, nenhuma marcação específica foi encontrada. Já quando foi utilizado a recuperação antigênica pelo calor, ao final do processo as marcações antigênicas foram observadas nos tecidos, entretanto, houve muita perda de fragmento ao utilizar esse método. Sabendo que a temperatura de ebulição do tampão citrato é de aproximadamente 100°C (Hussaini et al., 2013), ao atingir a temperatura de 96°C, ideal para uma eficiente recuperação antigênica, o líquido passa a sofrer mudanças no seu estado físico, formando bolhas, que por serem menos densas, tendem a se movimentar do fundo do recipiente para a superfície (Jabardo, 2008). Essa movimentação, por consequência, agitavam as lâminas que se encontram dentro do mesmo, esse fato pode ter colaborado para o descolamento de alguns fragmentos teciduais.

Inicialmente, foi utilizado a diluição 1:300 de anticorpos primários, conforme pré-estabelecidas na imuno-citoquímica. Entretanto, para detecção do vírus nos tecidos, essa diluição não obteve bons resultados, pois as marcações antigênicas em determinados tecidos eram indetectáveis. Nesse caso, a diluição de 1:200, demonstrou uma maior quantidade de imunomarcações, mantendo o padrão baixo de *background*. O controle negativo da coloração imuno-histoquímica foi obtido com a omissão dos anticorpos primários e adição de PBS.

A pigmentação das marcações teciduais foi muito sutil quando comparadas aos trabalhos descritos na literatura que utilizam a mesma técnica. Menores diluições de anticorpos secundários (1:300 e 1:400) e concentrações variadas do substrato (1% e 2%) foram testadas. No entanto, as variações na concentração dos anticorpos secundários, não alterou o padrão das imunomarcações. Já o substrato, quanto maior a concentração do reagente utilizada, mais marcações de fundo apareciam. Nesse caso optamos pela concentração de 2%, com um tempo de incubação de 3 minutos, pois com intervalos maiores, muitas marcações inespecíficas apareciam (Tabela 5).

Ainda assim, mesmo após os ajustes nas concentrações dos reagentes, as imunomarcações ficaram discretas. Hipotetizamos, que esse resultado seja em reflexo a baixa especificidade e afinidade dos anticorpos anti-EIAV produzidos a partir da precipitação por ácido caprílico e sulfato de amônio 50% de um *pool* de soros proveniente de diversos equídeos positivos para AIE. Até o presente momento, não existe nenhum registro na literatura de anticorpos primários sintetizados por esse método, sendo empregados em ensaios imuno-histoquímicos. As marcações imuno-histoquímicas foram intracitoplasmáticas de leve intensidade e apresentaram um aspecto granular.

**Tabela 5:** Análise das imunomarcações geradas na imuno-histoquímica ao se utilizar diluições variadas do anticorpo primário, secundário e as concentrações de DAB 1%, 1.5% e 2%, por 2, 3 e 4 minutos.

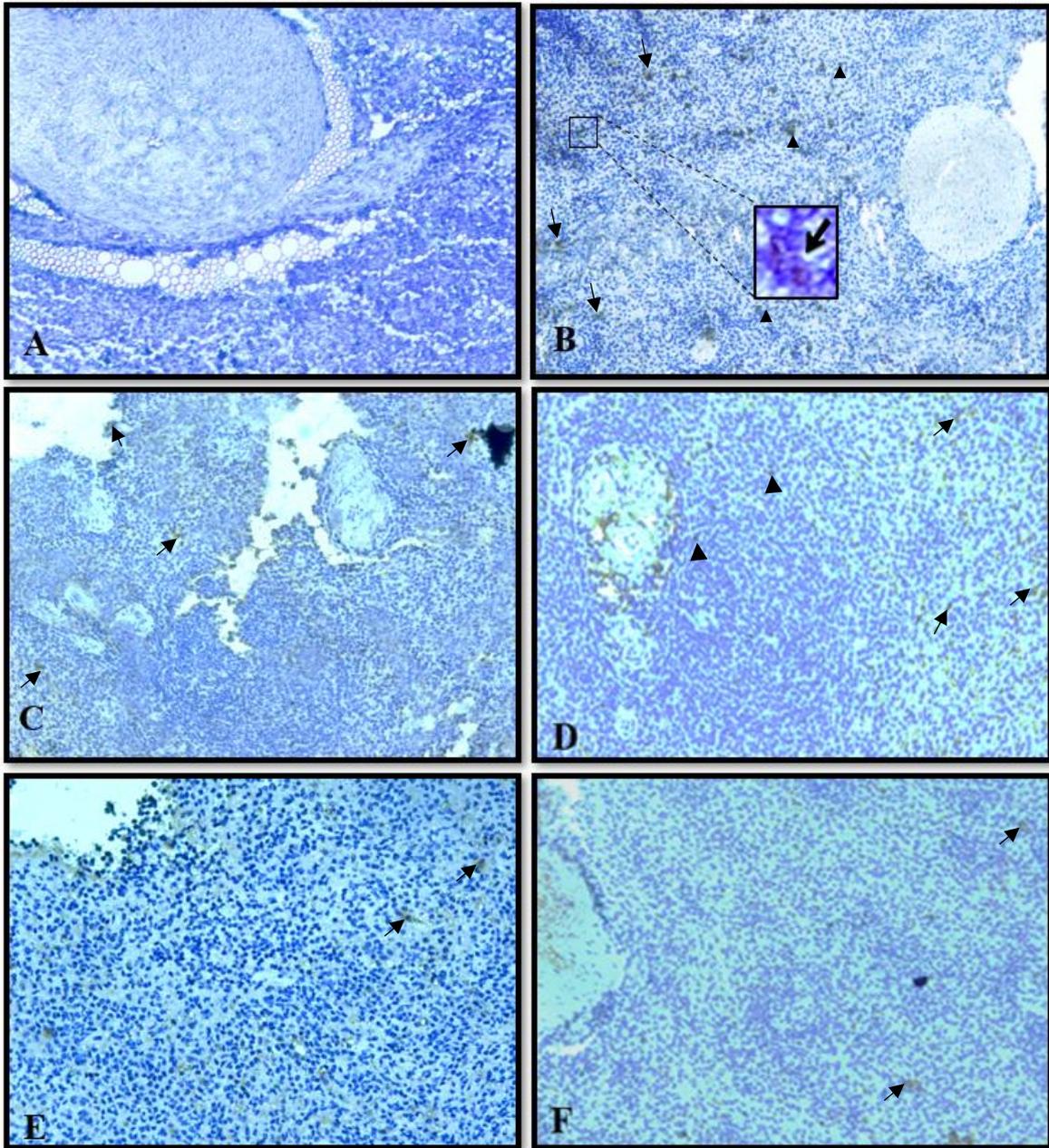
Diluições do AC1°	Concentrações de DAB									Diluições do AC2°
	1%			1,5%			2%			
	2min	3min	4min	2min	3min	4min	2min	3min	4min	
1:100	Bg	Bg	Bg	+	+	Bg	+	+	+	1:300
	Bg	Bg	Bg	+	+	Bg	+	+	+	1:400
	Bg	Bg	Bg	+	Bg	Bg	+	+	+	1:500
1:200	Bg	Bg	Bg	+	++	-/+	++	++	+	1:300
	Bg	Bg	Bg	+	++	-/+	++	+++	+	1:400
	Bg	Bg	Bg	+	+	-/+	+	++	+	1:500
1:300	Bg	Bg	Bg	-	+	-/+	-	+	+	1:300
	Bg	Bg	Bg	-	+	-/+	-	+	+	1:400
	Bg	Bg	Bg	-	+	-/+	-	-	+	1:500

A intensidade da marcação imunológica foi classificada como: (-) nenhuma; (-/+) pouca reação positiva com marcação de fundo intensa; (+) pouca reação positiva com marcação de fundo leve; (++) reação positiva com marcação de fundo mediano; (+++) reação positiva com marcação de fundo leve; (Bg), muita inespecificidade com marcação intensa do fundo.

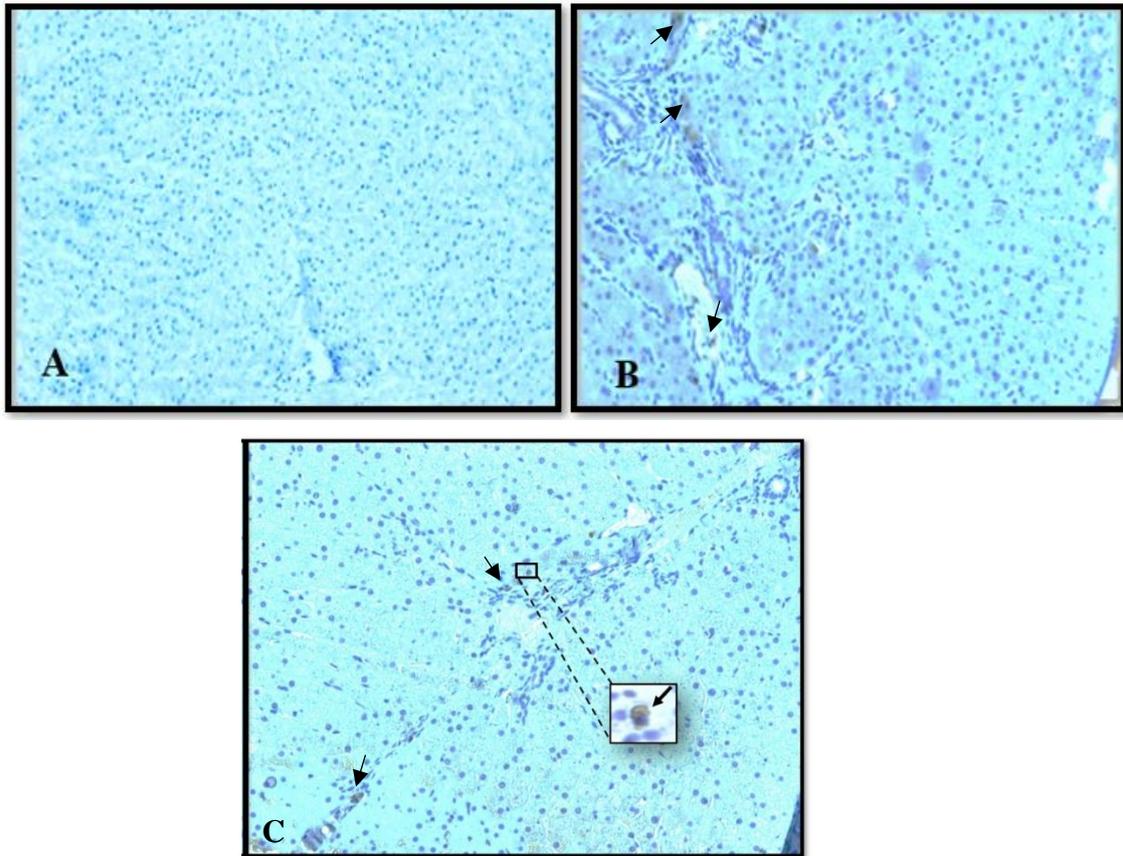
No baço (Figura 16), a maioria das marcações estavam disponíveis na polpa vermelha, formada por cordões esplênicos que constituem uma rede de leucócitos, granulócitos, linfócitos B e T, macrófagos, plasmócitos, eritrócitos e plaquetas, mas também foi possível identificar imunomarcações nas zonas marginais da polpa branca, principalmente no cavalo FAS, uma região com abundância de linfócitos, macrófagos e células dendríticas, capazes de reter e processar os antígenos trazidos pelo sangue.

No fígado (Figura 17), além do cavalo, apenas uma mula (07), apresentou imunomarcações, cerca de 3 a 5 focos foram detectados na região dos sinusóides hepáticos, capilares que conectam os vasos interlobulares, arteríolas e vênulas com a veia central. Os sinusóides são revestidos por células endoteliais, com a presença de macrófagos na superfície luminal do endotélio, conhecidos como células de Kupffer. Suas principais funções são metabolizar hemácias velhas, digerir hemoglobinas, secretar proteínas relacionadas com processos imunobiológicos e destruir eventualmente bactérias disponíveis no sangue (Junqueira e Carneiro, 2017).

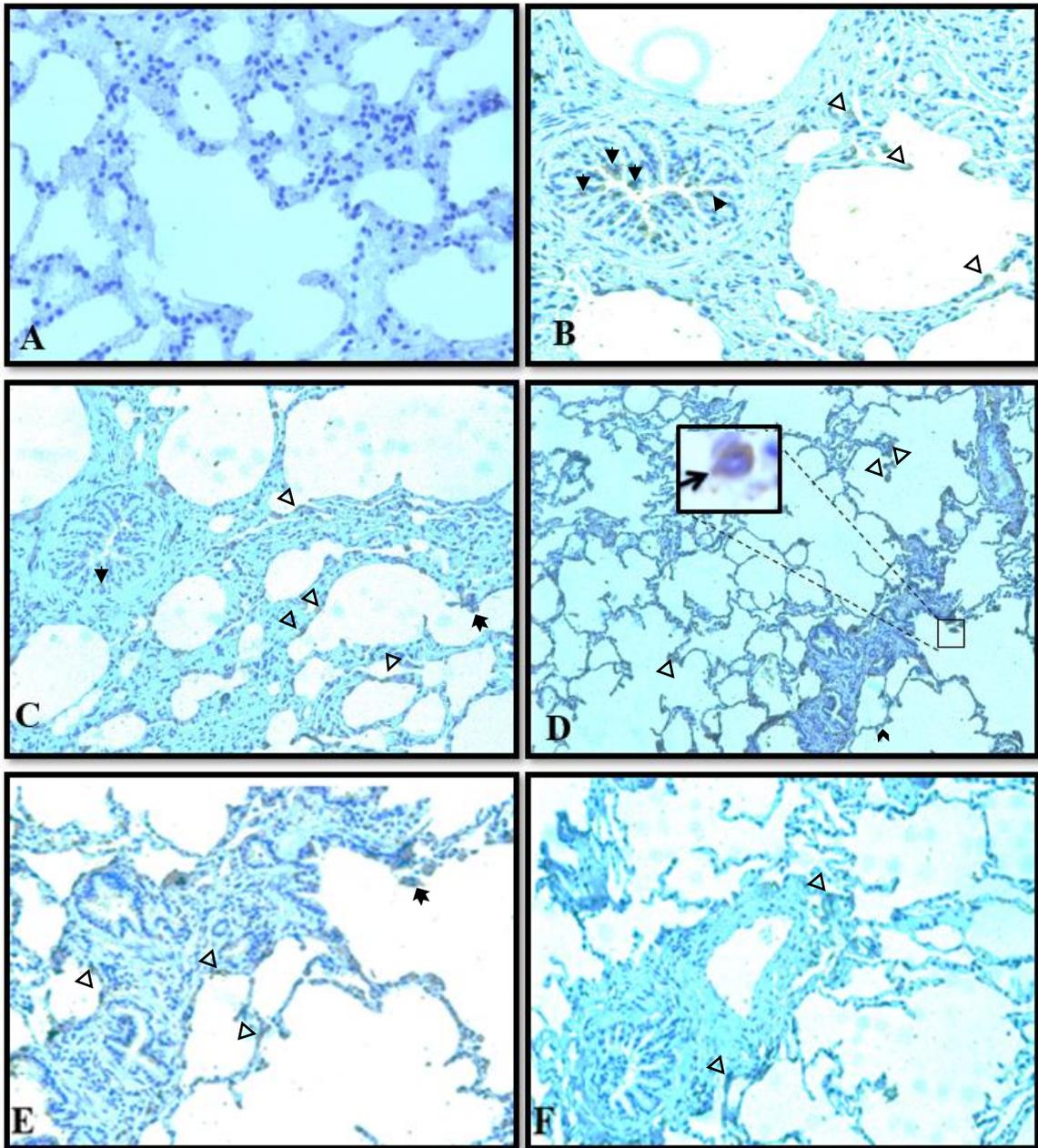
Nos pulmões (Figura 18), alguns macrófagos situados entre os alvéolos obtiveram coloração, entretanto, marcações expressivas foram encontradas nas células epiteliais dos bronquíolos terminais, assim como nas células endoteliais dos septos alveolares. Semelhante as imunomarcações encontradas nos rins (figura 19), que ocorreram na região cortical do órgão, onde se encontram as células epiteliais dos túbulos contorcidos proximal e distal, as marcações foram melhor visualizadas nos túbulos proximais, por serem mais longos e suas células serem mais largas, no entanto a redução do lúmen é reflexo da orla em escova que frequentemente é mal conservada, os capilares colabados e a presença de artefatos provenientes da técnica histológica.



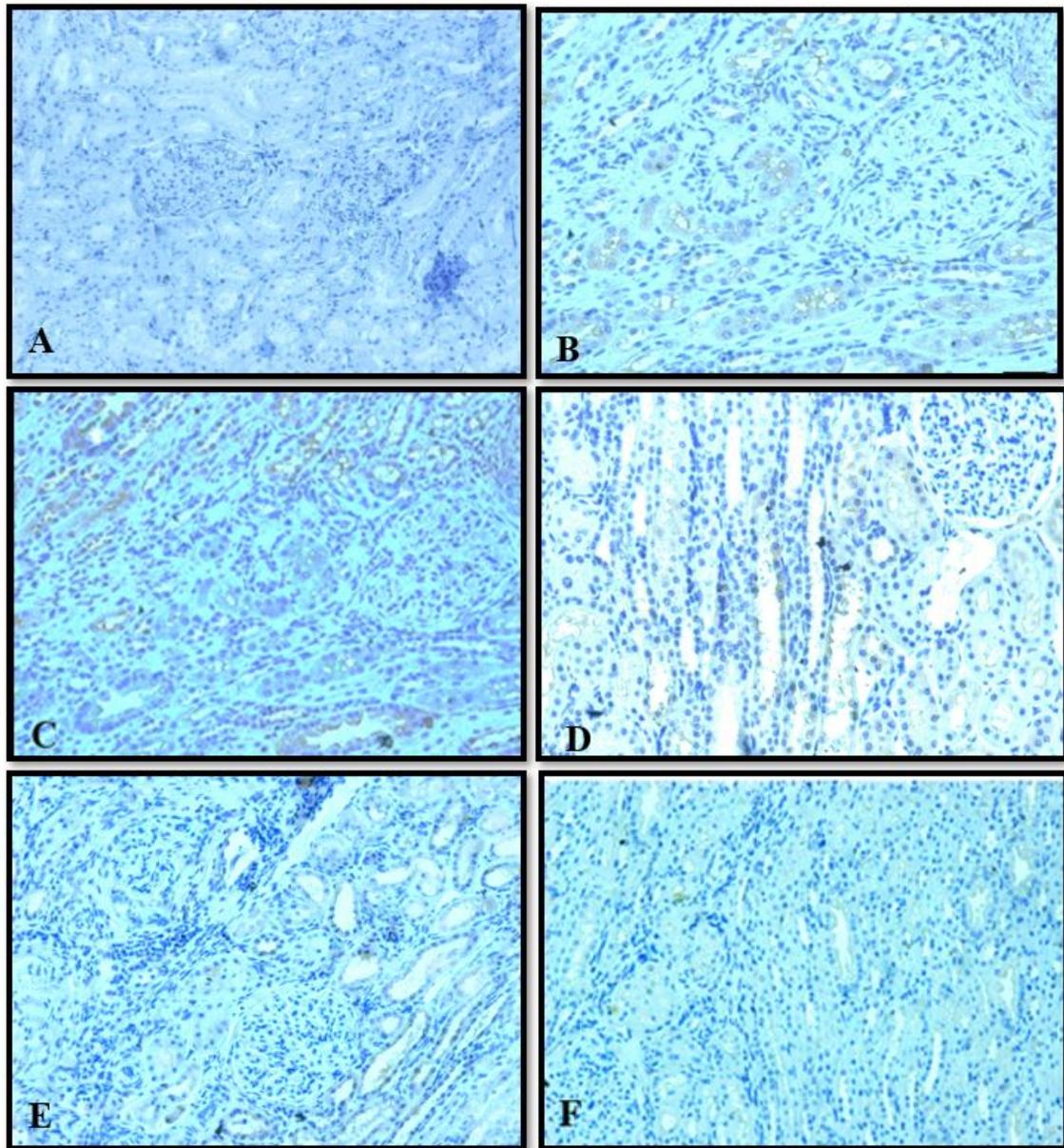
**Figura 16:** Marcações imuno-histoquímicas encontradas no baço. Nos animais positivos para AIE, as marcações foram encontradas na polpa vermelha (↗) e na zona marginal da polpa branca (▲). (A) Equino negativo para AIE. (B) Cavalos FAS, animal com sinais clínicos da doença, (C - F) animais diagnosticados como positivos para AIE, mas sem qualquer manifestação clínica. (C - 03; D - 07; E - 12; F-13). Ampliação 20x e 60x.



**Figura 17:** Fígado: marcações imuno-histoquímicas nos sinusóides hepáticos (♣) . Dos animais positivos para AIE, apenas em 2 foram encontradas imunomarcações. (B) Cavalos FAS, animal com sinais clínicos da doença. (C) Mula 07, diagnosticados como positivos para AIE, mas sem qualquer manifestação clínica. Em destaque para a marcação intracitoplasmática celular. (A) Equino negativo para AIE. Ampliação de 20x e 60x.



**Figura 18:** Marcações imuno-histoquímicas encontradas nos pulmões. As marcações foram encontradas nas células epiteliais dos bronquíolos terminais (↖), com exceção do animal 13 (F) e nas células endoteliais que revestem os septos alveolares (Δ). (A) Equino diagnosticado como negativo para AIE. (B) Cavalo FAS, animal com sinais clínicos da doença, (C - F) animais sem qualquer manifestação clínica. (C - 03; D - 07; E - 12; F - 13). Macrófagos alveolares (↗). Ampliação 20xe 60x.



**Figura 19:** Marcações imuno-histoquímicas encontradas nos rins. As marcações foram encontradas nas células epiteliais dos túbulos proximal e distal. (A) Controle negativo, potro diagnosticado como negativo para AIE; (B) Controle positivo, Cavalo FAS, animal com sinais clínicos da doença, (C - F) animais sem qualquer manifestação clínica. (C - 03; D - 07; E - 12). No animal 13 (F), foi encontrado apenas 2 pontos de marcação em túbulos proximais. Ampliação 20x.

Aproximadamente 95% dos equídeos infectados pelo EIAV, após um período inicial de manifestações clínicas, desenvolvem um quadro subclínico da doença por um prolongado tempo (Montelaro et al., 1993). O sistema imunológico do hospedeiro, apesar de não conseguir eliminar o vírus por completo, consegue limitar a sua replicação em macrófagos teciduais, gerando uma redução significativa da carga viral.

Os macrófagos são células envolvidas na detecção, fagocitose e destruição de patógenos. Sua síntese se inicia após um processo de diferenciação das células tronco, que ocorre na medula óssea, produzindo monócitos que são transferidos para a corrente sanguínea e se diferenciam posteriormente em macrófagos, principalmente no baço e nos gânglios linfáticos, que estão diretamente associados a defesa do organismo (Junqueira e Carneiro, 2017).

Considerando que a linhagem tecidual monócito/macrófago são as únicas células descritas até o momento que possuem o ELR-1, o único receptor associado a entrada do EIAV nas células alvo (Leroux, et al., 2004). O baço parece ser um local predominante de replicação viral e persistência, e isso justificaria a detecção do vírus neste tecido.

A polpa vermelha, foi a região de maior detecção de antígenos virais, isso pode ser explicado pela composição celular dessa região que é principalmente de linfócitos B e T, macrófagos e eritrócitos. Uma zona mal delimitada entre a polpa vermelha e branca, onde se encontram os chamados seios marginais, é uma região onde ocorre com abundância a apresentação de antígenos (Junqueira e Carneiro, 2017), e devido a isso, é também uma região rica em macrófagos e células dendríticas, entretanto, apenas 2 dos 5 animais apresentaram imunomarcações nessa região, a ausência de marcação nos seios marginais dos demais animais está diretamente associada a diminuição da carga viral, mediante a restrição transcricional que ocorre nas células-alvo do vírus (Oaks et al., 1998).

Os animais que apresentaram marcações nos seios marginais do baço foram também os únicos animais que desenvolveram imunomarcações no fígado, se trata do equino FAS e do muar 07. Cerca de 15% da sua população celular do fígado é constituída de macrófagos, denominados de células de Kupffer (Junqueira e Carneiro, 2017). Entretanto, alguns estudos têm demonstrado que existem duas isoformas do receptor ELR-1 na superfície dos macrófagos de equídeos, uma isoforma predominante e funcional e a outra com mutações no íntron 6 (ELR1-IN), que impede a síntese de ciclina T1 (eCT1), a principal proteína que permite a fusão do vírus na célula alvo. (Lin et al, 2013). Nesse sentido, Du e colaboradores (2015) após criarem camundongos transgênicos que expressavam o receptor ELR1/eCT1, observaram que os macrófagos hepáticos apresentavam um nível reduzido de transcrição do receptor funcional, quando comparado aos macrófagos esplênicos. Esse fato, associado a carga viral reduzida de um animal na fase assintomática da doença, pode justificar a ausência de imunomarcações.

Quanto ao muar 07, apesar de aparentemente não apresentar manifestações clínicas, além das marcações que o difere do restante dos animais assintomáticos, segundo informações cedidas pelos pesquisadores responsáveis pelo diagnóstico dos animais, o muar 07 apresentou uma leitura de densidade óptica (DO) bem alta no ELISA rgp45 e uma linha bem aparente no IDGA, indicando que a quantidade de anticorpos circulantes no hospedeiro frente ao EIAV, era elevada. A reatividade diferenciada desse animal pode ser explicada por fatores individuais do hospedeiro, como a variação da susceptibilidade deste animal e o tempo de infecção, visto que a alta quantidade de anticorpos circulantes e a ausência de sinais clínicos podem ser em reposta ao fim da fase crônica da doença, ao invés da fase inaparente, onde se encontravam os demais equídeos e por fatores relacionados ao vírus, como a diversidade genética e a carga viral. Resultados semelhantes foram encontrados em uma população de leões infectados com FIV, onde, apenas 2 dos animais analisados desenvolveram uma depleção progressiva de linfócitos, enquanto os demais felinos não apresentavam nenhuma alteração evidente, o fato foi associado a diversidade genética viral que circulava dentre os animais, que eleva a possibilidade de diferenças potenciais na patogenicidade (Roelke et al., 2009).

O cavalo FAS, se encontrava com manifestações clínicas, possivelmente associadas a fase crônica da doença, caracterizada por ciclos recorrentes de viremia, que desencadeia anemia, hemorragia, perda de peso e edemas. O desenvolvimento de sinais clínicos está diretamente associado a replicação viral ativa, que proporciona elevados níveis de vírus no sangue, podendo infectar uma maior quantidade de células-alvo (Harrold et al., 2000).

Foi observada a expressão de proteínas do EIAV em células mononucleares, bem como em células epiteliais dos bronquíolos terminais e endoteliais dos septos alveolares, em todos os animais, mas

em maiores proporções no equino FAS e no muar 07. É provável que a infecção crônica de células alveolares e / ou bronquiolares desempenhe um papel na manutenção de uma inflamação crônica, como tem sido sugerido para outras infecções causadas por lentivirus como o HIV-1 (Deeks et al., 2013). Com a imuno-histoquímica foi possível detectar também a presença de proteínas do EIAV nas células epiteliais dos túbulos renais dos equídeos persistentemente infectados. Marcações intracitoplasmáticas semelhantes, foram encontradas nos túbulos renais de ovinos naturalmente infectados pelo *Caprine arthritis encephalitis virus* (CAEV) (Angelopoulou et al., 2006), assim como transcritos de RNA viral foram encontrados nos glomérulos e túbulos renais de cabras infectadas pelo mesmo vírus (Zink et al., 1990).

Contudo, já foi demonstrado *in vitro*, a capacidade do HIV-1 em infectar células epiteliais pulmonares, e *in vivo*, a presença da glicoproteína de superfície gp120, foi detectada em células endoteliais dos pulmões de pacientes diagnosticados com AIDS (Kanmogne et al., 2001; Brune et al., 2016). Da mesma forma, proteínas estruturais, assim como o material genético do FIV e do SIV foram localizados nas células epiteliais dos túbulos renais de gatos domésticos e macacos *Rhesus*, respectivamente (Newman et al., 1998; Poli et al., 1993). Isso sugere, que as células endoteliais e epiteliais dos pulmões, bem como as células epiteliais dos rins são prováveis alvos dos lentivírus em diferentes espécies alvos.

O EIAV possui tropismo pela linhagem celular monócitos/macrófagos, devido a isso, o baço, o fígado, assim como o linfonodo são regiões onde normalmente são encontrados a maior quantidade de material genético e proteínas virais, visto que, são órgãos que possuem quantidades abundantes desses leucócitos mononucleares. Entretanto, assim como demonstrando por McGuire e colaboradores (1971), proteínas virais foram visualizadas no citoplasma de células endoteliais e epiteliais dos pulmões e nas células epiteliais tubulares dos rins de equídeos infectados com o EIAV.

Em estudos *in-vitro*, algumas estirpes do EIAV se replicaram em fibroblastos equinos em altos títulos (Klevjer-Anderson et al., 1979). Também foi observado que após o contato inicial do clone molecular EIAV<sub>MA-1</sub> com um cultivo de células endoteliais equinas, a infecção se espalhou rapidamente e produziu sobrenadantes com elevada carga viral. Isso sugere que o EIAV possui a capacidade de infectar e se replicar em outras linhagens celulares além dos macrófagos (Maury et al., 1998).

Aparentemente, os monócitos/macrófagos são os alvos primários do EIAV, no entanto, em infecções de longo prazo, devido à pressão seletiva do sistema imune do hospedeiro, o genoma viral passa a acumular mutações principalmente nas regiões *env* e *LTR*, que contém respectivamente o domínio de ligação do receptor viral e a sequência responsável por iniciar a transcrição do genoma, sendo assim, é possível que o tropismo celular seja afetado pela variação das sequências de nucleotídeos, que desenvolvem polimorfismos nos receptores, permitindo ao vírus reconhecer maior quantidade de variantes do ELR-1 (Liu et al., 2016), assim como ocorre com o HIV-1 e com o SIV, cujo tropismo inicial é por linfócitos TCD4, mas a longo prazo, são capazes de infectar as células endoteliais capilares do cérebro, causando neuropatias, independente dos linfócitos TCD4. (Connor et al., 1997; Edinger et al., 1997).

A presença de proteínas do EIAV no interior das células que revestem os bronquíolos, septos alveolares, túbulos proximais e distais de equídeos persistentemente infectados, indicam que novas partículas virais estão sendo sintetizadas no local, com isso, surgem novas possibilidades de eliminação do vírus no ambiente, como pela urina ou por aerossóis oriundos das vias aéreas.

Em 2007, 13 cavalos e 2 potros, abrigados em um hospital veterinário da Irlanda, se soros converteram, após uma égua AIE positiva, com sinais clínicos agudos e um intenso quadro de hemorragia ser alojada por 24 horas no local. Apesar de todos os animais estarem acomodados em baias individuais, 30 a 157 dias após o contato prévio com o equino infectado, todos os animais foram diagnosticados como positivos nos testes de ELISA e IDGA (Cullinane et al., 2007). Além desse fato, entre 2010 e 2011, durante um surto de AIE na Romênia, foi identificado lesões pulmonares associadas a uma doença pulmonar intersticial em 79 equinos infectados pelo EIAV, com posterior detecção das proteínas do capsídeo viral em células mononucleares, bem como em células endoteliais do pulmão desses animais (Bolfá et al., 2013).

Considerando a capacidade do vírus em se replicar em células epiteliais e endoteliais dos pulmões dos equídeos, a inalação de partículas virais aerossolizadas vem sendo cogitada como um possível mecanismo de disseminação do EIAV, assim como ocorre com o MVV e o CAEV, lentivirose que possuem tropismo por monócitos, macrófagos e células dendríticas de pequenos ruminantes, transmitidos via ingestão de colostro e leite, mas também por aerossóis, após induzir uma pneumonia intersticial linfocítica crônica em seus hospedeiros (Pépin et al., 1998; Pérez et al., 2015; Pinczowski et al., 2017). Alguns estudos, descreveram a presença do genoma do MVV e do CAEV nas células epiteliais

bronquiolares de ovelhas e cabras infectadas (Zink et al., 1990; Staskus et al., 1991), confirmando que o tropismo celular dos lentivírus pode se estender além dos limites estreitos de linfócitos e macrófagos, ampliando consequentemente as vias de transmissão desses vírus.

A eliminação de vírus pela urina foi recentemente relatada em pacientes infectados com o HIV-1 que não eram adeptos as terapias antiretrovirais, os pesquisadores observaram que a dinâmica de liberação do vírus é independente da produção do mesmo nas células sanguíneas, ou seja, o HIV-1 é sintetizado independente dos linfócitos em alguma célula do próprio trato genitourinário (Blasi et al., 2015). Um outro estudo, observou que a presença do vírus na urina estava associada a células epiteliais renais (Qiao et al., 2017), isso sugere que o local prévio de replicação do HIV-1 possa ser as células epiteliais associadas aos túbulos proximais e distais. Dessa forma, a presença de proteínas do EIAV nestas células, pode indicar uma possível eliminação do vírus na urina de equídeos infectados.

A detecção do vírus *in-situ*, é um importante passo para a compreensão de aspectos relevantes acerca da patogenidade viral, como o tropismo tecidual e a identificação das células-alvo.

Com a padronização da técnica de imuno-histoquímica, foi possível detectar células epiteliais e endoteliais pulmonares infectadas com o EIAV, assim como a presença de proteínas virais no epitélio dos túbulos distais e proximais dos rins, indicando novas células que possivelmente atuam como fonte de replicação do vírus. Embora altamente especulativo, surge uma hipótese de novas formas de eliminação e transmissão do EIAV, que vão além dos vetores mecânicos ou do compartilhamento de agulhas, materiais cirúrgicos e materiais equinos infectados com o sangue de um animal soropositivo.

A técnica de imuno-histoquímica descrita no trabalho, poderá ser útil não só para a compreensão da patogênese como para a expansão do conhecimento acerca do tropismo celular de outros retrovírus, sendo capaz de fornecer informações sobre possíveis vias alternativas de infecção e outros mecanismos de disseminação viral, semelhante ao que foi observado para o EIAV.

## 6. CONCLUSÃO

Nesse estudo foi padronizado um ensaio imuno-histoquímico capaz de detectar antígenos do EIAV em células do baço, fígado, rins e pulmões de equídeos naturalmente infectados pelo EIAV. A maior quantidade de imunomarcações foi observada no baço, local normalmente repleto de macrófagos, confirmando o tropismo viral por fagócitos mononucleares. No entanto, a presença do EIAV em células epiteliais do pulmão e do rim indica que o vírus consegue infectar outros tipos de células além dos macrófagos, podendo sua eliminação ocorrer pela urina e/ou por secreções oronasais, abrindo uma hipótese sobre novos mecanismos de transmissão que precisam ser melhores investigados.

## 7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICA

AMERICAN HORSE COUNCIL FOUNDATION, (AHCF). Economic Impact of the U.S. Horse Industry. Washington: AHCF, 2017. Disponível em: <https://thehorsemensnews.com/2018/03/ahcf-announces-results-2017-economic-impact-study/>. Acesso em: 10 de dezembro de 2018.

AHSAN, M. H.; GILL, A. F.; ALVAREZ, XAVIER, A.; et al. Kinetics of liver macrophages (Kupffer cells) in SIV-infected macaques. *Virology*, v. 446, n. 1–2, p. 77–85, 2013.

ALMEIDA, V. M. A.; GONÇALVES, V. S. P.; MARTINS, M. F.; et al. Anemia infecciosa equina: Prevalência em equídeos de serviço em Minas Gerais. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*, v. 58, n. 2, p. 141–148, 2006.

ALMEIDA, V. M. A.; DE OLIVEIRA, C. H. S.; FIORILLO, K. S.; et al. Prevalence of equine infectious anemia in stud farms in Minas Gerais, Brazil. *Semina: Ciências Agrárias*, v. 38, n. 3, p. 1335–1346, 2017.

- ANGELOPOULOU, K.; BRELLOU, G. D. E; VLEMMAS, I. Detection of Maedi-Visna Virus in the Kidneys of Naturally Infected Sheep. *Journal of Comparative Pathology*, v. 134, n. 4, p. 329–335, 2006.
- ARAÚJO, N. A. Origem histórica do jumento doméstico: suas raças. Patos de Minas, Ed. Grafipress, 1 ed, 311 p., 2010.
- ASPRONI, P.; ABRAMO, F.; MILLANTA, F.; et al. Amyloidosis in association with spontaneous feline immunodeficiency virus infection. *Journal of feline medicine and surgery*, v.15, n.4, p.300-306, 2013.
- BALUK, P.; ADAMS, A.; PHILLIPS, K.; et al. Preferential lymphatic growth in bronchus-associated lymphoid tissue in sustained lung inflammation. *American Journal of Pathology*, v. 184, n. 5, p. 1577–1592, 2014.
- BATTIFORA, H.; KOPINSKI, M. The influence of protease digestion and duration of fixation on the immunostaining of keratins. A comparison of formalin and ethanol fixation. *Journal of Histochemistry & Cytochemistry*, v. 34, n. 8, p. 1095-1100, 1986.
- BASKERVILLE, A.; RAMSAY, A.; CRANAGE, M. P.; et al. Histopathological changes in simian immunodeficiency virus infection. *The Journal of Pathology*, v. 162, n. 1, p. 67–75, 1990.
- 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.
- BLASI, M.; BALAKUMARAN, B.; PING, C. H. E. N.; et al. Renal epithelial cells produce and spread HIV-1 via T-cell contact. *AIDS (London, England)*, v.28, n.16, p.2345, 2014.
- BOLFA, P.; NOLF, M.; CADORÉ, J.L.; et al. Interstitial lung disease associated with Equine Infectious Anemia Virus infection in horses. *Veterinary Research*, v. 44, n. 1, 2013.
- BOENISCH, T. Formalin-fixed and heat-retrieved tissue antigens: a comparison of their immunoreactivity in experimental antibody diluents. *Applied Immunohistochemistry & Molecular Morphology*, v. 9, n. 2, p. 176-179, 2001.
- 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, *Journal of Virology 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. Instrução Normativa Nº 52, de 26 de novembro de 2018. 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, 27 nov. 2018. Seção 1, nº. 227, p.9.
- BRODIE, S. J.; MARCOM, K. A.; PEARSON, L. D.; et al. Effects of virus load in the pathogenesis of lentivirus-induced lymphoid interstitial pneumonia. *Journal of Infectious Diseases*, v.166, n.3, p. 531-541, 1992.
- BRUNE, K. A.; FERREIRA, F.; MANDKE, P.; et al. HIV Impairs Lung Epithelial Integrity and Enters the Epithelium to Promote Chronic Lung Inflammation. *PLoS ONE*, v. 11, n. 3, p. 1–17, 2016.
- CADORÉ, J. L.; STEINER-LAURENT, S.; GREENLAND, T.; et al. Interstitial lung disease in feline immunodeficiency virus (FIV) infected cats. *Research in veterinary science*, v. 62, n. 3, p.287-288, 1997.

- CAGNINI, D. Q.; CUNHA, P. H. J.; PANTOJA, J. C. F.; et al. Histopathological, immunohistochemical and molecular study of BHV-5 infection in the central nervous system of experimentally infected calves. *Pesquisa Veterinária Brasileira*, v. 35, n. 4, 2015.
- CAPOMACCIO, S., CAPPELLI, K., COOK, R. F.; et al. Geographic structuring of global EIAV isolates: A single origin for New World strains? *Virus Research*, v. 163, p.656–659, 2012.
- CAPPELLI, K.; CAPOMACCIO, S.; COOK, F. R.; et al. Molecular detection, epidemiology, and genetic characterization of novel european field isolates of equine infectious anemia virus. *Journal of Clinical Microbiology*, v. 49, n. 1, p. 27–33, 2011.
- CAPPER, D.; PREUSSER, M.; HABEL, A.; et al. Assessment of BRAF 600E mutation status by immunohistochemistry with a mutation-specific monoclonal antibody. *Acta Neuropathology*, v.122, n.1, p.11-19, 2011.
- CERVANTES, D. T.; BALL, J. M.; EDWARDS, J.; et al. Horses naturally infected with EIAV harbor 2 distinct SU populations but are monophyletic with respect to IN. *Virus Genes*, v.52, n.1, p. 71–80, 2016.
- CHEEVERS, W. P.; MCGUIRE, T. C. Equine Infectious Anemia Virus: Immunopathogenesis and Persistence, *Oxford University Press*, v. 7, n. 1, p. 83–88, 2016.
- CLABOUGH, D. L.; GEBHARD, D.; FLAHERTY, M. T.; et al. Immune-mediated thrombocytopenia in horses infected with equine infectious anemia virus. *Journal of virology*, v.65, n. 11, p. 6242-6251, 1991.
- CLEMENTS, J. E.; ZINK, M. C. Molecular biology and pathogenesis of animal lentivirus infections. *Clinical microbiology reviews*, v.9, n.1, p.100-117, 1996.
- CLERICI, M.; SHEARER, G.M. Correlates of protection in HIV infection and the progression of HIV infection to AIDS. *Immunology Letters*, v.51, n.1–2, p.69–73, 1996.
- 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.
- CONNORS, M.; KOVACS, J. A.; KREVAT, S.; et al. HIV infection induces changes in CD4+ T-cell phenotype and depletions within the CD4+ T-cell repertoire that are not immediately restored by antiviral or immune-based therapies. *Nature medicine*, v.3, n.5, p.533, 1997.
- COONS, A. H. C; REECH, H. J.; JONES, R. N. Immunological properties of an antibody containing a fluorescent group. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and medicine*, v.47, n.2, p.200-202, 1941.
- 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.; et al. Differential responses of *Equus caballus* and *Equus asinus* to infection with two pathogenic strains of equine infectious anemia virus. *Veterinary Microbiology*; v.79, n.2, p.93-109, 2001.
- 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*, v.313, n.2, 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. *Equine Veterinary Journal*, p.56-70, 2009.
- COOK, R. F.; LEROUX, C.; ISSEL, C. J. Equine infectious anemia and equine infectious anemia virus in 2013: A review. *Veterinary Microbiology*, v.167, n.1-2, p.181-204, 2013.
- COVALEDA, L.; FULLER, F. J.; PAYNE, S. L. EIAV S2 enhances pro-inflammatory cytokine and chemokine response in infected macrophages. *Virology*, v.397, n.1, p.217-233, 2009.
- 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.
- CULLINANE, A.; QUINLIVAN, M.; NELLY, M.; et al. Diagnosis of equine infectious anaemia during the 2006 outbreak in Ireland. *Veterinary Record*, v.161, n.19, p.647-652, 2007.
- CURSINO, A. E.; VILELA, A. P. P.; FRANCO-LUIZ, A. P. M.; et al. Equine infectious anemia virus in naturally infected horses from the Brazilian Pantanal. *Archives of Virology*, v.163, n.9, p.2385-2394, 2018.
- DAVIES, J. L.; UZAL, F. A.; WHITEHEAD, A. E. Necrotizing hepatitis associated with *Clostridium novyi* in a pony in western Canada. *Canadian Veterinary Journal*, v.58, n.3, p.285-288, 2017.
- DEEKS, S. G.; LEWIN, S. R.; HAVLIR, D. V. The end of AIDS: HIV infection as a chronic disease. *The Lancet*, v.382, n.9903, p.1525-1533, 2013.
- DEL PIERO, F. Equine viral arteritis. *Veterinary Pathology*, v.37, n.4, p.287-296, 2000.
- DESROSIERS, R. C. Nonhuman lentiviruses. In.: Knipe, D.M.; Howley, P.M. (Eds.), *Fields Virology*, vol. 2. Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, p. 2215, 2007.
- DONG, J. B.; ZHU, W.; COOK, F. R.; et al. Development of a nested PCR assay to detect equine infectious anemia proviral DNA from peripheral blood of naturally infected horses. *Archives of Virology*, v.157, n.11, p.2105-2111, 2012.
- DONG, J. B.; ZHU, W.; COOK, F. R.; et al. Identification of a novel equine infectious anemia virus field strain isolated from feral horses in southern Japan. *Journal of General Virology*, v.94, n. PART2, p.360-365, 2013.
- DU, C.; MA, J.; LIU, Q.; et al. Mice transgenic for equine cyclin T1 and ELR1 are susceptible to equine infectious anemia virus infection. *Retrovirology*, v.12, n.1, p.36, 2015.
- DUFOUR, C.; CORCIONE, A.; SVAHN, J.; et al. TNF-alpha and IFN-gamma are overexpressed in the bone marrow of Fanconi anemia patients and TNF-alpha suppresses erythropoiesis in vitro. *Blood*, v.102, p.2053-2059, 2003.
- EDINGER, A. L.; MANKOWSKI, J. L.; DORANZ, B. J.; et al. CD4-independent, CCR5-dependent infection of brain capillary endothelial cells by a neurovirulent simian immunodeficiency virus strain. *Pnas*, v. 94, p.14742-14747, 1997.
- EMBRETSON, J.; ZUPANCIC, M.; RIBAS, J. L.; et al. Massive covert infection of helper T lymphocytes and macrophages by HIV during the incubation period of AIDS. *Nature*, v.362, p.6418, 359, 1993.

- EQUINE CANADA. 2010 Canadian equine industry profile study, the state of industry- 2010. Ottawa: EQUINE CANADA, 2011. Disponível em: <https://thehorse.com/119780/2010-canadian-equine-industry-profile-study-results-released/>. Acesso em 10 de dezembro de 2018.
- FACIN, D. V. Sistema brasileiro de inspeção de produtos de origem animal. *Informativo técnico DPA*, n.7, p.1-2, 2011.
- FELLI, N.; PEDINI, F.; ZEUNER, A.; et al. Multiple members of the TNF superfamily contribute to IFN-gamma-mediated inhibition of erythropoiesis. *Journal of Immunology*; v.175, p.1464 – 1472, 2005.
- FERRO, A. B. Imunohistoquímica. Instituto Politécnico de Lisboa – Escola Superior de Tecnologia da Saúde de Lisboa, (2013). Disponível em: <https://amadeuferro.webs.com/documentos/texto%20total%20v2.4a.pdf>. Acesso em 26 de dezembro de 2018.
- FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS (FAO) - Statistical Database. Live Animals - Production of Horses by country. Roma: FAO, 2014. Disponível em: <http://www.fao.org/faostat/en/#data/QA/visualize>. Acesso em: 10 de dezembro de 2018.
- FRANCO, M.M.J.; PAES, A.C. Anemia infecciosa equina. *Veterinária e Zootecnia*, v.197, p.207, 2011.
- FREITAS, N. F. Q. R.; OLIVEIRA, C. M. C.; LEITE, R. C.; et al. Equine infectious anemia on Marajo Island at the mouth of the Amazon river. *Pesquisa Veterinária Brasileira*, v.35, n.12, p.947–950, 2015.
- GEISSMANN, F.; MANZ, M.G.; JUNG, S.; et al. Development of monocytes, macrophages and dendritic cells. *Science*, v.327, n.5966, p.656-661, 2010.
- GENDELMAN, H. E.; NARAYAN, O.; MOLINEAUX, S.; et al. Slow, persistent replication of lentiviruses: role of tissue macrophages and macrophage precursors in bone marrow. *Pnas*, v.82, p.7086–7090, 1985.
- GILBERT, M. T. P.; HASELKORN, T.; BUNCE, M.; et al. The Isolation of Nucleic Acids from Fixed, Paraffin-Embedded Tissues-Which Methods Are Useful When? *PLoS ONE*, v.2, n.6, 2007.
- GILLIES, S. D.; FOLSOM, V.; TONEGAWA, S. Cell type-specific enhancer element associated with a mouse MHC gene, E $\beta$ . *Nature*, v.310, n.5978, p.594-597, 1984.
- GOWN, A. M. Current issues in ER and HER2 testing by IHC in breast cancer. *Modern Pathology*, v.21, p.S8–S15, 2008.
- GUIRADO, R.; CARCELLER, H.; CASTILLO-GOMEZ, E.; et al. Automated analysis of images for molecular quantification in immunohistochemistry. *Heliyon*, v.4, n. 6, 2018.
- HAGENBEEK, A.; GASCOYNE, R.; DREYLING, M.; et al. Biomarkers and prognosis in malignant lymphomas. *Clinical Lymphoma and Myeloma*, v.9, n.2, p.160–166, 2009.
- HAMKINS, J. A.; ADAMS, J. R. M.; WILSON, B. H.; et al. Transmission of *Equine Infectious Anemia Virus* by *Tabanus fuscicostatus*. *Journal of American Veterinary Medical Association*, v.168, n.1, P. 63-64, 1976.

- HAMMOND, S. A.; HOROHOV, D.; MONTELARO, R.C. Functional characterization of equine dendritic cells propagated ex vivo using recombinant human GM-CSF and recombinant equine IL-4. *Veterinary immunology and immunopathology*, v.71, n.3-4, p. 197-214, 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.
- HANLY, W. C.; ARTWOHL, J. E.; BENNETT, B. T. Review of Polyclonal Antibody Production Procedures in Mammals and Poultry. *ILAR Journal*, v.37, n.3, p.93-118, 1995.
- HANS, C. P.; WEISENBURGER, D. D.; GREINER, T.C.; et al. Confirmation of the molecular classification of diffuse large B-cell lymphoma by immunohistochemistry using a tissue microarray. *Blood*, v.103, n.1, p.275-282, 2004.
- HARROLD, S. M.; COOK, S. J.; COOK, R. 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.3112-21, 2000.
- HASEGAWA, M.; KISHINO, H.; YANO, T. Dating of the human-ape splitting by a molecular clock of mitochondrial DNA. *Journal of molecular evolution*, v.22, n.2, p.160-174, 1985.
- HENSON, J. B.; MCGUIRE, T. C. Immunopathology of equine infectious anemia. *American Journal of Clinical Pathology*, v.56, n.3, p.306-13, 1971.
- HINES, R.; MAURY, W. DH82 cells: a macrophage cell line for the replication and study of equine infectious anemia virus, *Journal of Virology Methods* v.95, p.47-56, 2001.
- HUFERT, F. T.; SCHMITZ, J.; SCHREIBER, M.; et al. Human Kupffer cells infected with HIV-1 in vivo. *Journal of acquired immune deficiency syndromes*, v.6, n.7, p.772-777, 1993.
- HUSSAINI, S. M. Q.; JUN, H.; CHO, C. H.; et al. Heat-Induced Antigen Retrieval: An Effective Method to Detect and Identify Progenitor Cell Types during Adult Hippocampal Neurogenesis. *Journal of Visualized Experiments*, v. 30, n.78, p.7-11, 2013.
- INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA (IBGE). Censo demográfico, Rio de Janeiro: IBGE, 2012. Disponível [https://ww2.ibge.gov.br/home/estatistica/economia/ppm/2012/default\\_pdf.shtm](https://ww2.ibge.gov.br/home/estatistica/economia/ppm/2012/default_pdf.shtm). Acesso em 10 de dezembro de 2018.
- ISSEL, C. J.; COGGINS, L. Equine infectious anemia: current knowledge. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, v.174, n.7, p.727-733, 1979.
- ISSEL, C. J.; ADAMS Jr, W. V. 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.; SCICLUNA, M. T.; COOK, S. J.; et al. Challenges and proposed solutions for more accurate serological diagnosis of equine infectious anaemia. *Veterinary Record*, v.172, n.8, p. 210, 2013.

- ISSEL, C. J.; COOK, R. F.; MEALEY, R. H.; et al. Equine infectious anemia in 2014: Live with it or eradicate it? *Veterinary Clinics of North America - Equine Practice*, v.30, n.3, p.561–577, 2014.
- JABARDO, J. M. S. Transferência de calor por ebulição e trocadores de calor bifásicos. *Encontro brasileiro sobre ebulição, condensação e escoamento multifásico líquido-gás-ebecem*, v.1, 2008.
- JACKSON, P.; BLYTHE, D. Immunohistochemical techniques. *Theory & Practice of histological techniques. 7th ed., Churchill Livingstone of El Sevier. Philadelphia*, p.381–434, 2013.
- JORDAN, M.; HACZKU, A. Autoreactive bronchus-associated lymphoid tissue in interstitial lung disease: Friend or foe? *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology*, v.48, n.4, p.397–398, 2013.
- JUNQUEIRA, L. C. U.; CARNEIRO, J. Histologia básica: texto e atlas (13ª ed.). *Editora Guanabara Koogan*, 2017.
- KANMOGNE, G. D.; KENNEDY, R. C.; GRAMMAS, P. Analysis of human lung endothelial cells for susceptibility to HIV type 1 infection, coreceptor expression, and cytotoxicity of gp120 protein. *AIDS Research and Human Retroviruses*, v.17, n.1, p.45–53, 2001.
- KIM, S. H.; SHIN, Y. K.; LEE, K. M.; et al. An improved protocol of biotinylated tyramine-based immunohistochemistry minimizing nonspecific background staining. *Journal of Histochemistry & Cytochemistry*, v.51, n.1, p.129–132, 2003.
- KIM, S. W.; ROH, J.; PARK, C. S. Immunohistochemistry for Pathologists: Protocols, Pitfalls, and Tips. *Journal of Pathology and Translational Medicine*, v.50, n.6, p.411–418, 2016.
- KLEVJER-ANDERSON, P.; CHEEVERS, W. P.; CRAWFORD, T. B. Characterization of the infection of equine fibroblasts by equine infectious anemia virus. *Archives of virology*, v.60, n.3-4, p.279–289, 1979.
- KNOWLES R.C. An overview of equine infectious anemia control and regulation in the United States. *JAVMA*, v.184, n.3, p: 289–292, 1984.
- KÖHLER, G.; MILSTEIN, C. Derivation of specific antibody-producing tissue culture and tumor lines by cell fusion. *European journal of immunology*, v.6, n.7, p.511–519, 1976.
- KONO, Y.; KOBAYASHI, K.; FUKUNAGA, Y. Immunization of horses against equine infectious anaemia (EIA) with an attenuated EIA virus. *National Institute of Animal Health Quarterly*, v.10, p.113–122, 1970.
- KONO, Y.; YOSHINO, T. Propagation of equine infectious anemia virus in horse kidney cell cultures, *National institute of animal health quarterly*, v.14, p.155–162, 1974.
- KURITZKES, D. R. Quantification of human immunodeficiency virus type 1 by reverse transcriptase-coupled polymerase chain reaction. *The Journal of infectious diseases*, v.190, n.11, p.2047–54, 2004.
- LAIRMORE, M. D.; AKITA, G. Y.; RUSSELL, H.; et al. Replication and cytopathic of ovine lentivirus strains in alveolar macrophages correlate with in vivo pathogenicity. *Journal of Virology*, v.61, n.12, p. 4038–4042, 1996.
- LANGEMEIER, J. L.; COOK, S. J.; COOK, R. F.; et al. Detection of equine infectious anemia viral RNA in plasma samples from recently infected and long-term inapparent carrier animals by PCR. *Journal of Clinical Microbiology*, v.34, n.6, p.1481–1487, 1996.

- LEIB, S. R.; MCGUIRE, T. C.; BYRNE, K. M.; et al. Equine infectious anaemia virus proteins with epitopes most frequently recognized by cytotoxic T lymphocytes from infected horses. *Journal of General Virology*, v.81, n.11, p.2735–2739, 2000.
- LEONG, A. S. Y.; LEONG, T. Y. M. Newer developments in immunohistology. *Journal of Clinical Pathology*, v.59, n.11, p.1117–1126, 2006.
- LEROUX, C.; CRAIGO, J. K.; ISSEL, C. J.; et al. Equine Infectious Anemia Virus Genomic Evolution in Progressor and Nonprogressor Ponies. *Journal of Virology*, v.75, n.10, p.4570–4583, 2001.
- 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, H.; ZHANG, X.; FAN, X.; et al. A conservative domain shared by HIV gp120 and EIAV gp90: implications for HIV vaccine design. *AIDS Research & Human Retroviruses*, v.21, n.12, p.1057-1059, 2005.
- LIANG, H.; HE, X.; SHEN, R.; et al. Combined amino acid mutations occurring in the envelope closely correlate with pathogenicity of EIAV. *Archives of virology*, v.151, n.7, p.1387-1403, 2006.
- LIMA, R. A. S.; CINTRA, A. G. Revisão do Estudo do Complexo do Agronegócio do Cavalo. *Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento*, Brasília, v. 56, 2015.
- 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.
- LIU, Q.; MA, J.; WANG, X. F.; et al. Infection with equine infectious anemia virus vaccine strain EIAVDLV121 causes no visible histopathological lesions in target organs in association with restricted viral replication and unique cytokine response. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, v.170, p.30–40, 2016.
- MACFADDEN, B. J. Fossil horses from “Eohippus” (Hyracotherium) to Equus: Scaling, Cope’s Law, and the evolution of body size. *Paleobiology*, v.4, n.1986, p.355–369, 1986.
- MACFADDEN, B. J. Evolution. Fossil horses--evidence for evolution. *Science*, v. 307, n.5716, p. 6972–6974, 2005.
- MALMQUIST, W. A.; BARNETT, D.; BECVAR, C. S. Production of equine infectious anemia antigen in a persistently infected cell line. *Archieve of Viroogy*, v.42, p.361-370, 1973.
- MAURY, W. Monocyte maturation controls expression of equine infectious anemia virus, *Journal of Virology*, v.68, p.6270–6279, 1994.
- 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.
- MCGUIRE, T. C.; CRAWFORD, T. B.; HENSON, J. B. Immunofluorescent localization of equine infectious anemia virus in tissue. *The American journal of pathology*, v.62, n.2, p.283–294, 1971.

- MEALEY, R. Equine infectious anemia. In: Sellon, D. C.; Long, M. T. Equine infectious diseases. Saint Louis: Saunders Elsevier, p.213-219, 2007.
- MIGON, A. W.; CALDERAN, C.; POLLI, E. A. et al. Fluxograma e lesões encontradas em abate de equinos. *Projeto de Aperfeiçoamento Teórico e Prático – Getúlio Vargas – RS – Brasil*, v. 13, p. 74, 2017.
- MIRANDA, A. L. S.; PALHARES, M. S. Mueres: características, origem e particularidades clínico-laboratoriais. *Revista Científica de Medicina Veterinária*, v.29, p.1–8, 2017.
- 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.
- MORGAN, J. M.; NAVABI, H.; SCHMID, K. W.; et al. Possible role of tissue-bound calcium ions in citrate-mediated high-temperature antigen retrieval. *The Journal of pathology*, v.174, n.4, p.301-307, 1994.
- MUSUMECI, D.; RICCARDI, C.; MONTESARCHIO, D. G-Quadruplex forming oligonucleotides as Anti-HIV agents. *Molecules*, v.20, n.9, p.17511–17532, 2015.
- NAVES, J. H. F.; OLIVEIRA, F. G.; BICALHO, J. M.; et al. Serological diagnosis of equine infectious anemia in horses, donkeys and mules using an ELISA with a gp45 synthetic peptide as antigen. *Journal of Virological Methods*, v.18, 2018.
- NEWMAN, J. S.; BASKIN, G. B.; FRISQUE, R. J. Identification of SV40 in brain, kidney and urine of healthy and SIV-infected rhesus monkeys. *Journal of neurovirology*, v.4, n.4, p.394-406, 1998.
- NJAA, B. L.; CLARK, E. G.; JANZEN, E.; et al. Diagnosis of persistent bovine viral diarrhea virus infection by immunohistochemical staining of formalin-fixed skin biopsy specimens. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, v.12, n.5, p.393–399, 2000.
- NOGUEIRA, M. F.; OLIVEIRA, J. M.; SANTOS, C. J. S.; et al. Equine infectious anaemia in equids of Southern Pantanal, Brazil: Seroprevalence and evaluation of the adoption of a control programme. *Pesquisa Veterinaria Brasileira*, v.37, n.3, p.227–233, 2017.
- OAKS, J. L.; MCGUIRE, T. C.; ULIBARRI, C. et al. Equine infectious anemia virus is found in tissue macrophages during subclinical infection. *Journal of virology*, v. 72, n.9, p.7263-7269, 1998.
- OAKS, J. L.; ULIBARRI, C.; CRAWFORD, T. B. Endothelial cell infection in vivo by equine infectious anaemia virus. *Journal of General Virology*, v.80, n.9, p.2393–2397, 1999.
- OHLMANN, T.; MENGARDI, C.; LÓPEZ-LASTRA, M. Translation initiation of the HIV-1 mRNA. *Translation*, v.2, n.2, 2014.
- OLIVEIRA, F.G. Vírus da anemia infecciosa equina em asininos: sorologia em animais errantes e avaliação “in vitro” da resposta em macrófagos [online]. Tese (Doutorado em ciência animal), 2016. Disponível em: <http://www.bibliotecadigital.ufmg.br/dspace/handle/1843/SMOC-AHYNXJ>.
- OLIVEIRA, F. G.; COOK, R. F.; NAVES, J. H. F.; et al. Equine infectious anemia prevalence in feral donkeys from Northeast Brazil. *Preventive Veterinary Medicine*, v.140, p.30–37, 2017.
- ORLANDO, L. Equids. *Current Biology*, v.25, n.20, p.R973–R978, 2015.

PANTALEO, G.; GRAZIOSI, C.; DEMAREST, J. F.; et al. HIV infection is active and progressive in lymphoid tissue during the clinically latent stage of disease. *Nature*, v.362, n.6418, p.355, 1993.

PÉPIN, M.; VITU, C.; RUSSO, P.; et al. Maedi-visna virus infection in sheep: a review. *Veterinary research*, v.29, p.341–367, 1998.

PÉREZ, M.; BIESCAS, E.; REINA, R.; et al. Small Ruminant Lentivirus–Induced Arthritis: Clinicopathologic Findings in Sheep Infected by a Highly Replicative SRLV B2 Genotype. *Veterinary Pathology*, v.52, n.1, p.132–139, 2015.

PETROPOULUS, C. J. Retroviral taxonomy, protein structures, sequences, and genetic maps. *Retroviruses*. pp. 757. Edited by Coffin J. M. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1997.

PINCZOWSKI, P.; SANJOSÉ, L.; GIMENO, M.; et al. Small Ruminant Lentiviruses in Sheep: Pathology and Tropism of 2 Strains Using the Bone Marrow Route. *Veterinary Pathology*, v.54, n.3, p.413–424, 2017.

POLI, A.; ABRAMO, F.; TACCINI, E.; et al. Renal involvement in feline immunodeficiency virus infection: a clinicopathological study. *Nephron*, v.64, n.2, p.282–288, 1993.

POLI, A.; TOZON, N.; GUIDI, G.; et al. Renal alterations in feline immunodeficiency virus (FIV)-infected cats: A natural model of lentivirus-induced renal disease changes. *Viruses*, v.4, n.9, p.1372–1389, 2012.

POLLARD, V. W.; MALIM, M. H. The HIV-1 Rev Protein: Overview of the Retroviral Life Cycle. *Ann*, v.52, p.491–532, 1998.

POLTRONIERI, P.; SUN, B.; MALLARDO, M. RNA Viruses: RNA Roles in Pathogenesis, Coreplication and Viral Load. *Current genomics*, v.16, n.5, p.327–335, 2015.

QIAO, Y. C.; XU, Q.; WEI, J. C.; et al. Detection of HIV-1 in Urine of HIV-Infected Patients Without Antiviral Therapies. *AIDS research and human retroviruses*, v.33, n.9, p.898–899, 2017.

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. *Veterinary Record*, v.160, n.18, p.611–618, 2007.

QUINLIVAN, M.; COOK, R. F.; KENNA, R.; et al. Genetic characterization by composite sequence analysis of a new pathogenic field strain of equine infectious anemia virus from the 2006 outbreak in Ireland. *Journal of General Virology*, v.94, p.612–622, 2013.

RAMOS-VARA, J. A.; KIUPEL, M.; BASZIER, T.; et al. Suggested guidelines for immunohistochemical techniques in veterinary diagnostic laboratories. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, v.20, n.4, p.393–413, 2008.

RAMOS-VARA, J. A.; MILLER, M. A. When Tissue Antigens and Antibodies Get Along: Revisiting the Technical Aspects of Immunohistochemistry-The Red, Brown, and Blue Technique. *Veterinary Pathology*, v.51, n.1, p.42–87, 2014.

REIS, J. K. P.; DINIZ, R. S.; HADDAD, J. P. A.; et al. Recombinant envelope protein (rgp90) ELISA for equine infectious anemia virus provides comparable results to the agar gel immunodiffusion. *Journal of Virological Methods*, 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, 2014.
- RENSHAW, S. A.; LOYNES, C. A.; TRUSHELL, D. M.; et al. A transgenic zebrafish model of neutrophilic inflammation. *Blood*, v.108, n.13, p.3976-3978, 2006.
- RICHTER, W. Anemia Infecciosa Equina. In: JOACHIN BEER. Doença Infecciosa dos Animais Domésticos. 2.ed. São Paulo: Roca, p.211- 218, 1999.
- ROELKE, M. E.; BROWN, M. A.; TROYER, J. L.; et al. Pathological manifestations of feline immunodeficiency virus (FIV) infection in wild African lions. *Virology*, v.390, n.1, p.1-12, 2009.
- ROSE, K. D.; HOLBROOK, L. T.; RANA, R. S.; et al. Early Eocene fossils suggest that the mammalian order Perissodactyla originated in India. *Nature communications*, v.5, p.5570, 2014.
- RUIZ, F. S.; ALESSI, A. C.; CHAGAS, C. A. Immunohistochemistry in diagnostic veterinary pathology: a critical review. *Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial*, v.41, n.4, p.263-270, 2005.
- RURAL INDUSTRIES RESEARCH AND DEVELOPMENT CORPORATION, (RIRDC). Sub Program 3.5, Horses. Kingston ACT: RIRDC, 2004. Disponível em: <https://www.agrifutures.com.au/wp-content/uploads/publications/04-080.pdf>. Acesso em: 10 de dezembro de 2018.
- SÁNCHEZ-CORDÓN, P. J.; RODRIGUEZ-SÁNCHEZ, B.; RISALDE, M. A.; et al. Immunohistochemical Detection of *Bluetongue Virus* in Fixed Tissue. *Journal of Comparative. Pathology*, v.143, p.20-28, 2010.
- SCALIA, C. R.; BOI, G.; BOLOGNESI, M. M.; et al. Antigen Masking During Fixation and Embedding, Dissected. *Journal of Histochemistry and Cytochemistry*, v.65, n.1, p.5-20, 2017.
- SCICLUNA, M. T.; ISSEL, C. J.; COOK, F. R.; et al. Is a diagnostic system based exclusively on agar gel immunodiffusion adequate for controlling the spread of equine infectious anaemia? *Veterinary Microbiology*, v.165, n.1-2, p.123-134, 2013.
- SEIDU, M. A.; ADAMS, A. R.; GYASI, R. K.; et al. Immunoreactivity of some epitopes in longtime inappropriately stored paraffin-embedded tissues. *Journal of Histotechnology*, v.36, n.2, p.59-64, 2013.
- SEILER, C.; SHARPE, A.; BARRETT, J. C.; et al. Nucleic acid extraction from formalin-fixed paraffin-embedded cancer cell line samples: a trade off between quantity and quality? *BMC Clinical Pathology*, v.16, n.1, p.1-13, 2016.
- SELLON, D. C.; PERRY, S. T.; COGGINS, L.; et al. Wild-type equine infectious anemia virus replicates in vivo predominantly in tissue macrophages, not in peripheral blood monocytes. *Journal of virology*, v.66, n.10, p. 5906-5913, 1992.
- SELLON, D.C. Equine Infectious Anemia. *Veterinary Clinics of North America - Equine Practice*, v. 9, n. 2, p. 321-336, 1993.
- SELLON, D. C.; WALKER, K. M.; RUSSELL, K. E.; et al. Equine infectious anemia virus replication is upregulated during differentiation of blood monocytes from acutely infected horses. *Journal of virology*, v.70, n.1, p.590-594, 1996.

- SHEN, R.; WANG, Z. Development and use of an equine infectious anemia donkey leukocyte attenuated vaccine. EIAV: a national review of policies, programs, and future objectives. *American Quarter Horse Association*, p.135–148, 1985.
- SILVA, R.A.M.S.; DE ABREU, U.G.P.; DE BARROS, A.T.M. Anemia infecciosa equina: epizootiologia, prevencao e controle no Pantanal. *Embrapa Pantanal-Circular Técnica (INFOTECA-E)*, 2001.
- SINGH, H.; SINGH, C.K. Ante-mortem diagnosis of rabies from bodysecretions and mucosal impression smears in experimentally infect-ed buffalo calves. *Indian Journal Animal Science*, v. 81, p.205–208, 2011.
- SOMPURAM, S. R.; VANI, K.; BOGEN, S. A. A molecular model of antigen retrieval using a peptide array. *American Journal of Clinical Pathology*, v.125, n.1, p.91–98, 2006.
- SPYROU, V.; PAPANASTASSOPOULOU, M.; PSYCHAS, V.; et al. Equine infectious anemia in mules: Virus isolation and pathogenicity studies. *Veterinary Microbiology*, v.95, n.1–2, p.49–59, 2003.
- STASKUS, K. A.; RETZEL, E. F.; LEWIS, E. D.; et al. Isolation of replication-competent molecular clones of visna virus. *Virology*, v. 181, n.1, p.228-240, 1991.
- SUZUKI, T.; VEDA, S.; SAMEJINA, T. Enzyme-linked immunosorbent assay for diagnosis of equine infectious anemia. *Veterinary Microbiology*, v.7, n.4, p.307-315, 1982.
- TIGRE, D. M.; BRANDAO, C. F. L.; DE PAULA, F. L.; et al. Characterization of isolates of equine infectious anemia virus in Brazil. *Archives of virology*, v.162, n.3, p.873-877, 2017.
- TORNQUIST, S. J.; CRAWFORD, T. B. Suppresuin of megakaryocyte conoly growth by plasma from foals infectes with equine infectious anemia virus. *Blood*, v.90, p.2357-2363, 1997.
- TRAVIS, B. M.; DYKERS, T. I.; HEWGILL, D.; et al. Functional roles of the V3 hypervariable region of HIV-1 gp160 in the processing of gp160 and in the formation of syncytia in CD4+ cells. *Virology*, v.186, n.1, p.313-317, 1992.
- TU, Y. B.; ZHOU, T.; YUAN, X. F.; et al. Long terminal repeats are not the sole determinants of virulence for equine infectious anemia virus. *Archives of Virology*, v.152, n.1, p.209–218, 2007.
- UNTERGASSER, A.; NIJVEEN, H.; RAO, X.; et al. Primer3Plus, an enhanced web interface to Primer3. *Nucleic acids research*, 35(suppl\_2), W71-W74, 2007.
- VALETTE, D. Invisible Workers. The Brooke London. Disponível em: <https://www.thebrooke.org/news/working-livestock-invisible-claims-brooke-new-report>. Acesso em: 11 de dezembro de 2018.
- VALLÉE, H.; CARRE, H. Sur la nature infectieuse de l'anémie du cheval. *Comptes Rendus de l'Académie des. Sciences*, v.139, p.331-333, 1904.
- VIERA, L.; YE, Y.Z.; ESTÉVEZ, A.G.; et al. Immunohistochemical methods to detect nitrotyrosine. *Methods in Enzymology*, v.301, n.1996, p.373–381, 1998.
- VILSTRUP, J. T.; SEGUIN-ORLANDO, A.; STILLER, M.; et al. Mitochondrial Phylogenomics of Modern and Ancient Equids. *PLoS ONE*, v.8, n.2, 2013.

WANG, X. F.; LIN, Y. Z.; LI, Q.; et al. Genetic Evolution during the development of an attenuated EIAV vaccine. *Retrovirology*, v.13, n.1, p.1–13, 2016.

WORLD ORGANIZATION FOR ANIMAL HEALTH (OIE). Equine Infectious Anaemia In: *Manual of Diagnostic Test and Vaccines for Terrestrial Animals 2013*. Paris: OIE, 2013. Vol.2. Chapter 2.5.6, p.1-6. Disponível em: [http://www.oie.int/fileadmin/Home/eng/Health\\_standards/tahm/2.05.06\\_EIA.pdf](http://www.oie.int/fileadmin/Home/eng/Health_standards/tahm/2.05.06_EIA.pdf). Acesso em: 10 de dezembro de 2018.

WORLD ORGANIZATION FOR ANIMAL HEALTH (OIE). OIE – Listed disease, infectious and infestations in force in 2019. Paris: OIE, 2019. Disponível em: <http://www.oie.int/animal-health-in-the-world/oie-listed-diseases-2019/>. Acesso em: 25 de fevereiro de 2019.

ZACHARY, J. F.; MCGAVIN, M. D. Pathologic Basis of Veterinary Disease Expert Consult-E-BOOK. *Elsevier Health Sciences*, 2016.

Z Aidan, M.; Lescure, F. X.; Brochériou, I.; et al. Tubulointerstitial nephropathies in HIV-infected patients over the past 15 years: a clinico-pathological study. *Clinical Journal of the American Society of Nephrology*, v.8, n.6, p.930-938, 2013.

Zink, M. C.; Yager, J. A.; Myers, J. D. Pathogenesis of caprine arthritis encephalitis virus. Cellular localization of viral transcripts in tissues of infected goats. *The American journal of pathology*, v.136, n.4, p.843, 1990.

## 8. ANEXOS

**Anexo 1** – Ofício circular 001/17, emitido pelo CEUA/UFMG, sobre a manipulação de animais não vivos.



Universidade Federal de Minas Gerais  
Comissão de Ética no Uso de Animais - CEUA

OF. CIRC. CEUA-001/17

Belo Horizonte, 20 de setembro de 2017.

Sr (a)  
Prof (a).  
Chefe do  
Diretor do(a)

Prezados Diretores e Chefes de Departamentos,

A Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da UFMG vem informar os pareceres do CONCEA sobre pesquisa sem manipulação de animais vivos.

Na 32ª reunião ordinária do CONCEA, parecer sobre:

*A) A utilização de métodos alternativos em ensino e pesquisa é um esforço que vem sendo aplicado pela implantação da Lei Arouca (nº 11.794 de 8 de outubro de 2008), para se obter a redução, refinamento e substituição de animais vivos em diferentes situações e treinamentos. De acordo com essa Lei, em seu artigo 3º entende-se por experimentos – procedimentos efetuados em animais vivos, visando à elucidação de fenômenos fisiológicos ou patológicos, mediante técnicas específicas e preestabelecidas.*

*Assim, para todos os questionamentos que envolvem cadáveres ou as suas partes, a resposta é: Não há necessidade de obter a autorização da CEUA para os procedimentos listados. No entanto, recomenda-se que o pesquisador tenha todos os documentos que indiquem e autenticuem a origem e regularidade da coleta do material, quer seja os termos de consentimento ou de doação do proprietário do animal, ou aqueles que comprovem a sua aquisição dos cadáveres em Centros de Controle de Zoonoses ou aqueles derivados da coleta de animais silvestres (cópia da licença emitida pelo SISBIO) ou proveniente de abate humanitário ou outras situações aqui não descritas. Em todos os casos, o óbito deve ter ocorrido por causa natural ou eutanásia devido a outros propósitos que não o de pesquisa científica e ensino.*

*Salienta-se a necessidade de uma prática ética com respeito, nas aulas com animais, tanto nos vivos, como em cadáveres, para estimular um aprendizado com competência técnica e humanística.*

Na 36ª reunião ordinária do CONCEA, parecer sobre:

*Todos os questionamentos que envolvem exemplares já depositados em coleções científicas, sem manipulação de animal vivo, a resposta é: Não há necessidade de obter a autorização da CEUA.*

*A) A utilização de métodos alternativos em ensino e pesquisa é um esforço que vem sendo aplicado pela implantação da Lei Arouca (nº 11.794 de 8 de outubro de 2008), para se obter a redução, refinamento e substituição de animais vivos em diferentes situações e treinamentos. De acordo com essa Lei, em seu artigo 3º entende-se por experimentos – procedimentos efetuados em animais vivos, visando à*

A CEUA tem novo site: <http://www.ufmg.br/bioetica/cetea/ceua/>.

E-mail : [cetea@prpq.ufmg.br](mailto:cetea@prpq.ufmg.br)

Endereço: Unidade Administrativa II, 2º. andar, sala 2005.

Tel. 3409-4516, Fax: 3409-4592



Universidade Federal de Minas Gerais  
Comissão de Ética no Uso de Animais - CEUA

*elucidação de fenômenos fisiológicos ou patológicos, mediante técnicas específicas e preestabelecidas.*

*Assim, para todos os questionamentos que envolvem peças de abatedouro, dentes, entre outros, sem manipulação de animal vivo, a resposta é: Não há necessidade de obter a autorização da CEUA para os procedimentos listados. No entanto, recomenda-se que o pesquisador tenha todos os documentos que indiquem e autenticem a origem e regularidade da coleta do material, quer seja os termos de consentimento ou de doação do proprietário do animal, ou aqueles que comprovem a sua aquisição.*

A CEUA esclarece que nesses casos **não** emitirá certificados ou declarações. Caso os pesquisadores desejem obter certificados **deverão** submeter seus protocolos para análise, antes de iniciar a pesquisa.

Sendo o que nos apresenta no momento, ficamos à sua inteira disposição para outros esclarecimentos que se fizerem necessários.

Atenciosamente

Prof. Cleiza Maria de Faria Rezende  
Coordenadora da CEUA/UFMG

A CEUA tem novo site: <http://www.ufmg.br/bioetica/cetea/ceua/>.

E-mail : [cetea@prpq.ufmg.br](mailto:cetea@prpq.ufmg.br)

Endereço: Unidade Administrativa II, 2º. andar, sala 2005.

Tel. 3409-4516, Fax: 3409-4592

Anexo 2 – Documento de doação das amostras.



UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO SEMIÁRIDO  
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE

DECLARAÇÃO

Declarante: **Sidnei Miyoshi Sakamoto**, brasileiro, casado, portador do RG 18.303.520-3 (SSP-SP), CPF 112037808/77, professor Titular Livre da Universidade Federal Rural do Semi-Árido (SIAPE 24497204)

Declara, para os devidos fins, que serão disponibilizadas amostras de soro e tecidos para a execução do projeto intitulado “Presença e caracterização da anemia infecciosa equina, arterite viral equina, herpesvirus equino e mormo em asininos do nordeste brasileiro”, coordenado pelo Professor Jenner Karlisson Pimenta dos Reis. As amostras pertencem ao banco de amostras do projeto “Caracterização da infecção do Virus da Anemia Infecciosa Equina (EIAV) em Asininos do Município de Mossoró/RN”, aprovado na CEUA-UFERSA sob o número 23091.004349/2014-58, provenientes de diversas regiões do Estado do Rio Grande do Norte.

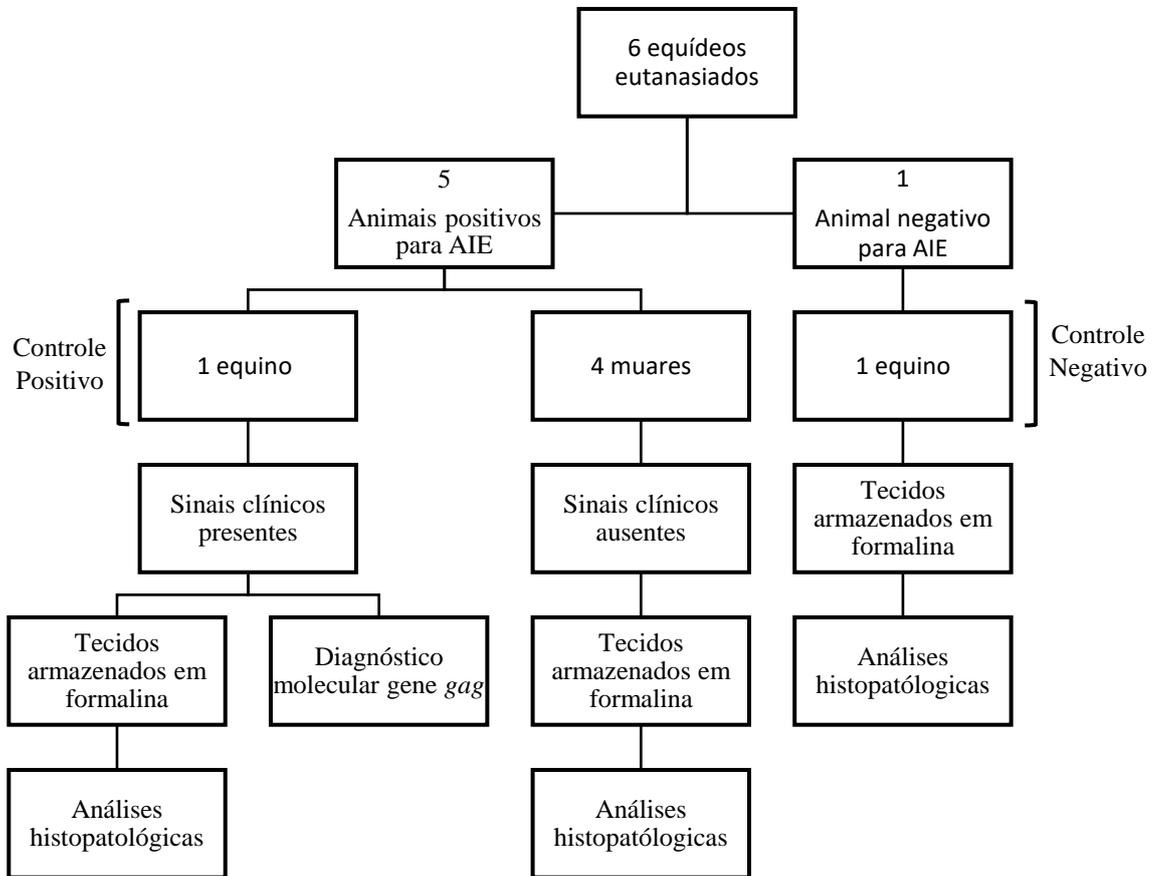
Adicionalmente, serão cedidas amostras provenientes do projeto Boas Práticas e Capacitação em Bem-estar de asininos do Nordeste em convênio formalizado entre o MAPA e a UFERSA que tem como parceiros a USP, Donkey Sanctuary e a Universidade Positivo, processo nº 21000.030968/2016-14, com o objetivo de identificar alternativas de manejo humanitário da espécie e capacitação de multiplicadores e manejadores, bem como órgãos públicos envolvidos nas políticas públicas voltadas para os asininos na região Nordeste além do diagnóstica da situação sanitária desses animais. O valor total do projeto é: R\$ 399.826,68 com finalização prevista para 2020 e prevê a coleta de amostras em propriedades do Ceará, Rio Grande do Norte e demais estados do Nordeste (ainda em fase de planejamento).

Por ser verdade, firmo.

Mossoró-RN, 14 de Agosto de 2017

Assinatura manuscrita em azul da Sidnei Miyoshi Sakamoto.

Anexo 3: Fluxograma demonstrando o destino dos fragmentos coletados.



**Anexo 4:** Resumo das lesões histopatológicas em cada animal positivo para AIE.

<i>Orgão</i>	<i>Lesão histopatológica</i>				
	Animal FAS	Animal 03	Animal 07	Animal 12	Animal 13
Baço	Hemossiderose intensa. Acúmulo de amiloides nos folículos linfoides. Hiperplasia discreta com leve diferenciação linfoplasmocitária.	Hemossiderose branda.	Hemossiderose branda. Mínimo acúmulo de amiloides nos folículos linfoides.	Hemossiderose branda.	Hemossiderose branda.
Fígado	Marginação leucocitária discreta. Presença de células inflamatórias via portal.	Ausência de lesões.	Ausência de lesões.	Ausência de lesões.	Ausência de lesões.
Pulmões	Infiltração branda de linfócitos e células mononucleares nos septos alveolares	Hiperemia. Mínimo aumento do BALT.	Hiperemia. Mínimo aumento do BALT.	Ausência de lesões.	Ausência de lesões.
Rins	Hemorragia fical na região adjacente aos grandes vasos córtico-medulares. Discreta nefrite túbulointerticial linfo-histiocítica multifocal.	Hiperemia cortical branda. Discreta nefrite túbulointerticial linfo-histiocítica multifocal	Hiperemia cortical branda. Discreta nefrite túbulointerticial linfo-histiocítica multifocal	Ausência de lesões.	Ausência de lesões.