



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO PIAUÍ
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA ANIMAL**

RAISSA PAULA ARAÚJO ALVES

SOROCONVERSÃO E CONTROLE DE INFECÇÃO DO LENTIVÍRUS CAPRINO

Teresina (PI)

2019

RAISSA PAULA ARAÚJO ALVES

SOROCONVERSÃO E CONTROLE DE INFECÇÃO DO LENTIVÍRUS CAPRINO

Tese de doutorado apresentado ao Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal do Centro de Ciências Agrárias da Universidade Federal do Piauí para obtenção do título de Doutora em Ciência Animal.

Área de Concentração: Sanidade e Reprodução Animal.

Orientadora: Prof^a Dra. Maria Socorro Pires e Cruz

Coorientador: Prof Dr. Raymundo Rizaldo Pinheiro

Teresina (PI)

2019

FICHA CATALOGRÁFICA
Universidade Federal do Piauí
Biblioteca Setorial do Centro de Ciências Agrárias
Serviço de Processamento Técnico

A474s Alves, Raíssa Paula Araújo
Soroconversão e controle de infecção do lentivírus caprino /
Raissa Paula Araújo Alves. – 2019.
121 f. : il.

Tese (Doutorado) – Universidade Federal do Piauí, Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal, Teresina, 2019.
Orientação: Prof^a. Dr^a. Maria Socorro Pires e Cruz

1. Lentivírus de pequenos ruminantes 2. PCR *nested*. 3. *Western Blotting* I. Título.

CDD 636.390 89

**SOROCONVERSÃO E CONTROLE DE INFECÇÃO DO LENTIVÍRUS
CAPRINO**

RAISSA PAULA ARAÚJO ALVES

Tese aprovada em: 21/03/2019

Banca Examinadora:




Profa. Dra. Maria do Socorro Pires e Cruz (Presidente) / DMV/CCA/UFPI



Profa. Dra. Maria Elizabete de Oliveira (Interno) / DZO/CCA/UFPI



Profa. Dra. Isolda Márcia Rocha do Nascimento (Interno) / CTT/UFPI



Prof. Dr. Raymundo Rizaldo Pinheiro (Coorientador) / EMBRAPA



Profa. Dra. Alice Andrioli Pinheiro (Externo) / EMBRAPA



Profa. Dra. Kelma Costa de Souza (Externo) / EMBRAPA

A Deus, por Sua infinita bondade e proteção.

AGRADECIMENTOS

A Deus: a minha fonte de vida, força e fé.

À minha mãe, que me incentiva, apoia, acolhe, orienta e guia pelos melhores caminhos.

Ao meu pai, que mesmo distante, torce, apoia e se alegra por cada conquista.

Ao meu querido irmão, Vicente, que Deus colocou em nossas vidas, e que me ensinou o sentimento de ser irmã e por compreender as minhas ausências.

À toda a minha família, em especial minhas avós, Rosa e Francisca, pela torcida, amor e carinho.

À minha orientadora, Profa. Dra. Maria do Socorro Pires e Cruz, por aceitar esse desafio, por confiar, ser compreensiva, amiga e por contribuir com minha formação, não só acadêmica, mas de vida.

Ao meu coorientador, Prof. Dr Raymundo Rizaldo Pinheiro, presente durante toda minha pós-graduação *stricto sensu*, mestrado e doutorado. Agradeço imensamente as oportunidades, a amizade, a confiança, o auxílio, a infinita compreensão, a toda ajuda e as boas palavras de incentivo e de cobrança.

Aos animais, em especial, que se doaram para que essas pesquisas acontecessem.

À Universidade Federal do Piauí, ao programa de Pós-graduação em Ciência Animal, por fornecer suporte para a realização do curso.

À Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária, por fornecer condições para a realização desta pesquisa.

A minha orientadora de mestrado, Profa. Dra. Maria do Carmo de Souza Batista, por toda confiança e ajuda permanecerá sempre no meu coração.

À banca examinadora da minha qualificação de doutorado, composta também pela Dra. Kelma de Souza e Dr. Antônio Júnior, pela grande contribuição na melhoria deste trabalho.

À competente equipe de pesquisadores da Embrapa Caprinos e Ovinos, representada aqui pela Dra. Alice Andrioli, Dra. Ângela, e Dra. Lúcia Sider, sempre dispostas a ajudar, auxiliar e orientar.

À equipe de técnicos de laboratório e de manejadores da Embrapa Caprinos e Ovinos, também muito competente e disposta representados por João Ricardo, Osmarilda e Orlando, por toda ajuda e disposição em prestar auxílio durante os nossos experimentos, por toda amizade e por tornar os dias de trabalho mais leves.

Aos colegas da Embrapa Caprinos e Ovinos, pós-graduandos e estagiários, representados por Vanderlan, Edgar, e Guilherme, que muito auxiliaram na condução dos experimentos e que foram peças fundamentais para que eles acontecessem.

À minha querida amiga, Liana Alcântara, por todas as vezes que me recebeu em sua casa, em Sobral, que além de seu lar, me ofereceu sua amizade. Minha gratidão será eterna.

Aos amigos do Hospital Universitário, Maria Cristina, Marayza Carvalho, Regielly Oliveira, Lainny Burlamaqui, Kennedy Ribeiro, Profa. Dra. Elaine Cristina e Profa. Lariza Falcão, que muitas vezes compreenderam minha ausência, me incentivaram e mantiveram acesa a minha vontade e força para concluir esse desafio.

Aos amigos da pós-graduação e grupo de pesquisa, Luana Moura, Leopoldo Marçal, por todo convívio prazeroso.

Às amigas, Dayane Miranda e Érika Paiva, que compartilharam comigo, em boa parte do período de realização deste curso, incertezas, dúvidas, desânimo, alegrias e a tão esperada vitória e que não desistiram, em momento nenhum, da luta.

Aos amigos do *Campus Ministro Reis Velloso*, agora Universidade Federal do Delta do Parnaíba, representados pelos professores Alexandro Marinho, Álvaro Caldas e Anderson Guzzi, que me apoiaram na conclusão deste curso, antes mesmo da minha chegada ao campus.

Aos meus queridos e melhores amigos de sempre: Clarissa Carvalho, Manoel Lopes, Thaís Maria, Júlia Aragão, Adriano Vieira, Ériça Regina, Yndyra Nayan e Micherlene Carneiro, simplesmente pela amizade e troca em todos esses anos.

A todos aqueles não foram citados nominalmente, mas cujas contribuições foram de suma relevância em meu desenvolvimento científico e pessoal, bem como na realização deste trabalho.

A todos, sempre serei muito grata.

“Devemos ser gratos a todos aqueles que nos fazem felizes; eles são os jardineiros responsáveis por fazerem a nossa alma florescer.”

(Marcel Proust).

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS	xiii
LISTA DE ABREVIATURAS OU SÍMBOLOS	xv
RESUMO	xix
ABSTRACT	xxi
1 INTRODUÇÃO	23
2 REVISÃO DE LITERATURA	27
2.1 Agente etiológico	27
2.2 Aspectos gerais da imunidade da AEC	30
2.3 Aspectos epidemiológicos da AEC	41
2.4 Sinais clínicos	44
2.5 Diagnóstico	46
3 ARTIGO 1	49
Resumo	49
Introdução	50
Material e Métodos	51
Resultados e Discussão	54
Considerações finais	58
Agradecimentos	58
Referências	58
4 ARTIGO 2	65
Resumo	65
Abstract	65
Introdução	66
Material e métodos	68

Local, animais e amostras	68
Aspectos éticos	69
Extração de DNA	69
Testes de diagnósticos	69
Análise estatística	71
Resultados	71
Discussão	74
Conclusão	82
Referências	82
5 CONCLUSÕES GERAIS	89
REFERÊNCIAS	91
Anexos	120

LISTA DE FIGURAS

2 REVISÃO DE LITERATURA

Figura 1 Representação do genoma viral de Lentivírus de Pequenos Ruminantes	28
Figura 2 Representação estrutural de um Lentivírus	28
Figura 3 Grupos e subgrupos dos Lentivírus de Pequenos Ruminantes.....	30

4 ARTIGO 2

Figura 1 Quantitativo dos resultados positivos dos testes de PCR <i>nested</i> nos 26 momentos	72
Figura 2 Quantitativo dos resultados positivos dos testes de <i>Western Blotting</i> nos 26 momentos	73
Figura 3 Demonstrativo de resultados positivos individuais no teste de PCR <i>nested</i>	73
Figura 4 Demonstrativo de resultados positivos individuais no teste de <i>Western Blotting</i>	74

LISTA DE ABREVIATURAS OU SÍMBOLOS

μL	Microlitro
μM	Micromolar (Micromol por litro)
A3G	Proteína Mediadora de Resistência Intrínseca Apobec 3G
ADCC	Citotoxicidade Mediada por Células Dependente de Anticorpos
AEC	Artrite Encefalite Caprina
CAEV	Vírus da Artrite Encefalite Caprina
CAEV-Cork	Estirpe Cork da AEC
AIEV	Anemia Infecciosa Equina
BIV	Vírus da Imunodeficiência Bovina
CA	Capsídeo
CEUA	Comissão de Ética no Uso de Animais
CFMV	Conselho Federal de Medicina Veterinária
CONCEA	Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal
CPK	Proteína Quinase C
DAB	Diaminobenzidine
DNA	Ácido Desoxirribonucleico
EDTA	Etilenodiaminotetracético
ELISA	Ensaio Imunoenzimático
<i>env</i>	Genes Estruturais do Envoltório
ENV	Proteína do Envoltório
FIV	Fator de Infectividade Viral
<i>gag</i>	Genes Estruturais de Antígenos Específicos de Grupo
GAS	Sítios de Ativação gama
GM-CSF	Fator de Estimulação de Crescimento de Colônia de Macrófagos e Granulócitos
gp-135	Proteína do Envelope gp-135
HIV	Vírus da Imunodeficiência Humana
IDGA	Imunodifusão em Gél de Agarose
IFN	LV Intérfenon induzido por Lentivírus de Pequenos Ruminantes
IFN- α	Intérfenon alfa

IFN- β	Intérferon beta
IFN- γ	Intérferon gama
IgG	Imunoglobulina G
IgM	Imunoglobulina M
IL	Interleucinas
IN	Integrase
KCL	Cloreto de Potássio
KIR	Receptor que inibe a morte
LTR	Região Longa Terminal
LV	Lentivírus de Pequenos Ruminantes
LVC	Lentivírus Caprino
LVPR	Lentivirose de Pequenos Ruminantes
MA	Matriz
MAPK	Proteína Quinase Ativadas por Mitógenos
MCP1	Proteína Quimioatrativa de Monócitos
mg	Miligrama
MHC	Complexo Principal de Histocompatibilidade
mL	Mililitro
mM	Milimol
MV	Maed-Visna
MVV	Vírus da Maed-Visna
NC	Nucleocapsídeo
NF κ B	Fator Nucleal Kappa B
NK	Natural Killer
ORFs	Fases Abertas de Leitura
PBS	Tampão Fosfato Salino
PCR <i>nested</i>	Reação em Cadeia de Polimerase <i>nested</i>
PCR	Reação em Cadeia de Polimerase
pH	Potencial Hidrogeniônico
<i>pol</i>	Genes Estruturais Polimerase
PR	Protease
RNA	Ácido Ribonucleico
RNAg	RNA genômico

RNA _m	RNA mensageiro
qPCR	Reação em Cadeia de Polimerase em Tempo Real
SDS-PAGE	Extração e Análise Eletroforética em Gel de Poliacrilamida
SIV	Vírus da Imunodeficiência Símia
SNC	Sistema Nervoso Central
STAT1	Transdutor de Sinal e Ativador de Transcrição
SU	Glicoproteína de Superfície
TAR	Elemento de Resposta a Transativação
Tetherin	Proteína Mediadora de Resistência Intrínseca Tetherin
TGFβ1	Fator de Crescimento Transformante beta 1
TLR	Receptores tipo Toll
TM	Glicoproteína Transmembranária
TMEM154	Gene da Proteína Transmembranária 154
TNF-α	Fator de Necrose Tumoral alfa
TR	Transcriptase Reversa
TRIN5α	Proteína Mediadora de Resistência Intrínseca TRIN5α
Tris-HCL	Trisaminometano - ácido clorídrico
UTP	dUTPase
UVA	Universidade Estadual Vale do Acaraú
VIF	Vírus da Imunodeficiência Felina
WB	<i>Western Blotting</i>

RESUMO

ALVES, R. P. A. **Soroconversão e controle de infecção do lentivírus caprino**. 2019. 121f. Tese (Doutorado em Ciência Animal). Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal, Universidade Federal do Piauí, Teresina, 2019.

O vírus da Artrite Encefalite Caprina (CAEV) pertence à família *Retroviridae*, subfamília *Lentivirinae*, gênero *Lentivírus*. Ele causa uma infecção denominada de Artrite Encefalite Caprina (AEC) que é capaz de se disseminar em um rebanho por um longo período. Com o presente estudo objetivou-se acompanhar a soroconversão da AEC, utilizando teste sorológico (*Western Blotting*), e a dinâmica de detecção da doença, com o uso da técnica molecular Reação em Cadeia de Polimerase *nested* (PCR *nested*). Dois lotes distintos de animais foram utilizados em momentos diferentes, sendo o primeiro formado com cabritos da raça Saanen, composto por 47 animais, e o segundo formado por 24 cabritos das raças Saanen e Anglo-nubiana. Em ambos os lotes realizaram-se testes de *Western Blotting* (WB) e PCR *nested* no momento imediatamente após o nascimento. No primeiro lote, os animais provieram de progenitores sorologicamente negativos para AEC, e permaneceram isolados individualmente até o resultado dos testes (PCR *nested* e WB). Dos 47 cabritos nascidos, 43, negativos em ambos os testes, foram acompanhados em mais dois momentos distintos: aos 60 dias de idade (M60) e aos 270 dias de vida (M270), compreendendo assim a fase de aleitamento e pós-aleitamento. No segundo lote, 24 cabritos das raças Saanen e Anglo-nubiana foram testados (WB e PCR *nested*) no momento do nascimento, aos 15 dias de idade e uma vez por mês, durante um período de 24 meses. Neste lote os animais descenderam de progenitores sorologicamente positivos para AEC. Somente cabritos positivos na primeira prova de PCR *nested* foram inseridos no estudo. Em ambos os lotes, todos os partos foram rigorosamente assistidos, realizando-se a separação imediata dos animais recém-nascidos das mães, no intuito de não permitir contato entre ambos. Nos 47 animais estudados no primeiro lote, o teste de WB não detectou positividade ao longo de todo o experimento e, pelo teste de PCR *nested*, 4 animais foram diagnosticados como positivos, todos no M0, e foram eliminados do rebanho. Nos outros momentos, M60 e M270, nenhum animal foi indicado como positivo pela técnica de PCR *nested*. Durante o estudo com os 24 animais do segundo lote, para cada um dos testes foram realizados 624 exames, totalizando 1.248 exames. No teste de PCR *nested*, dos 624 exames, 360 foram positivos. Já no WB apenas 9 exames foram positivos. A técnica de PCR *nested* superou a capacidade diagnóstica do WB durante todo o experimento, com 57,7% de positividade nas amostras testadas, contra apenas 1,4% de resultados positivos no WB. Das amostras positivas no WB, quatro foram detectadas aos 15 dias, duas aos 270 dias e apenas uma aos 240, 600 e 690 dias. Em conclusão, pode-se afirmar que a metodologia adotada nos animais do primeiro lote foi efetiva no controle da doença, na fase de aleitamento e pós-aleitamento, acreditando-se até mesmo numa possível eliminação do vírus da AEC no novo rebanho. Concluiu-se, também, que possivelmente ocorreu a transmissão intrauterina de CAEV para a prole, a partir de progenitores sorologicamente positivos e negativos. A combinação do sistema de manejo, que propicie diminuição de risco de transmissão horizontal, com o uso da associação de técnicas de diagnóstico mais apuradas, como o WB e a PCR, é relevante para elaboração de um plano estratégico de controle da enfermidade. Espera-se que com esses resultados, seja possível compreender e traçar medidas de monitoramento, controle e erradicação da AEC em rebanhos caprinos, com a realização de inquéritos de forma periódica e contínua.

Palavras-chave: Lentivírus de pequenos ruminantes. PCR *nested*. *Western Blotting*.

ABSTRACT

ALVES, R. P. A. **Methodologies for monitoring seroconversion and control of lentivirus infection in goats.** 2019. 121f. Thesis (PhD in Animal Science). Graduate Program in Animal Science, Federal University of Piauí, Teresina, 2019.

The Caprine Arthritis Encephalitis virus (CAEV) belongs to the family Retroviridae, subfamily Lentivirinae, genus Lentivirus. It causes an infection called Caprine Arthritis Encephalitis (AEC) that is capable of spreading in a herd for a long time. The present study aimed to follow the seroconversion of the AEC, using serological testing (Western Blotting), and the dynamics of detection of the disease, with the use of the molecular technique Polymerase Chain Reaction *nested* (PCR *nested*). Two different batches of animals were used at different times, the first one consisted of Saanen goats, composed of 47 animals, and the second was made up of 24 goats from the Saanen and Anglo-Nubian races. Western Blotting (WB) and *nested* PCR were performed in both batches immediately after birth. In the first batch, the animals came from serologically negative progenitors for AEC, and remained individually isolated until the test results (*nested* PCR and WB). Of the 47 goats born, 43, negative in both tests, were followed in two different moments: at 60 days of age (M60) and at 270 days of life (M270), thus comprising the phase of suckling and post-suckling. In the second batch, 24 goats of the Saanen and Anglo-Nubian races were tested (WB and *nested* PCR) at birth at 15 days of age and once a month for a period of 24 months. In this lot the animals descended from serologically positive parents to AEC. Only goats positive in the first *nested* PCR test were inserted into the study. In both batches, all deliveries were strictly attended, and the newborns were immediately separated from their mothers in order to avoid contact between the two. In the 47 animals studied in the first batch, the WB test did not detect positivity throughout the experiment and, by the *nested* PCR test, 4 animals were diagnosed as positive, all in M0, and were eliminated from the herd. At the other times, M60 and M270, no animals were indicated as positive by the *nested* PCR technique. During the study with the 24 animals of the second batch, 624 tests were performed for each of the tests, totaling 1,248 tests. In the *nested* PCR test, of the 624 exams, 360 were positive. In WB, only 9 tests were positive. The *nested* PCR technique surpassed the diagnostic capacity of the WB throughout the experiment, with 57.7% positivity in the samples tested, against only 1.4% positive WB results. Of the WB positive samples, four were detected at 15 days, two at 270 days and only one at 240, 600 and 690 days. In conclusion, it can be affirmed that the methodology adopted in the animals of the first batch was effective in controlling the disease, in the phase of breastfeeding and post-suckling, believing even a possible elimination of the AEC virus in the new herd. It was also concluded that intrauterine transmission of CAEV to offspring may have occurred from serologically positive and negative progenitors. The combination of the management system, which allows for a reduction in the risk of horizontal transmission, using the combination of more accurate diagnostic techniques, such as WB and PCR, is relevant for the elaboration of a strategic disease control plan. It is hoped that with these results, it will be possible to understand and devise measures for monitoring, control and eradication of AEC in goats, by conducting periodic and continuous surveys.

Keywords: Small ruminant lentivirus. *Nested* PCR. *Western Blotting*.

1 INTRODUÇÃO

A Artrite Encefalite Caprina (AEC) é causada por um *Lentivirus*, denominado *Vírus da Artrite Encefalite Caprina* (CAEV), pertencente à família *Retroviridae* (ICTV, 2017). Essa infecção é capaz de se disseminar insidiosamente em um rebanho por um longo período (HERRMANN-HOESING *et al.*, 2010). Através da importação de animais do continente europeu infectados pelo CAEV, a doença adentrou nos rebanhos caprinos brasileiros (LARA, 2002; SHAH *et al.*, 2004b), onde essa hipótese foi confirmada em estudo conduzido por Hasegawa e colaboradores (2017) que comprovaram que o CAEV detectado no Brasil estava relacionado a cepas europeias.

Os *Lentivirus* são RNA-vírus pertencentes a um gênero muito particular de entidades virológicas, componentes de um grupo taxonômico de patógenos que compartilham entre si similaridade genética, mecanismos moleculares de replicação, morfologia e interações biológicas entre seus hospedeiros (CLEMENTS; PAYNE, 1994). Nesta categoria estão incluídos vários vírus de interesse biomédico e veterinário, dentre eles: os Vírus da Imunodeficiência Humana (HIV), da Imunodeficiência Bovina (BIV), da Anemia Infecciosa Equina (AIEV), da Imunodeficiência Felina (VIF), da Artrite Encefalite Caprina (CAEV) e a Maedi – Visna (MVV) (SAMPAIO, 2007), este último compõe juntamente com o CAEV, os Lentivírus de Pequenos Ruminantes (LV).

Análises genômicas dos LV isolados a partir de ovinos e caprinos sugerem que tenham evoluído de um genótipo ancestral em comum. Foi evidenciado que têm a capacidade de cruzar barreiras interespecies e de adaptação a novos hospedeiros. Portanto, formam um grupo heterogêneo com abrangência de hospedeiros variáveis e diferentes capacidades patogênicas, que têm a capacidade de infectar tanto ovinos quanto caprinos, indicando, portanto a transmissão entre espécies, embora o CAEV pareça ser o mais disseminado em ambas as espécies (BATISTA *et al.*, 2004; DE SOUZA *et al.*, 2012; PISONI, QUASSO; MORONI, 2005; SHAH *et al.*, 2004a).

Os LV replicam-se produzindo um intermediário de ácido desoxirribonucleico (DNA), chamado provírus, que é integrado ao genoma da célula hospedeira, no caso o macrófago. O virion contém duas cópias do genoma viral para permitir a síntese do provírus e é envelopado, com a proteína do envoltório (ENV) incorporada na membrana do virion. A ENV medeia a interação com o receptor celular (*via* subunidade SU) e depois a fusão com a membrana plasmática/endossômica (CRANE; CLEMENTS; NARAYAN, 1988; MALASHKEVICH; SINGH; KIM, 2001). Uma vez que o capsídeo é liberado no citoplasma da célula-alvo, ocorre a transcrição reversa. O complexo

de pré-integração é transportado para o núcleo onde o provírus é integrado ao genoma do hospedeiro. A transcrição é conduzida a partir do promotor na repetição longa terminal (LTR) proviral, que é feito durante a síntese do provírus, permitindo a expressão de RNA mensageiro (RNAm) viral e RNA genômico (RNAg) (BLACKLAWS, 2012).

O principal tropismo dos LV é para monócitos, macrófagos e células dendríticas (ANDERSON; KLEVJER; LIGGITT, 1983; GENDELMAN *et al.*, 1985, 1986; NARAYAN *et al.*, 1983; RYAN *et al.*, 2000). No entanto, nos tecidos, outros tipos de células também podem estar infectadas e agir como reservatórios de vírus. Esses alvos adicionais incluem células epiteliais na glândula mamária, que são uma importante fonte de células infectadas e vírus livre para transmissão, tanto da AEC como da Maed-Visna (MV), de mães para seus descendentes (LERONDELLE; GODET; MORNEX, 1999; ZINK; YAGER; MYERS, 1990). Outras células infectadas importantes na patogênese podem incluir células endoteliais e células microgliais do sistema nervoso central (SNC), embora seja difícil estabelecer se a detecção do antígeno ou ácido nucléico do vírus indica infecção ou captação de produtos virais por essas células (GEORGSSON *et al.*, 1989; STOWRING *et al.*, 1985).

As principais vias de transmissão são o colostro (no intestino neonatal ou por aspiração para o trato respiratório), e por secreções respiratórias (por contato direto ou exalação de gotículas aerossolizadas) ao trato respiratório ou conjuntiva de animais (BLACKLAWS *et al.*, 2004; MCNEILLY *et al.*, 2007, 2008; NIESALLA *et al.*, 2008). Uma vez que eles entraram no corpo, os LV infectam macrófagos e células dendríticas na superfície da mucosa. É provável que as células dendríticas migrem para o linfonodo, onde o vírus é transferido para macrófagos que saem do linfonodo e, assim, permitem a ocorrência de infecção sistêmica (MCNEILLY *et al.*, 2008; RYAN *et al.*, 2000). Acredita-se que macrófagos infectados entrem na medula óssea, onde possam infectar células-tronco mieloides (GENDELMAN *et al.*, 1985) ou células estromais (GROSSI *et al.*, 2005), embora isso tenha sido desafiado por dados de Reação em Cadeia de Polimerase em Tempo Real (qPCR) em cabras (RAVAZZOLO *et al.*, 2006).

Estudos sobre a biologia e o ciclo de vida do vírus da AEC podem informar como um organismo infectado lida com a infecção, e quais elementos do sistema imunológico podem fornecer uma resposta a essa infecção viral. Diante disso, alguns métodos como a genética molecular, genômica, transcriptômica e proteômica estão sendo desenvolvidos e empregados na busca dessas respostas (DA CRUZ *et al.*, 2013).

Não há terapia específica para animais infectados pelo vírus da AEC, como também não há vacina disponível para prevenir a infecção, tampouco tratamento que diminua a carga viral no hospedeiro. Marcadores genéticos podem oferecer outra possibilidade para reproduzir animais saudáveis, uma vez que foi encontrado o uso do polimorfismo do gene da proteína transmembrana 154 (*TMEM154*) como marcador para ovinos resistentes a lentivírus, seguido por casos de scrapie em procriação seletiva (WHITE; KNOWLES, 2013). Estudos sobre polimorfismos do gene de citocinas e do gene do receptor de citocinas em ovinos indicam uma associação entre variantes genéticas e o nível de genes transcritos de citocinas (LARRUSKAIN; JUGO, 2013; WHITE *et al.*, 2009).

Pouco se sabe sobre os mecanismos imunológicos que envolvem os LV, especialmente sobre a AEC, e o por que um organismo infectado não consegue debelar a infecção. Conhecer os genes envolvidos na imunidade e identificar os fatores que os influenciam e suas expressões de produtos proteicos ajudam a ganhar consciência dos processos imunológicos nos organismos. As análises de expressões gênicas do sistema imune ainda são limitadas, especialmente no sistema imune caprino. Apesar de alguns estudos demonstrarem fatores possivelmente envolvidos na resistência imunológica e/ou na participação da resposta imune do hospedeiro à infecção, ou ainda da biologia do vírus, não se tem ainda compreensão completa do modo como o sistema imunológico do hospedeiro responde a esta infecção (JARCZAK *et al.*, 2016; LARRUSKAIN; JUGO, 2013; STONOS; WOOTTON; KARROW, 2014).

A sintomatologia clínica, tanto na AEC quanto na MV, manifesta-se em quatro formas clínicas principais: respiratória, nervosa, articular e mamária. Na forma respiratória, os animais podem apresentar dificuldade respiratória, intolerância ao exercício, emagrecimento crônico e quadros secundários de pneumonia. Na neurológica, podem exibir incoordenação, andar em círculo, postura anormal da cabeça, nistagmo, paresia gradual posterior, que progride a paralisia e morte. O quadro articular é caracterizado por claudicação e aumento de volume das articulações, principalmente as do carpo e metacarpo. A mastite caracteriza-se pelo endurecimento difuso do úbere e pela presença de pequenos nódulos, só identificados pela cuidadosa palpação, levando à diminuição da produção de leite (CALLADO; DE CASTRO; TEIXEIRA, 2001; RADOSTITS *et al.*, 2002). Outro quadro clínico observado é o emagrecimento progressivo (PINHEIRO *et al.*, 2012)

Estudos sobre os prejuízos diretos causados por estas doenças ainda são limitados, mas os resultados disponíveis indicam que, de uma maneira geral, ocorre a diminuição da vida produtiva

e da produção leiteira dos animais, redução na duração do período de lactação, predisposição para a ocorrência de infecções bacterianas, especialmente na glândula mamária, crescimento deficiente ou aumento da mortalidade das crias e diminuição da eficiência reprodutiva. As perdas indiretas referem-se à desvalorização dos rebanhos, reposição precoce dos animais que desenvolvem sintomas, despesas com o controle, barreiras comerciais para matrizes, reprodutores, sêmen e embriões (ANDRIOLI *et al.*, 2003; BRITO, 2009; DE SOUZA *et al.*, 2012).

As Lentivirose de Pequenos Ruminantes (LVPR) encontram-se difundidas nos rebanhos de caprinos e ovinos de diferentes países e têm sido motivo de restrições no comércio internacional destas espécies (MOOJEN, 2001a). No Brasil, diversos estudos comprovam a disseminação do LV em rebanhos (ALMEIDA *et al.*, 2003; BANDEIRA *et al.*, 2008; BATISTA *et al.*, 2004; LIMA, 2012; MARTINEZ *et al.*, 2011; MELO; FRANKE, 1997; MOREIRA; OELEMANN; LILENBAUM, 2007; MOURA SOBRINHO *et al.*, 2010; PINHEIRO; GOUVEIA; OLORTEGUI, 2001).

O diagnóstico dos LV pode ser realizado de forma direta e indireta, por meio da utilização de testes de triagem e complementares. Em consequência das infecções por LV frequentemente não induzirem sintomatologia clínica em animais soropositivos, utiliza-se a sorologia como a mais adequada alternativa de diagnóstico para detecção de animais positivos (ANDRÉS *et al.*, 2005).

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Agente etiológico

O primeiro isolamento de LV foi realizado por Sigurdson; Thomar; Palsson (1960) em ovinos, quando o autor consagrou o termo “vírus lentos”, por causarem uma infecção crônica de evolução lenta, persistente, progressiva e degenerativa. Segundo o Comitê Internacional de Taxonomia de Vírus (2017), os LV classificam-se na família *Retroviridae*, subfamília *Orthoretrovirinae*, gênero *Lentivirus*.

Os *Lentivirus* compõem um grupo taxonômico de patógenos que possuem características complexas, não oncogênicos, tendo uma reação cruzada entre si (ROBERSON *et al.*, 1982). São pleomórficos, esteróides, envelopados, com 80-100nm de diâmetro que possuem pequenas projeções do envelope dispersas em toda superfície (CLEMENTS; PAYNE, 1994). Seu genoma é composto de duas moléculas idênticas de RNA, lineares, de cadeia simples, não complementares e de polaridade positiva. O RNAg, através da transcriptase reversa, origina o genoma da célula hospedeira, sendo então denominado de provírus (NARAYAN CLEMENTS, 1989).

Na Figura 1 encontra-se ilustração do genoma dos LV, que em suas extremidades encontram-se duas regiões terminais não-codificantes (“*long terminal repeats*” ou “LTRs”), e entre essas duas LTRs estão dispostos os genes estruturais, *gag* (antígenos específicos de grupo) e *env* (envoltório), que codificam proteínas estruturais e o gene *pol* (polimerase), que codifica enzimas virais (CLEMENTS; PAYNE, 1994). O gene *gag* codifica um precursor que é subsequentemente clivado em 3 proteínas principais: matriz (MA), capsídeo (CA) e nucleocapsídeo (NC) (Figura 2). O gene *pol* codifica as proteínas de atividade enzimática: transcriptase reversa (TR), protease (PT), integrase (IN) e dUTPase (UTP) (Figura 2). O gene *env* codifica as glicoproteínas de superfície (SU) e transmembranária (TM) (PEPIN *et al.* 1998). Encontram-se também dispostos no genoma viral pequenas fases abertas de leitura (“*open reading frames*”, ou ORFs), com os genes acessórios e reguladores da expressão do genoma viral (*tat*, *rev* e *vif*). A proteína VIF (fator de infectividade viral) tem a função de facilitar a infectividade e a difusão do mesmo, particularmente, em linfócitos primários e macrófagos (CLEMENTS; PAYNE, 1994).

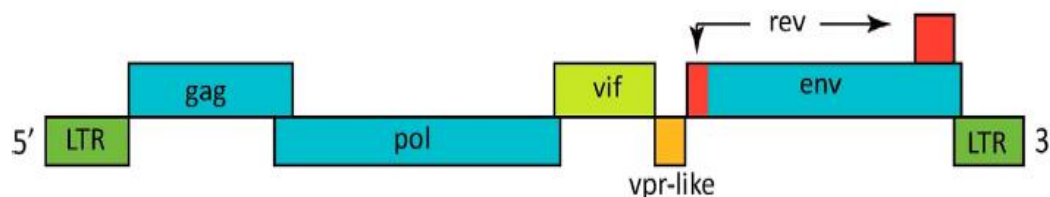


Figura 1 Representação do genoma viral de Lentivírus de Pequenos Ruminantes

Fonte: Minguijón *et al.* (2015).

Estes vírus são RNA-vírus, com alterações inflamatórias e/ou degenerativas, de progressão lenta e grave imunodeficiência (LEGASTELOIS; LEROUX; LEVREY, 1996). Seu agrupamento filogenético está dividido em 5 grupos distintos, dentre os quais estão o CAEV e o MVV (SHAH *et al.*, 2004b).

O envelope, destes vírus, está associado, por ligações covalentes, com as glicoproteínas TM e SU. A matriz é outra estrutura presente na partícula viral, e se situa entre o capsídeo e o envelope (PEPIN *et al.*, 1998), os quais são demonstrados na Figura 2.

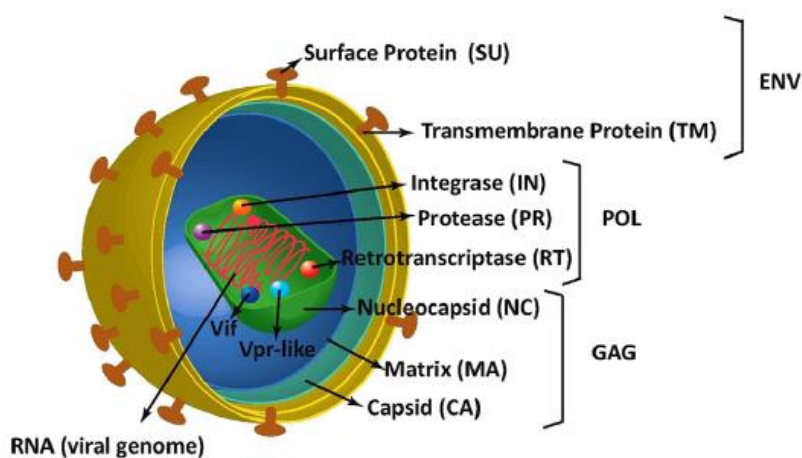


Figura 2 Representação estrutural de um lentivírus

Fonte: Minguijón *et al.* (2015).

Em seu ciclo de replicação viral, ocorre inicialmente o reconhecimento e ligação do LV a receptores celulares, com posterior fusão e penetração do nucleocapsídeo viral no interior da célula hospedeira. No processo de fusão, o envelope vírico se funde à membrana da célula (GONDA, 1994), que é mediada por uma porção hidrofóbica da proteína transmembrana do envelope que penetra na membrana celular (OLIVEIRA, 1994). O vírion é então desencapsulado e o Ácido Ribonucleico (RNA) viral fica exposto após a remoção do capsídeo. Ocorre, em seguida, a

retrotranscrição do RNA viral, pela ação da transcriptase reversa (TR), que promove a síntese do DNA proviral, migração para o núcleo e sob ação da IN é incorporado ao núcleo celular. O genoma viral então se torna parte do DNA celular e dessa forma, os animais permanecem infectados por toda a vida (DE LA CONCHA- BERMEJILLO, 1997). O estágio final do ciclo envolve a reunião dos produtos dos genes estruturais, incorporação do RNA genômico às partículas víricas e aquisição do envelope viral (GONDA, 1994).

O elevado nível de heterogenicidade do nucleotídeo e da sequência de aminoácidos dos LV determinam sua antigenicidade, crescimento e virulência, assim como a sua persistência e capacidade de debelar o sistema imunológico (FEITOSA *et al.*, 2010). Portanto, a caracterização molecular de diversas amostras de vírus é fundamental para evidenciar a diversidade de suas propriedades biológicas que podem redundar em diferenças de citopatogenicidade, tanto *in vivo* quanto *in vitro*, e de manifestação clínica da doença, além de auxiliar o desenvolvimento de métodos de diagnóstico mais sensíveis para o vírus de cada região (LIMA *et al.*, 2004).

Anteriormente, acreditava-se que o CAEV infectava apenas caprinos e o MVV acometia somente ovinos, caracterizados como espécie-específicos, mas atualmente se comprovou a transmissão do vírus caprino a ovinos e vice-versa (REINA *et al.*, 2009), uma vez que por meio do sequenciamento genético de amostras sanguíneas de ovinos e caprinos, foi possível constatar um padrão misto, com ovinos portando o vírus caprino bem como o caprino portando o vírus ovino (GERMAIN; VALAS, 2006).

Diferentes amostras de LV têm sido isoladas e caracterizadas em diversos estados brasileiros (CASTRO *et al.*, 1999; FEITOSA *et al.*, 2010; MARCHESIN; MOOJEN; RAVAZZOLO, 1998; RAVAZZOLO *et al.*, 2001).

Feitosa *et al.* (2010) demonstraram que os LV são geneticamente estáveis, como previamente foi observado por Laamanen; Jakava-Viljanen; Sihvonen (2007). Além disso, foi observado um alto nível de similaridade entre as quatro sequências do vírus do Nordeste do Brasil, da estirpe Cork do CAEV (CAEV-Co), o que talvez seja explicado pela transmissão vertical por meio de fêmeas infectadas ao longo das gerações.

Os LV são atualmente subdivididos em cinco grupos chamados de A, B, C, D e E. O grupo A é subdividido em 15 subtipos, A1-A15, já o grupo B em três subtipos B1, B2 e B3. Um pequeno número de isolados compreende os grupos C e D, enquanto o grupo E possui os subtipos E1 e E2 (Figura 3) (BERTOLOTTI *et al.*, 2011; FRAS *et al.*, 2013; GIAMMARIOLI *et al.*, 2011;

GJERSET; JONASSEN; RIMSTAD, 2007; GREGO *et al.*, 2007; KUHAR; BARLIC-MAGANJA; GROM, 2013; PISONI *et al.*, 2010; REINA *et al.*, 2010; SHAH *et al.*, 2004a).

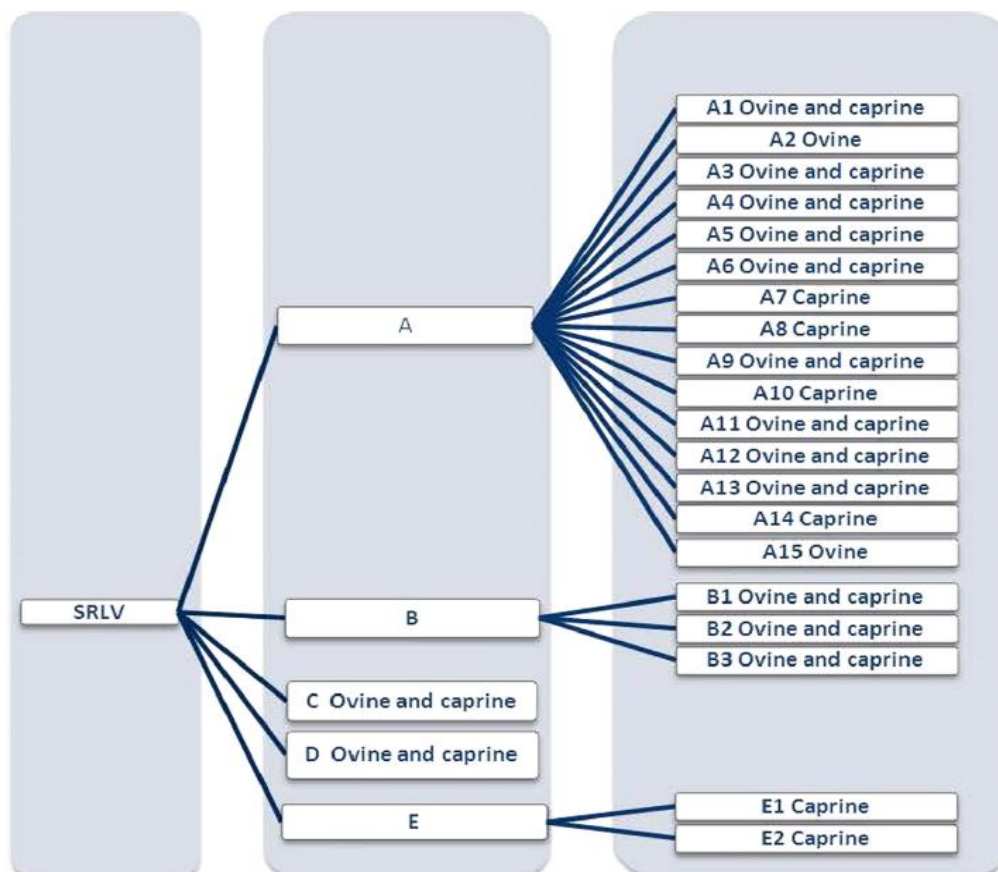


Figura 3 Grupos e subgrupos dos Lentivírus de Pequenos Ruminantes

Fonte: Minguijón *et al.* (2015).

2.2 Aspectos gerais da imunidade da AEC

O vírus da AEC tem tropismo por macrófagos, tanto em animais sintomáticos como animais assintomáticos (STORSET; EVENSEN; RIMSTAD, 1997), com replicação viral nestas células produzindo lesões do tipo inflamatória. No entanto, outros tipos de células, tais como fibroblastos, células epiteliais e células endoteliais também são suscetíveis à infecção *in vivo*, podendo ampliar o desenvolvimento das lesões (CARROZZA *et al.*, 2003). A disseminação do vírus para os múltiplos órgãos envolvidos na doença ocorrerá pelos monócitos infectados que não expressam o vírus (CLEMENTS; PAYNE, 1994).

A replicação viral e a resposta imune do hospedeiro podem ocorrer nas primeiras semanas após a infecção com o vírus, sendo necessário um longo período para o desenvolvimento da doença. (NARAYAN; CLEMENTS, 1989). Na terceira semana pós-infecção, detecta-se a

primeira resposta imune para a proteína do capsídeo, e em torno da quinta semana são formados anticorpos contra as demais proteínas do nucleocápside, matriz, glicoproteína transmembranária e glicoproteína de superfície (DE LA CONCHA-BERMEJILLO, 1997), porém, estes anticorpos neutralizantes são produzidos tardiamente, em quantidades limitadas, e são de baixa afinidade, de modo que não impedem o ciclo de replicação viral (BERTONI *et al.*, 1994). Soma-se a isso o fato de estruturas virais, como a SU5 presentes na superfície viral, atrair uma resposta de anticorpos neutralizantes para um epítipo funcionalmente irrelevante, o que favorece a ilusão do sistema imunitário de que está ocorrendo uma defesa efetiva do organismo (ZAHNO; BERTONI, 2018).

O sistema imunológico de animais infectados desenvolve Imunoglobulinas G (IgG) dos tipos 1 e 2, onde animais crônicos com a sintomatologia da artrite possuem, em sua maioria, IgG tipo 1, imunoglobulinas dirigidas para a proteína do envelope (gp-135), enquanto os animais sem alterações patológicas nas articulações possuem IgG do tipo 2 (TRUJILLO *et al.*, 2004).

A resposta celular é caracterizada pela proliferação de linfócitos TCD4+ (REYBURN *et al.*, 1992) e TCD8+, responsáveis pela destruição de células infectadas, porém incapazes de destruir as que não expressam o pró-vírus, como é o caso dos monócitos (LICHTENSTEIGER *et al.*, 1993).

Já foi demonstrado um maior número de células T no sangue, expressando CD8, mas não moléculas CD4, sugerindo que essas células poderiam desempenhar um papel protetor na infecção retroviral, principalmente durante a fase inicial de infecção, provavelmente através da atividade citotóxica (WU *et al.*, 2003).

Tanto a resposta imune inata como a adaptativa são induzidas pela infecção por LV. Macrófagos e células dendríticas são células importantes na interface do sistema imune inato e adaptativo, que atuam como células apresentadoras de antígenos para a estimulação de respostas de células T. Macrófagos e monócitos são os principais produtores de citocinas envolvidas na resposta antiviral intracelular precoce (BIRON, 1998), tais como os mecanismos envolvidos na alteração da expressão do Complexo Principal de Histocompatibilidade (MHC), adesão e moléculas co-estimuladoras, e diretamente ativando ou desativando células imunes. Os efeitos desses processos podem levar à ativação de respostas antivirais celulares envolvendo células Natural Killer (NK) e linfócito T citotóxico, e liberação de vírus mediada por anticorpos (RAMSHAW *et al.*, 1997). A infecção por LV pode interferir na função dessas importantes células e, assim, alterar os tipos de respostas imunológicas induzidas (BLACKLAWS, 2012).

O papel das células NK na infecção por LV não foi investigado, no entanto, dada a importância das células NK para a infecção pelo HIV-1, é provável que elas desempenhem um papel importante no controle dos LV. Não está claro se as células NK têm como alvo macrófagos infectados por LV, no entanto, pode-se induzir que elas reconhecem e ligam as células infectadas e partículas do virion através de mecanismos, incluindo reconhecimento mediado por receptor que inibe a morte (KIR), degranulação, ativação do complemento, citotoxicidade mediada por células dependentes de anticorpos (ADCC) e produção de Intérféron gama (IFN- γ), que serve para matar células infectadas, ou modular a ação de vírus por respostas imunes específicas (STONOS; WOOTTON; KARROW, 2014).

Já os linfócitos T, em especial T $\gamma\delta$ que compreendem aproximadamente 70% de todos os linfócitos em animais jovens e são uma parte importante do sistema imune inato, apresentam-se em uma proporção significativamente maior em cabras infectadas em comparação com cabras saudáveis, o que sugere que essas células podem ser importantes para o controle da infecção por LV (JOLLY *et al.*, 1997; KABA *et al.*, 2011; PONTI *et al.*, 2008). Outra importante função que possivelmente é exercida pelas T $\gamma\delta$, está ligada ao fato de sua localização nas superfícies mucosas. Acredita-se que este tipo de célula desempenhe um papel crucial na limitação da entrada, via mucosas, dos LV e na mediação das respostas imunes precoces contra esses vírus (STONOS; WOOTTON; KARROW, 2014).

Nos monócitos/macrófagos ocorre a replicação do vírus, de forma controlada e restrita (GEBALLE *et al.*, 1985; HAASE *et al.*, 1977; NARAYAN *et al.*, 1983). Os monócitos no sangue são infectáveis (ou seja, o vírus pode adentrar essa célula, transcrever reversamente e integrar provírus), mas há níveis muito baixos de transcrição do vírus. Na maturação dos macrófagos teciduais, a replicação viral torna-se produtiva, com altos níveis de transcrição viral e produção de proteína viral. Os macrófagos imaturos, portanto, atuam como “sentinelas” semeando células infectadas por vírus que não podem ser detectadas ou eliminadas pelo sistema imunológico, nos tecidos. Uma vez no tecido, essas células amadurecem e permitem a replicação do vírus (HAASE, 1986; PELUSO *et al.*, 1985).

Os Intérférons alfa (IFN- α), beta (IFN- β) e IFN- γ , que pertencem a um grupo das citocinas, são os responsáveis pela resposta a patógenos e parasitas bacterianos e virais. Estes intérférons são capazes de inibir a replicação viral, modular a imunidade, tanto os mecanismos inatos como a resposta adaptativa, exercendo influência antiproliferativa em alguns tipos de células (DE VEER *et al.*, 2001). Regulam a expressão do fator de restrição, induzindo assim a apoptose de células

infectadas e a resistência celular à infecção (SAMUEL, 2001), são ainda capazes de interferir na replicação do vírus, o que é importante na indução de estados antivirais em células não infectadas próximas (BIRON, 1998).

Os IFN- α e IFN- β induzem efeitos antivirais em uma ampla gama de vírus de RNA e DNA (VILCEK; SEN, 1996). Outra função antiviral muito importante é a estimulação de células NK, onde sua atividade contra células alvo sensíveis é aumentada e podem lisar uma vasta gama de células, incluindo as infectadas por vírus, ativação de linfócitos T citotóxicos e liberação de vírus mediados por anticorpos (BIRON, 1998; RAMSHAW *et al.*, 1997).

Um dos mais importantes mediadores da imunidade inata contra a infecção por vírus é o interferon tipo I (KOYAMA *et al.*, 2008). Os LV induzem fracamente a produção de IFN tipo I diretamente de células infectadas (BERTONI; BLACKLAWS, 2010; ZINK; NARAYAN, 1989). No entanto, na adição de linfócitos T a culturas infectadas com LV, interferon induzido por LV (IFN-LV) é produzido, sendo provavelmente um misto de IFN- γ tipo I e II (BERTONI; BLACKLAWS, 2010). Os LV são mais sensíveis aos efeitos do tratamento com IFN tipo I em monócitos, nos quais a inibição quase completa da replicação viral pode ser demonstrada, pois o IFN tipo I interfere na proliferação e diferenciação de monócitos a macrófagos e, portanto, inibe a replicação viral. Isso pode explicar porque o efeito inibitório do tratamento com IFN tipo I é tão aparente nos monócitos, enquanto em outros tipos celulares, incluindo macrófagos, há apenas reduções marginais na replicação viral (BERTONI; BLACKLAWS, 2010; ZINK; NARAYAN, 1989) e porque o tratamento com IFN tipo I imediatamente após a infecção experimental com Maed-Visna provoca reduções na carga viral e no desenvolvimento de patologia (JUSTE *et al.*, 2000).

Em animais com LV, as interleucinas (IL) IL-1 α , IL-1 β e IL-6 tiveram sua expressão diminuída nos níveis de transcrição de proteína, e não houve nenhuma expressão de IFN- γ e do Fator de Necrose Tumoral alfa (TNF- α) no nível de proteína no sangue total de animais (JARCZAK, 2014). Os níveis de transcrição e proteína de IFN- β foram os mesmos em animais infectados e livres de vírus. A inibição de muitas expressões de citocinas no sangue pode indicar a supressão da resposta imune do organismo infectado por LV. Esta observação pode ser confirmada pelos resultados obtidos por Pyrah e Watt (1996), que apontaram que as ovelhas infectadas com LV têm uma menor resposta imune aos antígenos micobacterianos, o que pode ser o motivo pelo qual a imunidade do hospedeiro é afetada.

Expressões elevadas de TNF- α e IL-6, assim como IFN- γ , IL-1 β , IL-4, IL-10 e IL-2 em tecidos pulmonares, foram identificadas em microglia derivadas de ovelhas infectadas por MVV (TORSTEINSDOTTIR, 2007). Lechner *et al.*, (1997a) descobriram que o CAEV aumenta a expressão constitutiva de IL-8 e de proteína quimioatrativa de monócitos 1 (MCP-1) em macrófagos infectados *in vitro*, enquanto diminui o nível do fator de crescimento transformante β 1 (TGF- β 1). Macrófagos infectados e não infectados com LV mostraram diferentes padrões de expressão de citocinas em resposta à infecção por outros patógenos. Isso pode significar que a presença de lentivírus nos macrófagos desregula seu funcionamento (JARCZAK, 2014; PYRAH; WATT, 1996). Nível elevado de IL-8 parece ser um atributo comum em infecções por lentivírus, já que a infecção pelo HIV em humanos e a infecção por LV em ovelhas também aumentam a expressão dessa citocina. Em alguns casos de infecções por lentivírus houve ausência de expressão de IL-8, o que ocasionou baixos níveis de IFN- γ , IL-2 e IL-10 (LECHNER *et al.*, 1997b).

Um estudo sobre a expressão de citocinas em membranas sinoviais em diversos momentos após inoculações experimentais do vírus por meio venoso, revelou níveis elevados de TNF- α , MCP-1 e IL-6 logo aos seis dias após a infecção, e essa expressão aumentada persistiu por mais de dois anos após a infecção (LECHNER *et al.*, 1997b).

Nimmanapalli; Sharmila; Reddy (2010) estudaram o efeito imunomodulador da infecção por lentivírus na expressão de IL-16 (IL-16 humana recombinante, rhIL-16) *in vitro*, utilizando células derivadas de cabras infectadas e não infectadas por LV. O nível de DNA proviral foi menor nos monócitos caprinos tratados com rhIL-16. O aumento da expressão de IL-16 durante a infecção por lentivírus pode, portanto, ter inibido a integração viral.

Em estudo conduzido por Ravazzolo *et al.*, (2006), utilizando animais com diferentes cargas virais do CAEV, uma cabra com AEC (animal com as maiores cargas de RNA proviral e viral), expressou alterações de duas a onze vezes nos níveis de IFN- α , IL-12p40, IL-10, TGF- α . A expressão de IL-04 variou entre as cabras, embora não tenha havido correlação com a carga viral. Em outro estudo, ao analisar a produção da IL-16, uma citocina pró-inflamatória produzida por uma variedade de células, incluindo macrófagos, demonstrou expressão aumentada (nos níveis de RNAm e proteína) no sangue de uma cabra infectada por LV. A IL-16 também mostrou níveis elevados em células de membrana sinovial infectadas por LV, *in vitro*, em comparação com células não infectadas. A maior produção de IL-16 durante a infecção por LV pode ser responsável pelo aumento das infiltrações de células linfóides observadas em articulações e outros tecidos (SHARMILA; WILLIAMS; REDDY, 2002).

A sinalização via Receptores do tipo Toll (TLR) induzida por vírus não tem sido amplamente estudada em ovinos e caprinos, no entanto, durante a infecção por LV, os TLRs 7 e 8 se ativam induzindo a produção de IFN- α , IL-6, TNF- α e subsequente expressão de proteína antiviral. Não está claro se as vias de sinalização de TLR induzem a replicação de LV, ou se o genoma de LV possui um sítio de ligação transcricional do fator nuclear kappa B (NF- κ B) no promotor. No entanto, dada a importância dos macrófagos como células efetoras imunes inatas, a maturação e a ativação de macrófagos podem induzir a replicação de LV. Dessa forma uma investigação mais aprofundada sobre os papéis da ativação de TLR e dos fatores de restrição intrínseca na limitação da infecção por LV é necessária (STONOS; WOOTTON; KARROW, 2014).

Proteínas mediadoras de resistência intrínseca em células contra infecções virais, incluindo Apobec3G (A3G), TRIM5 α e Tetherin, são regulados positivamente pelo tratamento de IFN tipo I, mas há poucos dados em LV para mostrar se estes são os principais bloqueios para a replicação do vírus (STONOS; WOOTTON; KARROW, 2014). Recentemente TRIM5 α foi identificado em ovinos e caprinos, e considerado eficaz na restrição das LVPR (JAUREGUI *et al.*, 2012). Uma proteína semelhante a A3G também foi identificada em ovelhas e mostrou atividade de citidina desaminase (LARUE *et al.*, 2008). Como o HIV-1, os LV contêm o gene acessório *vif* para combater a atividade restritiva do A3G, e o *vif* dos LV parece restringir o A3G entre as espécies (LARUE *et al.*, 2008). A Tetherin foi investigada em ovinos devido ao seu papel na restrição de retrovírus endógenos (ARNAUD *et al.*, 2010). Como os genomas da LV carecem do gene acessório, *vpu*, provavelmente ocorre alta atividade de restrição de LV. Duas mutações de aminoácidos ligadas em *gag* e *vif* causam perda da capacidade de replicação em macrófagos e atenuação in vivo (GUDMUNDSSON *et al.*, 2005).

A expressão do genoma é controlada pelo promotor/potenciador viral na LTR, a partir do seu provírus integrado. É a atividade desse promotor que influencia fortemente o tropismo de células e tecidos dos LV in vivo. Nos LV não há nenhum elemento de resposta à transativação (TAR) e a LTR sozinha é um promotor forte, sem qualquer exigência para a presença de outros produtos virais (BARROS; ANDRÉSDÓTTIR; FEVEREIRO, 2005; GDOVIN; CLEMENTS, 1992; MERCIER; GALIEN; EMANOIL-RAVIER, 1994; VILLET *et al.*, 2003). O promotor é ativo em macrófagos maduros e ativados e a transcrição é controlada pela disponibilidade de fatores de transcrição que interagem com ele (CLEMENTS; PAYNE, 1994; CLEMENTS; ZINK, 1996; SMALL *et al.*, 1989).

A estimulação das vias da Proteína Quinase Ativadas por Mitógenos (MAPK) e da Proteína Quinase C (CPK) está ligada à expressão da LTR viral (BARBER *et al.*, 2002; SMALL *et al.*, 1989). As citocinas envolvidas nessa estimulação estão sendo lentamente identificadas. A replicação dos LV é aumentada em resposta ao Fator de Estimulação de Crescimento de Colônia de Macrófagos e Granulócitos (GM-CSF), a IL-1beta e ao IFN-gama. Além disso, respostas precoces à estimulação do TNF-alfa em macrófagos foram demonstradas (ELLIS; RUSSELL; DU, 1994; MURPHY *et al.*, 2006; TONG-STARKSEN; SEPP; PAGTAKHAN, 1996; ZHANG *et al.*, 2002). Para algumas destas citocinas, foram encontrados elementos de resposta direta no promotor de LTR, incluindo sítios de ativação gama (GAS) para a ligação do transdutor de sinal e o ativador da transcrição 1 (STAT1) na resposta de IFN-gama do CAEV. As citocinas são todas produzidas em uma resposta inflamatória e ajudam a aumentar a replicação do vírus nas lesões inflamatórias que se acumulam durante a patogênese. As citocinas estimulatórias para replicação dos LV são semelhantes àquelas que aumentam a replicação de HIV-1 em macrófagos, onde IL-1beta, IL-6 e TNF-alfa são todos necessários para a transcrição máxima do promotor de HIV, em conjunto com a estimulação através da co-moléculas estimuladoras CD80/86 e CD40 (HOSHINO *et al.*, 2002).

Algumas citocinas podem ser produzidas como resposta à inflamação induzida por vírus e também podem ajudar a aumentar a replicação do vírus. O GM-CSF e TNF- α (MURPHY *et al.*, 2006), IL-1 β (ELLIS; RUSSELL; DU, 1994) e IFN- γ (TONG-STARKSEN; SEPP; PAGTAKHAN, 1996), induzem a replicação de LV através da ativação do promotor do gene do vírus. Além disso, por um lado, o TNF- α estimula os macrófagos durante a resposta precoce à infecção (MURPHY *et al.*, 2006), mas, por outro lado, a ativação de macrófagos, especialmente a maturação dos monócitos do sangue para macrófagos teciduais, provoca um aumento na replicação dos vírus dentro dessas células (PELUSO *et al.*, 1985). Processos semelhantes ocorrem durante a infecção pelo HIV-1, onde o aumento da replicação do vírus nos macrófagos também requer contato de citocinas e linfócitos (HOSHINO *et al.*, 2002). Assim, as citocinas protegem o hospedeiro contra a infecção por LV, mas são utilizadas simultaneamente por vírus para replicar seus genomas (BLACKLAWS, 2012).

As respostas imunes adaptativas aos LV são tanto humorais quanto celulares, embora ainda não esteja claro como cada uma delas se relaciona com a proteção do hospedeiro ou com a progressão da doença. Tal como o HIV-1, o grau da resposta imunitária influencia a carga viral, que está correlacionada com a gravidade e a presença de sintomas clínicos da doença. Os animais que respondem com uma resposta imune mediada por células são frequentemente referidos como

não progressores da doença a longo prazo porque exibem uma infecção viral persistente, mas não apresentam sintomas clínicos e têm uma carga viral baixa. Esses animais produzem altos níveis de anticorpos IgG2 específicos para gp135 e um subgrupo dominante de células Th responsivas a gp135 exibindo altos níveis de expressão gênica de IFN- γ (CHEEVERS *et al.*, 2000; CHEEVERS; BEYER; HÖTZEL, 2001). Em contraste, os animais artríticos tendem a dar uma resposta imune mediada por anticorpos, caracterizado por altos títulos policlonais de anticorpos IgG1 reativos aos LV e um subconjunto dominante de células Th2 com baixa proliferação e expressão aumentada do gene IL-4 (HOTZEL; CHEEVERS, 2001; PRENDERGAST *et al.*, 2010). Respostas sistêmicas podem levar vários meses para serem detectadas após a infecção natural, mas as respostas imunes no sistema linfático que drenam um local de infecção experimental são detectáveis dentro de 4 dias, por meio da produção de anticorpos (BERTONI; BLACKLAWS, 2010).

A resposta imune mediada por células é provavelmente a resposta mais eficiente para controlar a carga viral. Como o CAEV, ao contrário do HIV-1, não infecta as células TCD4+, a manutenção das populações de células TCD4+ durante a infecção por CAEV permitirá o desenvolvimento e a manutenção de linfócitos T citotóxicos específicos. No entanto, a infecção pode interferir na proliferação de células TCD4+, uma vez que as cabras artríticas infectadas por CAEV reduziram a proliferação de células CD4+ em comparação com as cabras assintomáticas infectadas por CAEV (PERRY *et al.*, 1995). A proliferação reduzida de linfócitos também foi observada em ovelhas clinicamente afetadas em comparação com animais assintomáticos infectados pelo MVV (REINA *et al.*, 2007). LV não contém o gene viral *nef*, e a regulação negativa do MHC I por LV provavelmente não ocorre. No entanto, os LV podem regular negativamente a expressão da molécula de MHC de classe II em macrófagos infectados (JOLLY *et al.*, 1997), e a regulação negativa de moléculas co-estimuladoras de CD80 foi observada em ovelhas com sintomas clínicos de doença (REINA *et al.*, 2007). Em geral, isto sugere que a infecção por LV parece interferir com o processamento e apresentação do antígeno e, deste modo, limita a capacidade das células apresentadoras de antígeno para ativar células TCD4+ e induzir respostas por linfócitos T citotóxicos.

A região do MHC, localizado no cromossomo 20 em ovelhas e no cromossomo 23 em caprinos (AMILLS *et al.*, 1998; DUKKIPATI *et al.*, 2006), tem sido implicado na infecção e na doença induzida por LV. Os genes do MHC Classe I e II codificam as glicoproteínas receptoras que se ligam e apresentam peptídeos antigênicos às células T que iniciam a resposta imune. O MHC é um dos poucos sistemas polimórficos para os quais foi possível estabelecer um significado

funcional para a variação genética observada (SAYERS; SWEENEY, 2005). Seu polimorfismo e associação com doenças infecciosas têm sido intensamente estudados em uma grande variedade de doenças com etiologia viral, embora tais estudos sejam escassos em pequenos ruminantes (LARRUSKAIN; JUGO, 2013). A natureza altamente polimórfica de muitos loci no MHC, torna difícil investigar seu envolvimento na patogênese dos LV (SAYERS; SWEENEY, 2005). Os métodos de genotipagem com resolução suficiente são necessários para determinar o tipo de loci do MHC, e os tamanhos das amostras são frequentemente inadequados para testar variantes raras. O efeito de diferentes alelos do MHC ainda precisa ser elucidado, mas é possível que polimorfismos, dependendo da localização, possam alterar a capacidade de moléculas de MHC se ligarem e apresentarem antígenos, afetarem a interação com células T ou desencadearem respostas imunes diferentes (BATALIA; COLLINS, 1997; KONNAI *et al.*, 2003).

A infecção pela AEC induz produção de anticorpo contra todas as proteínas virais, mas os anticorpos funcionalmente mais importantes são aqueles para a proteína do envelope viral, *env*, que inibem sua função, e portanto, são neutralizantes. Anticorpos neutralizantes podem bloquear tanto a ligação do receptor celular como a fusão da membrana. No entanto, anticorpos neutralizantes são lentamente induzidos e possuem baixa afinidade, com níveis de titulação relativamente baixos. Também não se sabe se eles possuem funções importantes *in vivo*. Os LV associam-se as células *in vivo*, e passam célula-a-célula, uma vez que induzem a formação de sincícios. Havendo, portanto, pouco vírus livre para neutralizar (BERTONI; BLACKLAWS, 2010). A maioria dos lentivírus induzem respostas de anticorpos neutralizantes, onde a replicação do vírus é controlada, uma vez que uma resposta de anticorpos eficaz é induzida, mas após uma mutação do vírus para evadir da resposta, novos episódios cíclicos de doença surgem (CRAIGO; MONTELARO, 2010; LEROUX; ISSEL; MONTELARO, 1997). Resultados de ensaios de neutralização do MVV variaram dependendo do tipo de célula utilizada (fibroblastos ou macrófagos), com anticorpos neutralizantes retardando em vez de inibir a replicação em macrófagos (JOLLY; NARAYAN, 1989; KENNEDY-STOSKOPF; NARAYAN, 1986).

Macrófagos e células dendríticas são receptores Fc positivos e fagocíticos, para o complexo vírus/anticorpo, que pode ser internalizado preferentemente pela interação entre os receptores de anticorpo e o receptor Fc, ao invés da interação entre os receptores *env* e os receptores celulares. Após esse complexo adentrar a célula, o vírus é liberado do complexo permitindo a sua infecção (BECK; PROHÁSZKA; FÜST, 2008; GRUND; EQUINE, 1996).

Os receptores celulares para os LV ainda não foram identificados. As cepas clássicas de MVV e CAEV não parecem usar os mesmos receptores (HOTZEL; CHEEVERS, 2001; HÖTZEL; CHEEVERS, 2002), o receptor para MVV é amplamente expresso por diferentes espécies e diferentes tipos de células (CHEEVERS, 2002; LYALL; SOLANKY; TILEY, 2000). Portanto, o tropismo de células e espécies no MVV não parece surgir da expressão limitada do seu receptor. No entanto, os receptores para CAEV e algumas cepas de MVV mostram padrões mais restritos de expressão (CHEEVERS, 2002; HOTZEL; CHEEVERS; BEYER; HOTZEL, 2001; HOTZEL; CHEEVERS, 2002; JOLLY; NARAYAN, 1989; LYALL; SOLANKY; TILEY, 2000), sugerindo que as restrições de tropismo para algumas cepas de LV são afetadas pela expressão do receptor (MSELLI-LAKHAL *et al.*, 2000). Desconhece-se se os LV usam um receptor celular principal ou se as interações receptor/co-receptor são necessárias para a entrada viral da célula. Os receptores de carboidratos e as interações com os resíduos de glicano na superfície do vírus também são usados pelos lentivírus para entrar nas células, e o receptor de manose foi implicado na entrada de MVV em macrófagos e células da membrana sinovial (CRESPO *et al.*, 2011).

Respostas de anticorpos de imunoglobulinas M (IgM) e IgG são induzidas após a infecção natural por LV. Em ovinos são detectadas apenas respostas IgG1 anti-MVV (BIRD *et al.*, 1995), enquanto em caprinos infectados por CAEV é induzida uma resposta dominada por IgG1 (TRUJILLO *et al.*, 2004). Isto é sugestivo que células T auxiliar tipo 2 (Th2), produzam IL-4 em resposta nos animais infectados, e a produção de IgG2 é indicativa de uma resposta de células T auxiliar tipo 1 (Th1) CD4 + (ESTES; BROWN, 2002). Em cabras infectadas que desenvolvem artrite, há produção de IgG1, enquanto animais infectados sem sinais clínicos, produzem uma resposta mista de IgG1 e IgG2, sugerindo que os anticorpos IgG2 anti-LVPR protegem contra o desenvolvimento de patologia (TRUJILLO *et al.*, 2004).

A resposta dos anticorpos aos LV geralmente atinge epítomos nas proteínas gp135, gp38 e capsídeo (BERTONI *et al.*, 2000). Essas respostas podem surgir a partir de 2 a 4 semanas após a infecção e tendem a produção de IgG1 específica para gp135, enquanto os animais artríticos exibem níveis muito elevados de IgG2 e uma relação IgG1/IgG2 maior do que os animais assintomáticos, ocorrendo flutuação nesses níveis durante os primeiros 6 meses da infecção (RACHID *et al.*, 2013). Além disso, como o HIV-1, esses primeiros anticorpos são específicos de epítomos lineares e, portanto, não neutralizam (CHEEVERS *et al.*, 2000; PERRY *et al.*, 1995). No entanto, esses primeiros anticorpos podem desempenhar um papel importante nas células de citotoxicidade dependente de anticorpo (SINGH *et al.*, 2006). Os epítomos do vírus da AEC podem

sofrer mutação em resposta à pressão de seleção imposta pelas imunoglobulinas do hospedeiro. Estas mutações tendem a ocorrer no quarto domínio variável da gp135 e a mutação de uma citosina conservada mostrou alterar o epítipo de neutralização (HAFLIDADÓTTIR *et al.*, 2008), estas mutações provavelmente contribuem para a progressão da doença (TRUJILLO *et al.*, 2004). Embora mais pesquisas sejam necessárias para melhor compreender o papel dos anticorpos neutralizantes no controle da infecção por LV, é evidente que a resposta imune mediada por anticorpos não é suficiente para controlar a infecção (GONZÁLEZ *et al.*, 2005), e prontamente contribui para a progressão da doença (STONOS; WOOTTON; KARROW, 2014).

As respostas de células T proliferativas e de células T citotóxicas (isto é, respostas de células T CD4+ e CD8+) são induzidas após a infecção por LV e, apesar de sua presença durante a infecção persistente, o vírus não é eliminado (BERTONI; BLACKLAWS, 2010). No entanto, há evidências que na doença em estágio final a resposta das células T proliferativa diminui devido à redução na função de apresentação de antígenos (a expressão de CD80 é reduzida) (REINA *et al.*, 2007). Nem linfócitos T CD4 + nem CD8 + demonstraram ser protetores na infecção por LV (ERIKSSON *et al.*, 1999a, 1999b), embora a metodologia usada (depleção *in vivo* por anticorpos monoclonais) possa não ter sido eficiente suficientemente com essa infecção viral lenta para permitir efeitos mensuráveis (BLACKLAWS, 2012).

As células T CD4+ são essenciais para o estabelecimento da infecção por LV, embora elas próprias não sejam células-alvo para infecção, pois já foi demonstrado que ao atingir o linfonodo de drenagem, o vírus é transferido para os macrófagos, nessa etapa ocorre o envolvimento de linfócitos T CD4+, assim, a falta de linfócitos T CD4 + bloqueia a disseminação do vírus para a circulação sistêmica (ERIKSSON *et al.*, 1999a, 1999b).

As células T CD8+ demonstraram ser importantes no controle de outras infecções por lentivírus, por exemplo do HIV e pelo Vírus da Imunodeficiência Símia (SIV) (BORROW *et al.*, 1994; JIN *et al.*, 1999; KOUP *et al.*, 1994; SCHMITZ *et al.*, 1999).

Apesar da falta de evidências para mecanismos específicos de controle imunológico de LV, evidências indiretas sugerem que a imunidade pode ser importante no controle da replicação. Primeiramente, nos estudos de canulação linfática, as células infectadas pelo vírus saem do local da infecção em uma onda, com a redução no número de células infectadas, ocorrendo quando respostas imunológicas específicas (especialmente células T) tornam-se detectáveis (BIRD *et al.*, 1993; BLACKLAWS *et al.*, 1995). Em segundo lugar, a infecção de animais jovens com sistemas imunológicos imaturos pode causar rápida progressão da doença (BENAVIDES *et al.*, 2007;

HEATON *et al.*, 2012; LAIRMORE; ROSADIO; DEMARTINI, 1986). Em terceiro lugar, a mutação dos LV ocorre durante a infecção persistente, e os LV que sofreram mutações para escapar da resposta do anticorpo foram isolados (BERTONI; BLACKLAWS, 2010).

Os níveis de células infectadas por LV no sangue são baixos e muito raramente há vírus livres no plasma, nos tecidos ou no plasma linfático aferente que drena o local da infecção (MCNEILLY *et al.*, 2007; PISONI *et al.*, 2007; RYAN *et al.*, 2000). Isto está em contraste com outros lentivírus, que muitas vezes têm níveis elevados de células infectadas e vírus livres no plasma, especialmente durante a infecção aguda e na fase tardia da doença. Durante a doença clínica causada pelo EIAV, há altas cargas virais no plasma sanguíneo. A dependência dos LV na disseminação célula-a-célula dentro do hospedeiro é, portanto, muito diferente da patogênese de muitos dos outros lentivírus. É o recrutamento de monócitos infectados ou não infectados 'latentemente' para infecção que permite a replicação contínua de LV no tecido. As respostas imunes à replicação viral e antígenos causam a resposta inflamatória crônica que é observada durante a infecção por LV e que leva ao acúmulo gradual de alterações patogênicas nos tecidos (HAASE, 1986).

A definição de respostas imunes protetoras é confundida pelo fato de que os LV usam o sistema imunológico para auxiliar sua replicação. Em primeiro lugar, a ativação de macrófagos aumenta a replicação do vírus dentro deles; em segundo lugar, as células T CD4⁺ são necessárias para o estabelecimento da infecção; e, por último, os anticorpos podem ajudar o vírus a entrar nos macrófagos e nas células dendríticas (BLACKLAWS, 2012).

2.3 Aspectos epidemiológicos da AEC

A infecção pela AEC ocorre em qualquer faixa etária. Animais mais velhos acabam se expondo mais ao agente infeccioso e a soroprevalência tende a ser mais elevada nesta faixa etária, enquanto em rebanhos com alta taxa de infecção de matrizes, pode haver um aumento de animais jovens soropositivos (ROBINSON; ELLIS, 1986).

O período para que ocorra a soroconversão pode levar anos, surgindo, em alguns casos, períodos de sororeversão caracterizados pela diminuição da titulação de anticorpos, o que representa um fator negativo no que se refere ao diagnóstico e controle das LVPR (ANDRÉS *et al.*, 2005).

O reservatório e a fonte de infecção são os animais portadores do vírus e a transmissão se dá por meio de secreções e excreções, contendo células do sistema monocítico-fagocitário, ricas em partículas virais. A forma de infecção mais comum é a ingestão de colostro e leite de matrizes infectadas (BLACKLAWS *et al.*, 2004).

A infecção geralmente se dá pelas vias digestivas e respiratórias, nos animais ainda jovens, ou pode ocorrer ainda por via uterina (CALLADO; DE CASTRO; TEIXEIRA, 2001) quando os LV infectam os monócitos e macrófagos, onde irá ocorrer a replicação viral. Há infiltração de leucócitos mononucleares nos órgãos e tecidos alvos atingidos, como: pulmões, úbere, articulações, dentre outros, e a secreção de citocinas pode estar envolvida na patogenia (LEGASTELOIS; LEROUX; LEVREY, 1996). A indução da resposta imunológica é variável e não protege contra a infecção. Os LV escapam da ação do sistema imune do hospedeiro e disseminam-se, produzindo uma infecção persistente (CALLADO; DE CASTRO; TEIXEIRA, 2001; MOOJEN 2001a).

Os LV podem ser encontrados também em células mamárias causando lesões na glândula mamária caracterizando uma mastite intersticial (LE JAN *et al.*, 2005). Por isso, o consumo de colostro e leite e a contaminação das cabras em lactação durante a ordenha são responsáveis pela transmissão (LERONDELLE; GODET; MORNEX, 1999; ZINK; JOHNSON, 1994). Além disso, cabras naturalmente infectadas com o vírus, expressam o DNA pró-viral em diversos tecidos do seu trato genital (ALI AL AHAMAD *et al.*, 2005), em células do córtex ovariano e em folículos pré-antrais ovarianos (SILVA, 2006), sendo que a presença do vírus nestes, pode contribuir para uma transmissão vertical da enfermidade (FIENI *et al.*, 2003).

A transmissão vertical, que ocorre mais comumente através do colostro, também pode ocorrer via placenta, pois alguns pesquisadores consideram a possibilidade da passagem do agente infeccioso da mãe para o feto, antes do nascimento (KONISH *et al.*, 2011; LARA; BIRGEL JÚNIOR; BIRGEL, 2005).

Se a fêmea se infectar antes dos sessenta dias de gestação, poderá haver abortamento, mas após o centésimo dia, não deverá ocorrer perda fetal (BLACKLAWS *et al.*, 2004). Animais recém-nascidos, em decorrência da permeabilidade intestinal aumentada, podem se infectar mais facilmente por meio da ingestão de colostro e leite infectados (ADAMS *et al.*, 1983; ÁLVAREZ *et al.*, 2006; HOUWERS; VAN DER MOLEN, 1987).

A transmissão intrauterina pode ocorrer em aproximadamente 10% dos animais nascidos de mães infectadas (BRODIE *et al.*, 1994). A presença de células infectadas por LV no trato genital

de fêmeas (útero e oviduto) é uma importante fonte de contaminação para embriões e fetos (FIENI *et al.*, 2003; LAMARA *et al.*, 2002). A infecção já foi confirmada em cordeiros recém-nascidos de mães positivas por meio da técnica de PCR (ÁLVAREZ *et al.*, 2006). Cavalcante (2013), utilizando em seu estudo 13 matrizes infectadas experimentalmente pelo CAEV-Cock e soropositivas na Imunodifusão em Gel de Ágar (IDGA) e WB (WB) com 30 e 60 dias pós-infecção, verificou que após 20 meses os animais soronegativaram no IDGA e somente três obtiveram resultado positivo no WB. Observou também que das 13 cabras, três apresentaram resultado negativo no IDGA, Ensaio Imunoenzimático (ELISA), WB e PCR *nested* de sangue, porém, foram positivas no PCR *nested* RT-PCR de ovócito e/ou fluido uterino, demonstrando assim, a existência de reações soropositivas intermitentes e a presença do vírus, em determinados momentos, em órgãos e não na corrente sanguínea, sem estimular o sistema imunológico.

A transmissão horizontal ocorre mais facilmente em situações de altas densidades populacionais no rebanho, ocorrendo frequentemente por meio das fezes, saliva, secreções respiratória e urogenital, bem como, por mãos, toalhas, copos de ordenhadeiras mecânicas usadas em criações leiteiras e outros fômites contaminados (ROWE; EAST, 1997), podendo ocorrer também por meio de comedouros e bebedouros contaminados (BLACKLAWS *et al.*, 2004).

A idade, tamanho do rebanho, associação de caprinos com ovinos e contato com outros rebanhos caprinos apresentam uma relação significativa com a soropositividade à infecção pelo CAEV (GHANEM *et al.*, 2009).

A baixa ventilação no recinto dos animais também pode favorecer a exposição ao vírus (PETERHANS *et al.*, 2004). O equipamento de ordenha mecânica contaminado pelo leite de animais infectados, torna-se um fômite eficiente de disseminação do CAEV quando manejado de maneira inadequada (ADAMS *et al.*, 1983).

Já foi comprovada a presença de RNA viral nos pulmões onde pneumócitos do tipo I e II, macrófagos alveolares e intersticiais, células endoteliais e fibroblastos, podem atuar como reservatório para o vírus (CARROZA *et al.*, 2003). A presença do DNA pró-viral também tem sido relatada em células da membrana sinovial caprina (CHUNG; O'SULLIVAN, 1981), terceira pálpebra (CARPUCCHIO *et al.*, 2003), células epiteliais das criptas intestinais, dos túbulos renais, da tireóide (ZINK; YAGER; MYERS, 1990), células do *cumulus oophorus* de folículos terciários (ALI AL AHMAD *et al.*, 2005), no trato genital feminino (útero e oviductos), no sêmen (ALI AL AHMAD *et al.*, 2008; ANDRIOLI; GOUVEIA; PINHEIRO, 1999; PAULA *et al.*, 2009) e em células epiteliais mamárias, indicando uma possível participação destas células na transmissão

vertical (BOLEA *et al.*, 2006; FIENI *et al.*, 2003). O vírus também está presente nos órgãos sexuais de machos infectados que podem apresentar de forma intermitente o vírus no sêmen (PAULA *et al.*, 2009; PETERSON *et al.*, 2008) fazendo da transmissão venérea uma importante forma de transmissão (DE SOUZA *et al.*, 2012).

O aumento da atividade sexual e estresse durante o período reprodutivo, pode reativar a carga viral e a subsequente excreção do vírus (PETERSON *et al.*, 2008). Reprodutores recentemente infectados, na fase que precede a soroconversão podem eliminar o vírus pelo sêmen e devem ser considerados importantes fontes de infecção (PAULA *et al.*, 2009).

Após a infecção dos macrófagos, o animal permanece infectado durante toda sua existência, mesmo ocorrendo produção de anticorpos pelo sistema imunológico (PUGH, 2005).

Na infecção pelo CAEV os sinais clínicos surgem em animais jovens ou adultos (GUEDES, 2007), caracterizando-se por um longo período de incubação, inflamação linfoproliferativa progressiva, infecções persistentes e lento desenvolvimento dos sintomas (CALLADO; DE CASTRO; TEIXEIRA, 2001).

O sucesso em evitar a propagação da infecção dos LV depende, em grande parte, da detecção precoce e do abate de animais infectados no rebanho, métodos de diagnósticos adequados, incluindo desde testes sorológicos periódicos, que detectam anticorpos específicos, como é o caso do WB, associados a testes moleculares, como por exemplo a PCR, para fins confirmatórios, constituem formas adequadas de medidas de monitoramento e controle, para estratégias bem sucedidas de controle e erradicação da doença (RAMÍREZ *et al.*, 2013).

2.4 Sinais clínicos

A infecção por Lentivírus de Pequenos Ruminantes geralmente é assintomática, crônica, progressiva, multisistêmica, podendo induzir à morte. Animais infectados pelo CAEV podem não apresentar sintomatologia clínica e permanecerem por longos períodos sem alterações perceptíveis, porém com o passar do tempo pode ocorrer desvio de nutrientes antes destinados a funções fisiológicas normais, passando a ser destinados a funções imunológicas, contra o vírus (GREENWOOD, 1995).

As apresentações clínicas das LVPR têm sido classificadas em quatro formas básicas: nervosa, respiratória, artrítica e mamária (PERETZ; ASSO; DEVILLECHAIS, 1993).

A forma nervosa ou leucoencefalomielite acomete preferencialmente animais com idade inferior a quatro meses e, menos frequentemente, animais mais velhos, em associação com a forma artrítica. Os animais podem apresentar paresia ou ataxia uni ou bilateral dos membros posteriores, que evolui para tetraparesia e decúbito, bem como, nistagmo, opistótomo, torcicolos e desvios da cabeça e pescoço, além de febre (MOOJEN, 2001a).

A apresentação pulmonar pode ocorrer tanto em animais jovens quanto em adultos, podendo desencadear tosse, secreção nasal, dificuldade respiratória após exercícios físicos, perda de peso e, à auscultação, percebem-se ruídos estertorosos característicos de pneumonia intersticial (SERAKIDES; NUNES; PEREIRA, 1996). Emagrecimento progressivo, outra forma clínica bastante relatada, é uma característica observada de forma mais acentuada nesta forma clínica (RIET-CORREA; SIMÕES; AZEVEDO, 2011).

A forma articular ou artrítica caracteriza-se por aumento na consistência e diâmetro das articulações, especialmente as carpo-metacarpianas, progredindo para deformidade (desvio do terço distal do membro) e perda da flexibilidade articular, dor, graus variados de claudicação e prostração. Pode haver aumento dos linfonodos regionais e higroma carpal (CRAWFORD; ADAMS, 1981). Esta forma, se configura como a mais importante em caprinos e tende a acometer os animais com idade superior a dois anos (WOODWARD *et al.*, 1982).

A forma mamária é responsável por induzir grandes perdas econômicas, em consequência do comprometimento da produção leiteira e da predisposição da glândula mamária a infecções bacterianas (LEITNER *et al.*, 2010). A queda na produção leiteira se deve não só a lesões provocadas pelo vírus, mas também à diminuição do metabolismo (CHRISTODOULOPOULOS, 2006). O animal consegue manter o apetite, mas não metaboliza o alimento e, portanto, não possui elementos que favoreçam a produção leiteira. Observa-se mastite, que pode ser importante causa de mortalidade de cordeiros (MOOJEN, 2001b).

A detecção precoce de animais infectados para a separação e/ou eliminação do rebanho é uma forma prática e essencial para a eficiente prevenção e controle das LVPR, que não deve ser baseada nos sinais clínicos principalmente porque eles aparecem tardiamente. Somente poucos animais infectados em um rebanho tendem a desenvolver a doença clínica, além dos sintomas não serem específicos para essas enfermidades e da carga viral no sangue ser baixa (TORRES *et al.*, 2009).

2.5 Diagnóstico

Os métodos de diagnóstico dos LV podem ser: o diagnóstico clínico, mais facilmente realizado quando há algum quadro da sintomatologia clínica típica da doença instalada no animal infectado, mesmo assim, na maioria dos casos é necessária a confirmação por provas laboratoriais para detecção, de forma direta (pesquisa pelo vírus ou seu material genético), ou ainda através da detecção de anticorpos, por provas indiretas (PINHEIRO; GOUVEIA; ALVES, 2001).

O diagnóstico das LVPR pode ser realizado de forma direta e indireta, por meio da utilização de testes de triagem e complementares. Como as infecções por LV frequentemente não induzem sintomatologia clínica em animais soropositivos, utiliza-se a sorologia como a mais adequada alternativa de diagnóstico para detecção desses animais (ANDRÉS *et al.*, 2005).

Os testes diretos incluem o isolamento e a identificação do vírus, sendo importantes no diagnóstico da infecção viral. Dentre esses testes tem-se a Imunohistoquímica (IH), e métodos de detecção de ácidos nucleicos, como a Hibridização *in situ* (HIS) e o teste de PCR, que é uma técnica bastante sensível e específica, capaz de detectar animais com infecção recente ou que ainda não soroconverteram, além de detectar microrganismos em estado latente, mortos ou que estejam unidos ao material genético do hospedeiro. Esta técnica requer equipamentos sofisticados e mão-de-obra qualificada (ANDRIOLI *et al.*, 2006; TIGRE; CAMPOS; SARDI, 2006).

A técnica de PCR permite a obtenção de milhares de cópias de uma sequência específica de DNA. As primeiras pesquisas sobre a utilização deste teste, para diagnóstico veterinário, datam do final dos anos 80, apresentando-se com grande importância para o diagnóstico de doenças virais. Este é capaz de detectar pequenas quantidades de DNA e RNA viral presentes no material, amplificando-o em quantidades identificáveis. Atualmente este tipo de diagnóstico tem sido utilizado para a pesquisa do DNA proviral de lentivírus caprino em diferentes amostras como: sangue, leite e soro de leite, líquido sinovial, sêmen, fluídos uterinos e embriões (PINHEIRO; GOUVEIA; OLORTEGUI, 2001).

O PCR *nested* aumenta a sensibilidade quando compara a PCR simples, enquanto que a combinação do uso de PCR múltiplos reduz o número de falsos negativos, sendo de extrema importância a correta escolha do *primers* para o sucesso da técnica. Esta técnica poderá ser utilizada em programas de erradicação, quando estiver disponível rotineiramente, para identificar os animais não diagnosticados por sorologia. (PINHEIRO; GOUVEIA; OLORTEGUI, 2001).

O diagnóstico indireto é muito utilizado devido aos custos menos elevados quando comparados aos testes diretos. Vários métodos de diagnóstico sorológico podem ser utilizados para a detecção de anticorpos anti-LV, dentre eles estão o ELISA, o *Dot Blot* (DB), o WB, o IDGA, a Reação de Imunofluorescência Indireta (RIFI), Fixação do Complemento (FC), entre outros (ANDRÉS *et al.*, 2005; PUGH, 2005; TIGRE; CAMPOS; SARDI, 2006).

Na técnica de WB o material viral é separado por eletroforese e transferido para uma membrana de nitrocelulose, onde o complexo antígeno/anticorpo é visualizado através da aplicação de um conjugado enzimático ao qual se adiciona um substrato que reage com a enzima, dando cor a reação (BJERRUM; HEEGAARD, 1988). Este teste detecta anticorpos para p28 aos 4 dias após a infecção, apresentando assim alta sensibilidade, para a detecção precoce de anticorpos para o Vírus da Artrite Encefalite Caprina (PINHEIRO; GOUVEIA; OLORTEGUI, 2001).

A utilização consorciada de métodos de diagnóstico diretos e indiretos, como por exemplo PCR e WB, promove a detecção precoce, reduz os riscos de erros diagnósticos e evita a propagação da doença em rebanhos caprinos, pois pela identificação de animais infectados é possível promover a separação destes dos demais animais saudáveis (RAMÍREZ *et al.*, 2013).

1 **3 ARTIGO 1¹**2 **BASES PARA UM PROGRAMA DE CONTROLE DA ARTRITE ENCEFALITE**
3 **CAPRINA EM REBANHO LEITEIRO**4 **Resumo**

5 A Artrite Encefalite Caprina (AEC) acarreta grandes perdas econômicas em rebanhos caprinos,
6 por isso o controle desta doença é de fundamental importância. Objetivou-se neste estudo
7 avaliar um programa de controle da AEC, a partir da utilização de testes diagnósticos altamente
8 sensíveis para detectar a doença, separação de mãe e cria imediatamente após o nascimento e
9 outras medidas de manejo, com o intuito de formar rebanho livre do vírus. Neste estudo foram
10 utilizados 47 cabritos da raça Saanen, nascidos em agosto de 2013, do rebanho leiteiro da
11 Embrapa Caprinos e Ovinos. Destes, 43 animais foram acompanhados com três testes de
12 Reação em Cadeia de Polimerase *nested* (PCR *nested*) e Western Blotting (WB), em momentos
13 diferentes, sendo a primeira coleta de sangue no momento imediatamente após o nascimento
14 (M0), a segunda coleta aos 60 dias (M60) e a terceira coleta aos 270 dias de vida (M270). Todos
15 os procedimentos dos partos foram rigorosamente assistidos, realizando-se a separação
16 imediata dos animais recém-nascidos das mães, no intuito de não permitir contato entre ambos.
17 Todos os animais utilizados como progenitores foram soronegativos para AEC. Os animais
18 utilizados no experimento permaneceram isolados individualmente até o resultado dos testes.
19 O teste de WB não detectou positividade ao longo de todo o experimento e, pelo teste de PCR
20 *nested*, 4 animais foram diagnosticados como positivos, todos no M0, e foram eliminados do
21 rebanho. Nos outros momentos, M60 e M270, nenhum animal foi indicado como positivo pela
22 técnica de PCR *nested*. Podemos afirmar que a metodologia adotada nesse estudo foi efetiva no
23 controle da doença, na fase de aleitamento e pós-aleitamento, acreditando-se até mesmo numa
24 possível eliminação do vírus da AEC no novo rebanho. Conclui-se que a combinação do sistema
25 de manejo que propicie diminuição de risco de transmissão horizontal, com técnicas de
26 diagnóstico mais apuradas, como o WB e a PCR, é relevante para elaboração de um plano
27 estratégico de controle da enfermidade.

28 **Palavras-chave:** manejo; lentivirus; caprino.

¹ *Artigo elaborado conforme as normas do periódico *Acta Veterinaria Brasilica* (ISSN: 1981-5484).

29

Introdução

30 As Lentivirose de Pequenos Ruminantes (LVPR) acarretam grandes perdas econômicas nos
31 rebanhos caprinos e ovinos, principalmente naqueles de produção leiteira, afetando animais de
32 diferentes raças, idades e sexos (Dawson, 1989). A Artrite Encefalite Caprina (AEC) é
33 enquadrada como uma LVPR e tem como agente etiológico um vírus da família *Retroviridae*,
34 subfamília *Orthoretovirinae*, gênero *Lentivirus* (International Committee on Taxonomy of
35 Viruses, 2017), conhecido como o vírus da AEC ou CAEV. O conhecimento sobre os modos
36 de transmissão desse vírus é fundamental para o estabelecimento de medidas eficientes voltadas
37 ao controle, e possível erradicação (Andrioli et al., 2006a).

38 As medidas de controle e erradicação da AEC são complexas, onerosas e trabalhosas,
39 principalmente pela ocorrência de animais assintomáticos. Outras dificuldades ao
40 estabelecimento de medidas profiláticas abrangem: a inexistência de vacinas eficazes; a lenta
41 produção de anticorpos, ocasionando detecção tardia de animais soropositivos por meio de
42 testes sorológicos; a presença de animais nos rebanhos falso-negativos; e a ampla disseminação
43 da enfermidade nos rebanhos (Joag et al., 1996; Lara, 2008). Por conta disso, a importância do
44 diagnóstico precoce é ressaltada: pelo reconhecimento de caprinos positivos antes da
45 apresentação clínica da enfermidade; pela retirada antecipada de animais acometidos do
46 rebanho, para reduzir a quantidade de animais expostos à contaminação; e pela redução dos
47 custos com tratamentos, sacrifício ou descarte de animais e perdas na produção de carne, leite
48 e pele (Pinheiro et al., 2003).

49 Uma medida de controle e acompanhamento do status sanitário do rebanho é a realização de
50 testes sorológicos, para diagnosticar a AEC. Estes devem ser repetidos semestralmente ou
51 sempre que o caprinocultor tiver condições de encaminhar os soros para o laboratório, porém
52 devem ser realizados em animais com mais de quatro meses de idade, pois antes deste período
53 pode haver influência dos anticorpos maternos (Souza, 2014). No entanto, mesmo com a
54 realização periódica de testes sorológicos, alguns animais não soroconvertem e, portanto, não
55 são detectados nesses testes, ocasionando presença de animais falso-negativos no rebanho,
56 sendo um grande entrave para a consolidação de programas de controle da enfermidade (Castro
57 et al., 2002). Por conta disso, tem-se a necessidade do uso de testes diretos, como a Reação em
58 Cadeia de Polimerase (PCR) (Konishi et al., 2011), que é capaz de estabelecer um diagnóstico
59 precoce e ampliar a sensibilidade de detecção de animais positivos. Essa técnica se baseia na

60 amplificação de parte específica do ácido nucléico viral presente em fluidos e tecidos de um
61 animal infectado (Pinheiro et al., 2012).

62 A realização de exames sensíveis é necessária para que seja feita a adoção de medidas de
63 controle, como a separação e/ou descarte dos animais (Hirsh; Zee, 2003). Considerando-se que
64 não há tratamento que elimine o vírus quando o animal já se encontra infectado, nem vacina
65 que previna a enfermidade (Callado et al., 2001; Ghanem et al., 2009), é importante impedir a
66 disseminação do CAEV nos rebanhos, mediante a realização periódica semestral desses testes
67 de diagnóstico, pois apesar de ser uma prática aparentemente onerosa, é essencial para a
68 implantação e manutenção de programas de controle (Pinheiro et al., 2003).

69 O objetivo com este estudo foi avaliar um programa de controle da AEC, a partir da utilização
70 de testes diagnósticos sensíveis para diagnosticar a doença, separação de mãe e cria
71 imediatamente após o nascimento e outras medidas de manejo, com o intuito de formar
72 rebanhos livres do vírus.

73

Material e Métodos

74 Esta pesquisa foi realizada em acordo com os princípios éticos adotados pelo Conselho
75 Nacional de Controle de Experimentação Animal – CONCEA (Lei nº 11.794, de 8 de outubro
76 de 2008), com aprovação da Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Universidade
77 Estadual Vale do Acaraú (UVA) com o número de protocolo CEUA/UVA 014.12 (Anexo).

78 Os cabritos utilizados neste estudo foram provenientes de um rebanho leiteiro pertencente à
79 Embrapa Caprinos e Ovinos, localizada no município de Sobral, região semiárida do sertão
80 Cearense, a 3° 42' de latitude Sul e 40° 21' de longitude Oeste e 83 metros de altitude. No
81 rebanho é adotado um programa de controle da enfermidade, no qual os animais são submetidos
82 aos testes de Imunodifusão em Gel de Ágar (IDGA), Ensaio Imunoenzimático (ELISA) e
83 Western Blotting (WB) quadrimestralmente, sendo separados em grupos de animais
84 soropositivos e soronegativos conforme o diagnóstico. As cabras são divididas em grupos
85 distintos de forma a ocorrer três estações de parição no rebanho anualmente, para não haver
86 intermitência na produção de leite. O sistema de acasalamento adotado no rebanho é a monta
87 natural controlada, sendo que cabras soronegativas são cobertas por reprodutores soronegativos
88 e cabras soropositivas por reprodutores soropositivos. Para a seleção de animais soronegativos
89 foram obtidos resultados negativos seguidos em dois testes de IDGA, dois de ELISA e dois de
90 WB. O diagnóstico de gestação é realizado com auxílio do ultrassom aos 45 dias.

91 Neste estudo acompanhou-se um período de parição de cabritos da raça Saanen no setor leiteiro
92 da Embrapa Caprinos e Ovinos, em agosto de 2013. Todos os procedimentos dos partos foram
93 rigorosamente assistidos, realizando-se a separação imediata dos animais recém-nascidos das
94 mães, no intuito de não permitir nenhum contato entre ambos. Todos os animais utilizados
95 como progenitores foram soronegativos para AEC.

96 Após o nascimento, uma amostra de sangue de cada cria foi obtida para realização dos testes
97 de WB e PCR *nested*. A coleta de sangue após o nascimento ocorreu antes dos animais
98 mamarem o colostro termicamente tratado (56°C por 60 minutos). Todos os cabritos
99 permaneceram isolados individualmente até o resultado dos exames. Os animais que tiveram
100 resultados positivos, em pelo menos um dos testes, foram eutanasiados, e somente os animais
101 negativos, nos dois testes, foram agrupados, formando assim um rebanho, que foi acompanhado
102 até os 270 dias de idade. Salienta-se que este rebanho permaneceu totalmente isolado dos
103 demais animais da fazenda no decorrer da pesquisa.

104 Durante todo o estudo, realizaram-se três coletas de sangue, sendo a primeira no momento
105 imediatamente após o nascimento (M0), a segunda aos 60 dias (M60), e a terceira aos 270 dias
106 de idade (M270).

107 A coleta foi realizada através da venipunção da jugular, usando tubos tipo Vacutainer® de 10
108 mL, com (EDTA) e sem anticoagulante. As amostras de sangue foram encaminhadas aos
109 Laboratórios de Patologia Clínica e de Biotecnologia da Embrapa Caprinos e Ovinos onde,
110 aquelas sem anticoagulante foram centrifugadas a 3000 g por 15 minutos, e os soros obtidos
111 armazenados em microtubos tipo eppendorf® e congelados a -20°C, até a realização da prova
112 sorológica de WB. Após centrifugação, encaminharam-se as amostras com anticoagulante para
113 a extração do DNA.

114 As amostras de sangue com anticoagulante foram centrifugadas a 1500 g, para obtenção das
115 camadas de leucócitos que foram tratadas com cloreto de amônio, segundo metodologia de
116 Karanikolaou et al. (2005).

117 A extração de DNA realizou-se através da metodologia de Grimberg et al. (1989), a partir das
118 células obtidas da papa de leucócitos. A quantificação e avaliação da qualidade do DNA
119 extraído foram realizadas por leitura da espectrofotometria a 260 e 280 nm. Na sequência as
120 amostras foram armazenadas a -20°C até o momento da realização do teste de PCR *nested*.

121 Para a realização do PCR *nested*, os iniciadores desenhados foram: CAEV1 =
122 5'CAAGCAGCAGGAGGGAGAAGCTG3'; CAEV2 =

123 5'TCCTACCCCCATAATTTGATCCAC3. (posição genômica 1249 – 1226) descritos por
124 Barlough et al. (1994), resultando na amplificação de um fragmento de DNA de 296pb. O
125 produto desta amplificação foi então re-amplificado com iniciadores internos CAEV3 =
126 5'GTTCCAGCAACTCGAA ACAGTAGCAA TG-3' (posição genômica 997 – 1024) e
127 CAEV4 = 5'ACCTT TCTGCTTCTTCATTTAATTTCCC 3' (posição genômica 1181 – 1154),
128 afim de obter-se um fragmento-alvo final de 185pb (Rimstad et al., 1993). As reações de PCR
129 foram realizadas em volume total de 50µL, contendo 10mM de Tris-HCl (pH 8,0), 50mM de
130 KCl, 1,5mM de MgCl₂, 100µM de cada dNTP (dATP, dGTP, dCTP, dTTP), 20pmoles de cada
131 iniciador, 2,0 U Taq DNA polimerase e 3 µL do DNA molde. Os ciclos foram constituídos de
132 uma desnaturação inicial a 94°C por 5min e 35 ciclos com desnaturação a 94°C por 5min,
133 hibridização a 63°C por 1min e extensão a 72°C por 45 segundos. Uma extensão final de 72°C
134 por 7min (Andrioli et al., 2006b).

135 Para leitura dos resultados, realizou-se eletroforese em gel de agarose 2% corado com brometo
136 de etídio. Em todas as corridas foram utilizados controles negativos (células de MSC não
137 infectadas), controle positivo (células de MSC infectadas) e controle de reagentes (H₂O
138 bidestilada, autoclavada, livre de DNase) (Andrioli et al., 2006b). As amostras amplificadas
139 por PCR foram purificadas após eletroforese em gel de agarose de baixo ponto de fusão ("*low*
140 *melting point*") a 1%, por meio do kit de extração, conforme instruções do fabricante.

141 O teste de WB seguiu o protocolo de Pinheiro et al. (2011). Realizando-se eletroforese SDS-
142 PAGE com géis de concentração e separação a 4% e 12,5%, respectivamente. Em seguida
143 ocorreu a transferência passiva das proteínas contidas no gel para membrana de nitrocelulose
144 (Protan® - 0,45µm – Amersham. Cat N° 10600002). A membrana foi previamente bloqueada
145 com PBS Tween a 0,3%. O imunodiagnóstico foi realizado com diluições de soro de 1:50 e
146 conjugado *rabbit anti-goat* IgG peroxidase (Sigma® Cat. A5420) de 1:15000. A revelação das
147 bandas de proteína ocorreu ao abrigo da luz, com os substratos 4-Cloro-1-Naphthol e 3,3'
148 Diaminobenzidine (DAB), com H₂O₂ a 30% e a reação inibida com adição de água destilada.

149 Realizou-se estatística descritiva dos dados na forma de porcentagem simples para demonstrar
150 as quantidades de animais detectados como positivos e negativos, para cada teste diagnóstico
151 realizado. Por meio do programa Epi Info™ 7.0, executou-se o teste Exato de Fischer (P<0,05),
152 para comparação do M0 com o M60 e com o M270, nos resultados do teste de PCR *nested*.

153

Resultados e Discussão

154 Nesse estudo, um total de 47 animais foram inicialmente utilizados. Destes, quatro foram
 155 positivos no M0, no teste de PCR *nested*. Desta forma o percentual de positividade do teste no
 156 M0 foi de 8,5% (4/47, Tab. 1). Os quatro animais positivos no M0 foram eliminados do
 157 rebanho, e não tiveram contato com os demais. No M60 e no momento M270 nenhum dos 43
 158 animais foi indicado como positivo pela técnica de PCR *nested* (Tab. 1).

159 Durante todo o experimento, o teste sorológico utilizado (WB) não detectou animais
 160 soropositivos (Tab. 1). Este resultado diverge com os de Frota et al. (2005) que, trabalhando
 161 com 46 animais separados ao nascimento, oriundos de um rebanho sob o controle da AEC,
 162 também obtiveram resultado negativo pelo teste sorológico, que no caso foi o IDGA, em um
 163 primeiro exame sorológico, em todos os indivíduos testados. No entanto, observaram
 164 soroconversão em um novo teste sorológico aos seis meses de idade.

Tabela 1: Valores reais e percentuais de positividade e negatividade para os testes de *Western Blotting* e PCR *nested*, do momento do nascimento (M0), aos 60 dias (M60) e aos 270 dias de vida (M270).

Idade	<i>Western Blotting</i>		PCR <i>nested</i>		Total de animais
	+	-	+	-	
M0	0 (0%)	47 (100%)	4 (8,5%)	43 (91,5%)	47
M60	0 (0%)	43 (100%)	0 (0%)	43 (100%)	43
M270	0 (0%)	43 (100%)	0 (0%)	43 (100%)	43

165 Possivelmente a retirada dos animais infectados, PCR positivo no momento do nascimento,
 166 aliados à separação total dos cabritos, imediatamente após o nascimento, tenha evitado a
 167 disseminação do vírus entre os cabritos. Entretanto, como nesta enfermidade pode ocorrer
 168 soroconversão tardia, é possível que algum animal estivesse em uma fase inicial de infecção e,
 169 assim sendo, com o nível de anticorpos baixo ou até mesmo inexistente (Adams, 1982). A baixa
 170 carga viral no sangue é um grande desafio para a detecção de vírus. Além disso, como foi
 171 mostrado em cabras experimentalmente infectadas com CAEV, pode ocorrer variação da carga
 172 viral, podendo existir diferenças de resultados entre indivíduos (Juste et al., 1998; Zhang et al.,
 173 2000).

174 A técnica de PCR vem sendo utilizada com sucesso na detecção de Lentivírus de Pequenos
 175 Ruminantes (LV) possuindo alta sensibilidade e especificidade (Zanoni et al., 1990). Wagter et
 176 al. (1998) afirmaram que essa técnica é bastante versátil e foi adaptada para amostras
 177 sanguíneas, de leite, sêmen e de outros tecidos, porém, em se tratando de animais em estágios
 178 iniciais da doença, as amostras de sangue são mais eficientes para a detecção do DNA proviral.
 179 Segundo Zanoni et al. (1992), a PCR apresenta vantagem sobre métodos sorológicos de

180 detecção de infecção em animais com anticorpos colostrais. Em infecções por LV,
181 diagnosticadas pela técnica de PCR, são frequentemente encontrados animais negativos nos
182 testes sorológicos (falsos negativos) (Rimstad et al., 1993; Johnson et al., 1992), demonstrando
183 uma menor sensibilidade destes métodos, frente ao teste molecular (Cardinaux et al., 2013). No
184 entanto, o diagnóstico por meio da técnica de PCR pode falhar, em casos em que a carga viral
185 está muito baixa (Brodie et al., 1993). Estudos demonstram que a técnica de PCR é capaz de
186 detectar a infecção em 88,3% de ovinos e caprinos que são soropositivos e em 11% que são
187 soronegativos na Imunodifusão em Gel de Agarose (IDGA) (Wagter et al., 1998). Outros
188 estudos já indicaram que os métodos de PCR tendem a ser menos sensíveis do que testes
189 sorológicos (ELISA e IDGA) (Alvarez et al., 2006; Zanoni et al., 1996), mesmo esse teste
190 indicando animais infectados antes da soroconversão (Alvarez et al., 2006). Essa diminuição
191 no nível de sensibilidade da técnica de PCR foi demonstrada pelo tipo de amostra biológica
192 utilizada no teste (Extramiana et al., 2002). Esses autores evidenciaram níveis de detecção de
193 83,5% para leucócitos no sangue periférico, 66,7% nas células do leite e 88% nos tecidos.
194 Observaram, ainda, que a técnica de PCR apresentou uma especificidade de até 100% quando
195 comparado com a IDGA. Segundo Karanikolaou et al. (2005), a utilização da técnica de PCR
196 em diferentes amostras biológicas, a especificidade foi mantida em 100%.

197 Quanto ao fato da ocorrência de nascimento de animais positivos para a infecção, Cavalcante
198 et al. (2013) demonstraram a presença do pró-vírus em ovócitos e fluído uterino, de três animais
199 infectados experimentalmente, que reagiam negativamente às provas sorológicas. Isto pode ter
200 ocorrido neste estudo, uma vez que os animais utilizados como progenitores eram soronegativos
201 para AEC, no entanto, poderiam abrigar o vírus no sistema reprodutor, e não na corrente
202 sanguínea, favorecendo a transmissão intrauterina.

203 Estudos demonstram que animais positivos representam uma importante fonte de infecção do
204 vírus da AEC para animais saudáveis em um rebanho (Heat et al., 2012; White et al., 2014). O
205 isolamento de animais imediatamente após o parto e a eliminação dos positivos, diagnosticados
206 através de testes sorológicos e/ou moleculares, são fundamentais para um controle efetivo desta
207 enfermidade. Estas medidas previnem a transmissão vertical e horizontal da doença
208 impossibilitando a contaminação dos animais nascidos negativos (Konish et al., 2011).

209 East et al. (1993) descreveram a ocorrência da transmissão entre animais de todas as idades em
210 contato próximo por meio de aerossol, e até mesmo a transmissão de até vários metros de
211 distância parece ser uma rota significativa de disseminação, particularmente em sistema de
212 manejo intensivo ou condições de pastoreio. Villoria et al. (2013) detectaram a presença do

213 vírus em 9% e 11% das amostras de água e ar, respectivamente, coletadas em currais e em 35%
214 das ovelhas que participaram do estudo. Encontrou-se, ainda, a presença de LV no ar expelido
215 por esses animais.

216 A transmissão horizontal pode ocorrer, também, através das secreções respiratórias, o que já foi
217 demonstrado principalmente pelo fato de que células infectadas com o vírus já terem sido
218 encontradas em fluido brônquio alveolar de ovelhas positivas (Mcneilly et al. 2008). Além
219 disso, células tanto livres quanto associadas ao vírus têm sido detectadas em leite ou colostro
220 de ovelhas e cabras e acredita-se que a aerolização do leite por parte dos animais durante o
221 manejo possa contribuir para a transmissão da doença (Herrman-Hoesing et al., 2007). A rota
222 de transmissão horizontal tem sido amplamente aceita como responsável pela propagação das
223 LVPR (Peterhans et al., 2004).

224 Um comportamento muito comum nessa fase de vida dos animais, e que favorece a ocorrência
225 da transmissão horizontal, relaciona-se ao hábito de cabritos jovens ficarem aglomerados e
226 simularem o movimento de sucção de leite em diversas partes do corpo de outros animais,
227 favorecendo a troca de secreções (Gufler et al., 2007). De Souza et al. (2015), já comprovaram
228 a presença do CAEV na saliva, que reforça a hipótese da transmissão entre animais,
229 principalmente nessa faixa etária, por ocasião do comportamento descrito acima. A adoção de
230 testes diagnósticos no momento do nascimento, associados à separação dos animais positivos,
231 possivelmente pode ter bloqueado essa rota de transmissão do CAEV.

232 Álvarez et al. (2005), ao estudarem transmissão horizontal, afirmaram que a Pneumonia
233 Progressiva dos Ovinos ou Maedi-Visna, doença enquadrada como LVPR, acontece na faixa
234 entre 85,7% a 90% para rebanhos sem programas de controle sanitário (Valas et al., 2000). O
235 esclarecimento da epidemiologia e o curso da infecção são essenciais para a diminuição do
236 número de animais infectados e, conseqüentemente, a redução das perdas econômicas (White;
237 Knowles, 2013; Kaba et al., 2012; Jarczak et al, 2016).

238 As estratégias de prevenção e erradicação mais comumente utilizadas são: realização periódica
239 de testes e remoção de animais sorologicamente positivos; separação imediata das crias de mães
240 soropositivas ao nascimento, com fornecimento de colostro bovino ou termizado; separação de
241 animais soropositivos de soronegativos e o controle do comércio de animais vivos (Peterhans
242 et al., 2004; Berriatua et al., 2003; Rowe et al., 1992, Rodrigues et al., 2018). O sucesso parcial
243 até o momento dos programas de controle indica que os testes disponíveis para diagnóstico
244 desta doença e as medidas de contenção comumente adotadas são úteis para reduzir a

245 prevalência da infecção (Peterhans et al., 2004), mas não para a sua erradicação. Pérez et al.
246 (2013) e Rodrigues et al. (2018), implementando programas estratégicos de controle de LVPR
247 em ovinos e caprinos, respectivamente, conseguiram reduzir significativamente os níveis de
248 animais soropositivos e eliminar os sintomas clínicos no rebanho, através da associação de
249 técnicas de diagnóstico sorológicas com medidas de manejo sanitário, mas não conseguiram
250 zerar a incidência sorológica.

251 Um programa compulsório de erradicação do CAEV, em uma região ao sul da Itália, vem sendo
252 implementado desde 2007, com testes sorológicos realizados anualmente em uma época do ano
253 específica. Nestes, todos os animais sorologicamente positivos ou inconclusivos foram/são
254 abatidos. Ademais, cabritos não testados (menores de seis meses de idade) nascidos de animais
255 soropositivos, que foram alimentados com colostro da mãe infectada e/ou estiveram em contato
256 próximo com ela, também foram/são considerados infectados. Após a adoção dessas medidas,
257 a soroprevalência diminuiu de 13,9% em 2007-2008 para 0,3% em 2014-2015. Essa drástica
258 redução na soroprevalência de rebanhos durante este período indica que o programa de controle
259 implementado foi bem-sucedido, mas não eliminou o vírus (Tavella et al., 2018).

260 Um caso de sucesso na erradicação do CAEV foi obtido por Konish et al. (2011). Esses autores,
261 por meio de um programa de erradicação do vírus da AEC, desenvolvido entre os anos de 2002
262 e 2006, conseguiram formar um rebanho livre da doença, a partir de um rebanho sabidamente
263 positivo e com alta prevalência (60,8%) sorológica (IDGA) da infecção. Esse programa, muito
264 semelhante ao desse estudo, consistiu em diversas medidas de manejo como: separação
265 imediata entre mãe e cria após o parto; fornecimento de colostro bovino; abate de animais
266 positivos; segregação dos animais positivos e negativos; segregação de outros que tiveram
267 contato com o rebanho com status positivo ou desconhecido; separação dos animais de forma
268 a evitar o contato entre animais de diferentes idades; uso de testes molecular e sorológico (PCR
269 e IDGA, respectivamente) periodicamente; equipes de manejadores específicos para cada
270 rebanho de forma a garantir a prevenção da transmissão vertical e horizontal.

271 Na primeira Conferência de Consenso sobre os LV realizada pela União Europeia, a primeira
272 no campo da medicina veterinária, três importantes questões no âmbito dos LV foram
273 discutidas: as rotas de transmissão, consequências da infecção e do papel potencial dos
274 programas de erradicação em nível local europeu, de acordo com a situação em cada país ou
275 região. Nesse programa de controle desenvolvido em países da União Europeia, as etapas para
276 erradicação da doença foram definidas: determinar a prevalência de LVPR por pesquisas e
277 outras fontes de dados; reduzir a taxa de soroprevalência até sorologia negativa, erradicando

278 assim a doença; e finalmente consolidar o status de sorologia negativa com erradicação do vírus
279 (Peterhans et al., 2004).

280 Os resultados desse estudo mostraram um forte indicativo de que esse conjunto de estratégias
281 de controle evitou a contaminação nos cabritos pelo vírus da AEC, pois nos dois momentos
282 (M60 e M270) e em ambos os testes (WB e PCR *nested*), nenhum dos 43 animais foi positivo.
283 Entretanto, para a confirmar o desaparecimento do vírus desse rebanho, seria necessária uma
284 pesquisa com mais análises diagnósticas e um tempo mais prolongado como foi descrito por
285 Konishi et al., (2011).

286 **Considerações finais**

287 Indicamos que a metodologia adotada nesse estudo foi efetiva no controle da doença, na fase
288 de aleitamento e pós-aleitamento. Salienta-se que, a combinação do sistema de manejo, que
289 propicie diminuição de risco de transmissão horizontal, com técnicas de diagnóstico mais
290 apuradas, como o Western Blotting e a PCR *nested*, é relevante para elaboração de plano
291 estratégico de controle da enfermidade.

292 **Agradecimentos**

293 À EMBRAPA Caprinos e Ovinos, pelo suporte dado para a realização da pesquisa.

294 **Referências**

295 ADAMS, D. S. The meaning of the agar gel immunodiffusion test (AGID) for antibody
296 against caprine arthritis encephalitis virus (CAEV). Dairy Goat Journal, v.60, n.9, p.17-20,
297 1982.

298
299 ALVAREZ, V. et al. PCR detection of colostrum-associated Maedi-Visna virus (MVV)
300 infection and relationship with ELISA-antibody status in lambs. Research Veterinary Science,
301 v. 80, p. 226–234, 2006.

302
303 ALVAREZ, V. et al. Relative contribution of colostrum from Maedi-Visna virus (MVV)
304 infected ewes to MVV-seroprevalence in lambs. Research in Veterinary Science, v. 78, n. 3,
305 p. 237–243, 2005.

- 306
307 ANDRIOLI, A. et al. Fatores de risco na transmissão do lentivírus caprino pelo sêmen.
308 Pesquisa Agropecuária Brasileira, v. 41, n. 8, p. 1313-1319, 2006a.
309
- 310 ANDRIOLI, A. et al. Protocolos para extração do DNA-proviral e PCR do lentivírus caprino
311 em sangue. Comunicado Técnico Embrapa, Sobral, v. 1, n. 72, p. 1-5, 2006b.
312
- 313 BARLOUGH, J. et al. Double-*nested* polymerase chain reaction for detection of caprine
314 arthritis-encephalitis virus proviral DNA in blood, milk, and tissues of infected goats. Journal
315 of Virological Methods, v. 50, n. 1-3, p. 101-114, 1994.
316
- 317 BERRIATUA, E. et al. Transmission and control implications of seroconversion to maedi-
318 visna virus in Basque dairy-sheep flocks. Preventive Veterinary Medicine, v. 60, p. 265–279,
319 2003.
320
- 321 BRASIL. Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008. Regulamenta o inciso VII do § 1o do art.
322 225 da Constituição Federal, estabelecendo procedimentos para o uso científico de animais;
323 revoga a Lei no 6.638, de 8 de maio de 1979; e dá outras providências, [2008]. Disponível
324 em: http://www.planalto.gov.br/ccivil_03/_ato2007-2010/2008/lei/111794.htm. Acesso em: 16
325 fevereiro 2017.
326
- 327 BRODIE, S.J. et al. Host-virus interaction as defined by amplification of viral DNA and
328 serology in lentivirus-infected sheep. Archives of Virology, v. 130, p.413–428, 1993.
329
- 330 CAEV which generate infectious virus. Virology, Nova York, v. 179, p. 347-364, 1990.
331
- 332 CALLADO, A. K. C.; CASTRO, R. S.; TEIXEIRA, M.F.S. Lentivírus de Pequenos
333 Ruminantes (CAEV e MAEDI-VISNA): revisão e perspectivas. Pesquisa Veterinária
334 Brasileira, v.21, n.3, p.87-97, 2001.
335
- 336 CARDINAUX, L. et al. Virological and phylogenetic characterization of attenuated small
337 ruminant lentivirus isolates eluding efficient serological detection. Veterinary Microbiology,
338 v. 162, p. 572–581, 2013.
339

- 340 CASTRO, R.S. et al. Soroconversão e sororeatividade de cabras leiteiras naturalmente
341 expostas ao vírus da Artrite encefalite caprina no Brasil. *Ciência Rural*, v.32, n. 4, p.603-607,
342 2002.
- 343
- 344 CAVALCANTE, F. R. A. et al. Detecção do vírus da Artrite Encefalite Caprina por
345 *nested*PCR e *nested*QPCR em ovócitos e fluído uterino. *Arquivo do Instituto biológico, São*
346 *Paulo*, v.80, n.4, p.381-386, 2013.
- 347
- 348 DAWSON, M. The caprine arthritis encephalitis syndrome. *Veterinary Annual*. v. 29, p. 98–
349 102, 1989.
- 350
- 351 DE SOUZA, K. C. et al. Detecção de sequências do DNA proviral do vírus da Artrite
352 Encefalite Caprina em saliva. *Acta Scientiae Veterinariae*, v.43, p.1266, 2015.
- 353
- 354 EAST, N. E. et al. Modes of transmission of caprine arthritis-encephalitis virus infection.
355 *Small Ruminant Research*, v. 10, p. 251-262, 1993.
- 356
- 357 EXTRAMIANA, A. B. et al. Evaluation of a PCR technique for the detection of Maedi-Visna
358 proviral DNA in blood, milk and tissue samples of naturally infected sheep. *Small Ruminant*
359 *Research*, v. 44, p. 109–118, 2002.
- 360
- 361 FROTA, M. N. L. et al. Artrite-Encefalite Caprina em cabritos de renbanhos com programas
362 de controle no estado do Ceará. *Arquivos do Instituto Biológico, São Paulo*, v. 72, n.2, p.147-
363 152, 2005.
- 364
- 365 GHANEM, Y.M. et al. Prevalence and risk factors of Caprine Arthrotis-Encephalitis virus
366 infection (CAEV) in Northern Somalia. *Small Ruminane Research*, v.85, p.142-148, 2009.
- 367
- 368 GRIMBERG, J. et al. A simple and eficiente non-organic procedure for the isolation of
369 genomic DNA from blood. *Nucleic Acids Research*, v. 17, n. 20, p. 8390, 1989.
- 370
- 371 GUFLE, H. et al. Serological study of small ruminant lentivirus in goats in Italy. *Small*
372 *Ruminant Research*, v. 73, n. 1, p. 169-173, 2007.
- 373

- 374 HEATON, M. P. M. et al. Reduced lentivirus susceptibility in sheep with TMEM154
375 mutations. *PLoS Genetics*, v. 8, p. 1-12, 2012.
376
- 377 HERRMANN-HOESING, L.; PALMER, G.; KNOWLES, D. Evidence of proviral clearance
378 following postpartum transmission of an ovine lentivirus. *Virology*, v. 362, n. 1, p. 226–234,
379 2007.
380
- 381 HIRSH, D. C.; ZEE, Y. C. 2003. *Microbiologia Veterinária*. 1. ed.: Rio de Janeiro, Guanabara
382 Koogan, 446p.
383
- 384 International Committee on Taxonomy of Viruses, 2017. Disponível em:
385 <<http://ictvonline.org/virusTaxonomy.asp>>. Acesso em: 16 janeiro de 2019.
386
- 387 JARCZAK, J. et al. Impaired Expression of Cytokines as a Result of Viral Infections with an
388 Emphasis on Small Ruminant Lentivirus Infection in Goats. *Viruses*, v. 8, 186, p. 1-12, 2016.
389
- 390 JOAG, S. V.; STEPHENS, E. B.; NARAYAN, O. Lentiviruses. In: FIELDS, M. D.; KNIPE,
391 D. M. 1996. *Fields Virology*. 3 ed. Nova York, Raven Press, 2501p.
- 392 JOHNSON, L.K.; MEYER, A.L.; ZINK, M.C. Detection of ovine lentivirus in seronegative
393 sheep by in situ hybridization, PCR, and cocultivation with susceptible cells. *Clinical*
394 *Immunology and Immunopathology*. v. 65, p. 254–260, 1992.
395
- 396 JUSTE, R. A.; KWANG, J.; DE LA CONCHA-BERMEJILLO, A. Dynamics of cell-
397 associated viremia and antibody response during the early phase of lentivirus infection in
398 sheep. *American Journal of Veterinary Research*, v. 59, p. 563–568, 1998.
399
- 400 KABA, J. et al. Twelve-year cohort study on the influence of caprine arthritis-encephalitis
401 virus infection on milk yield and composition. *Journal of Dairy Science*, v. 95, n. 4, p. 1617–
402 1622. 2012.
403
- 404 KARANIKOLAOU, K. et al. Detection of small ruminant lentiviruses by PCR and serology
405 tests in field samples of animals from Greece. *Small Ruminant Research*, v.58, p.181-187,
406 2005.
407

- 408 KONISHI, M.; et al. Combined eradication strategy for CAE in a dairy goat farm in Japan.
409 *Small Rum.Research*, v.99, p.65-71, 2011.
410
- 411 LARA, M. C. C. S. H. Artrite-Encefalite dos Caprinos (CAE). 2008. Artigo em Hypertexto.
412 Disponível em: <http://www.infobibos.com/Artigos/2008_4/artrite/index.htm>. Acesso em:
413 16 Fev. 2015.
414
- 415 MCNEILLY, T. et al. Role of alveolar macrophages in respiratory transmission of
416 visna/maedi virus. *Journal Virology*, v, 82, n. 3, p. 1526–1536. 2008.
417
- 418 PÉREZ, M. et al. Successful Visna/maedi control in a highly infected ovine dairy flock using
419 serologic segregation and management strategies. *Preventive Veterinary Medicine*, v.112,
420 p.423- 427, 2013.
421
- 422 PETERHANS, E. et al. Routes of transmission and consequences of small ruminant
423 lentiviruses (SRLVs) infection and eradication schemes. *Veterinary Research*, v.35, n.3,
424 p.257-274, 2004.
425
- 426 PINHEIRO, R. R. et al. Lentiviroses em Pequenos Ruminantes: Principais Métodos de
427 Diagnóstico. *Série Documentos da Embrapa Caprinos e Ovinos*, Sobral, v. 107, 42p., 2012.
428
- 429 PINHEIRO, R. R. et al. Viroses de pequenos ruminantes. *Série Documentos da Embrapa*
430 *Caprinos*, Sobral, v. 46, 30p., 2003.
431
- 432 PINHEIRO, R.R. et al. Protocolo de immunoblotting para diagnóstico da Artrite-Encefalite
433 Caprina. *Embrapa Caprinos e Ovinos*, Ceará, Brasil, Comunicado Técnico 122, 4 p., 2011.
434
- 435 RIMSTAD, E. et al. Delayed seroconversion following naturally acquired caprine arthritis-
436 encephalitis virus infection in goats. *American Journal of Veterinary Research*, v. 54, p.1858–
437 1862, 1993.
438
- 439 RODRIGUES, A. S. et al. Avaliação de um controle estratégico da artrite encefalite caprina
440 em rebanho caprino leiteiro. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*, v.70,
441 n.1, p.139-146, 2018.

- 442
443 ROWE, J. D. et al. Risk factors associated with the incidence of seroconversion to caprine
444 arthritis-encephalitis virus in goats on California dairies. *American Journal of Veterinary*
445 *Research*, v.53, p. 2396–2403, 1992.
- 446
447 SOUZA, T. S. Transmissão interespecies de lentivírus de caprinos para ovinos. 2014. 123p.
448 Tese (Doutorado em Ciência Animal nos Trópicos) – Programa de Pós-graduação em Ciência
449 Animal nos Trópicos, Universidade Federal da Bahia, Salvador.
- 450
451 TAVELLA, A. et al. Achievements of an eradication programme against caprine arthritis
452 encephalitis virus in South Tyrol, Italy. *Veterinary Record*, v. 182, p. 1-5. 2018.
- 453
454 VALAS, S. et al. Variability and immunogenicity of caprine arthritis-encephalitis virus
455 surface glycoprotein. *Journal of Virology*, v.74, n.13, p.6178–6185, 2000.
- 456
457 VILLORIA, M. et al. Detection of small ruminant lentivirus in environmental samples of air
458 and water. *Small Ruminant Research*, v. 110, p. 155–160, 2013.
- 459
460 WAGTER, L. H. A. et al. PCR detection of lentiviral gag segment DNA in the white blood
461 cells of sheep and goats. *Veterinary Research Communication*, v.22, p.355-362, 1998.
- 462
463 WHITE, D. et al. Recommendations for pen-based oral-fluid collection in growing pigs.
464 *Journal Swine Health Production*, v.22, n.3, p.138–141, 2014.
- 465
466 WHITE, S. N.; KNOWLES, D. P. Expanding possibilities for intervention against small
467 ruminant lentiviruses through genetic marker-assisted selective breeding. *Viruses*, v. 5, p.
468 1466–1499, 2013.
- 469
470 ZANONI, R. G. et al. Genomic heterogeneity of small ruminant lentiviruses detected by PCR.
471 *Veterinary Microbiology*, v. 33, p. 341-351, 1992.
- 472
473 ZANONI, R. G. et al. PCR for the detection of lentiviruses from small ruminants. *Schweiz*
474 *Arch Tierheilkd Journal*, v. 138, p. 93–98, 1996.
- 475

- 476 ZANONI, R.; PAULI, U.; PETERHANS, E. Detection of caprine arthritis-encephalitis- and
477 maedi-visna viruses using the polymerase chain reaction. *Experientia*, v. 46, p. 316–319,
478 1990.
- 479
- 480 ZHANG, Z. et al. Quantitative analysis of maedi-visna virus DNA load in peripheral blood
481 monocytes and alveolar macrophages. *Journal Virology Methods*, v. 86, p.13–20, 2000.

1 **4 ARTIGO 2²**2 **DINÂMICA DO DIAGNÓSTICO IMUNOMOLECULAR DE ANIMAIS COM**
3 **INFECCÃO PELO LENTIVÍRUS CAPRINO**4 **Resumo**

5 A Artrite Encefalite Caprina (AEC) é enfermidade crônica, incurável, de alta prevalência
6 em rebanhos leiteiros nacionais e associada a perdas econômicas. Ela é causada pelo
7 Lentivírus Caprino (LVC), pertencente à família *Retroviridae*. Nesse estudo objetivou-se
8 acompanhar a dinâmica de anticorpos anti-LVC e a presença do DNA próviral, em
9 cabritos positivos no teste de PCR *nested* imediatamente após o nascimento, durante 24
10 meses. Os animais foram acompanhados do momento do nascimento, e mensalmente, até
11 os 24 meses, pelos testes Western Blotting (WB) e PCR *nested*. Foram realizados 624
12 testes para cada uma das técnicas, totalizando 1.248 exames. No teste de PCR *nested*, 360
13 (57,7%) apresentaram resultados positivos. Já no WB apenas 9 (1,4%) dos exames foram
14 reativos. Das amostras positivas no WB, quatro foram detectadas aos 15 dias, duas aos
15 270 dias e apenas uma aos 240, 600 e 690 dias. Em conclusão, os resultados
16 demonstraram que o controle efetivo da AEC requer a associação de diferentes técnicas
17 diagnósticas (molecular e sorológica), para identificação de animais que não estão
18 respondendo imunologicamente, além da realização de inquéritos de forma periódica e
19 contínua. São necessários mais estudos sobre a patogenia do LVC em crias e a sua
20 dinâmica de transmissão intrauterina.

21
22 **Palavras-chave:** Artrite Encefalite Caprina, transmissão vertical, Western Blotting,
23 PCR.

24 **Abstract**

25 Caprine Arthritis Encephalitis (AEC) is a chronic, incurable disease of high prevalence
26 in national dairy herds and associated with economic losses. It is caused by Goat
27 Lentivirus (LVC), belonging to the family *Retroviridae*. The objective of this study was
28 to monitor the dynamics of anti-LVC antibodies and the presence of prokaryotic DNA in
29 goats positive in the *nested* PCR test immediately after birth for 24 months. The animals
30 were followed at birth and monthly up to 24 months by Western Blotting (WB) and *nested*
31 PCR. A total of 624 tests were performed for each technique, totaling 1,248 tests. In the
32 *nested* PCR test, 360 (57.7%) presented positive results. In WB, only 9 (1.4%) of the
33 exams were reactive. Of the WB positive samples, four were detected at 15 days, two at
34 270 days and only one at 240, 600 and 690 days. In conclusion, the results demonstrated
35 that the effective control of the AEC requires the association of different diagnostic
36 techniques (molecular and serological), to identify animals that are not responding

² Artigo elaborado conforme as normas do periódico *Brazilian Journal of Microbiology* (ISSN 1517-8382, versão impressa, ISSN 1678-4405, versão online).

37 immunologically, and to conduct surveys on a regular and continuous basis. Further
38 studies on the pathogenesis of LVC in calves and their dynamics of intrauterine
39 transmission are needed.

40 **Keywords:** Caprine Arthritis Encephalitis, Vertical Transmission, Western Blotting,
41 PCR.

42 **Introdução**

43 O Lentivírus Caprino (LVC) é o agente etiológico da Artrite Encefalite Caprina
44 (AEC), enfermidade crônica, incurável, de alta prevalência em rebanhos leiteiros
45 nacionais e associada a perdas econômicas. O vírus da AEC ao entrar em um rebanho,
46 pode demorar meses a anos para o desenvolvimento clínico da doença, o que favorece a
47 sua disseminação (Andrioli *et al.*, 2006a; De Andres *et al.*, 2005).

48 Pinheiro *et al.* (2012), demonstraram que indiferente de raça, sexo e idade, os
49 caprinos estão sujeitos à infecção pela AEC, no entanto Larruskain e Jugo (2013)
50 relataram que fatores do hospedeiro, como a raça, o fenótipo e o genótipo, associados à
51 cepa dos Lentivírus de Pequenos Ruminantes (LV), podem ter relação direta na
52 resistência do hospedeiro aos sinais clínicos da doença. A observação de doenças
53 retrovirais em várias espécies mostrou que, mesmo em uma população infectada por uma
54 determinada cepa de vírus, há diferenças no resultado individual do processo infeccioso
55 e/ou da doença nos animais (Maclachlan, 2011).

56 Infecções por LV são difíceis de controlar devido à capacidade do vírus de se
57 integrar ao genoma do hospedeiro, induzir infecções persistentes e evitar a neutralização
58 viral (Zahno e Bertoni, 2018; Patel *et al.*, 2012; Leroux e Mornex, 2008; Brodie *et al.*,
59 1992). O controle da AEC depende da prevenção da transmissão, principalmente através
60 do colostro e do leite, da sensibilidade e especificidade dos testes de diagnóstico, do
61 intervalo e frequência do monitoramento sorológico e do sacrifício de animais infectados

62 (Almeida *et al.*, 2003; Berriatua *et al.*, 2003; Cruz *et al.*, 2003; Lima *et al.*, 2013; Pinheiro
63 *et al.*, 2010; Reina *et al.*, 2009).

64 A técnica de Reação em Cadeia de Polimerase (PCR) é um teste sensível de grande
65 eficácia, que já vem sendo utilizado para diagnosticar a infecção pelo LVC há mais de
66 vinte anos (Herrmann-Hoesing, 2010). Várias técnicas de PCR com alta precisão para
67 detecção da AEC foram recentemente desenvolvidas, porém nenhuma delas, até agora,
68 tem sido disponibilizada para uso comercial e, dificilmente permanecem em uso na
69 prática veterinária de rotina, devido a falta de laboratórios equipados, pessoal qualificado
70 e aos custos elevados (De Regge e Cay, 2013; Kuhar *et al.*, 2013).

71 Os testes sorológicos de diagnóstico da AEC, por possuírem custo menos
72 elevados, vêm sendo mais utilizados. Apesar de ser possível a detecção de anticorpos para
73 várias proteínas do LVC, esses testes apresentam problemas como a soroconversão tardia
74 (Rimstad *et al.*, 1983), inconsistência dos níveis de anticorpos em cabras soropositivas
75 cronicamente infectadas (Hanson *et al.*, 1996) e a diversidade genética do vírus
76 (Lacerenza *et al.*, 2006). Dentre os testes sorológicos, o *Western Blotting* (WB)
77 caracteriza-se por ter melhor sensibilidade quando comparado principalmente com a
78 Imunodifusão em Gel de Agarose (IDGA) e com o Ensaio Imunoenzimático (ELISA)
79 (Konishi *et al.*, 2011; Pinheiro, *et al.*, 2012). Para um diagnóstico mais seguro das
80 Lentivirose de Pequenos Ruminantes (LVPR) é necessário que sejam empregados testes
81 sorológicos sensíveis, como o ELISA ou o WB, combinado com técnicas moleculares
82 diretas, como a Reação em Cadeia de Polimerase (PCR) (Rodrigues *et al.*, 2018).

83 Nesse estudo, objetivou-se acompanhar a dinâmica de anticorpos anti-CAEV pelo
84 teste de WB, e a presença do DNA próviral, através da realização de PCR *nested*, em

85 cabritos positivos no teste de PCR *nested* imediatamente após o nascimento, durante 24
86 meses.

87 **Material e métodos**

88 **Local, animais e amostras**

89 Este estudo foi desenvolvido na Embrapa Caprinos e Ovinos, localizada no
90 município de Sobral, região semiárida do sertão Cearense, a 3° 42' de latitude Sul e 40°
91 21' de longitude Oeste, a uma altitude de 83 metros. No rebanho experimental é adotado
92 o programa de controle da AEC há mais de 20 anos, onde inicialmente era realizado o
93 teste de IDGA e abate dos animais positivos (EMBRAPA, 1996).

94 Atualmente são realizados os testes ELISA e WB a cada quatro meses. A partir
95 do diagnóstico os animais são separados em grupos de soropositivos e soronegativos, em
96 locais específicos e distantes entre si.. As cabras são divididas em grupos distintos de
97 forma a ocorrer três estações de parição no rebanho anualmente, para não haver
98 intermitência na produção de leite. O sistema de acasalamento utilizado é a monta natural
99 controlada, sendo que cabras soronegativas são cobertas por reprodutores soronegativos
100 e cabras soropositivas por reprodutores soropositivos. O diagnóstico de gestação é
101 realizado por ultrassonografia aos 45 dias após a monta. As crias de ambos os grupos são
102 separadas imediatamente após o parto e é fornecido colostro termizado (56°C por uma
103 hora) de cabras soronegativas e leite de vaca (Rodrigues *et al.*, 2018).

104 Para o desenvolvimento deste experimento, foram utilizados 24 animais de ambos
105 os sexos, das raças Anglo Nubiana e Saanen, nascidos no setor Leiteiro da Embrapa
106 Caprinos e Ovinos, em setembro de 2015, que apresentaram resultado positivo para AEC
107 no teste de PCR *nested* no momento do nascimento. As análises de PCR *nested* e WB

108 foram realizadas nas amostras de sangue coletadas no momento do nascimento, aos 15
109 dias de vida, e, mensalmente, até os 24 meses.

110 **Aspectos éticos**

111 Os procedimentos de manejo e da realização de coleta de sangue, já praticados
112 rotineiramente na Embrapa Caprinos e Ovinos, foram submetidos à Comissão de Ética
113 no Uso de Animais (CEUA) da Embrapa e aprovado sob número 13/2015 (Anexo 2).

114 **Extração de DNA**

115 As amostras de sangue com anticoagulante foram centrifugadas a 1500g, para
116 obtenção das camadas de leucócitos que foram tratadas com cloreto de amônio, segundo
117 metodologia de Karanikolaou *et al.* (2005).

118 A extração de DNA realizou-se através da metodologia de Grimberg *et al.* (1989),
119 a partir dos leucócitos. A quantificação e avaliação da qualidade do DNA extraído foi
120 realizada por leitura da espectrofotometria a 260 e 280 nm. Na sequência as amostras
121 foram armazenadas a -20°C até o momento da realização do teste de PCR *nested*.

122 **Testes de diagnósticos**

123 ***Reação em Cadeia de Polimerase (PCR) nested***

124 Os iniciadores desenhados: CAEV1 =
125 5'CAAGCAGCAGGAGGGAGAAGCTG3'; CAEV2 =
126 5'TCCTACCCCATAATTTGATCCAC3. (posição genômica 1249 – 1226) descritos
127 por Barlough *et al.* (1994), resultaram na amplificação de um fragmento de DNA de
128 296pb. O produto desta amplificação foi então re-amplificado com iniciadores internos
129 CAEV3 = 5'GTTCCAGCAACTCGAA ACAGTAGCAA TG-3' (posição genômica 997
130 – 1024) e CAEV4 = 5'ACCTT TCTGCTTCTTCATTTAATTTCCC 3' (posição

131 genômica 1181 – 1154), afim de obter-se um fragmento alvo final de 185pb (Rimstad *et*
132 *al.*, 1993). As reações de PCR foram realizadas em volume total de 50µL, contendo
133 10mM de Tris-HCl (pH 8,0), 50mM de KCl, 1,5mM de MgCl₂, 100µM de cada dNTP
134 (dATP, dGTP, dCTP, dTTP), 20pmoles de cada iniciador, 2,0 U Taq DNA polimerase e
135 3 µL do DNA molde. Os ciclos foram constituídos de uma desnaturação inicial a 94°C
136 por 5min e 35 ciclos com desnaturação a 94°C por 5min, hibridização a 63°C por 1min e
137 extensão a 72°C, por 45 segundos, e uma extensão final de 72°C por 7min (Andrioli *et*
138 *al.*, 2006b).

139 Para leitura dos resultados, realizou-se eletroforese em gel de agarose 2% corado
140 com brometo de etídio. Em todas as corridas foram utilizados controles negativos (células
141 de membrana sinovial caprina - MSC não infectadas), controle positivo (células de MSC
142 infectadas) e controle de reagentes (H₂O bidestilada, autoclavada, livre de DNase)
143 (Andrioli *et al.*, 2006b). As amostras amplificadas por PCR foram purificadas após
144 eletroforese em gel de agarose de baixo ponto de fusão ("*low melting point*") a 1%, por
145 meio do kit de extração, conforme instruções do fabricante.

146 *Sequenciamento*

147 Com o objetivo de confirmar a infecção pelo LVC, os produtos de amplificação
148 por PCR *nested* de amostras de sangue dos cabritos foram sequenciados na plataforma
149 Applied Biosystems® 3500 Genetic Analyzer. As sequências obtidas foram alinhadas
150 com as seqüências BR / CNPC-G1, BR / CNPC-G2, BR / CNPC-G3, BR / CNPC-G4 e
151 CAEV-Cork (disponíveis no GenBank, numeradas em EU300976, EU300977,
152 EU300978, EU300979 e M33677, respectivamente), usando o algoritmo Clustal W
153 (Thompson *et al.*, 1994), a partir do BioEdit Sequence Alignment Editor® (Hall, 1999).

154 **Western Blotting (WB)**

155 O teste de WB seguiu o protocolo de Pinheiro *et al.* (2011). Realizando-se
156 eletroforese SDS-PAGE com géis de concentração e separação a 4% e 12,5%,
157 respectivamente. Em seguida, ocorreu a transferência passiva das proteínas contidas no
158 gel para membrana de nitrocelulose (Protan® - 0,45µm – Amersham. Cat N° 10600002).
159 A membrana foi previamente bloqueada com PBS Tween a 0,3%. O imunodiagnóstico
160 foi realizado com diluições de soro de 1:50 e conjugado *rabbit anti-goat* IgG peroxidase
161 (Sigma® Cat. A5420) de 1:15000. A revelação das bandas de proteína ocorreu ao abrigo
162 da luz, com os substratos 4-Cloro-1-Naphthol e 3,3' Diaminobenzidine (DAB), com H₂O₂
163 a 30% e a reação inibida com adição de água destilada.

164 **Análise estatística**

165 Todos os dados foram tabulados no programa Microsoft Excel® e utilizou-se a
166 estatística descritiva para analisar os dados.

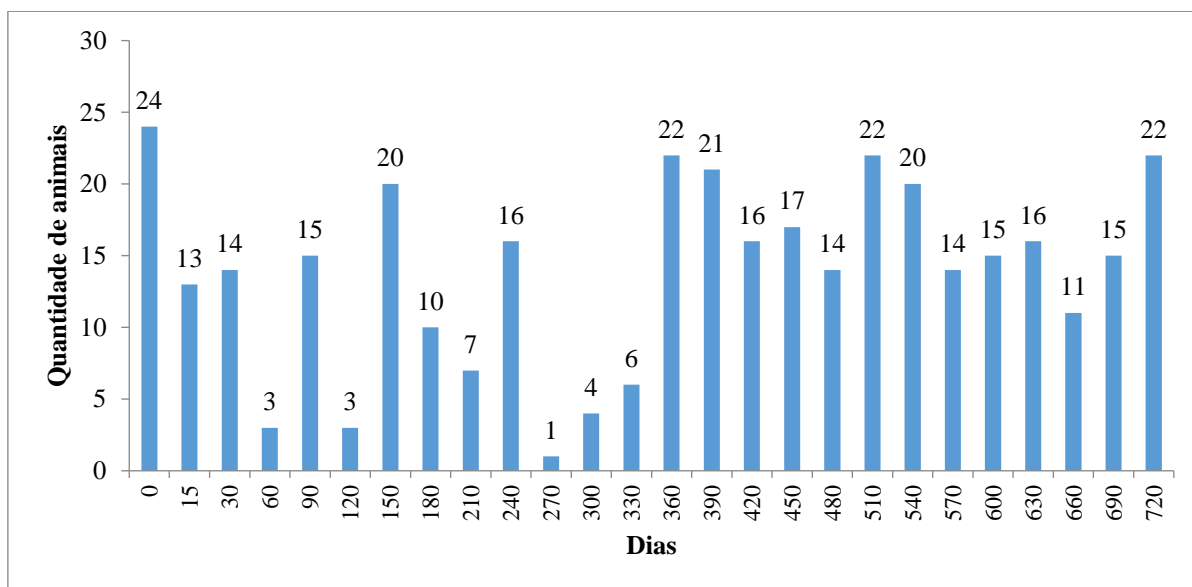
167 **Resultados**

168 Foram realizados 1.248 testes de diagnóstico, sendo 624 de WB e 624 de PCR.
169 Dos testes de PCR *nested*, 360 (57,7%) foram positivos, enquanto apenas nove (1,4%)
170 apresentaram sororreação no WB.

171 Embora todos os 24 animais obtiveram diagnóstico positivo ao nascimento no
172 PCR *nested*, houve uma intermitência nos resultados ao longo do estudo, sendo que o
173 percentual máximo de positividade de 91,7% (22 animais), ocorreu em três momentos
174 diferentes (nos testes das amostras de 360, 510 e 720 dias), todos já no segundo ano de

175 vida dos animais. O percentual mínimo de detecção de amostras positivas foi de 4,2% (1
176 amostra) aos 270 dias (Figura 1).

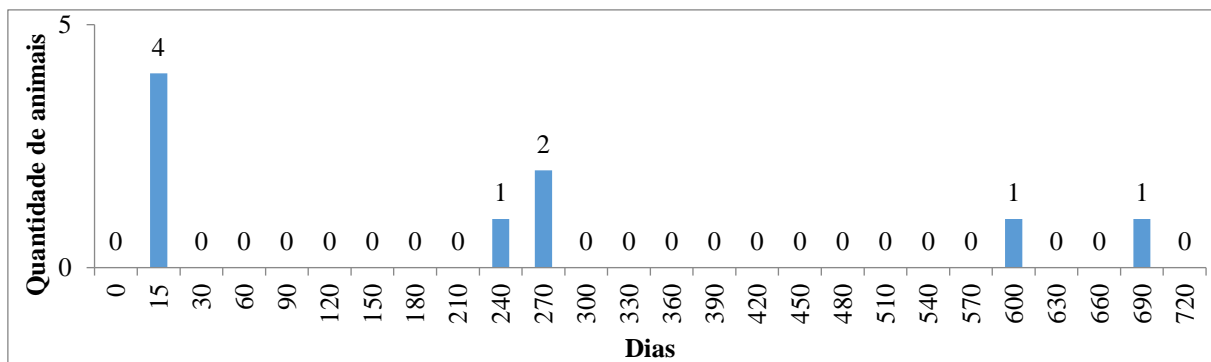
177 Ao dividirmos o experimento em duas etapas, sendo a primeira dos 15 dias até os
178 360 dias (neste caso excluimos o momento zero pois os animais foram selecionados com
179 base na positividade ao PCR *nested*) e a segunda dos 360 aos 720 dias, a média de
180 positividade do PCR *nested* foi de 42,9% no primeiro ano enquanto que no segundo ano
181 de vida foi de 70,4% (Figura 1).



182

Figura 1 Quantitativo dos resultados positivos dos testes de PCR *nested* nos 26 momentos

183 No WB, a capacidade máxima de detecção de animais positivos deu-se aos 15
184 dias, com 16,7% (4 amostras) das amostras testadas (Figura 2). O animal de número
185 15126, positivo aos 690 dias, foi o único animal que positivou duas vezes por esta técnica,
186 tendo seu primeiro resultado positivo aos 15 de idade. Ao contrário do que aconteceu no
187 PCR *nested*, na primeira fase (primeiro ano) do experimento o WB obteve uma melhor
188 detecção de positividade quando comparado a segunda fase (segundo ano de vida).



189

Figura 2 Quantitativo dos resultados positivos dos testes de *Western Blotting* nos 26 momentos

190

191

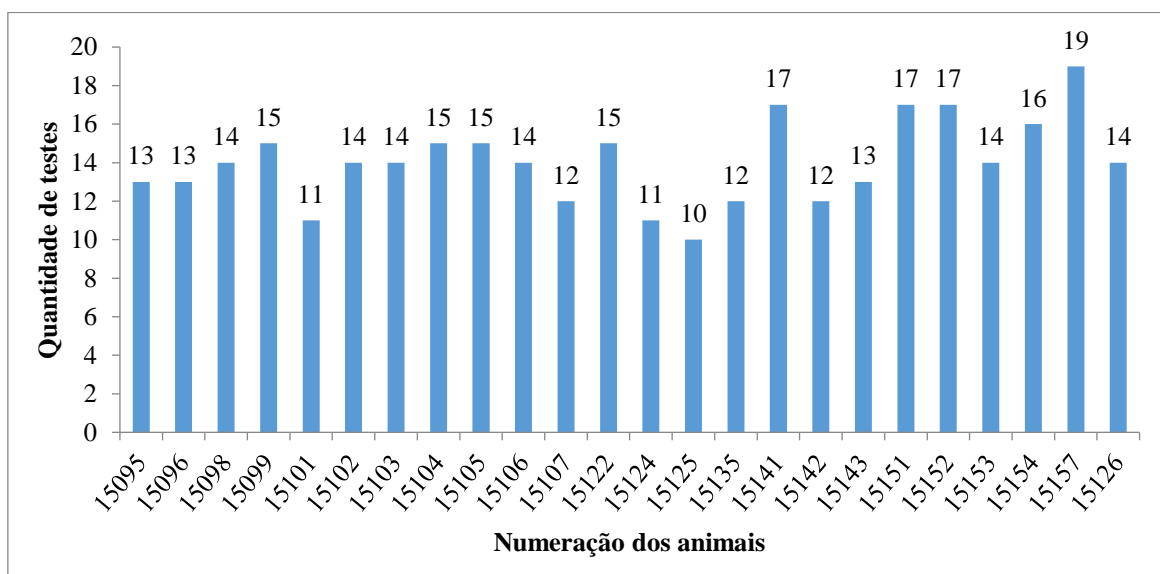
192

193

194

195

Na avaliação dos resultados, obteve-se também a quantidade de resultados positivos de cada animal em cada um dos testes. O animal com numeração 15157 foi o que mais apresentou-se positivo no PCR *nested*, com 19 (73,1%) resultados, seguidos pelos animais de numeração 15141, 15151 e 15152, com 17 (65,4%) resultados positivos cada um. O animal com menos resultados positivos no PCR *nested* foi o 15125, com 10 (38,5%) (Figura 3).



196

Figura 3 Demonstrativo de resultados positivos individuais no teste de PCR *nested*

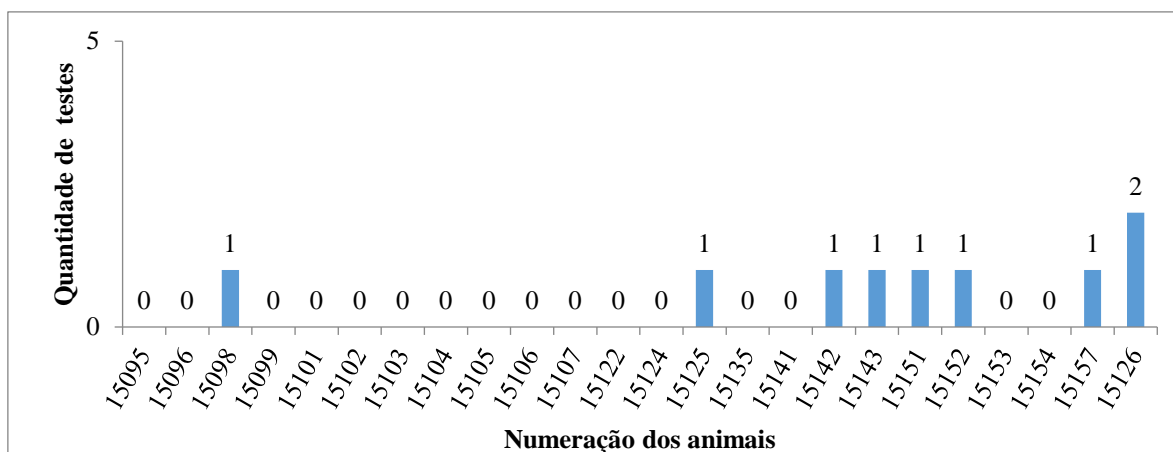
197

198

199

200

No WB apenas oito animais dos 24 testados, foram detectados como positivos, sendo que o animal de numeração 15126, foi o único que foi diagnosticado por duas vezes (7,7%) no referido teste, totalizando apenas 9 (1,46%) amostras positivas de 624 realizadas durante todo o período de estudo (Figura 4).



201

Figura 4 Demonstrativo de resultados positivos individuais no teste de *Western Blotting*

202

Sequências obtidas de produtos amplificados por PCR de amostras de sangue

203

coletadas dos animais, imediatamente após o parto, mostraram que estes adquiriram vírus

204

altamente relacionados com o protótipo caprino lentiviral CAEV-Cork e cepas locais

205

como BR / CNPC (BR / CNPC-G1, BR / CNPC-G2, BR / CNPC- G3 e BR / CNPC-G4).

206

Estas sequências BR / CNPC representam a estirpe viral circulante no rebanho caprino

207

utilizado, conforme descrito por Feitosa *et al.* (2010).

208

Discussão

209

A presença do DNA proviral e anticorpos contra o CAEV em caprinos jovens,

210

diagnosticados como positivos no momento do nascimento, demonstrou que em apenas

211

oito, dos 24 animais testados por 24 meses, foram detectados anticorpos. Este

212

comportamento pode ser explicado, em parte, pela intermitência da resposta imunológica,

213

que apresenta níveis variáveis de anticorpos em animais sabidamente positivos e que pode

214

ocorrer ao longo de semanas, meses e até anos (Rowe *et al.*, 1992; Rimstad *et al.*, 1993;

215

Preziuso *et al.*, 2003). A ausência de soroconversão ou soroconversão tardia de um animal

216

infectado com a AEC está relacionada com a patogenicidade da doença, que envolve a

217

restrição da replicação e a latência viral na forma de DNA pró-viral integrado ao genoma

218 celular de monócitos ou em suas células progenitoras na medula óssea (Blacklaws, 2012).
219 Assim, o vírus permanece camuflado (Blacklaws, 2012) e a infecção persiste sem a
220 ativação do sistema imunológico (Brellou *et al.*, 2007; Ravazzolo *et al.*, 2006). Alguns
221 autores sugerem a possibilidade de ocorrência de aquisição transitória de vírus devido a
222 determinantes virais e imunológicos desconhecidos que podem levar à não persistência
223 da infecção. Neste caso, ao longo do tempo, os animais não apresentam resultados
224 positivos em testes de diagnóstico, seja molecular (PCR) ou sorológicos (Herrman-
225 Hoelsing *et al.*, 2007).

226 Deve-se, também, levar em conta que, muito provavelmente, a retirada dos
227 animais que expressavam anticorpos contra as proteínas dos LV, ao longo de mais de 20
228 anos de controle, tenha produzido um efeito de seleção sobre o rebanho caprino, o que
229 pode explicar o número reduzido de resultados WB positivo. Pinheiro *et al.* (2010)
230 salientaram a importância da alternância dos kits de diagnóstico com proteínas virais
231 diferentes nos programas de controle da Artrite Encefalite Caprina. Estes autores
232 verificaram que em um rebanho submetido ao controle utilizando um teste de diagnóstico
233 com um antígeno, que contenha uma proteína específica, com o tempo ele perde a
234 capacidade de detecção em virtude da retirada de todos os animais infectados que
235 expressam anticorpos para aquela proteína.

236 Outra explicação para que 66,7% dos animais não tenham soroconvertido durante
237 o experimento, seria uma possível imunotolerância fetal, isto é, o vírus infectou os
238 animais antes do desenvolvimento da competência imunológica, o que pode resultar na
239 geração de animais que apresentam a infecção persistente pelo LVC sem estímulo
240 imunológico detectável. Caso a contaminação do feto ocorra quando o sistema
241 imunológico é imaturo, as proteínas virais são reconhecidas erroneamente como próprias

242 do indivíduo (*self*), o que torna o animal imunologicamente tolerante ao LVC. Este
243 problema ocorre com outros vírus como, por exemplo, o vírus da diarreia viral bovina
244 (Brock, 2003; Liebler-Tenorio, 2005).

245 O fato de animais recém-nascidos, separados imediatamente da mãe após o
246 nascimento e provenientes de cabras sorologicamente positivas para o LVC, positivarem
247 em teste molecular para AEC, sugere que estes foram infectados no ambiente uterino.
248 Reforçando esta ocorrência, Rodrigues *et al.* (2017), através do WB, detectaram quatro
249 descendentes de animais soropositivos (1,4% - 4/283), dos quais três nasceram de cabras
250 soropositivas e um de cabra soronegativa. Todos foram de imediato separados da mãe ao
251 nascer, indicando que, apesar de baixa frequência (1,4%), existe a possibilidade de
252 transmissão via transplacentária do LVC. Alvarez *et al.* (2005) estudaram a transmissão
253 do vírus Maedi-Visna através do colostro de ovelhas infectadas e verificaram que uma
254 das crias, que foi separada imediatamente após o nascimento, e portanto, antes da ingestão
255 de colostro, foi soropositiva no teste ELISA comercial. Além desses achados, Andrioli *et*
256 *al.* (2002) e Cavalcante *et al.* (2013) relatam que não existe certeza de que o LVC possa
257 passar para o feto via placenta, entretanto foi detectada a presença desse vírus no trato
258 reprodutivo feminino.

259 Pesquisas recentes, concordantes com esse estudo, relatam positividade de
260 cabritos jovens em teste molecular (PCR *nested*), sem, no entanto, expressarem o mesmo
261 resultado em testes sorológicos (ELISA e IDGA) (Hasegawa *et al.*, 2017). Apesar disso,
262 segundo Barquero *et al.* (2011), animais com esse histórico não devem ser considerados
263 falsos positivos, pois é relatada soroconversão tardia. Em um programa de controle da
264 AEC, utilizando a segregação entre animais positivos e negativos baseado nos testes
265 sorológicos (IDGA, ELISA e WB), após oito coletas quadrimestrais, Rodrigues *et al.*

266 (2018), conseguiram alcançar, na última coleta, níveis baixos de soropositividade (0,9%)
267 para AEC. Entretanto, ao realizarem um teste molecular (PCR), constataram um nível
268 significativo de animais positivos (10,8%) quando comparado a condição de positividade
269 indicado pelo WB (0,9%).

270 Os animais desta pesquisa, PCR *nested* positivos ao nascimento, demonstraram
271 variações nos resultados do teste molecular ao longo do estudo, exibindo também
272 respostas negativas. Estes resultados, não devem ser interpretados como falsos positivos,
273 pois já foi observada intermitência da presença do DNA pró-viral tanto no sangue como
274 no sêmen de reprodutores caprinos (Andrioli *et al.*, 2006a; Peterson *et al.*, 2008; Minardi,
275 2009). Alvarez *et al.* (2006) realizaram um teste de PCR em cordeiros de progenitoras
276 soropositivas ao vírus Maedi-Visna e constataram que 13 dos 204 cordeiros (6,4%)
277 nasceram positivos. Além disso, oito destes foram positivos apenas na coleta realizada no
278 momento do nascimento, depois negativos em todos os demais períodos (15, 30, 90, 180
279 e 300 dias). Em outras pesquisas, a técnica de PCR *nested*, apresentou-se com baixa
280 porcentagem de positivos (Gonzales *et al.*, 2013), baixa sensibilidade (Andrés *et al.*,
281 2005) e falsos positivos (Brinkhof *et al.*, 2008; Brinkhof *et al.*, 2010, Barquero *et al.*,
282 2011). Entretanto, a PCR *nested* apresenta relevância na identificação de animais
283 infectados e não detectados em testes sorológicos, o que pode ocorrer no caso de
284 soroconversão tardia ou na fase inicial da infecção, situações nas quais essa técnica
285 apresenta maior sensibilidade (Frota *et al.*, 2005; Tigre *et al.*, 2006; Souza, 2010).

286 Outra forte justificativa para a intermitência dos resultados positivos no teste de
287 PCR *nested* pode estar relacionada à compartimentalização viral do CAEV. A
288 compartimentalização de *quasispecies* de Lentivírus de Pequenos Ruminates é
289 determinada como a distinção genética de isolados de LV em tecidos de diferentes

290 animais, correspondendo a subpopulações virais no mesmo indivíduo (Ramirez *et al.*,
291 2012). Assim sendo, o vírus pode permanecer em um órgão ou órgãos específicos e não
292 na corrente sanguínea. Caso este demonstrado por Cavalcante *et al.* (2013), onde
293 relataram que três cabras infectadas experimentalmente e positivas sorologicamente
294 (IDGA e WB), com 30 e 60 dias após a infecção, após decorridos 24 meses, foram
295 negativas em IDGA, ELISA, WB e PCR *nested* em amostras sanguíneas. Ainda assim,
296 esses mesmos animais foram positivos PCR *nested* e/ou reação da transcriptase reversa,
297 seguida de reação em cadeia da polimerase (RT-PCR), realizados em oócitos e/ou
298 amostras de fluidos uterinos, demonstrando que o vírus em algum momento pode ser
299 encontrado em órgãos, e não no sangue. Hasegawa *et al.* (2017), ao inseminar 11 cabras
300 com sêmen fresco contendo cepa CAEV-Cork, observou que todas permaneceram
301 negativas no PCR *nested* até 210 dias após a inseminação. Uma dessas cabras permaneceu
302 negativa em todos os testes realizados no experimento (IDGA, ELISA e PCR *nested*), no
303 entanto suas crias apresentaram-se positivas no ELISA e no PCR *nested* aos 15 e 30 dias
304 após o nascimento, o que reforça a hipótese de compartimentalização do vírus, neste caso
305 no sistema reprodutivo feminino.

306 Peixoto (2014), estudando a infecção de reprodutores pelo LVC, verificou uma
307 possível compartimentalização do vírus no sistema reprodutor masculino quando obteve
308 resultado positivo pelo teste de WB no plasma seminal de um animal que não coincidiu
309 com a detecção no soro sanguíneo. Fato similar ocorreu nos estudos de Ramírez *et al.*,
310 (2009), onde 16% de um total de 94 amostras foram reativas ao WB apenas no fluido
311 seminal. Diferentes padrões de compartimentalização podem ser explicados por
312 diferenças na susceptibilidade genética do hospedeiro; em características anatômicas; no
313 genoma do vírus infectante, bem como altas taxas de mutação e replicação. Assim, após

314 passar por uma seleção, o vírus modifica e compartimentaliza produzindo uma
315 *quasispecies*, podendo, após isso, atingir outros órgãos, através de células linfoides ou
316 sanguíneas (Domingo e Gomez, 2007; Lemey *et al.*, 2009).

317 Neste estudo nenhum dos animais apresentou resultado positivo ao teste de WB
318 no momento do nascimento, e durante o experimento detectou-se anticorpos em apenas
319 cinco momentos diferentes; 15 dias (4 amostras), 240 dias (1 amostra), 270 dias (2
320 amostras), 600 dias (1 amostra) e 690 dias (1 amostra) após o nascimento. Nos quatro
321 animais, aos 15 dias de idade, em que foram detectados anticorpos anti-LVC,
322 provavelmente estes foram oriundos do colostro termizado (56°C por 60 minutos), que
323 eram originários de cabras sorologicamente negativas, mas provenientes de um rebanho
324 positivo, sob um programa de controle. Segundo Souza *et al.* (2012), os anticorpos anti-
325 LVC presentes no colostro e ingeridos pelas crias são detectados pelo WB até 70 dias de
326 vida. Destes quatro sororreagentes, somente um apresentou WB positivo após a coleta de
327 15 dias. Então, provavelmente, apenas cinco animais dos oito soropositivos ao longo do
328 experimento soroconverteram.

329 Ainda analisando a coleta realizada no 15º dia de vida, treze amostras testadas
330 positivaram no teste de PCR *nested* e quatro no WB. Destas, três foram positivas nos dois
331 testes. As demais amostras da 15ª coleta (sendo 11 no teste de PCR *nested* e 20 no teste
332 de WB), foram negativas, apesar de no primeiro momento todas serem positivas no PCR
333 *nested*. Estes dados ratificam achados em estudos anteriores que demonstram interações
334 complexas entre retrovírus e seus hospedeiros. Os retrovírus são patógenos obrigatórios
335 que exigem que a estrutura celular do hospedeiro complete seu ciclo. Em resposta, os
336 hospedeiros desenvolveram mecanismos sofisticados para combater infecções virais,
337 incluindo o sistema imune inato e adaptativo (Bochud *et al.*, 2007; Abbas *et al.*, 2006). A

338 observação de doenças retrovirais em várias espécies mostrou que, mesmo em uma
339 população infectada por uma determinada cepa de vírus, geralmente há diferenças no
340 resultado da infecção e da doença, individualmente (Maclachlan *et al.*, 2011).

341 No PCR *nested*, em todos os momentos testados, houve taxas bem mais elevadas
342 de detecção de amostras positivas, tendo seu maior pico de positividade em três
343 momentos distintos, aos 360, 510 e 720 dias com 22 (91,6%) dos 24 animais positivos.
344 Rutkoski *et al.* (2001), obtiveram resultados contrastantes com este estudo, pois houve
345 maior proporção de detecção de animais infectados pelo LVC no IDGA, quando
346 comparado ao PCR. Estes autores, juntamente com Giammarioli *et al.* (2011) e Hasegawa
347 *et al.* (2017) relataram que os falso negativos são frequentes no diagnóstico viral e
348 poderiam estar relacionados ao alto número de variantes do CAEV em uma cabra
349 infectada.

350 O aumento do número de PCR positivo após o 10º mês pode estar associado à
351 maturidade sexual. É possível que exista uma correlação entre o aumento da liberação de
352 hormônios nesta fase com a presença do vírus no sangue. Observa-se que o principal
353 sintoma desta enfermidade é artrite e ela ocorre somente após o oitavo mês, na maturidade
354 sexual (Crawford *et al.*, 1980; Lara *et al.*, 2005).

355 No caso deste estudo, a contaminação intrauterina foi a forma de infecção mais
356 provável. O contágio pelo vírus da AEC no momento do parto, torna-se uma possibilidade
357 descartada, pois, sendo assim, não seria possível a detecção de animais positivos no teste
358 de PCR *nested*, imediatamente após o nascimento. A soroconversão geralmente não é
359 observada logo após o parto, devido à imaturidade do sistema imune, pois apesar deste já
360 estar montado e funcional no início da vida, ele não é competente, tornando-se mais apto
361 com o crescimento (Morein *et al.*, 2002) e/ou a imunotolerância fetal (Brock, 2003;

362 Liebler-Tenorio, 2005). A imunidade inata, encontra-se disponível desde cedo para
363 responder aos desafios imunitários que o neonato possa encontrar, mediante a produção
364 de uma série de substâncias antimicrobianas e a ação desenvolvida por uma resposta
365 humoral e celular. No entanto, este tipo de imunidade não se encontra na sua plena
366 atividade no período inicial da vida (Tizard, 2014). Para o reconhecimento,
367 processamento e exposição de antígenos, as células apresentadoras de antígenos,
368 principalmente as dendríticas, terão que desenvolver uma maior capacidade de expressão
369 de proteínas importantes para a ligação ao sistema imunitário adquirido, o que também
370 não se encontra em total maturidade neste período, tampouco na fase intrauterina (Morein
371 *et al.*, 2002). Em tempo, também ocorre uma imunossupressão transitória, tanto na mãe
372 como nos fetos, como resultado das altas concentrações circulantes de estrogênios e
373 cortisol no momento do parto. Na fase fetal, o sistema complemento não está totalmente
374 funcional o que resulta numa atividade de opsonização mais tênue. O mesmo acontece
375 com a capacidade dos macrófagos de inativarem os vírus que é gradualmente
376 desenvolvida após o nascimento. Todos esses fatores contribuem para impedir o controle
377 inicial da infecção e a produção de anticorpos (Chase *et al.*, 2008; Tizard, 2014).

378 O fato de, neste estudo, animais nascerem positivos na PCR *nested* e serem
379 sorologicamente negativos, coincide com os de Hasegawa *et al.* (2017) que, com uma
380 metodologia semelhante, utilizaram o teste de IDGA associado ao ELISA (testes
381 sorológicos) e a PCR *nested* para avaliar a transmissão vertical da AEC, e verificaram
382 que de 12 cabritos nascidos de mães inseminadas com sêmen fresco contendo LVC,
383 nenhum deles foi diagnosticado com a doença nos testes sorológicos utilizados, no
384 entanto, seis foram positivos no PCR *nested*. Rimstad *et al.* (1993), demonstraram que
385 nos animais estudados, 25% deles foram soronegativos no IDGA, ELISA e WB e

386 positivos na técnica de PCR. Estes achados demonstram que, para se obter um diagnóstico
387 mais adequado da AEC, deve ser realizada a associação de testes (molecular e sorológico)
388 e repetição durante um período de tempo mais prolongado.

389 Apesar de complexo e difícil o diagnóstico e o controle das Lentivirose de
390 Pequenos Ruminantes, os achados de Konishi *et al.* (2011) indicam que o uso combinado
391 de testes em rebanhos leiteiros em inquéritos periódicos é eficaz na formação de um
392 rebanho livre de AEC, a partir de um criatório infectado. Estudos mais detalhados sobre
393 a resposta imune do hospedeiro ao LVC, variabilidade genética e expressão são
394 necessários para esclarecer a infecção (Stonos *et al.*, 2014; Jarczak *et al.*, 2016)

395 **Conclusão**

396 O controle efetivo da AEC requer a associação de diferentes técnicas diagnósticas
397 (molecular e sorológica), para identificação de animais que não estão respondendo
398 imunologicamente, além da realização de inquéritos de forma periódica e contínua.

399 São necessários mais estudos sobre a patogenia do LVC em crias e a sua dinâmica
400 de transmissão intrauterina.

401 **Referências**

- 402 Abbas AK, Lichtman AH (2006) Basic Immunology. Saunders Elsevier, Filadélfia, PA,
403 EUA.
404
405 Almeida Brodie SJ, Marcom KA, Pearson LD, Anderson BC, De La Concha-Bermejillo
406 A, Ellis JA, De Martini JC (1992) Effects of virus load in the pathogenesis of lentivirus-
407 induced lymphoid interstitial pneumonia. *J. Infect. Dis* 166: 531–541.
408
409 Almeida NC, Teixeira MFS, Ferreira RCS, Callado AKC, Frota MNL, Melo ACM,
410 Aprigio CJL (2003) Detecção de ovinos soropositivos para Maedi/Visna destinados ao
411 abate na região metropolitana de Fortaleza. *Veterinária Notícias* 9:59- 63.
412

- 413 Álvarez V, Arranz J, Daltabuit-Test M, Leginagoikoa I, Juste RA, Amorena B,
414 Berriatua E (2005) Relative contribution of colostrum from Maedi-Visna virus (MVV)
415 infected ewes to MVV-seroprevalence in lambs. *Research in Veterinary Science* 78:
416 237–243.
417
- 418 Álvarez V, Daltabuit-Test M, Arranz J, Leginagoikoa I, Juste RA, Amorena B, DE
419 Andrés D, Luján LL, Badiola JJ, Berriatua E (2006) PCR detection of colostrum
420 associated Maedi-Visna virus (MVV) infection and relationship with ELISA-antibody
421 status in lambs. *Research in Veterinary Science* 80: 226-234.
422
- 423 Andrés D, Klein D, Watt NJ, Berriatua E, Torsteinsdottir S, Blacklaws BA, Harkiss GD
424 (2005) Diagnostic tests for small ruminant lentiviruses. *Veterinary Microbiology* 107:
425 49-62.
426
- 427 Andrioli A, Gouveia AMG, Moura Sobrinho PA (2002) Transferência de embriões em
428 cabras naturalmente infectadas pelo lentivírus caprino. *Revista Brasileira de Medicina*
429 *Veterinária* 24: 215-220.
430
- 431 Andrioli A, Gouveia AMG, Martins AS, Pinheiro RR, Santos DO (2006a) Fatores de
432 risco na transmissão do lentivírus caprino pelo sêmen. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*
433 41:1313-1319.
434
- 435 Andrioli A, Souza KC, Pinheiro RR, Sousa FML (2006b) Protocolos para extração do
436 DNA-proviral e PCR do lentivírus caprino em sangue. Comunicado Técnico On line
437 Embrapa. Disponível em:
438 <<http://www.infoteca.cnptia.embrapa.br/bitstream/doc/533316/1/cot72.pdf>>. Acessado
439 em 23 dezembro 2018.
440
- 441 Barlough J, East N, Rowe JD, Hoosier KV, Derock E, Bigornia L, Rimstad E (1994)
442 Double-*nested* polymerase chain reaction for detection of caprine arthritis-encephalitis
443 virus proviral DNA in blood, milk, and tissues of infected goats. *Journal of Virological*
444 *Methods* 50:101-113.
445
- 446 Barquero N, Arjona A, Domenech A, Toural C, De Las Heras A, Fernandez-Garayzabal
447 JF, Ruiz-Santa Quiteria JA, Gomez-Lucia E (2011) Diagnostic performance of PCR and
448 ELISA on blood and milk samples and serological survey for small ruminant
449 lentiviruses in central Spain. *Vet. Rec.* 168.
450
- 451 Berriatúa E, Álvarez V, Extramiana B, González L, Daltabuit M, Juste R (2003)
452 Transmission and control implications of seroconversion to Maedi-Visna Virus in
453 Basque dairy-sheep flocks. *Prev. Vet. Med.* 60:265–279.
454
- 455 Blacklaws BA (2012) Small ruminant lentiviruses: Immunopathogenesis of visna-maedi
456 and caprine arthritis and encephalitis virus. *Comp Immunol Microb* 35:259-269.
457
- 458 Bochud PY, Bochud M, Telenti A, Calandra T (2007) Immunogenetics Innate: Uma
459 ferramenta para explorar novas fronteiras de defesa do hospedeiro. *Lancet Infect. Dis.* 7:
460 531-542.

- 461 Brellou GD, Angelopoulou K, Poutahidis T, Vlemmas I (2007) Detection of Maedi-
462 Visna Virus in the liver and heart of naturally infected sheep. *J Comp Pathol* 136:27-35.
463
- 464 Brinkhof JM, Van Maanen C, Wigger R, Peterson K, Houwers DJ (2008) Specific
465 detection of small ruminant lentiviral nucleic acid sequences located in the proviral long
466 terminal repeat and leader-gag regions using real-time polymerase chain reaction. *J*
467 *Viol. Methods* 147: 338–344.
468
- 469 Brinkhof JM, Houwers DJ, Moll L, Dercksen d, Van Maanen C (2010) Diagnostic
470 performance of ELISA and PCR in identifying SRLV-infected sheep and goats using
471 serum, plasma and milk samples and in early detection of infection in dairy flocks
472 through bulk milk testing. *Vet. Microbiol* 142: 193–198.
473
- 474 Brock KV (2003) The persistence of bovine viral diarrhea virus. *Biologicals* 31: 133-
475 135.
476
- 477 Cavalcante RFRA, Andrioli A, Pinheiro RR, Sousa KC, Veras AKA, Lopes TA, Sousa
478 SD (2013) Detecção do vírus da Artrite Encefalite Caprina por *nested* PCR e *nested*
479 QPCR em ovócitos e fluido uterino. *Arquivos do Instituto Biológico* 80: 381–386.
480
- 481 Chase CCL, Hurley DJ, Reber AJ (2008) Neonatal Immune Development in the Calf
482 and its impact on vaccine response. *Veterinary Clinics of North America: Food Animal*
483 *Pratice* 24: 87-104.
484
- 485 Crawford TB, Adams DS, Cheevers WP, Cork LC (1980) Chronic arthritis in goats
486 caused by a retrovirus. *Science* 207: 997-999.
487
- 488 Cruz ET, González RH, Rodríguez AM, Álvarez HR, Ortega MET, Schmid RK, Setién
489 AA (2003) Detección de anticuerpos contra artritis encefalitis caprina (AEC) mediante
490 inmunoelectrotransferencia. *Veterinária México*. 34:119-127.
491
- 492 De Andres D, Klein D, Watt NJ, Berriatua E, Torsteinsdottir S, Blacklaws BA, Harkiss
493 GD (2005) Diagnostic tests for small ruminant lentiviruses. *Veterinary Microbiology*
494 107: 49–62.
495
- 496 De Regge N, Cay B (2013) Development, validation and evaluation of added diagnostic
497 value of a q(RT)-PCR for the detection of genotype A strains of small ruminant
498 lentiviruses. *J. Virol. Methods* 194: 250–257, 2013.
499
- 500 Domingo E, Gomez J (2007) Quasispecies and its impact on viral hepatitis. *Virus Res*
501 127: 131-150.
502
- 503 EMBRAPA, PROGRAMA DE CONTROLE DA ARTRITE ENCEFALITE CAPRINA
504 NA REGIAO NORDESTE: Relatório de reunião inicial. 1996, Sobral, CE EMBRAPA.
505 EMBRAPA/CNPC, Sobral, 1996. 88p.
506 Feitosa ALVLTeixeira MFS, Pinheiro RR, Cunha RMS, Lima JPMS, Andrioli A,
507 Dantas TVM, Melo VSP, Pinheiro DCSN (2010) Phylogenetic analysis of small

- 508 ruminant lentiviruses from Northern Brazil. *Small Ruminant Research*, Amsterdam 94:
509 205-209.
- 510
- 511 Frota MNL, Silva JBA, Araújo SAC, Teixeira MFS (2005) Artrite-encefalite caprina
512 em cabritos de rebanhos com programas de controle no estado do Ceará. *Arquivos do*
513 *Instituto Biológico* 72: 147-152.
- 514
- 515 Giammarioli M, Bazzucchi M, Puggioni G, Brajon G, Dei Giudici S, Taccori F,
516 Feliziani F, De Mia GM (2011) Phylogenetic analysis of small ruminant lentivirus
517 (SRLV) in Italian flocks reveals the existence of novel genetic subtypes. *Virus Genes*
518 43:380-384.
- 519
- 520 Gonzales JVC, Domingo CYJ, Abes NS, Gutierrez CA, Villanueva MA, Mingala CN
521 (2013) Concordance of competitive enzyme linked immunosorbent assay and *nested-*
522 *polymerase chain reaction* in the detection of caprine arthritis-encephalitis virus. *Small*
523 *Rumin. Res.* 115(1): 143-139.
- 524
- 525 Grimberg J, Nawoschik S, Belluscio L, Mckee R, Turck A, Eisenberg A (1989) A
526 simple and eficiente non-organic procedure for the isolation of genomic DNA from
527 blood. *Nucleic Acids Reserarch* 17: 8390.
- 528
- 529 Hall TA (1999) BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and
530 analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symposium Series* 41: 95-98.
- 531
- 532 Hanson J, Hydbring E, Olsson K (1996) A long term study of goats naturally infected
533 with caprine arthritis-encephalitis virus. *Acta Veterinaria Scandinavica* 37: 31-39.
- 534
- 535 Hasegawa YM, Lara MCCSH, Gaeta NC, Marques JA, Ribeiro BLM, Rossi RS,
536 Gregory L (2017) Transmissibilidade de Lentivírus de Pequenos Ruminantes para
537 cabritos e cabras adultas por meio de sêmen infectado experimentalmente. *Pesquisa*
538 *Veterinária Brasileira* 37: 805–812.
- 539
- 540 Herrmann-Hoesing LM, White SN, Lewis GS, Mousel MR, Knowles DP (2007)
541 Development and validation of an ovine progressive pneumonia virus quantitative PCR.
542 *Clin Vaccine Immunol* 14: 1274–1278.
- 543
- 544 Herrmann-Hoesing LM (2010) Diagnostic assays used to control small ruminant
545 lentiviruses. *J. Vet. Diagn. Invest* 22: 843–855.
- 546
- 547 Jarczak J, Kaba J, Reczyńska D, Bagnicka E (2016) Impaired expression of cytokines as
548 a result of viral infections with an emphasis on small ruminant lentivirus infection in
549 goats. *Viruses* 8.
- 550
- 551 Karanikolaou K, Angelopoulou K, Papanastasopoulou M, Koumpati-Artopiou M,
552 Papadopoulos O, Koptopoulos G (2005) Detection of small ruminant lentiviruses by
553 PCR and serology tests in field samples of animals from Greece. *Small Rumin. Res.*
554 58:181-187.
- 555

- 556 Konishi M, Nagura Y, Takei N, Fujita M, Hayashi K, Tsukioka M, Murakami K (2011)
557 Combined eradication strategy for CAE in a dairy goat farm in Japan. *Small Ruminant*
558 *Research* 99: 65–71.
559
- 560 Kuhar U, Barlic-Maganja D.O, Grom J (2013) Development and validation of TaqMan
561 probe based real time PCR assays for the specific detection of genotype A and B small
562 ruminant lentivirus strains. *BMC Vet. Res.* 9: 172.
563
- 564 Lacerenza D, Giammarioli M, Grego E, Marini C, Profiti M, Rutili D, Rosati S (2006)
565 Antibody response in sheep experimentally infected with different small ruminant
566 lentivirus genotypes. *Veterinary Immunology and Immunopathology* 112: 264–271.
567
- 568 Lara MCCSH, Birgel Junior EH, Gregory L, Birgel EH (2005). Aspectos clínicos da
569 artrite-encefalite dos caprinos. *Arquivos Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*
570 57: 736-740 n.6.
571
- 572 Larruskain A, Jugo BM (2013) Retroviral infections in sheep and goats: Small ruminant
573 lentiviruses and host interaction. *Viruses* 5: 2043–2061.
574
- 575 Lemey P, Rambaut A, Drummond AJ, Suchard MA (2009) Bayesian phylogeography
576 finds its roots. *PLoS Comput Biol.* 5.
577
- 578 Leroux C, Mornex JF (2008) Retroviral infections in sheep and the associated diseases.
579 *Small Rumin. Res.* 76: 68–76.
580
- 581 Liebler-Tenorio EM (2005). Classification and molecular biology, p. 121-144. In:
582 Goyal S.M & Ridpath J.F. (Eds), *Bovine Viral Diarrhea Virus: Diagnosis, management*
583 *and control.* Blackwell Publishing, Iowa.
584
- 585 Lima CCV, Costa JN, Souza TS, Martinez P, Costa Neto AO, Anunciação, AVM,
586 Almeida MGAR, Araújo BR, Pinheiro RR (2013) Inquérito soropidemiológico do
587 lentivírus caprino e perfil das criações de caprinos na região do Baixo Médio São
588 Francisco (BA). *Arquivos do Instituto Biológico* 80: 288–296.
589
- 590 Maclachlan, N. (2011) *Virologia Veterinária de Dubovi* EJ Fenner. Elsevier, Londres,
591 Reino Unido.
592
- 593 Minardi J.C. (2009) Monitoramento sorológico e da presença do DNA pró-viral do
594 lentivírus caprino (CAEV) no sangue e sêmen de reprodutores infectados. Minas Gerais,
595 Brasil, 35p. (Tese de Doutorado. Escola de Veterinária UFMG).
596
- 597 Morein, B, Abusugra, I, Blomqvist, G (2002) Immunity in neonates. *Veterinary*
598 *immunology* 87: 207 -213.
599
- 600 Patel JR, Heldens JGM, Bakonyi T, Rusvai M (2012) Important mammalian veterinary
601 viral immunodiseases and their control. *Vaccine* 30: 1767–1781.
602

- 603 Peixoto RM (2014) Avaliação comportamental, fisiológica e hematológica de
604 reprodutores caprinos portadores do Vírus da Artrite Encefalite caprina (CAEV) e
605 análise do Western Blotting no plasma seminal. Ceará, Brasil, 52p. (Dissertação de
606 Mestrado. Centro de Ciências Agrárias e Biológicas, UVA).
607
- 608 Peterson K, Brinkhof J, Houwers DJ, Colenbrander B, Gadella BM (2008) Presence of
609 pro-lentiviral DNA in male sexual organs and ejaculates of small ruminants.
610 *Theriogenology* 69: 433–42.
611
- 612 Pinheiro RR, Andrioli A, Martinez PM, Gouveia AMG, Aragão MAC, Martinez, PM
613 (2010) Avaliação de antígenos para o diagnóstico de lentivírus em rebanho caprino sob
614 programa de controle 77: 133–137.
615
- 616 Pinheiro RR, Brito RLL, Rodrigues AS, Dias RP, Andrioli A, GOUVEIA AMG (2011)
617 Protocolo de immunoblotting para diagnóstico da Artrite-Encefalite Caprina. Ceará,
618 Brasil, 4 p. (Embrapa Caprinos e Ovinos. Comunicado Técnico 122).
619
- 620 Pinheiro RR, Andrioli A, Sider LH, Santiago LB, Oliveira EL, Sousa ALM, Alves FSF,
621 Cruz JCM (2012) Lentivirose em pequenos ruminantes: principais métodos de
622 diagnóstico. Ceará, Brasil, 42 p. (Embrapa Caprinos e Ovinos. Documentos, 107).
623
- 624 Preziuso S, Sanna E, Sanna MP, Loddo C, Cerri D, Taccini E, Mariotti F, Braca G,
625 Rossi G, Renzoni G (2003) Association of maedi visna virus with *Brucella ovis*
626 infection in rams. *Eur. J. Histochem* 47: 151–158.
627
- 628 Ramírez H, San Román B, Glaria I, Reina R, Hernández MM, De Andrés X, Crespo H,
629 Hichou B, Cianca S, Goñi C, Grandas A, García-Pastor L, Vijil LE, Quintín F, Grilló
630 MJ, de Andrés D, Amorena B. (2009) Antibody-based diagnosis of small ruminant
631 lentivirus infection in seminal fluid. *Theriogenology* 72: 1085–1096. Referências da
632 metodologia.
633
- 634 Ramírez H, Reina R, Bertolotti L, Cenoz A, Hernández MM, San Román B, De Andrés
635 D (2012) Study of compartmentalization in the visna clinical form of small ruminant
636 lentivirus infection in sheep. *BMC Veterinary Research* 8: 1-12.
637
- 638 Ravazzolo AP, Nenci C, Vogt HR, Waldvogel A, Obexer-Ruff G, Peterhan, E, Bertoni
639 G (2006). Viral load, organ distribution, histopathological lesions, and cytokine mRNA
640 expression in goats infected with a molecular clone of the caprine arthritis encephalitis
641 virus. *Virology* 350: 116–127.
642
- 643 Reina R, Berriatua E, Luján L, Juste R, Sánchez A, De Andrés D, Amorena B. (2009).
644 Prevention strategies against small ruminant lentiviruses: An update. *The Veterinary*
645 *Journal*, 182: 31–37.
646
- 647 Rimstad E, East NE, Torten M, Higgins J, Derock E, Pedersen NC (1993) Delayed
648 seroconversion following naturally acquired caprine arthritis-encephalitis virus infection
649 in goats. *American Journal of Veterinary Research* 54: 1858-62.
650

- 651 Rodrigues AS, Pinheiro RR, Brito RLL, Oliveira LS, Oliveira EL, Santos VWS,
652 Andrioli A, Souza TS, Dias RP, Teixeira MFS (2017) Evaluation of Caprine Arthritis-
653 Encephalitis Virus transmission in newborn goat kids. *Arq. Inst. Biol.*, 84, 1-5.
654
- 655 Rodrigues AS, Pinheiro RR, Brito RLL, Andrioli A, Oliveira EL, Sider LH, Teixeira
656 MFS (2018) Avaliação de um controle estratégico da artrite encefalite caprina em
657 rebanho caprino leiteiro. *Arq. Inst. Biol.*, 37: 139–146.
658
- 659 Rowe JD, East NE, Thurmond MC, Franti CE, Pedersen NC (1992) Cohort study of
660 natural transmission and two methods for control of caprine arthritis-encephalitis virus
661 infection in goats on a California dairy. *Am. J. Vet. Res.* 53: 2386–2395.
662
- 663 Rutkoski JK, Werenicz R, Reischak D, Wendelstein AC, Moojen V, Ravazzolo AP
664 (2001) Detecção da infecção pelo Vírus da Artrite-Encefalite Caprina: imunodifusão em
665 ágar e reação em cadeia da polimerase com “primers” degenerados. *Arq. Bras. Med.*
666 *Vet. Zootec.* 53(6), 635-640.
667
- 668 Souza, K.C. (2010) Artrite-encefalite caprina: Infecção experimental via inseminação
669 artificial e acompanhamento clínico e sorológico. Ceará, Brasil, 100 p. (Dissertação de
670 Mestrado. Centro de Ciências Agrárias e Biológicas, UVA).
671
- 672 Souza TS, Pinheiro RR, De Lima CCV, Costa JN (2012) Transmissão interespecie dos
673 lentivírus de pequenos ruminantes: Revisão e desafios. *Acta Veterinaria Brasilica* 6: 23–
674 34.
675
- 676 Stonos N, Wootton SK, Karrow N (2014) Immunogenetics of small ruminant lentiviral
677 infections. *Viruses* 6: 3311–3333.
678
- 679 Thompson JD, Higgins DG, Gibson TJ, Clustal W (1994) Improving the sensitivity of
680 progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific
681 gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Research* 22: 4673-4680.
682
- 683 Tigre DM, Campos GS, Sardi SI (2006) Isolamento e identificação do Vírus da Artrite
684 Encefalite Caprina, a partir do co-cultivo de células mononucleares do sangue com
685 células de membrana sinovial de cabra. *Revista de Ciências Médicas e Biológicas,*
686 *Salvador* 5: 124 – 131.
687
- 688 Tizard, IR (2014) *Imunologia veterinária*. Elsevier, 9. Ed, Rio de Janeiro, BRA.
689
- 690 Zahno ML, Bertoni G (2018). An Immunodominant Region of the Envelope
691 Glycoprotein of Small Ruminant Lentiviruses May Function as Decoy Antigen. *Viruses*
692 10: 1-11.
693

5 CONCLUSÕES GERAIS

Os dados aqui apresentados demonstram que a metodologia adotada nesse estudo foi efetiva no controle da doença, na fase de aleitamento e pós aleitamento, acreditando-se até mesmo numa possível eliminação do vírus da AEC no novo rebanho.

A combinação do sistema de manejo, que propicie diminuição de risco de transmissão horizontal e vertical, com técnicas de diagnóstico mais apuradas, como o WB e a PCR, é relevante para elaboração de plano estratégico de controle da enfermidade e importante para a detecção de infecção pelo vírus, melhorando o desempenho do diagnóstico.

Espera-se que com esses resultados, seja possível compreender e adotar medidas de monitoramento, controle e erradicação da AEC em rebanho caprinos, com a realização de inquéritos de forma periódica e contínua.

Para a confirmação da eficácia dos métodos utilizados nesses estudos, comprovação da eliminação do vírus a partir da metodologia adotada e constatação da via de transmissão intrauterina do CAEV para a prole, por progenitores sorologicamente positivos e negativos para AEC, novos estudos com mais análises diagnósticas e um tempo mais prolongado devem ser realizados.

REFERÊNCIAS

- ADAMS, D.S.; KLEVJER-ANDERSON, P.; CARLSON, B.S.; MCGUIRE, T.C.; GORHAM JR. Transmission and control of caprine arthritis-encephalitis virus. **American Journal Veterinary Research**, v.44, p. 1670-1675, 1983.
- ALI AL AHMAD, M. Z.; FIENI, F.; MARTIGNA, T. L.; CHATAGNON, G.; BARIL, G.; BOUVIER, F.; CHEBLOUNE, Y. Proviral DNA of caprine arthritis encephalitis virus (CAEV) is detected in cumulus oophorus cells but not in oocytes from naturally infected goats. **Theriogenology**, v. 64, p. 1656-1666, 2005.
- ALI AL AHMAD, M. Z.; FIENI, F.; PELLERIN, J.L.; GUIGUEN, F.; CHEREL, Y.; CHATAGNON, G.; BOUZAR, A.B.; CHEBLOUNE, Y. Detection of viral genomes of caprine arthritis-encephalitis virus (CAEV) in semen and in genital tract tissues of male goat. **Theriogenology**, v. 69, p. 473-80, 2008.
- ALMEIDA, N.C.; TEIXEIRA, M.F.S.; FERREIRA, R.C.S.; CALLADO, A.K.C.; FROTA, M.N.L.; MELO, A.C.M.; APRIGIO, C.J.L. Detecção de ovinos soropositivos para maedi/visna destinados ao abate na região metropolitana de Fortaleza. **Veterinária Notícias**, v. 9, p. 59-63, 2003.
- ÁLVAREZ, V.; DALTABUIT-TEST, M; ARRANZ, J.; LEGINAGOIKOA, I.; JUSTE, R.A.; AMORENA, B.; DE ANDRÉS, D.; LUJÁN, L.L.; BADIOLA, J.J.; BERRIATUA, E.; PCR detection of colostrum associated Maedi-Visna virus (MVV) infection and relationship with ELISA-antibody status in lambs. **Research in Veterinary Science**, v. 80, p.226-234, 2006.
- AMILLS, M.; RAMIYA, V.; NORIMINE, J.; LEWIN, H.A. The major histocompatibility complex of ruminants. **Revue scientifique et technique (International Office of Epizootics)**, v. 17, n. 1, p. 108–20, 1998.

- ANDERSON, L. W.; KLEVJER, A. P.; LIGGITT, H. D. Susceptibility of blood-derived monocytes and macrophages to caprine arthritis-encephalitis virus. **Infection and Immunity**, v. 41, n. 2, p. 837–840, 1983.
- ANDRÉS, D.; KLEIN, D.; WATT, N.J.; BERRIATUA, E.; TORSTEINSDOTTIR, S.; BLACKLAWS, B.A.; HARKISS, G.D. Diagnostic tests for small ruminant lentiviruses. **Veterinary Microbiology**. v. 107, p. 49-62, 2005.
- ANDRIOLI, A.; GOUVEIA, A.M.G.; PINHEIRO, R.R. Detecção do DNA pró-viral do Lentivirus caprino em sêmen de bodes naturalmente infectados. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 23, p. 420-420, 1999.
- ANDRIOLI, A.; PINHEIRO, R. R.; ALVES, F. S. F; GOUVEIA, A. M. G. **Transmissão de doenças infecciosas através das biotecnologias reprodutivas em pequenos ruminantes**. Sobral, CE, 2003 26p. (Documentos: Embrapa Caprinos, 51).
- ANDRIOLI, A.; SOUZA, K. C.; PINHEIRO, R. R.; SOUSA, F. M. L. **Protocolo para extração do DNA – proviral e PCR do lentivírus caprino em sangue**. Sobral, CE: Embrapa Caprinos, 2006. 5 p. (Comunicado Técnico, 72).
- ARNAUD, F.; BLACK, S.; MURPHY, L.; GRIFFITHS, D.; NEIL, S.; SPENCER, T.; PALMARINI, M. Interplay between Ovine Bone Marrow Stromal Cell Antigen 2/Tetherin and Endogenous Retroviruses. **Journal of Virology**, v. 84, n. 9, p. 4415–4425, 2010.
- BANDEIRA, D. A.; CASTRO, R.S.; AZEVEDO, E.O.; MELO, L.S.S.; MELO, C.B. Seroprevalence of caprine arthritis-encephalitis virus in goats in the Cariri region, Paraíba state, Brazil. **Veterinary Journal**, v. 180, n. 3, p. 399–401, 2008.
- BARBER, S. A. BRUETT, L.; DOUGLASS, B. R.; HERBST, D. S.; ZINK, M. C.; CLEMENTS, J. E. Visna virus-induced activation of MAPK is required for virus

replication and correlates with virus-induced neuropathology. **Journal of Virology**, v. 76, n. 2, p. 817–828, 2002.

BARROS, S. C.; ANDRÉSDÓTTIR, V.; FEVEREIRO, M. Cellular specificity and replication rate of Maedi Visna virus in vitro can be controlled by LTR sequences. **Archives of Virology**, v. 150, n. 2, p. 201–213, 2005.

BATISTA, M. C. S.; CASTRO, R.S.; CARVALHO, F.A. A.; CRUZ, M. S. P.; SILVA, S. M. M. S.; REGO, E. W.; LOPES, J. B. Anticorpos anti-lentivirus de equenos ruminantes em caprinos integrantes de nove municípios piauienses. **Ciência Veterinária nos Trópicos**, v.7, p. 75-81, 2004.

BATALIA, M. A.; COLLINS, E. J. Peptide Binding for Class I and Class II MHC Molecules. **Biopolymers**, p. 281–302, 1997.

BECK, Z.; PROHÁSZKA, Z.; FÜST, G. Traitors of the immune system-Enhancing antibodies in HIV infection: Their possible implication in HIV vaccine development. **Vaccine**, v. 26, n. 24, p. 3078–3085, 2008.

BENAVIDES, J.; GARCÍA-PARIENTE, C.; FERRERAS, M. C.; FUERTES, M.; GARCÍA-MARÍN, J. F.; PÉREZ, V. Diagnosis of clinical cases of the nervous form of Maedi-Visna in 4- and 6-month-old lambs. **Veterinary Journal**, v. 174, n. 3, p. 655–658, 2007.

BERTOLOTTI, L.; MAZZEI, M.; PUGGIONI, G.; CARROZZA, M.L.; DEI GIUDICI, S.; MUZ, D.; JUGANARU, M.; PATTA, C.; TOLARI, F.; ROSATI, S. Characterization of new small ruminant lentivirus subtype B3 suggests animal trade within the Mediterranean Basin. **Journal of General Virology**, v.92, n.8, p.1923-1929, 2011.

BERTONI, G.; ZAHNO, M.L.; ZANONI, R.; VOGT, H. R.; PETEKHANS, E.; RUFF, G.; CHEEVERS, W. P.; SONIGO, G. Antibody Reactivity to the Immunodominant

Epitopes of the Caprine Arthritis-Encephalitis Virus gp38 Transmembrane Protein Associates with the Development of Arthritis. **American Society for Microbiology**. v. 68, n. 11, p. 7139–7147, 1994.

BERTONI, G.; HERTIG, C.; ZAHNO, M.L.; VOGT, H.R.; DUFOUR, S.; CORDANO, P.; PETERHANS, E.; CHEEVERS, W.P.; SONIGO, P.; PANCINO, G. B-cell epitopes of the envelope glycoprotein of caprine arthritis – encephalitis virus and antibody response in infected goats. **Journal of General Virology**, n. 2000, p. 2929–2940, 2000.

BERTONI, G.; BLACKLAWS, B.A. Small ruminant lentiviruses and cross species transmission. In: Desport M, editor. Lentivirus and macrophages: molecular and cellular interactions. **Caister Academic Press**; p. 277–306. 2010.

BJERRUM, O.J.; HEEGAARD, N.H.H. Handbook of Immunoblotting of Proteins: technical descriptions. **Florida: CRC Press**, 265p. 1988.

BIRD, P.; BLACKLAWS, B.A.; REYBURN, H.T.; ALLEN, D.; HOPKINS, J.; SARGAN, D.; MCCONNELL, I. Early events in immune evasion by the lentivirus maedi-visna occurring within infected lymphoid tissue. **Journal of virology**, v. 67, n. 9, p. 5187–5197, 1993.

BIRD, P.; REYBURN, H. T.; BLACKLAWS, B. A.; ALLEN, D.; NETTLETON, P.; YIRRELL, D. L.; WATT, N.; SARGAN, D.; MCCONNELL, I. The restricted IgG1 antibody response to maedi visna virus is seen following infection but not following immunization with recombinant gag protein. **Clinical and experimental immunology**, v. 102, n. 2, p. 274–280, 1995.

BIRON, C. A. Role of early cytokines, including alpha and beta interferons (IFN- α/β), in innate and adaptive immune responses to viral infections. **Seminars in Immunology**. V. 10, p. 383- 390, 1998.

BLACKLAWS, B. A.; BIRD, P.; ALLEN, D.; ROY, D. J.; MACLENNAN, I. C.; HOPKINS, J.; SARGAN, D. R.; MCCONNELL, I. Initial lentivirus-host interactions within lymph nodes: a study of maedi-visna virus infection in sheep. **Journal of virology**, v. 69, n. 3, p. 1400–1407, 1995.

BLACKLAWS, B. A.; BERRIATUA, E.; TORSTEINSDOTTIR, S.; WATT, N. J.; DE ANDRES, D.; KLEIN, D.; HARKISS, G. D. Transmission of small ruminant lentiviruses. **Veterinary Microbiology**, v. 101, n. 3, p. 199–208, 2004.

BLACKLAWS, B. A. Small ruminant lentiviruses: Immunopathogenesis of visna-maedi and caprine arthritis and encephalitis virus. **Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases**, v. 35, n. 3, p. 259–269, 2012.

BOLEA, R.; MONLEÓN, E.; CARRASCO, L.; VARGAS, A.; DE ANDRÉS, D.; AMORENA, B.; BADIOLA, J. J.; LUJÁN, L. Maedi-visna virus infection of ovine mammary epithelial cells. **Veterinary Research**, v.37, p.133-144, 2006.

BORROW, P.; LEWICKI, H.; HAHN, B. H.; SHAW, G. M.; OLDSTONE, M. B. Virus-specific CD8⁺ cytotoxic T-lymphocyte activity associated with control of viremia in primary human immunodeficiency virus type 1 infection. **Journal of virology**, v. 68, n. 9, p. 6103–6110, 1994.

BRITO, R. L. L. **Implicações da artrite-encefalite caprina na reprodução, produção e na qualidade de leite de cabras**. 2009. 109 f. Dissertação (Mestrado em Zootecnia) - CCAB, Universidade do Vale do Acaraú, Sobral, 2009.

BRODIE, S. J.; DE LA CONCHA-BERMEJILLO, A.; KOENIG, G.; SNOWDER, G. D.; DEMARTINI, J.C. Maternal factors associated with prenatal transmission of ovine lentivirus. **Journal of Infectious Disease**, v.169, p.653-657, 1994.

- CALLADO, A. K. C.; DE CASTRO, R. S.; TEIXEIRA, M. F. D. S. Lentivírus de pequenos ruminantes (CAEV e Maedi-visna): Revisão e perspectivas. **Pesquisa Veterinaria Brasileira**, v. 21, n. 3, p. 87–97, 2001.
- CARPUCCHIO, M. T.; SANNA, E.; M.P.; SANNA, M.P.; FARIGU, S.; MINELLI, R.; GUARDA, F. Maedi-Visnavirus detection in ovine third eyelids. **Journal of comparative pathology**. v. 129, p. 37-43, 2003.
- CARROZZA, M.L.; MAZZEI, M.; BANDECCHI, P.; ARISPICI, M.; TOLARI, F. In situ PCR-associated immunohistochemistry identifies cell types harbouring the Maedi-Visna virus genome in tissue sections of sheep infected naturally. **Journal of Virological Methods**, v. 107, p.121-127, 2003.
- CASTRO, R.S.; LEITE, R.C.; RESENDE, M.; GOUVEIA, A. M.G. A labeledavidin-biotin ELISA to detect antibody to caprine arthritis-encephalitis virus in goats' sera. **Veterinary Research Communications**, v. 23, p.515-522, 1999.
- CAVALCANTE, R.F.R.A.; ANDRIOLI, A.; PINHEIRO, R.R.; SOUSA, K.C.; VERAS, A.K.A.; LOPES, T.A.; SOUSA, S. D. Detecção do vírus da Artrite Encefalite Caprina por *nested* PCR e *nested* QPCR em ovócitos e fluido uterino. **Arquivos do Instituto Biológico**, v. 80, n. 4, p. 381–386, 2013.
- CHEEVERS, W. P.; HOTZEL, I.; BEYER, J.; KUMPULA-MCWHIRTER, N. Immune response to caprine arthritis-encephalitis virus surface protein induced by coimmunization with recombinant vaccinia viruses expressing the caprine arthritis-encephalitis virus envelope gene and caprine interleukin-12. **Vaccine**, v. 18, n. 23, p. 2494–2503, 2000.
- CHEEVERS, W. P.; BEYER, J. C.; HÖTZEL, I. Plasmid DNA encoding caprine interferon gamma inhibits antibody response to caprine arthritis-encephalitis virus (CAEV) surface protein encoded by a co-administered plasmid expressing CAEV env and tat genes. **Vaccine**, v. 19, n. 23–24, p. 3209–3215, 2001.

CHEEVERS, W. P. A maedi – visna virus strain K1514 receptor gene is located in sheep chromosome 3p and the syntenic region of human chromosome 2. **Journal of General Virology**, n. 2002, p. 1759–1764, 2002.

CHRISTODOULOPOULOS, G. Maedi – Visna: Clinical review and short reference on the disease status in Mediterranean countries. **Small Ruminant Research**, v. 62, p. 47–53, 2006.

CHUNG, Y. S.; O’SULLIVAN, B. M. Isolation of caprine-arthritis virus and detection of agar gel immunodiffusion antibodies in goats. **Australian Veterinary Journal**, v. 58, p. 37–38, 1981.

CLEMENTS, J. E.; PAYNE, S. L. Molecular basis of the pathobiology of lentiviruses. **Virus Research**, v. 32, n. 2, p. 97–109, 1994.

CLEMENTS, J. E.; ZINK, M. C. Molecular biology and pathogenesis of animal lentivirus infections. These include: Molecular Biology and Pathogenesis of Animal Lentivirus Infections. **Microbiology**, v. 9, n. 1, p. 100–117, 1996.

CRAIGO, J. K.; MONTELARO, R. C. EIAV envelope diversity: shaping viral persistence and encumbering vaccine efficacy. **Current HIV research**, v. 8, n. 1, p. 81–6, 2010.

CRANE, S. E.; CLEMENTS, J. E.; NARAYAN, O. Separate epitopes in the envelope of visna virus are responsible for fusion and neutralization: biological implications for anti-fusion antibodies in limiting virus replication. **Journal of virology**, v. 62, n. 8, p. 2680–2685, 1988.

CRAWFORD, T.B.; ADAMS, D.S. Caprine arthritis-encephalitis clinical features and presence of antibody in selected goat populations. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 178, p. 713–719, 1981.

CRESPO, H.; REINA, R.; GLARIA, I.; RAMÍREZ, H.; DE ANDRÉS, X.; JÁUREGUI, P.; LUJÁN, L.; MARTÍNEZ-POMARES, L.; AMORENA, B.; DE ANDRÉS, D. F. Identification of the ovine mannose receptor and its possible role in Visna/Maedi virus infection. **Veterinary Research**, v. 42, n. 1, p. 28, 2011.

DA CRUZ, J. C. M.; SINGH, D. K.; LAMARA, A.; CHEBLOUNE, Y. Small ruminant lentiviruses (SRLVs) break the species barrier to acquire new host range. **Viruses**, v. 5, n. 7, p. 1867–1884, 2013.

DE LA CONCHA-BERMEJILLO, A. Maedi-Visna and ovine progressive pneumonia. **Veterinary Clinical North American: Food Animal Practice**. v. 13, p. 13-33, 1997.

DE SOUZA, T. S.; PINHEIRO, R. R.; DE LIMA, C. C. V.; COSTA, J. N. Transmissão interespecie dos lentivírus de pequenos ruminantes: Revisão e desafios. **Acta Veterinaria Brasilica**, v. 6, n. 1, p. 23–34, 2012.

DE SOUZA, K. C.; ANDRIOLI, A.; SIDER, L. H.; PINHEIRO, R. R.; BEZERRA JUNIOR, R. Q.; PEIXOTO, R. M.; TEIXEIRA, M. F. DA S. Detecção de sequências do DNA proviral do vírus da Artrite Encefalite Caprina em saliva. **Acta Scientiae Veterinariae**, v.43, p.1266 - 1212, 2015.

DE VEER, M. J.; HOLKO, M.; FREVEL, M.; WALKER, E.; DER, S.; PARANJAPE, J.M.; SILVERMAN, R.H.; WILLIAMS, B.R.G. Functional classification of interferon-stimulated genes identified using microarrays. **Journal of leukocyte biology**, v. 69, n. 6, p. 912– 920, 2001.

DUKKIPATI, V. S. R.; BLAIR, H.T.; GARRICK, D.J.; MURRAY, A. “Ovar-Mhc” - Ovine major histocompatibility complex: Structure and gene polymorphisms. **Genetics and Molecular Research**, v. 5, n. 4, p. 581–608, 2006.

ELLIS, J. A.; RUSSELL, H. I.; DU, C. W. Effect of selected cytokines on the replication of *Corynebacterium pseudotuberculosis* and ovine lentiviruses in pulmonary macrophages. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 40, n. 1, p. 31–47, 1994.

ERIKSSON, K.; MCINNES, E.; RYAN, S.; TONKS, P.; MCCONNELL, I.; BLACKLAWS, B. CD4(+) T-cells are required for the establishment of maedi-visna virus infection in macrophages but not dendritic cells in vivo. **Virology**, v. 258, n. 2, p. 355–364, 1999a.

ERIKSSON, K.; MCINNES, E.; RYAN, S.; TONKS, P.; MCCONNELL, I.; BLACKLAWS, B. In vivo depletion of CD8+ cells does not affect primary maedi visna virus infection in sheep. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 70, n. 3–4, p. 173–187, 1999b.

ESTES, D. M.; BROWN, W. C. Type 1 and type 2 responses in regulation of Ig isotype expression in cattle. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 90, n. 1–2, p. 1–10, 2002.

FRAS, M.; LEBOEUF, A.; LABRIE, F.M.; LAURIN, M.A.; SINGH SOHAL, J.; L'HOMME, Y. Phylogenetic analysis of small ruminant lentiviruses in mixed flocks: multiple evidence of dual infection and natural transmission of types A2 and B1 between sheep and goats. *Infection, Genetics and Evolution*, v.19, p.97-104, 2013.

FEITOSA, A. L. V. L.; TEIXEIRA, M. F. S.; PINHEIRO, R. R.; CUNHA, R. M.; S.; LIMA, J. P.; ANDRIOLI, A.; DANTAS, T. V. M.; DE MELO, V. S. P.; PINHEIRO, D. C. S. N. Phylogenetic analysis of small ruminant lentiviruses from Northern Brazil. **Small Ruminant Research**, v. 94, n. 1–3, p. 205–209, nov. 2010.

FIENI, F.; ROWE, J.; VAN HOOSEAR, K.; BURUCOA, C.; OPPENHEIM, S.; ANDERSON, G.; MURRAY, J.; BONDURANT, R. Presence of caprine arthritis-

encephalitis virus (CAEV) proviral DNA in genital tract tissues of superovulated dairy goat does. **Theriogenology**, v. 59, p. 1515-1523, 2003.

GDOVIN, S. L.; CLEMENTS, J. E. Molecular mechanisms of visna virus Tat: Identification of the targets for transcriptional activation and evidence for a post-transcriptional effect. **Virology**, v. 188, n. 2, p. 438–450, 1992.

GEBALLE, A. P.; VENTURA, P.; STOWRING, L.; HAASE, A. T. Quantitative analysis of visna virus replication in vivo. **Virology**, v. 141, n. 1, p. 148–54, fev. 1985.

GENDELMAN, H. E.; NARAYAN, O.; MOLINEAUX, S.; CLEMENTS, J. E.; GHOTBI, Z. Slow, persistent replication of lentiviruses: role of tissue macrophages and macrophage precursors in bone marrow. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 82, n. 20, p. 7086–7090, 1985.

GEORGSSON, G.; HOUWERS, D. J.; PFILSSON, P. A.; PÉTURSSON, G. Expression of viral antigens in the central nervous system of visna-infected sheep: an immunohistochemical study on experimental visna induced by virus strains of increased neurovirulence. **Neuropathologica Acta**. p. 299–306, 1989.

GERMAIN, K.; VALAS, S. Distribution and heterogeneity of small ruminant lentivirus envelope subtypes in naturally infected French sheep. **Virus Research**, v. 120, n. 1–2, p. 156–162, set. 2006.

GHANEM, Y. M.; EL-KHODERY, S. A.; ASHRAF, A. S.; ELRAGABY, S. A.; ABDELKADER, A. H.; HEYBE, A. Prevalence and risk factors of caprine arthritis encephalitis virus infection (CAEV) in Northern Somalia. **Small Ruminant Research**. v. 85, p. 142-148, 2009.

GIAMMARIOLI, M.; BAZZUCCHI, M.; PUGGIONI, G.; BRAJON, G.; DEI GIUDICI, S.; TACCORI, F.; FELIZIANI, F.; DE MIA, G.M. Phylogenetic analysis of

small ruminant lentivirus (SRLV) in Italian flocks reveals the existence of novel genetic subtypes. **Virus Genes**. v. 43, p.380-384, 2011.

GJERSET, B.; JONASSEN, C.M.; RIMSTAD, E. Natural transmission and comparative analysis of small ruminant lentiviruses in the Norwegian sheep and goat populations. **Virus Research**, v.125, n.2, p.153-161, 2007.

GONDA, M. A. Molecular biology and virus-host interactions of lentiviruses. **Annals New York Academy Science**. v. 724, p. 22-42, 1994.

GONZÁLEZ, B.; REINA, R.; GARCIA, I.; ANDRES, S.; GLARIA, I.; ALZUETA, M.; MORA, M. I.; JUGO, B. M.; ARRIETA-AGUIRRE, I.; DE LA LASTRA, J. M.; RODRIGUEZ, D.; RODRIGUEZ, J. R.; ESTEBAN, M.; GRILLO, M. J.; BLACKLAWS, B. A.; HARKISS, G. D.; CHEBLOUNE, Y.; LUJAN, L.; ANDRES, D.; AMORENA, B. Mucosal immunization of sheep with a Maedi-Visna virus (MVV) env DNA vaccine protects against early MVV productive infection. **Vaccine**, v. 23, n. 34, p. 4342–4352, 2005.

GREENWOOD, P. L. Effects of caprine arthritis-encephalitis virus on productivity and health of dairy goats in New South Wales, Australia. **Preventive Veterinary Medicine**, v. 22, p. 71-85, 1995.

GREGO, E.; BERTOLOTTI, L.; QUASSO, A.; PROFITI, M.; LACERENZA, D.; MUZ, D.; ROSATI, S. Genetic characterization of small ruminant lentivirus in Italian mixed flocks: Evidence for a novel genotype circulating in a local goat population. **Journal of General Virology**. v. 88, p. 3423–3427, 2007.

GROSSI, P.; GIUDICE, C.; BERTOLETTI, I.; CIOCCARELLI, G.; BROCCHI, E.; CAMMARATA, G. GELMETTI, D. IMMUNOHISTOCHEMICAL DETECTION OF THE P27 CAPSID PROTEIN OF CAPRINE ARTHRITIS-ENCEPHALITIS VIRUS (CAEV) IN BONE-MARROW CELLS OF SEROPOSITIVE GOATS. **Journal of Comparative Pathology**. v. 133, n. 2–3, p. 197–200, 2005.

GRUND, C. H.; EQUINE, G. Fine specificity of equine infectious anaemia virus gp90-specific antibodies associated with protective and enhancing immune responses in experimentally infected and immunized ponies. **Journal of General Virology**, n. 1996, p. 435–442, 1996.

GUDMUNDSSON, B.; JÓNSSON, S. R.; OLAFSSON, O.; AGNARSDÓTTIR, G.; MATTHÍASDÓTTIR, S.; GEORGSSON, G.; TORSTEINSDÓTTIR, S.; SVANSSON, V.; KRISTBJORNSDÓTTIR, H. B.; FRANZDÓTTIR, S.R.; ANDRÉSSON, O. S.; ANDRÉSDÓTTIR, V. Simultaneous mutations in CA and Vif of Maedi-Visna virus cause attenuated replication in macrophages and reduced infectivity in vivo. **Journal of virology**, v. 79, n. 24, p. 15038–15042, 2005.

GUEDES, K. M. R. Doenças do Sistema Nervoso Central em caprinos e ovino no semi-árido: Campina Grande. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 27, p.29-38, 2007.

HAASE, A. T.; STOWRING, L.; NARAYAN, P.; GRIFFIN, D.; PRICE, D. Slow persistent infection caused by visna virus: role of host restriction. **Science** v. 195, p. 175–177. 1977.

HAASE, A. T. Pathogenesis of lentivirus infections. **Nature**, v. 322, n. 6075, p. 130–136, 1986.

HAFLIDADÓTTIR, B. S.; MATTHIASDOTTIR, S.; AGNARSDOTTIR, G.; TORSTEINSDOTTIR, S.; PETURSSON, G.; ANDRESSON, O.S.; ANDRESDOTTIR, V. Mutational analysis of a principal neutralization domain of visna/maedi virus envelope glycoprotein. **Journal of General Virology**, v. 89, n. 3, p. 716–721, 2008.

HASEGAWA, M. Y.; LARA, M. DO C.C.S.H.; GAETA, N. C.; MARQUES, J.A.; RIBEIRO, B. L.M.; ROSSI, R. S.; MARQUES, E. C.; GREGORY, L.
Transmissibilidade de Lentivírus de Pequenos Ruminantes para cabritos e cabras

adultas por meio de sêmen infectado experimentalmente. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 37, n. 8, p. 805–812, 2017.

HEATON, M. P.; CLAWSON, M. L.; CHITKO-MCKOWN, C.G.; LEYMASTER, K. A.; SMITH, T. P.L.; HARHAY, G. P.; WHITE, S. N.; HERRMANN-HOESING, L. M.; MOUSEL, M. R.; LEWIS, G. S.; KALBFLEISCH, T. S.; KEEN, J. E.; LAEGREID, W. W. Reduced lentivirus susceptibility in sheep with TMEM154 mutations. **PLoS Genetics**, v. 8, n. 1, 2012.

HERRMANN-HOESING, L.M.; BROUGHTON-NEISWANGER, L.E.; GOUINE, K.C.; WHITE, S.N.; MOUSEL, M.R.; LEWIS, G.S.; MARSHALL, K.L.; KNOWLES, D.P. Evaluation of a caprine arthritis-encephalitis virus/maedi-visna virus indirect enzyme-linked immunosorbent assay in the serological diagnosis of ovine progressive pneumonia virus in U.S. sheep. **Clin. Vaccine Immunol.** v. 17, p. 307–310, 2010.

HOSHINO, Y.; NAKATA, K.; HOSHINO, S.; HONDA, Y.; TSE, D. B.; SHIODA, T.; ROM, W. N.; WEIDEN, M. Maximal HIV-1 replication in alveolar macrophages during tuberculosis requires both lymphocyte contact and cytokines. **The Journal of experimental medicine**, v. 195, n. 4, p. 495–505, 2002.

HOTZEL, I.; CHEEVERS, W. P. Host Range of Small-Ruminant Lentivirus Cytopathic Variants Determined with a Selectable Caprine Arthritis- Encephalitis Virus Pseudotype System. **Journal of Virology**, v. 75, n. 16, p. 7384–7391, 2001.

HOTZEL, I.; CHEEVERS, W. P. Differential receptor usage of small ruminant lentiviruses in ovine and caprine cells: Host range but not cytopathic phenotype is determined by receptor usage. **Virology**, v. 301, n. 1, p. 21–31, 2002.

HOUWERS, D.J.; VAN DER MOLEN, E.J. A five-year serological study of natural transmission of maedi-visna virus in a flock of sheep, completed with post mortem investigation. **Journal of Veterinary Medicine – Series B.**, v.34, p.421-431, 1987.

INTERNATIONAL COMMITTEE ON TAXONOMY OF VIRUSES. 2017. Disponível em: <https://talk.ictvonline.org/taxonomy/p/taxonomy-history?taxnode_id=20185027>. Acesso em 30 out. 2018.

JARCZAK, J. **Expression of Selected Genes of Goat Immune System in Response to the Presence of Caprine Arthritis Encephalitis Virus (CAEV)**. Ph.D. 2014. Tese-Instituto de Genética e Melhoramento Animal PAS, Jastrz̧ebiec, Polônia, 2014.

JARCZAK, J.; KABA, J.; RECZYŃSKA, D.; BAGNICKA, E. Impaired expression of cytokines as a result of viral infections with an emphasis on small ruminant lentivirus infection in goats. **Viruses**, v. 8, n. 7, 2016.

JAUREGUI, P.; CRESPO, H.; GLARIA, I.; LUJAN, L.; CONTRERAS, A.; ROSATI, S.; DE ANDRES, D.; AMORENA, B.; TOWERS, G.J.; REINA, R. Ovine TRIM5 Can Restrict Visna/Maedi Virus. **Journal of Virology**, v. 86, n. 17, p. 9504–9509, 2012.

JIN, X. BAUER, D. E.; TUTTLETON, S. E.; LEWIN, S.; GETTIE, A.; BLANCHARD, J.; IRWIN, C. E.; SAFRIT, J. T.; MITTLER, J.; WEINBERGER, L.; KOSTRIKIS, L. G.; ZHANG, L.; PERELSON, A. S.; HO, D. D. Dramatic rise in plasma viremia after CD8⁺ T cell depletion in Simian Immunodeficiency Virus-infected macaques. **The Journal of Experimental Medicine**, v. 189, n. 6, p. 991–998, 1999.

JOLLY, P. E.; NARAYAN, O. Evidence for interference, coinfections, and intertypic virus enhancement of infection by ovine-caprine lentiviruses. **Journal of virology**, v. 63, n. 11, p. 4682–4688, 1989.

JOLLY, P. E.; GANGOPADHYAY, S.; CHEN, P. G.; REDDY, H. L.; WEISS; W. J. SAPP. Changes in the leukocyte phenotype profile of goats infected with the caprine arthritis encephalitis virus. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 56, n. 1–2, p. 97–106, 1997.

JUSTE, R.A.; OTT, T.L.; KWANG, J.; BAZER, F.W.; DE LA CONCHA-BERMEJILLO, A. Efeito de interferon-tau recombinante de ovinos na replicação de lentivírus de ovinos e progressão da doença. **Journal of General Virology**, v. 81, p. 525 – 532. 2000.

KABA, J.; WINNICKA, A.; ZALESKA, M.; NOWICKI, M.; BAGNICKA E. Influence of chronic caprine arthritis-encephalitis virus infection on the population of peripheral blood leukocytes. **Polish Journal of Veterinary Sciences**, v. 14, n. 4, p. 585–590, 2011.

KUHAR, U.; BARLIC-MAGANJA, D.; GROM, J. Development and validation of TaqMan probe based real time PCR assays for the specific detection of genotype A and B small ruminant lentivirus strains. **BMC Veterinary Research**. v. 9, p. 172, 2013.

KENNEDY-STOSKOPF, S.; NARAYAN, O. Neutralizing antibodies to visna lentivirus: mechanism of action and possible role in virus persistence. **Journal of virology**, v. 59, n. 1, p. 37–44, 1986.

KONNAI, S.; TAKESHIMA, S.; TAJIMA, S.; YIN, S.A.; OKADA, K.; ONUMA, M.; AIDA, Y. The influence of ovine MHC class II DRB1 alleles on immune response in bovine leukemia virus infection. **Microbiology and immunology**, v. 47, n. 3, p. 223–232, 2003.

KONISHI, M.; NAGURA, Y.; TAKEI, N.; FUJITA, M.; HAYASHI, K.; TSUKIOKA, M.; YAMAMOTO, T.; KAMEYAMA, K.; SENTSU, H.; MURAKAMI, K. Combined eradication strategy for CAE in a dairy goat farm in Japan. **Small Ruminant Research**, v. 99, n. 1, p. 65–71, 2011.

KOUP, R. A.; SAFRIT, J. T.; CAO, Y.; ANDREWS, C. A.; MCLEOD, G.; BORKOWSKY, W.; FARTHING, C.; HO, D. D. Temporal association of cellular immune responses with the initial control of viremia in primary human

immunodeficiency virus type 1 syndrome. **Journal of virology**, v. 68, n. 7, p. 4650–5, 1994.

KOYAMA, S.; ISHII, K.J.; COBAN, C.; AKIRA, S. Innate immune response to viral infection. **Cytokine**, v. 43, n. 3, p. 336–341, 2008.

LAAMANEN, I.; JAKAVA-VILJANEN, M.; SIHVONEN, L. Genetic characterization of maedi-visna virus (MVV) detected in Finland. **Veterinary Microbiology**, v. 122, n. 3–4, p. 357–365, 2007.

LAIRMORE, M. D.; ROSADIO, R. H.; DEMARTINI, J. C. Ovine lentivirus lymphoid interstitial pneumonia. Rapid induction in neonatal lambs. **American Journal of Pathology**, v. 125, p. 173–181, 1986.

LAMARA, A.; FIENI, F.; MSELLI-LAKHAL, L.; TAINTURIER, D.; CHEBLOUNE, Y. Epithelial cells from goat oviduct are highly permissive for productive infection with caprine arthritis – encephalitis virus (CAEV). **VirusResearch**. v. 87, p. 69-77. 2002.

LARA, M.C.C.S.H. Identificação imuno-sorológica de anticorpos anti-virus da artrite-encefalite dos caprinos: Comparação das técnicas de imunodifusão em gel de agar, ensaio imunoenzimático e imunofluorescência indireta. **Arq. Inst. Biol.**, v.69, p.1-5, 2002.

LARA, M. C. C. S. H.; BIRGEL JÚNIOR, E.H.; BIRGEL, E.H. Possibilidade de transmissão do vírus da artrite-encefalite dos caprinos em cabritos. **Arquivos Brasileiros de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 57, p.53-555, 2005.

LARRUSKAIN, A.; JUGO, B. M. Retroviral infections in sheep and goats: Small ruminant lentiviruses and host interaction. **Viruses**, v. 5, n. 8, p. 2043–2061, 2013.

LARUE, R. S.; JONSSON, S.; SILVERSTEIN, K.; LAJOIE, M.; BERTRAND, D.; EL-MABROUK, N.; HOTZEL, I.; ANDRESOTTIR, V.; SMITH, T.; HARRIS, R. The

artiodactyl APOBEC3 innate immune repertoire shows evidence for a multi-functional domain organization that existed in the ancestor of placental mammals. **BMC Molecular Biology**, v. 9, p. 1–20, 2008.

LECHNER, F.; VOGT, H. R.; SEOW, H. F.; BERTONI, G.; CHEEVERS, W. P.; BODUNGEN, U. V.; ZURBRIGGEN, A.; PETERHANS, E. Expression of cytokine mRNA in lentivirus-induced arthritis. **The American journal of pathology**, v. 151, n. 4, p. 1053–1065, 1997a.

LECHNER, F.; MACHADO, J.; BERTONI, G.; SEOW, H. F.; DOBBELAERE, D. A. E.; PETERHANS, E. Caprine arthritis encephalitis virus dysregulates the expression of cytokines in macrophages. **Journal of virology**, v. 71, n. 10, p. 7488–7497, 1997b.

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

LE JAN, C.; BELLATON, C.; GREENLAND, T.; MORNEX, J.F. Mammary transmission of caprine arthritis-encephalitis virus: a 3D model for in vitro study. **Reprod. Nutr.** v.45, p. 513–523, 2005.

LEITNER, G.; KRIFUCKS, O.; WEISBLIT, L.; LAVI, Y.; BERNSTEIN, S.; MERIN, U. The effect of caprine arthritis encephalitis virus infection on production in goats. **The Veterinary Journal**. v.183, p. 328-331, 2010.

LERONDELLE, C.; GODET, M.; MORNEX, J. F. Infection of primary cultures of mammary epithelial cells by small ruminant lentiviruses. **Veterinary Research**. v. 30, n. 5, p. 467–474, 1999.

LEROUX, C.; ISSEL, C. J.; MONTELARO, R. C. Novel and dynamic evolution of equine infectious anemia virus genomic quasispecies associated with sequential disease cycles in an experimentally infected pony. **Journal of virology**, v. 71, n. 12, p. 9627–9639, 1997.

LICHTENSTEIGER, C. A.; CHEEVERS, W. P.; DAVIS, W. C. CD8+ cytotoxic Tlymocytes against antigenic variants of caprine arthritis encephalitis virus, **Journal of General Virology**, v. 74, p. 2111-2116, 1993.

LIMA, P. P. ROCHA, M.A.; STANCEK, D.; GOUVEIA, A.M.G.; OLIVEIRA, G. D. Vírus da artrite encefalite caprina: isolamento e caracterização de parte do gene. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**. vol.56, p. 30- 38, 2004.

LIMA, C.C.V. **Inquérito soropidemiológico da artrite-encefalite caprina na Microrregião de Juazeiro-Bahia e comparação de técnicas imunodiagnósticas**. 2012. 87f. Dissertação de Mestrado - Escola de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Federal da Bahia, Salvador. 2012.

LYALL, J. W.; SOLANKY, N.; TILEY, L. S. Restricted species tropism of maedi-visna virus strain EV-1 is not due to limited receptor distribution. **Journal of General Virology**, v. 81, n. 12, p. 2919–2927, 2000.

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

MARTINEZ, P.M.; COSTA, J.N.; SOUZA, T.S.; LIMA, C.C.V.; COSTA NETO, A.O.; PINHEIRO, R.R. Prevalência sorológica da maedi-visna em rebanhos ovinos da Microrregião de Juazeiro-Bahia por meio do teste de imunodifusão em gel de ágar. **Ciência Animal Brasileira**, v.12, n.2, p. 322-329, 2011.

MALASHKEVICH, V. N.; SINGH, M.; KIM, P. S. The trimer-of-hairpins motif in membrane fusion: Visna virus. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 98, n. 15, p. 8502–8506, 2001.

MCNEILLY, T. N.; TENNANT, P.; LUJÁN, L.; PÉREZ, M.; HARKISS, G. D. Differential infection efficiencies of peripheral lung and tracheal tissues in sheep infected with Visna/maedi virus via the respiratory tract. **Journal of General Virology**, v. 88, n. 2, p. 670–679, 2007.

MCNEILLY, T. N.; MCNEILLY, T. N.; BAKER, A.; BROWN, J. K.; COLLIE, D.; MACLACHLAN, G.; RHIND, S. M.; HARKISS, G. D. Role of Alveolar Macrophages in Respiratory Transmission of Visna/Maedi Virus. **Journal of Virology**, v. 82, n. 3, p. 1526–1536, 2008.

MELO, A.C.M.; FRANKE, C.R.; Soroprevalência da infecção pelo vírus da Artrite-Encefalite Caprina (CAEV) no rebanho de caprinos leiteiros da região da grande Fortaleza, Ceará, Brasil. **Ciência Rural**, v. 27, p.113-117, 1997.

MERCIER, G.; GALIEN, R.; EMANOIL-RAVIER, R. Differential effects of ras and jun family members on complex retrovirus promoter activities. **Research in Virology**, v. 145, n. C, p. 361–367, 1994.

MINGUIJÓN, E.; REINA, R.; PÉREZ, M.; POLLEDO, L.; VILLORIA, M.; RAMÍREZ, H.; LEGINAGOIKOA, I.; BADIOLA, J.J.; GARCÍA-MARTÍN, J.F.; DE ANDRÉS, D.; LUJÁN, L.; AMORENA, B.; JUSTE, R.A. Small ruminant lentivirus infections and diseases. **Veterinary Microbiology**. v. 181, n.1, p. 75- 89, 2015.

MOOJEN, V. Artrite-EncefaliteCaprina. In: RIET-CORREA, F. et al. **Doenças de Ruminantes e Equinos**. v. 1, São Paulo: Varela, p. 55-64. 2001a.

MOOJEN, V. Maedi-Visna dos Ovinos. In: RIET-CORREA, F. et al. **Doenças de Ruminantes e Equinos**. v. 1, São Paulo: Varela, p. 138-144. 2001b.

MOREIRA, M. C.; OELEMANN, W. M. R.; LILENBAUM, W. Dados sorológicos da artrite encefalite caprina no Estado do Rio de Janeiro e avaliação do uso do índice

clínico como ferramenta de diagnóstico. **Revista Brasileira de Medicina Veterinária**, v. 29, p.51-53, 2007.

MOURA SOBRINHO, P. A.; RAMOS, T. R. R.; FERNANDES, C. H. C.; CAMPOS, A. C.; COSTA, L. M.; CASTRO, R. S. Prevalência E Fatores Associados À Infecção Por Lentivírus De Pequenos Ruminantes Em Caprinos No Estado Do Tocantins. **Ciência Animal Brasileira**, v. 11, n. 1, p. 117–124, 2010.

MSELLI-LAKHAL, L.; FAVIER, C.; LEUNG, K.; GUIGUEN, F.; GREZEL, D.; MIOSSEC, P.; MORNEX, J.; NARAYAN, O.; QUÉ RAT, G.; CHEBLOUNE, Y. Lack of Functional Receptors Is the Only Barrier That Prevents Caprine Arthritis-Encephalitis Virus from Infecting Human Cells. **Journal of Virology**, v. 74, n. 18, p. 8343–8348, 2000.

MURPHY, B. G.; HÖTZEL, I.; JASMER, D. P.; DAVIS, W. C.; KNOWLES, D. TNF α and GM-CSF-induced activation of the CAEV promoter is independent of AP-1. **Virology**, v. 352, n. 1, p. 188–199, 2006.

NARAYAN, O.; KENNEDY-STOSKOPF, S.; SHEFFER, D.; GRIFFIN, D. E.; CLEMENTS, J. E. Activation of caprine arthritis-encephalitis virus expression during maturation of monocytes to macrophages. **Infection and Immunity**, v. 41, n. 1, p. 67–73, 1983.

NARAYAN, O.; CLEMENTS, J. E. Biology and Pathogenesis of Lentiviruses. **Journal of General Virology**. v.70, p.1617–1639. 1989.

NIESALLA, H.; MCNEILLY, T. N.; ROSS, M.; RHIND, S. M.; HARKISS, G. D. Experimental infection of sheep with visna/maedi virus via the conjunctival space. **Journal of General Virology**, v. 89, n. 6, p. 1329–1337, 2008.

NIMMANAPALLI, R.; SHARMILA, C.; REDDY, P. G. Immunomodulation of caprine lentiviral infection by interleukin-16. **Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases**, v. 33, n. 6, p. 529–536, 2010.

OLIVEIRA, L. H. S. **Virologia Humana**. 1 ed. Rio de Janeiro: Cultura Médica, 1994. 368p.

PAULA, N. R. O.; ANDRIOLI, A.; CARDOSO, J. F.S.; PINHEIRO, R.R.; SOUSA, F.M.L.; SOUZA, K.C.; ALVES, F.S.F.; CAMPELO, C.C.; RICARTE, A.R.F.; TEIXEIRA, M.F.S. Profile of the Caprine arthritis-encephalitis virus (CAEV) in blood, semen from bucks naturally and experimentally infected in the semi-arid region of Brazil. **Small Ruminant Research**. v. 85, p. 27-33, 2009.

PELUSO, R.; HAASE, A.T.; STOWRING, L.; EDWARDS, M.; VENTURA, P. A. A Trojan Horse mechanism for the spread of visna virus in monocytes. **Virology**, v. 147, n. 1, p. 231–236, 1985.

PEPIN, M.; , C.; RUSSO, P.; MORNEX, J. P.; PETERHANS, E. Maedi-visna virus infection in sheep : a review. **Veterinary Research**, v. 29, p. 341-367, 1998.

PERETZ, G.; ASSO, J.; DEVILLECHAISE, P. Le CAEV: revue des connaissances actuelles et conséquences pratiques. **Revue de Médecine Vétérinaire**, v. 144, p.93-98, 1993.

PERRY, L. L.; WILKERSON, M. J.; HULLINGER, G. A.; CHEEVERS; W. P. Depressed Cd4+ T Lymphocyte Proliferative Response and Enhanced Antibody Response to Viral Antigen in Chronic Lentivirus-Induced Arthritis. **The Journal of Infectious Diseases**, V. 171, p. 328–334. 1995.

PETERHANS, E.; GREENLAND, T.; BADIOLA, J.; HARKISS, G.; BERTONI, G.; AMORENA, B.; ELIASZEWICZ, M.; JUSTE, R.A.; KRASSNIG, R.; LAFONT, J.P.; LENIHAN, P.; PETURSSON, G.; PRITCHARD, G.; THORLEY, J., VITU, C.;

MORNEX, J.F.; PEPIN, M. Routes of transmission and consequences of small ruminant lentiviruses (SRLVs) infection and eradication schemes. **Veterinary Research**, v. 35, p. 257–274, 2004.

PETERSON, K.; BRINKHOF, J.; HOUWERS, D. J.; COLENBRANDER, B.; GADELLA, B. M. Presence of pro-lentiviral DNA in male sexual organs and ejaculates of small ruminants. **Theriogenology**, v.69, p.433–42, 2008.

PINHEIRO, R.R.; GOUVEIA, A.M.G.; ALVES, F.S. Prevalência da infecção pelo vírus da artrite encefalite caprina no estado do Ceará, Brasil. **Revista do Centro de Ciências Rurais**, v. 31, p. 449-454, 2001.

PINHEIRO, R.R.; GOUVEIA, A.M.G.; OLORTEGUI, C.C. **Dot-Blot: alternativa para o diagnóstico da artrite encefalite-caprina (AEC)**. Sobral, CE: Embrapa, 2001. 4p. EMBRAPA. (Comunicado Técnico, n.570).

PINHEIRO, R.R.; ANDRIOLI, A.; SIDER, L.H.; SANTIAGO, L.B.; OLIVEIRA, E.L.; SOUSA, A.L.M.; ALVES, F.S.F.; CRUZ, J.C.M. **Lentiviroses em Pequenos Ruminantes: Principais Métodos de Diagnóstico**. Sobral: EMBRAPA Caprinos e Ovinos, 2012. 40p. (EMBRAPA – Caprinos e Ovinos. Documentos, 107).

PISONI, G.; QUASSO, A.; MORONI, P. Phylogenetic analysis of small-ruminant lentivirus subtype B1 in mixed flocks: Evidence for natural transmission from goats to sheep. **Virology**, v. 339, n. 2, p. 147–152, 2005.

PISONI, G.; MORONI, P.; TURIN, L.; BERTONI, G. Compartmentalization of small ruminant lentivirus between blood and colostrum in infected goats. **Virology**, v. 369, n. 1, p. 119–130, 2007.

PISONI, G.; BERTONI, G.; MANAROLLA, G.; VOGT, H.R.; SCACCABAROZZI, L.; LOCATELLI, C.; MORONI, P. Genetic analysis of small ruminant lentiviruses following lactogenic transmission. **Virology**, v.407, n.1, p.91-99, 2010.

PONTI, W.; PAAPE, M.; BRONZO, V.; PISONI, G.; POLLERA, C.; MORONI, P. Phenotypic alteration of blood and milk leukocytes in goats naturally infected with caprine arthritis-encephalitis virus (CAEV). **Small Ruminant Research**, v. 78, n. 1–3, p. 176–180, 2008.

PRENDERGAST, A. PRADO, J.; KANG, U.; CHEN, F.; RIDDELL, L.; LUZZI, G.; GOULDER, P.; KLENERMAN, P. HIV-1 infection is characterized by profound depletion of CD161+ Th17 cells and gradual decline in regulatory T cells. **Aids**, v. 24, n. 4, p. 491–502, 2010.

PUGH, D.G. **Clínica de Ovinos e Caprinos**. Roca, São Paulo, 2005, 513p.

PYRAH, I. T. G.; WATT, N. J. Immunohistological study of the depressed cutaneous DTH response in sheep naturally infected with an ovine lentivirus (Maedi-Visna virus). **Clinical and Experimental Immunology**, v. 104, n. 1, p. 32–36, 1996.

RACHID, A. CROISE, B.; RUSSO, P.; VIGNONI, M.; LACERENZA, D.; ROSATI, S.; KUZMAK, J.; VALAS, S. Diverse host-virus interactions following caprine arthritis-encephalitis virus infection in sheep and goats. **Journal of General Virology**, v. 94, n. 3, p. 634–642, 2013.

RADOSTITS, O. H.; GAT, C. C.; BLOOD, D. C.; HINCHCLIFF, K.W. Artrite encefalite caprina. In: Otto M. Radostits | Douglas C. Blood | Clive C. Gay | Kenneth W. Hinchcliff. **Clínica Veterinária: Um tratado de doenças dos bovinos, ovinos, suínos, caprinos e equinos**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan. 9.ed. p. 1098-1101. 2002.

RAMSHAW, I.A.; RAMSAY, A.J.; KARUPIAH, G.; ROLPH, M.S.; MAHALINGAM, S.; RUBY, J.C. Cytokines and immunity to viral infections. **Immunological Reviews**. v. 159, p. 119–135. 1997.

RAMÍREZ, H.; REINA, R.; AMORENA, B.; DE ANDRÉS, D.; MARTÍNEZ, H. A. Small Ruminant Lentiviruses: Genetic Variability, Tropism and Diagnosis. **Viruses**, v. 5, p. 1175–1207, 2013.

RAVAZZOLO, A. P.; REISCHAK, D.; PETERHANS, E.; ZANONI, R. Phylogenetic analysis of small ruminant lentiviruses from Southern Brazil. *Virus Research*. v. 79, p. 117–123, 2001.

RAVAZZOLO, A. P.; NENCI, C.; VOGT, H. R.; WALDVOGEL, A.; OBEXER-RUFF, G.; PETERHANS, E.; BERTONI, G. Viral load, organ distribution, histopathological lesions, and cytokine mRNA expression in goats infected with a molecular clone of the caprine arthritis encephalitis virus. **Virology**, v. 350, n. 1, p. 116–127, 2006.

REINA, R.; GLARIA, I.; BENAVIDES, J.; ANDRÉS, X.; CRESPO, H.; SOLANO, C.; PÉREZ, V.; LUJÁN, L.; PÉREZ, M.M.; PÉREZ, J.M.L.; ROSATI, S.; BLACKLAWS, B.; HARKISS, G.; ANDRÉS, D.; AMORENA, B. Association of CD80 and CD86 Expression Levels with Disease Status of Visna/Maedi Virus Infected Sheep. **Viral Immunology**, v. 20, n. 4, p. 609–622, 2007.

REINA, R. BERRIATUA, E.; LUJAN, L.; JUSTE, R.; SANCHEZ, A.; DE ANDRES, D.; AMORENA, B. Prevention strategies against small ruminant lentiviruses: An update. **The Veterinary Journal**, v. 182, n. 1, p. 31–37, out. 2009.

REINA, R.; BERTOLOTTI, L.; DEI GIUDICI, S.; PUGGIONI, G.; PONTI, N.; PROFITI, M.; PATTA, C.; ROSATI, S. Small ruminant lentivirus genotype E is widespread in Sarda goat. **Veterinary Microbiology**. v. 144, p. 24–31, 2010.

REYBURN, T. H.; ROY, J. D.; BLACKLAWS, A. B.; SARGAN, R.; WATT, J. N.; McCONNELL, I. Characteristics of the T cell-mediated immune response to Maedi-Visna virus. **Virology**, v. 141, p. 1009-1012, 1992.

RIET-CORREA, F.; SIMÕES, S. V. D.; AZEVEDO, E. O. **Principais Enfermidades de Caprinos e Ovinos no Semiárido Brasileiro**. In: XV Congresso Latino Americano de Buiatria, 2011, Paysandú. XXXIX Jornadas Uruguayas de Buiatria. Paysandú: Centro Médico veterinário de Paysandú, 2011, p. 1-34.

ROBERSON, S.M.; McGUIRE, T.C.; KLEVJER-ANDERSON, P.; GORHAM, J.R.; CHEEVERS, W.P. Caprine arthritis-encephalitis virus is distinct from visna and progressive pneumonia viruses as measured by genome sequence homology. **Journal of Virology**, v.42, p.755-758,1982.

ROBINSON, W.E.; ELLIS, T.M. Caprine arthritis encephalitis virus infection: from recognition to eradication. **Australian Veterinary Journal**, v. 61, p. 237-241, 1986.

ROWE, J. D.; EAST, N. E. Risk factors for transmission and methods for control of caprine arthritis-encephalitis virus infection. *Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice*, v. 13, p. 35-53, 1997.

RYAN, S.; TILEY, L.; MCCONNELL, I.; BLACKLAWS, B. Infection of dendritic cells by the Maedi-Visna lentivirus. **Journal of virology**, v. 74, n. 21, p. 10096–10103, 2000.

SAMPAIO, J. A. **Soroprevalência das lentiviroses de Pequenos Ruminantes em Caprinos e Ovinos no Município de Teresina, Piauí, Brasil**. 2007. 72 f. **Dissertação (Mestrado em Ciências Animal)** - Universidade Federal do Piauí, Teresina, 2007.

SAMUEL, C. E. Antiviral Actions of Interferons. **Clinical Microbiology Reviews**. v. 14, n. 4, p. 778–809, 2001.

SAYERS, G.; SWEENEY, T. Gastrointestinal nematode infection in sheep – a review of the alternatives to anthelmintics in parasite control. **Animal Health Research Reviews**, v. 6, n. 02, p. 159–171, 2005.

SCHMITZ, J.E.; KURODA, M.J.; SANTRA, S.; SASSEVILLE, V.G.; SIMON, M.A.; LIFTON, M.A.; RACZ, P.; TENNER-RACZ, K.; DALESANDRO, M.; SCALLON, B.J.; GHRAYEB, J.; FORMAN, M.A.; MONTEFIORI, D.C.; RIEBER, E.P.; LETVIN, N.L.; REIMANN, K.A. Control of viremia in simian immunodeficiency virus infection by CD8+ lymphocytes. **Science**. v. 283, p.857-860. 1999.

SERAKIDES, R.; NUNES, V.A.; PEREIRA, M.F. Estudo clínico, anatomopatológico e imuno-histoquímico de pulmões de cabras naturalmente infectadas pelo vírus da artrite-encefalite caprina (CAE). **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.48, p.415-424, 1996.

SHAH, C.; BONI, J.; HUDER, J. B.; VOGT, H. R.; MUHLHERR, J.; ZANONI, R.; MISEREZ, R.; LUTZ, H.; SCHUPBACH, J. Phylogenetic analysis and reclassification of caprine and ovine lentiviruses based on 104 new isolates: Evidence for regular sheep-to-goat transmission and worldwide propagation through livestock trade. **Virology**, v. 319, n. 1, p. 12–26, 2004a.

SHAH, C.; HUDER, J. B.; BÖNI, J.; SCHÖNMANN, M.; MÜHLHERR, J.; LUTZ, H.; SCHÜPBACH, J. Direct evidence for natural transmission of small-ruminant lentiviruses of subtype A4 from goats to sheep and vice versa. **Journal of virology**, v. 78, n. 14, p. 7518–7522, 2004b.

SHARMILA, C.; WILLIAMS, J.W.; REDDY, P.G. Effect of caprine arthritis-encephalitis virus infection on expression of interleukin-16 in goats. **Am. Journal Veterinary Research**. v. 63, p. 1418–1422, 2002.

SILVA, G.A.; SOUZA, B.B.; ALFARO, C.E.P.; SILVA, E. M. N.; AZEVEDO, S. A.; AZEVEDO NETO, J.; SILVA, R. M. N. Efeito da época do ano e período do dia sobre os parâmetros fisiológicos de reprodutores caprinos no semiárido paraibano. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, v.10, n.4, p.903-909, 2006.

SINGH, I.; MCCONNELL, I.; DALZIEL, R.; BLACKLAWS, B. Serum containing ovine IgG2 antibody specific for maedi visna virus envelope glycoprotein mediates antibody dependent cellular cytotoxicity. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 113, n. 3–4, p. 357–366, 2006.

SMALL, J. A.; BIEBERICH, C.; GHOTBI, Z.; HESS, J.; SCANGOS, G.A.; CLEMENTS, J.E. The Visna Virus Long Terminal Repeat Directs Expression of. **Journal of virology**, v. 63, n. 5, p. 1891–1896, 1989.

STONOS, N.; WOOTTON, S. K.; KARROW, N. Immunogenetics of small ruminant lentiviral infections. **Viruses**, v. 6, n. 8, p. 3311–3333, 2014.

STORSET, A.K., EVENSEN, O., RIMSTAD, E., Immunohistochemical identification of caprine arthritis–encephalitis virus in paraffin-embedded specimens from naturally infected goats. **Veterinary Pathology**. v. 34, p. 180–188, 1997.

STOWRING, L.; HAASE, A. T.; PETIJRSSON, G.; GEORGSSON, G.; PALSSON, P.; LIJTLEY, R.; Roos, R.; SZUCHET, S. Detection of Visna Virus Antigens and RNA in Glial Cells in Foci of Demyelination. **Virology**, v. 141, p. 311-318. 1985.

TIGRE, D. M.; CAMPOS, G. S.; SARDI, S. I. Isolamento e identificação do Vírus da Artrite Encefalite Caprina, a partir do co-cultivo de células mononucleares do sangue com células de membrana sinovial de cabra. **Revista de Ciências Médicas e Biológicas**, v. 5, p. 124 – 131, 2006.

TONG-STARKSEN, S. E.; SEPP, T.; PAGTAKHAN, A S. Activation of caprine arthritis-encephalitis virus long terminal repeat by gamma interferon. **Journal of virology**, v. 70, n. 1, p. 595–599, 1996.

TORRES CAMPOS, G.S.; FREITAS, M.M.; BRANDÃO, C.F.L.; SARDI, S.I. Produção de antígeno viral para sorodiagnóstico da artrite encefalite caprina utilizando

um teste imunoenzimático (ELISA). **Revista de Ciências Médicas e Biológicas** v.8 p. 107-114. 2009.

TORSTEINSDOTTIR, S. Immune response to maedi-visna virus. **Frontiers in Bioscience**, v. 12, n. 1, p. 1532, 2007.

TRUJILLO, J. D. HÖTZEL, K. J.; SNEKVIK, K. R.; CHEEVERS, W. P. Antibody response to the surface envelope of caprine arthritis-encephalitis lentivirus: Disease status is predicted by SU antibody isotype. **Virology**, v. 325, n. 1, p. 129–136, 2004.

VILCEK, J.; SEN, G.C. Interferons and other cytokines; in Fields BN, Knipe DM, Howley PM (eds): **Fields Virology**. Philadelphia, Lippincott-Raven, p. 341–365. 1996.

VILLET, S.; FAURE, C.; BOUZAR, B. A.; MORIN, T.; VERDIER, G.; CHEBLOUNE, Y.; LEGRAS, C. Lack of trans-activation function for Maedi Visna virus and Caprine arthritis encephalitis virus Tat proteins. **Virology**, v. 307, n. 2, p. 317–327, 2003.

WHITE, S. N.; MOUSEL, M. R.; REYNOLDS, J. O.; LEWIS, G. S. HERRMANN-HOESING, L. M. Common promoter deletion is associated with 3.9-fold differential transcription of ovine CCR5 and reduced proviral level of ovine progressive pneumonia virus. **Animal Genetics**, v. 40, n. 5, p. 583–589, 2009.

WHITE, S. N.; KNOWLES, D. P. Expanding possibilities for intervention against small ruminant lentiviruses through genetic marker-assisted selective breeding. **Viruses**, v. 5, n. 6, p. 1466–1499, 2013.

WOODWARD, J.C.; GASKIN, C.; POULOS, P.W.; MACRAY, R.J.; BURRIDGE, M.J. Caprine arthritis-encephalitis: clinicopathologic study. **American Journal of Veterinary Research**, v. 43, p. 2065-2096, 1982.

WU, D.; MURAKAMI, K.; MOROOKA, A.; JIN, H.; INOSHIMA, Y.; SENTSU, H.
In vivo transcription of bovine leukemia virus and bovine immunodeficiency-like virus.
Virus Res. v.97, p.81–87, 2003.

ZAHNO, M.L.; BERTONI, G. An Immunodominant Region of the Envelope
Glycoprotein of Small Ruminant Lentiviruses May Function as Decoy Antigen.
Viruses. v. 10, p. 1-11. 2018.

ZHANG, Z.; HARKISS, G.D.; HOPKINS, J.; WOODALL, C.J. Granulocyte
macrophage colony stimulating factor is elevated in alveolar macrophages from sheep
naturally infected with maedi-visna virus and stimulates maedi-visna virus replication in
macrophages in vitro. **Clinical and Experimental Immunology**, v. 129, n. 2, p. 240–
246, 2002.

ZINK, M. C.; NARAYAN, O. Lentivirus-induced interferon inhibits maturation and
proliferation of monocytes and restricts the replication of caprine arthritis-encephalitis
virus. **Journal of virology**, v. 63, n. 6, p. 2578–2584, 1989.

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. 843–854, 1990.

ZINK, M. C.; JOHNSON, L. K. Pathobiology of lentivirus infections of sheep and
goats. **Virus Research**, v. 32, p. 139 – 154, 1994.

Anexos

1 – Carta de Aprovação da CEUA/UVA (Artigo I)

CEUA / UVA	Certificado de Conduta Ética	CCE
------------	------------------------------	-----

Certificamos que o Protocolo nº 014.12, sob título "Análise da eficácia das medidas de controle da Artrite-Encefalite Caprina em rebanho leiteiro semi-intensivo" sob a responsabilidade de, Maria Fátima da Silva Teixeira e Apoliana de Sousa Rodrigues, está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotados pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal - CONCEA (Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008), **TENDO SIDO CONSIDERADO APROVADO PELA** Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Estadual Vale do Acaraú (CEUA/UVA) em reunião realizada em 29 de agosto de 2012.

Sobral, 30 de agosto de 2012.


 Dra. Alice Adrioli Pinheiro
 Coordenadora da CEUA/UVA
 Universidade Estadual Vale do Acaraú

Reconhecida pela Portaria N° 821 / MEC, D.O.U. de 01/06/1994 Avenida da Universidade, 850 -
 Betânia - CEP: 62.040-370 - Sobral - Ceará Fone: (85) 3577.4271 | FAX: (88) 3613.1866 -
www.uva.net.br

2 – Carta de Aprovação CEUA/EMBRAPA (Artigo II)



Caprinos e Ovinos

Comissão de Ética no Uso de Animais –
CEUA / CNPC

CERTIFICADO DE CREDENCIAMENTO E AUTORIZAÇÃO PARA REALIZAÇÃO DE PROTOCOLO

Certificamos que o projeto intitulado “Estudo dos impactos produtivos e econômicos da CAE em rebanhos caprinos leiteiros”, *protocolo nº 013/2015*, sob a responsabilidade do Dr. Raymundo Rizaldo Pinheiro – que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica – encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), e foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Embrapa Caprinos e Ovinos (CEUA/CNPC), em reunião realizada em 18/08/2015.

Vigência do projeto	18/08/2015 a 31/12/2018
Espécie/linhagem	<i>Capra hircus</i> . Caprinos das raças Saanen, Anglo Nubiana e Parda Alpina
Número de animais	900
Peso/idade	20 a 80 kg de peso corporal / 0,5 a 8 anos de idade
Sexo	300 Machos e 600 Fêmeas
Origem	Rebanhos comerciais

Sobral, CE, 04 de novembro de 2015.

Dr. Diego Barcelos Galvani
Coordenador da CEUA-CNPC

Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária
Centro Nacional de Pesquisa de Caprinos e Ovinos
Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento
Fazenda Três Lagoas, Estrada Sobral-Groaíras, Km 4,
CEP 62010-970 Sobral – CE
Telefone (88) 3112.7400 Fax (88) 3112.7455
www.embrapa.br/caprinos-e-ovinos