

**UNIVERSIDADE ESTADUAL DO CEARÁ  
PRÓ-REITORIA DE PÓS-GRADUAÇÃO E PESQUISA  
FACULDADE DE VETERINÁRIA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS  
VETERINÁRIAS**

**IGOR CIRÍACO BARROSO**

**ESTUDO ANALÍTICO MORFOLÓGICO DE PULMÕES OVINOS  
INFECTADOS PELO VÍRUS MAEDI-VISNA**

**FORTALEZA  
2013**

IGOR CIRÍACO BARROSO

ESTUDO ANALÍTICO MORFOLÓGICO DE PULMÕES OVINOS  
INFECTADOS PELO VÍRUS MAEDI-VISNA

Dissertação de mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias da Faculdade de Veterinária da Universidade Estadual do Ceará, como requisito parcial para a obtenção do grau de Mestre em Ciências Veterinárias.

Área de Concentração: Reprodução e Sanidade Animal.

Linha de Pesquisa: Reprodução e sanidade de pequenos ruminantes.

Orientadora: Profa. Dra. Maria Fátima da Silva Teixeira

**FORTALEZA**  
**2013**

**Dados Internacionais de Catalogação na Publicação**

**Universidade Estadual do Ceará**

**Biblioteca Central Prof. Antônio Martins Filho**

B277e Barroso, Igor Ciríaco.

Estudo analítico morfológico de pulmões ovinos infectados pelo vírus Maedi-Visna/ Igor Ciríaco Barroso. — 2013.

CD-ROM 60f. : il. (algumas color.) ; 4 ¾ pol.

“CD-ROM contendo o arquivo no formato PDF do trabalho acadêmico, acondicionado em caixa de DVD Slin (19 x 14 cm x 7 mm)”.

Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual do Ceará, Faculdade de Veterinária, Programa de Pós-graduação em Ciências Veterinárias Mestrado Acadêmico em Ciências Veterinárias, Fortaleza, 2013.

Área de Concentração: Reprodução e Sanidade Animal.

Orientação: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Maria Fátima da Silva Teixeira.

1. *TissueMicroarray*. 2. Histopatologia. 3. Nested-PCR. 4. Pulmão. I. Título.

CDD: 636.089

IGOR CIRÍACO BARROSO

ESTUDO ANALÍTICO MORFOLÓGICO DE PULMÕES OVINOS  
INFECTADOS PELO VÍRUS MAEDI-VISNA

Dissertação de mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias da Faculdade de Veterinária da Universidade Estadual do Ceará, como requisito parcial para a obtenção do grau de Mestre em Ciências Veterinárias.

Aprovada em: 19/07/2013

BANCA EXAMINADORA

---

Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Maria Fátima da Silva Teixeira  
Universidade Estadual do Ceará  
Orientador

  
Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Janaina Serra Azul Monteiro Evangelista  
Universidade Estadual do Ceará  
Examinador

  
Prof. Dr. Raymundo Rivaldo Pinheiro  
EMBRAPA Caprinos e Ovinos  
Examinador

Á Deus, por me guiar, abençoar e permitir a conclusão deste trabalho.

Ao amor demonstrado por meus pais Vera LúciaCiríaco Barroso e Luís Rodrigues Barroso que sempre estiveram ao meu lado me apoiando e incentivando. Obrigado.

## **AGRADECIMENTOS**

A Universidade Estadual do Ceará por disponibilizar condições técnica e pessoal para realização deste trabalho.

AFUNCAP (Fundação Cearense de Apoio ao Desenvolvimento Científico e Tecnológico), FINEP (Financiadora de Estudos e Projetos) e a CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior) pelo apoio financeiro.

A Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (EMBRAPA)Caprinos e Ovinos pelo apoio no desenvolvimento de parte do experimento.

Ao Grupo Edson Queiroz que disponibilizou o abatedouro para a colheita de material tecidualpara a realização deste trabalho.

À Deus, por estar comigo me abençoando e me guiando nos momentos em que sempre precisei Dele. Sem Ele essa conquista não seria possível.

Ao meu pai Luís Rodrigues Barroso e minha mãe Vera Lúcia Ciríaco Barroso por todo carinho, dedicação e apoio incondicional, durante toda a minha vida, sem vocês a realização desse sonho não seria possível.

Ao meu irmão Ítalo Ciríaco Barroso, a Antônia Braga e a Isabele Braga pelo apoio durante essa etapa da minha vida.

A minha avó Damiana Rodrigues Barroso e aos meus tios, tias, primos e primas que sempre me incentivaram, em especial o Tio José Barroso e a Tia Joana Maria Barroso (EM MEMÓRIA), por todo carinho.Vocês moram no meu coração.

A minha namorada Ana Caroline Moura Rodrigues pelo apoio, carinho, sempre me ajudando e motivando.

À minha orientadora Prof<sup>a</sup>. Dra. Maria Fátima da Silva Teixeira, por ser uma pessoa amiga, paciente e carinhosa que sempre esteve ao meu lado, me ajudando e aconselhando durante toda minha faculdade e mestrado. Obrigado!

A todos meus Amigos do Laboratório de Virologia - UECE em especial a Gabrielle Rosemblit, Rosivaldo Júnior, Tereza D'ávila, Rebeca Marinho, Ronaldo Pereira, Kelma Costa, aos alunos de Iniciação Científica e a Elisângela pela ajuda durante a realização deste trabalho e a amizade.

À secretária do PPGCV/UECE, Adriana Maria Sales Albuquerque, pelo carinho e ajuda.

A Professora Janaína Serra Azul Monteiro Evangelista, ao Professor Daniel de Araújo Viana, a Médica Veterinária Glayciane Bezerra de Moraes e a todos que fazem parte do HISTOVESP pela disponibilidade, carinho e paciência em ajudar no meu projeto.

Aos animais, que são nosso objetivo maior.

E a todos aqueles que direta ou indiretamente colaboraram com o desenvolvimento deste trabalho.

## RESUMO

Maedi-Visna é uma doença crônica, multissistêmica e debilitante em ovinos. É ocasionada por um vírus da família *Retroviridae*, do grupo dos Lentivírus de Pequenos Ruminantes. Ela causa grandes perdas econômicas em rebanhos ovinos, como falhas reprodutivas, diminuição da produção láctea, perda de peso e morte dos animais. Esse trabalho tem como objetivo diagnosticar através de imunohistoquímica e análise histológica, pulmões ovinos suspeitos de infecção pelo vírus Maedi-Visna, provenientes de abatedouro da Região Metropolitana de Fortaleza. Este projeto foi aprovado pela Comissão de Ética para o Uso de Animais da Universidade Estadual do Ceará sob o número de protocolo 11224777-6/57. Foram coletados pulmões de 58 animais da espécie ovina provenientes de um abatedouro da Região Metropolitana de Fortaleza, Ceará. Foram selecionados pulmões que apresentavam lesões macroscópicas sugestivas do vírus, como: pulmões não colapsados quando aberto o tórax, ou que apresentavam lesões focais ou multifocais branco-acinzentadas, ou de consistência densa e borrachosa, ou que apresentavam lobos de coloração variando de amarelo-acinzentado até azul-acinzentado. Após a seleção eles foram acondicionados e transportados sobre refrigeração ao Laboratório de Virologia da Universidade Estadual do Ceará para posterior análise morfológica. No laboratório os pulmões foram analisados quanto às alterações macroscópicas e coletadas células do lavado bronco-alveolar para realização do Nested-PCR. Após esse procedimento foram retirados fragmentos pulmonares de 2x2cm em cortes transversais e longitudinais, armazenados em frascos contendo formalina a 10%, neutra e tamponada para posterior diagnóstico por imunohistoquímica utilizando a técnica histológica de *tissue-microarray* e clássica. Das 13 amostras selecionadas para o estudo histopatológico, as lesões microscópicas mais frequentes foram presença de edema, inflamação crônica, hemorragias, hipertrofia das fibras musculares lisas, hiperplasia do tecido linfóide associado aos brônquios, congestão, atelectasia e a presença de macrófagos alveolares. As lesões como hipertrofia das fibras musculares lisas, congestão e atelectasia foram evidenciadas em todos os pulmões. Três amostras foram positivas para a imunohistoquímica. Dessa forma, as lesões histopatológicas encontradas foram sugestivas de Maedi-Visna. A técnica de imunohistoquímica permitiu a detecção da imunomarcagem em seções de pulmões processados pela técnica de *tissuemicroarray*.

**Palavras chave:** *TissueMicroarray*, Histopatologia, Nested-PCR, Pulmão

## ABSTRACT

Maedi-Visna is a chronic, multisystem and debilitating sheep. It is caused by a virus of the family Retroviridae, Lentivirus group of Small Ruminants. It causes great economic losses in sheep flocks as reproductive failure, decreased milk production, weight loss and death of the animals. This work aims to diagnose by immunohistochemical and histological analysis, lungs sheep suspected of infection with Maedi-Visna, from abattoir in the Metropolitan Region of Fortaleza. This project was approved by the Ethics Committee under protocol number 11224777-6/57. Lungs were collected from 58 ovine from an abattoir in the Metropolitan Region of Fortaleza, Ceará. Lungs were selected that had gross lesions suggestive of the virus, such as lungs collapsed when the thorax opened, or those with focal lesions or multifocal gray-white, or dense and rubbery consistency, or wolves that had varying in color from yellow-gray to blue-gray. After selection they were packed and transported on cooling the Virology Laboratory of the State University of Ceará for subsequent morphological analysis. In the laboratory the lungs were analyzed for the macroscopic and the cells collected bronchoalveolar lavage to perform the nested PCR. After this procedure lung fragments were removed 2x2 cm in transverse and longitudinal stored in vials containing 10% formalin neutral buffered, and for further diagnosis by immunohistochemistry using the technique of histological tissue-microarray, and favorite. Of the 13 samples selected for histopathological study, microscopic lesions were more frequent edema, chronic inflammation, hemorrhage, hypertrophy of smooth muscle cells, hyperplasia of the bronchus-associated lymphoid tissue, congestion, atelectasis and alveolar macrophages. Lesions hypertrophy of smooth muscle fibers, congestion and atelectasis were observed in all lungs. Three samples were positive for immunohistochemistry. Thus, the histopathological lesions found were suggestive of Maedi-Visna. Immunohistochemistry allowed detection of immunostaining in lung sections processed by tissue microarray technique.

**KEYWORDS:** *Tissue Microarray*, Histopathology, Nested-PCR, Lung

## LISTA DE FIGURAS

### DISSERTAÇÃO

Figura 1 –Genoma do MVV. São mostradas as posições das regiões U3, R e U5 do LTR e das grandes estruturas de fase aberta de leitura do MVV. Posições aproximadas de nucleotídeos são indicadas por uma barra de escala. T, tat; Rv, ver.....18

### ARTIGO

Figura 1–Guia de montagem dos blocos de *tissuemicroarrays*.....38

Figura 2 –A - Fotomicrografia evidenciando a hiperplasia do musculo liso (Setas).M.O. 200X.(H&E). B - Fotomicrografia das células de revestimento dos alvéolos tumefeitas e tornando-se cubóides (Seta). M.O. 400X. (H&E). Laboratório Bio-Ciência, Fortaleza, Ceará, 2013.....41

Figura 3 – Fotomicrografia da imunohistoquímica pela técnica de *tissuemicroarray* de pulmões ovinos acometidos pelo vírus Maedi-Visna, contracoloração com Hematoxilina de Harris (Setas). M.O.400X.....43

## LISTA DE TABELAS

### ARTIGO

Tabela 1–Principais lesões histopatológicas pulmonares representativas do MVV, de acordo com sua gravidade. Pulmões sem lesões (-), com lesões discretas (+), com lesões moderadas (++) e com lesões graves (+++). .....40

Tabela 2–Amostras pulmonares positivas e negativas para o teste de imunohistoquímica em comparação com a técnica de Nested-PCR. ....42

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AIEV	Vírus da Anemia Infecciosa Equina
BIV	Vírus da Imunodeficiência Bovina
BALT	Tecido Linfoide Associado aos Brônquios
CA	Capsídeo
CEUA	Comissão de Ética para Uso de Animais da UECE
CAE	Artrite Encefalite Caprina
CAEV	Vírus da Artrite Encefalite Caprina
DNA	Ácido Desoxirribonucleico
ELISA	<i>EnzymeLinkedImmunosorbentAssay</i>
Env	Gene que Codifica as Proteínas do Envelope Viral
FIV	Vírus da Imunodeficiência Felina
Gag	Gene que Codifica as Proteínas Internas do Vírus
HIV	Vírus da Imunodeficiência Humana
IDGA	Imunodifusão em Gel de Agarose
LVPR	Lentivírus de Pequenos Ruminantes
LTRs	Sequências Longas Repetidas
MA	Matriz
MVV	Vírus Maedi-Visna
MV	Maedi-Visna
MSC	Membrana Sinovial Caprina
M	Molar
mM	Milimolar
OIE	Organização Mundial de Saúde Animal
ORFs	Fase de Leitura Aberta
PCR	Reação em Cadeia da Polimerase
pH	Potencial de Hidrogênio
PBS	Tampão Fosfato Salino
Pol	Gene que Codifica as Enzimas Virais
rpm	Rotações por Minuto
RNA	Ácido Ribonucléico
Rev	Gene de Regulação Viral

SRD	Sem Raça Definida
SU	Glicoproteína de Superfície
SIV	Vírus da Imunodeficiência Símia
Tat	Gene de Regulação Viral
TM	Glicoproteína Transmembrânica
TMA	<i>TissueMicroarray</i>
UECE	Universidade Estadual do Ceará
Vif	Gene de Regulação Viral
WB	<i>Western Blot</i>
μL	Microlitro

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	14
<b>2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA</b> .....	16
2.1 DOENÇA MAEDI-VISNA.....	16
2.2 ETIOLOGIA DA DOENÇA.....	16
2.3 REPLICAÇÃO VIRAL.....	18
2.4 FISIOPATOGENIA DA DOENÇA.....	19
2.5 TRANSMISSÃO DA DOENÇA.....	20
2.6 IMUNOLOGIA DA INFECÇÃO DO MVV.....	21
2.7 SINTOMATOLOGIA DA DOENÇA.....	22
2.8 ALTERAÇÕES MACRO E MICROSCÓPICAS DE PULMÕES INFECTADOS COMMVV.....	23
2.9 DIAGNÓSTICO DO MVV.....	24
2.9.1 IMUNODIFUSÃO EM GEL DE AGAROSE (IDGA).....	25
2.9.2 HISTOPATOLOGIA.....	25
2.9.3 IMUNOHISTOQUÍMICA.....	26
2.9.4 ISOLAMENTO EM CULTIVO CELULAR.....	27
2.9.5 REAÇÃO EM CADEIA DE POLIMERASE (PCR).....	27
2.10 CONTROLE E PROFILAXIA.....	28
<b>3 JUSTIFICATIVA</b> .....	30
<b>4 HIPÓTESE CIENTÍFICA</b> .....	31
<b>5 OBJETIVOS</b> .....	32
5.1 Objetivo Geral.....	32
5.2 Objetivos Específicos.....	32
<b>6 CAPÍTULO 1</b> .....	33
<b>7 CONCLUSÕES</b> .....	44
<b>8 PERSPECTIVAS</b> .....	45
<b>9 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....	46

## 1 INTRODUÇÃO

A agropecuária brasileira participou em 2010 com 5,8% no Produto Interno Bruto (PIB) do País. Movimentando um valor aproximado de 180 bilhões de reais, representando um crescimento de 6,5% sobre o volume registrado em 2009 (IBGE, 2010). No ano de 2011, ela foi afetada pelo agravamento da crise econômica mundial, principalmente a europeia. Como reflexo, houve uma desaceleração econômica global, o qual se verificou uma queda em volume nas exportações de produtos comercializados pelo Brasil (IBGE, 2011).

O maior efetivo da população de ovinos encontra-se na Região Nordeste com 56,7% de um total nacional, apresentando um crescimento de 3,0% no ano de 2010 em relação a 2009, onde os maiores produtores desse efetivo estão localizados nos Estados da Bahia, do Ceará e de Pernambuco. O Estado do Ceará detém o segundo maior rebanho da Região Nordeste com aproximadamente dois milhões de cabeças ovinas, ficando apenas atrás do Estado da Bahia (IBGE, 2010). Em relação ao ano de 2011, o efetivo total da população ovina foi aproximadamente 17 milhões de cabeças, representando um aumento de 1,6% em relação aos números registrados em 2010 (IBGE, 2011).

No Nordeste brasileiro, a ovinocultura é uma atividade que tem por finalidade fixar o homem no campo, bem como, gerar empregos e renda (ARAÚJO, 2004). Entretanto, essa atividade está sendo ameaçada por problemas de ordem sanitária, como por exemplo, a doença Maedi-Visna (MV). Ela é ocasionada pelo vírus Maedi-Visna (MVV), o qual foi oriundo de outras nações, introduzido na região através da importação de animais puros de origem, visando o melhoramento genético e, conseqüentemente, o aumento da produção (ALMEIDA, 2003). No Brasil, o primeiro relato da doença foi realizado por Dal Pizzolet al. (1989) no estado do Rio Grande do Sul.

O MVV pertencente ao gênero *Lentivirus*, o qual está inserido no grupo dos lentivírus de pequenos ruminantes (LVPR), sendo responsável por causar uma enfermidade crônica, progressiva e multissistêmica nos ovinos (POLLEDO et al., 2012). Ele afeta principalmente os pulmões e o sistema nervoso central, embora o úbere e as articulações também possam ser comprometidos (PREZIUSO et al., 2003).

As perdas econômicas causadas por esse vírus são de grande importância, ele acarreta falhas reprodutivas, diminuição da produção láctea, perda de peso e morte (DANTAS, 2004;LAGO et al., 2012). Devido a esses impactos, vários programas de controle são sugeridos para a erradicação ou redução da prevalência da infecção nos rebanhos ovinos(AZIZI et al., 2012).

Para reduzir ou até mesmo erradicar o vírus nesses rebanhos, é necessário o emprego de técnicas auxiliares que busquem aumentar a sensibilidade e especificidade de testes já utilizados no diagnóstico inicial da doença.

Diante disso, a Imunohistoquímica tem sido adotada como uma técnica de detecção de agentes patogênicos nos tecidos afetados, sendo capaz de localizar a reação antígeno-anticorpo no interior das lesões teciduais produzidas pelo progresso da doença. Isto pode ajudar a identificar o agente patogênico presente no tecido que está causando a lesão e, portanto, a doença(DAGLEISH et al., 2010).

Em razão do alto nível de sensibilidade e reprodutibilidade, da grande economia de reagentes e de tempo para a realização das reações, da uniformização das reações e facilidade na interpretação comparativa dos casos de uma pesquisa, da possibilidade de repetição das reações em múltiplos níveis do bloco imunohistoquímica realizada pela técnica de *tissuemicroarray* poderá ser útil como método auxiliar no diagnóstico da doença(ANDRADE et al., 2007).

## 2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1 DOENÇA MAEDI-VISNA

A doença Maedi-Visna foi descrita pela primeira vez como uma pneumonia progressiva dos ovinos na África do Sul no ano de 1915 (PALSSON, 1976). Isto foi seguido em 1923 por um relatório de pneumonia intersticial crônica grave de ovelhas em Montana, que resultou em perda e morte dos animais. Cerca de 15 anos mais tarde, em 1947 uma nova forma de pneumonia crônica (denominada Maedi) foi reconhecida em ovelhas islandesas. No decorrer da década seguinte na Islândia, uma condição neurológica caracterizada por paralisia e perda de peso (denominada Visna) foi identificada apenas em rebanhos, que também tiveram Maedi (ZINK & JOHNSON, 1994).

No início dos anos 50, o vírus foi descoberto pela primeira vez na espécie ovina por Sigurdsson e colaboradores na Islândia (SIGURDSSON et al., 1954; PÉPIN et al., 1998). Nessa época, foram observados casos esporádicos da doença no sistema nervoso central de ovelhas em várias áreas no sudoeste e sul da Islândia (SIGURDSSON et al., 1957). Essa doença foi introduzida na Islândia por uma importação de ovelhas Karakul da Alemanha no ano de 1933. No qual, a importação teve o objetivo de melhorar a raça nativa islandesa (STRAUB, 2004).

Inicialmente, pensava-se que Maedi e Visna fossem duas doenças distintas (CHRISTODOULOPOULOS, 2006), mas depois que suas cepas foram isoladas e caracterizadas (STRAUB, 2004), concluiu-se que as infecções virais possuíam as mesmas manifestações clínicas e histopatológicas (CHRISTODOULOPOULOS, 2006), sendo atualmente identificado como vírus Maedi-Visna, um lentivírus. Maedi-Visna ou Pneumonia Progressiva Ovina foi à primeira das infecções causadas por lentivírus, sendo reconhecida como uma doença independente em ovinos (STRAUB, 2004). O termo Lentivírus ou “vírus lento” são denominados para infecções causadas por retrovírus, em que se desenvolvem infecções crônicas de evolução lenta, persistente, progressiva e degenerativa (SIGURDSSON et al., 1954).

### 2.2 ETIOLOGIA DA DOENÇA

O vírus Maedi-Visna pertence à família *Retroviridae*, subfamília *Orthoretrovirinae*, gênero *Lentivirus* do grupo Lentivírus de Pequenos Ruminantes (LVPR), ao qual também faz parte o vírus da Artrite Encefalite Caprina (ICTV, 2012).

Os Lentivírus são vírus não oncogênicos exógenos que causam doenças crônicas, multissistêmicas e debilitantes com um início lento em hospedeiros suscetíveis (BRAUN et al., 1987). Além do vírus Maedi-Visna e do vírus da Artrite Encefalite Caprina (CAEV), o gênero Lentivírus incluem ainda os vírus das imunodeficiências em felinos (FIV), bovinos (BIV), símios (SIV) e humanos (HIV), o vírus da Anemia Infecciosa Equina (AIEV) (SMALL et al., 1989) e da Doença de Membrana (JDV) que também foi caracterizado como Lentivírus (BURKALA et al., 1998).

Assim, como os demais lentivírus, sua estrutura é caracterizada por partícula esférica, envelopada medindo em torno de 80 a 100 µm de diâmetro (CLEMENS & ZINK, 1996). A parte central do vírus é formada por uma transcriptase reversa associada com um complexo de nucleoproteína genômica, essa estrutura é delimitada dentro de um capsídeo icosaédrico rodeado por um envelope derivado da membrana plasmática da célula hospedeira (PÉPIN et al., 1998).

O DNA resultante mediado pela transcriptase viral apresenta duas regiões terminais não-codificantes (“*long terminal repeats*” ou “LTRs”) (CALLADO et al., 2001). As zonas LTR podem ter tamanhos variáveis e servem como locais de início da transcrição (PEREIRA, 2009), além do mais são responsáveis por desempenharem um papel no tropismo do vírus nos tecidos e na replicação viral (PÉPIN et al., 1998). Essas regiões são compostas por três fragmentos U3-R-U5 que são essenciais para a replicação do vírus: duas regiões R repetidas nas duas terminações, uma região U5 na terminação 5' e uma U3 na terminação 3'. A região U3 contém vários elementos importantes para a transcrição viral e tropismo (LEROUX & MORNEX, 2008).

Entre os LTRs estão os genes que codificam as proteínas estruturais (*gag* e *env*) e enzimas virais (*pol*), além de pequenas fases abertas de leitura (“*open reading frames*”, ou ORFs), com os genes acessórios *tat*, *vif*, *rev*, codificantes de proteínas reguladoras. O gene *gag* codifica um precursor que é clivado em três proteínas principais: matriz (MA), capsídeo (CA) e nucleocapsídeo (NC). O gene *pol* codifica as proteínas de atividade enzimática: transcriptase reversa, protease, integrase e dUTPase. O gene *env* codifica as glicoproteínas de superfície (SU) e transmembranária (TM) (CALLADO et al., 2001), representados na figura 1.

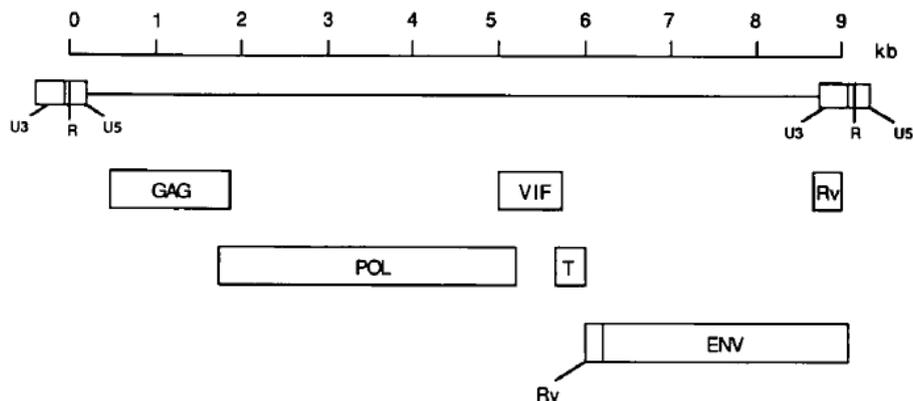


Fig. 1 Genoma do MVV. São mostradas as posições das regiões U3, R e U5 do LTR e das grandes estruturas de fase aberta de leitura do MVV. Posições aproximadas de nucleotídeos são indicadas por uma barra de escala. T, tat; Rv, rev(CAREY & DALZIEL, 1993).

### 2.3 REPLICAÇÃO VIRAL

A replicação dos lentivírus inicia-se com o reconhecimento e ligação do vírus ao receptor celular, posteriormente ocorre à fusão e penetração do nucleocapsídeo viral no interior da célula hospedeira (GONDA, 1994). Após a ligação e endocitose do vírus na célula, o RNA viral é liberado no citoplasma e transcrito em DNA proviral pela enzima viral transcriptase reversa. O DNA proviral migra para o núcleo onde se integra ao DNA celular do hospedeiro (ZINK et al., 1987) sob ação das integrases e LTRs virais (HAASE et al., 1974). Poucas moléculas de DNA são integradas e este fato é importante para a persistência da infecção (HAASE, 1986). O DNA viral integrado pode permanecer latente até que fatores celulares ou virais o ativem (FIELDS et al., 1996). Quando eles são ativados, ocorre a transcrição com produção de RNAm(s) que serão codificados no citoplasma para a produção de proteínas reguladoras. 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, que em macrófagos é obtido pelo brotamento de vesículas citoplasmáticas, rompidas com o excesso de partículas virais, já nos fibroblastos, o envelope é obtido pelo brotamento da membrana plasmática (GONDA, 1994).

Os lentivírus podem ser classificados em dois grupos, de acordo com sua replicação, este poderá ocorrer principalmente em macrófagos e linfócitos ou em ambos. A replicação nestas células do sistema imune é responsável por manifestações clínicas e patológicas específicas da doença. As células da linhagem dos monócitos e

macrófagos são hospedeiras primárias para a replicação do MVV *in vivo* (CLEMENTS & ZINK, 1996).

*In vitro*, estes patógenos podem replicar-se em cultivos de células fetais do plexo coroide (SIGURDSSON et al., 1960), músculo liso (LEROUX et al., 1995), baço, timo, linfonodo escapular (NARAYAN et al., 1980), membrana sinovial caprina (CRAWFORD et al., 1980), células de linhagens caprinas imortalizadas (TEIXEIRA et al., 1997) e tecido epitelial (LEE et al., 1996). O efeito citopático produzido pelo MVV consiste na formação de células gigantes multinucleadas e lise celular (CAREY & DALZIEL, 1993)

#### 2.4 FISIOPATOGENIA DA DOENÇA

A doença Maedi-Visna é caracterizada por um longo período de incubação, com manifestação de forma gradual, progressiva e crônica (NARAYAN & CLEMENTS, 1989), onde os sintomas demoram de meses a anos para se desenvolverem (PÉPIN et al., 1998).

Os mecanismos desenvolvidos pelo vírus para persistência da infecção frente à resposta imune incluem: capacidade dos monócitos em conter o provírus integrado em seu genoma sem ser detectado pelo sistema imune; capacidade de infectar persistentemente macrófagos, sem causar lise celular; interrupção do ciclo viral pelo processamento incompleto da glicoproteína de superfície; replicação de variantes antigênicas na presença de anticorpos neutralizantes; produção insuficiente de anticorpos neutralizantes e produção de interferon; presença de ácido siálico na superfície da partícula viral e a alta mutabilidade do agente que pode resultar em variantes antigênicas (CALLADO et al., 2001).

O MVV penetra no organismo dos animais susceptíveis geralmente por via digestória ou respiratória. Em seguida, infecta as células do sistema monocítico-fagocitário, produzindo uma infecção persistente no hospedeiro (CALLADO et al., 2001), podendo permanecer em um estado latente por um período indeterminado (CHRISTODOULOPOULOS, 2006). Após a infecção inicial, ocorre à disseminação do vírus até os linfonodos regionais por meio das células dendríticas, estas atuam no início da resposta imune, como sendo a mais potente célula apresentadora de antígeno (RYAN et al., 2000).

A persistência do vírus na presença de resposta imune do hospedeiro não é totalmente compreendida (CHRISTODOULOPOULOS, 2006). Os monócitos e

macrófagos são considerados as principais células alvo, mas o MVV também tem sido detectado em outros tipos de células, tais como fibroblastos, células dendríticas, células epiteliais, células endoteliais, adipócitos e células microgliais (PREZIUSO et al., 2009).

A expressão viral é dependente da maturação de monócitos para macrófagos. Além disso, o vírus tem uma grande capacidade de mutação, resultando em variantes antigênicas derivando novas cepas do vírus. Isso explica os diferentes padrões da doença associadas com as diferentes cepas do vírus (CHRISTODOULOPOULOS, 2006).

A soroconversão dos animais ocorre aproximadamente seis meses após a infecção. Após um longo período, 1 a 2 anos, pode-se verificar lesões histopatológicas em um ou mais órgãos alvo, incluindo os pulmões, sistema nervoso central, glândulas mamárias e articulações. Muitos ovinos permanecem portadores assintomáticos por toda vida. (CHRISTODOULOPOULOS, 2006).

## 2.5 TRANSMISSÃO DA DOENÇA

As vias de transmissão dos Lentivírus de Pequenos Ruminantes foram investigadas e um conjunto de evidências acumuladas ao longo dos anos, levou a concluir que as principais vias de transmissão ocorrem através da ingestão de colostro e/ou leite infectado, ou através da inalação de secreções respiratórias (PÉPIN et al., 1998), mais frequentemente nos períodos de confinamento (CALLADO et al., 2001).

A transmissão horizontal e vertical são as principais vias de transmissão dos LVPRs (DANTAS, 2004). A transmissão horizontal ocorre através da inalação de secreções respiratórias contendo células infectadas com o vírus ou, a partir, do vírus livre (PÉPIN et al., 1998), através do contato direto entre os animais, gotículas de aerossóis infectadas, contato indireto com alimentos contaminados, bebedouros e baias. Condições de manejos, tamanho do alojamento, densidade populacional elevada e pouca ventilação nas construções, facilitam a exposição ao vírus (REINA et al., 2009).

A transmissão por máquinas de ordenha contaminadas ou baldes é considerada um fator de risco. Seres humanos também podem contribuir para a propagação da infecção pela veiculação de agentes nas roupas, botas e equipamentos quando se tratar de rebanhos infectados e não infectados. Os animais tais como cães ou gatos não são susceptíveis de desempenhar um papel na transmissão viral (PETERHANS et al., 2004).

Já a transmissão vertical ocorre normalmente através do colostro e leite infectados em rebanhos endemicamente afetados, na qual a permeabilidade do intestino dos cordeiros recém-nascidos favorece esse tipo de transmissão (PÉPIN et al., 1998).

O úbere e pulmão são provavelmente as duas principais fontes de excreção do vírus Maedi-Visna, entretanto outras fontes de infecção também devem ser consideradas (PÉPIN et al., 1998), como no caso o sistema nervoso central (SNC) (CAPUCCHIO et al., 2003).

Placentas contaminadas por sangue materno devido a uma inflamação local com infiltração leucocitária também pode representar uma fonte de infecção, logo a presença dos leucócitos faz com que favoreça a infecção do recém-nascido durante o parto, durante a maturação da placenta, e ou durante a distensão do colo do útero (CORTEZ-ROMERO et al., 2012). A importância da transmissão intrauterina continua a não ser clara, evidências sugerem que a transmissão pode ocorrer em até 10% dos fetos nascidos de fêmeas infectadas (PETERHANS et al., 2004), logo essa via de infecção tem sido relatada apenas ocasionalmente (REINA et al., 2009).

Rodrigues (2012) em seu estudo detectou por *Western Blot* (WB) uma baixa frequência (1,4%) de animais positivos para Lentivirus de Pequenos Ruminantes após o parto, sugerindo uma transmissão intrauterina.

O uso do sêmen de carneiros soropositivos não parece ser um importante fator de risco em ovelhas. No entanto, estudos recentes demonstraram a detecção intermitente de DNA proviral de SRLV no sêmen, que, juntamente com contato próximo de macho e fêmea, pode ser um fator de risco relevante na transmissão (REINA et al., 2009). Já na técnica de transferência de embrião parece representar um risco mínimo, desde que os embriões mantenham sua zona pelúcida íntegra e sejam lavados segundo as normas da Sociedade Internacional de Transferência de Embriões (IETS) (BLACKLAWS et al., 2004).

## 2.6 IMUNOLOGIA DA INFECÇÃO DO MVV

Se comparados com outros lentivirus que causam imunodeficiência humana e símia (HIV e SIV), o MVV não causa imunodeficiência, entretanto provoca uma inflamação crônica em vários tecidos. Os mecanismos precisos pelos quais o MVV causa danos são em grande parte desconhecidos, mas a desregulação da expressão de citocinas tem sido postulada como um possível mecanismo de manutenção da inflamação. Um estudo realizado mostrou que o interferon- $\gamma$ , interleucina (IL)-10, IL-

1 $\beta$ , IL-4, RNAm de receptores para IL-2 estavam regulada positivamente em tecidos pulmonares de ovinos infectados pelo MVV que apresentavam lesões nos pulmões (ZHANG et al., 2002).

A infecção causada pelo MVV induz em intensidades variadas resposta imunológica celular e humoral, que não protegem contra a replicação viral (CHEEVERS et al., 1993; BERTONI et al., 1994).

A resposta celular induz uma proliferação de linfócitos T CD4+ (REYBURN et al., 1992) e T CD8+ (LICHTENSTEIGER et al., 1993; BLACKLAWS et al., 1994) que são responsáveis pela destruição de células infectadas, porém não destroem as que não expressam o provírus (células infectadas latentemente) (ADAMS et al., 1983; MACKENZIE et al., 1987; CUTLIP et al., 1988). Macrófagos infectados com MVV recrutam linfócitos agindo como apresentador de antígeno às células e posteriormente aos linfócitos T citotóxicos CD8+ (LEE et al., 1994).

## 2.7 SINTOMATOLOGIADA DOENÇA

Independentemente das altas taxas de infecção em ovinos, a maioria dos animais dificilmente manifestam sinais clínicos da doença, entretanto durante o exame post-mortem, 20% dos animais podem apresentar lesões indicativas da doença subclínica (ZINK&JOHNSON, 1994).

A doença Maedi-Visna é caracterizada por uma inflamação intersticial crônica não purulenta nos pulmões, articulações, glândula mamária e sistema nervoso central (SNC), aparecendo em diferentes formas clínicas (BENAVIDES et al., 2009).

A forma clínica pulmonar também conhecida na Islândia como Maedi (ZINK et al., 1987) é a forma mais comum da infecção causada pelo vírus da MV (CHRISTODOULOPOULOS, 2006), cuja principal manifestação clínica é a pneumoniaprogessiva (KATSOULOS et al., 2009). Ela é muito frequente e grave em ovinos, cujos sintomas são tosse, dispnéia após exercícios físicos, taquipnéia, consolidação pulmonar (ARAÚJO, 2004).

A forma clínica nervosa, conhecida como Visna, foi relatada pela primeira vez na Islândia durante as epidemias de MV que ocorreram em meados do século passado (BENAVIDES et al., 2009). Essa forma apresenta pouca importância por ser considerada incomum (BENAVIDES et al., 2009) e raramente observada antes da idade de dois anos, entretanto há casos de cabritos onde a encefalite tornou-se evidente dentro de alguns meses de infecção (ANDRÉS et al., 2005). Foi relatada em ovinos

adultos geralmente como complicação da forma respiratória (CALLADO et al., 2001). Os sinais nervosos incluem fraqueza e ataxia dos membros posteriores, paralisia ou hipermetria geralmente conduzindo a decúbito, embora o animal permaneça em estado alerta e responde a estímulos externos (POLLEDO et al., 2012).

A forma clínica mamária, apesar de existir poucos relatos, os animais afetados apresentam mastite, esta ocasiona um endurecimento da glândula mamária reduzindo, assim, a produção de leite (CUTLIP et al., 1988). Na prática, a mastite só pode ser diagnosticada através de exame histológico. Já a produção de leite por estar significativamente reduzida, há um aumento na contagem de células somáticas (CCS). Embora não haja grandes alterações para as características do leite (CHRISTODOULOPOULOS, 2006).

A forma clínica artrítica é outro sintoma raramente descrito na Maedi-Visna (CHRISTODOULOPOULOS, 2006). Os animais apresentam claudicação, com edema no carpo e nas articulações do tarso, ocasionalmente são vistos fraqueza dos membros posterior com paralisia ascendente (CUTLIP et al., 1988).

Além dessas sintomatologias, os animais podem apresentar aumento dos linfonodos, das articulações e tecido periarticular e uma perda de peso acentuada (LAIRMORE et al., 1988). A morte dos animais podem ocorrer num período de 6 meses a 1 ano depois do reconhecimento dos sintomas, onde as infecções bacterianas secundárias nos pulmões são geralmente a causa da morte (CUTLIP et al., 1988).

## 2.8 ALTERAÇÕES MACRO E MICROSCÓPICAS DE PULMÕES INFECTADOS COM MVV

O vírus MVV é responsável por infectar principalmente os pulmões, sistema nervoso central, glândula mamária e articulações causando uma patologia inflamatória, lenta e progressiva. No entanto, ele também poderá afetar outros órgãos, como: fígado, rins, coração (BLACKLAWS, 2012), baço, medula óssea, e terceira pálpebra (PREZIUSO et al., 2009).

Os pulmões afetados encontram-se severamente consolidados (ZINK et al., 1987), apresentando uma pneumonia intersticial crônica linfoplasmocitária com formação de nódulos linfáticos, bem como a hiperplasia do músculo liso das vias aéreas terminais. A alveolite envolve a infiltração de macrófagos, neutrófilos e linfócitos (KATSOULOS et al., 2009). Durante a necropsia dos pulmões observam-se aderências

pleurais, pulmões pesados e firmes à palpação e áreas de coloração róseo-acinzentadas (ARAÚJO, 2004). Os lobos pulmonares apresentam-se com uma coloração acinzentada e consistência uniformes. Os pulmões estão distendidos e aumentados, pesando de duas a cinco vezes mais que os pulmões normais, normalmente 300 a 500g (JONES et al., 2000). O peso de um pulmão normal varia em torno de 500g (CHRISTODOULOPOULOS, 2006).

A doença quando afeta o sistema nervoso central é caracterizada por uma meningoencefalite não purulenta, esta consiste em manguitos perivasculares mononucleares, infiltrado de células inflamatórias no parênquima neural edesmielinização (BENAVIDES et al., 2009). Em casos mais graves da doença, são identificadas áreas liquefeitas na substância branca do encéfalo e áreas de malácia em forma de cunha na medula espinal (POLLEDO et al., 2012).

Na glândula mamária o MVV é responsável por causar mastite (PÉPIN et al., 1998). A mastite é caracterizada por um infiltrado de células linfóides no interstício do parênquima glandular e ao redor dos ductos, não ocorrendo características de supuração (CUTLIP et al., 1988).

Em linfonodos ocorre uma intensa infiltração e proliferação linfóide em órgãos alvo, sendo normalmente acompanhada por uma acentuada hiperplasia dos gânglios linfáticos associados com um aumento no número de folículos e expansão da zona paracortical. Além disso, muitos animais têm uma hiperplasia linfóide generalizada ao longo do curso da doença (ZINK & JOHNSON, 1994).

## 2.9 DIAGNÓSTICO DO MVV

Uma variedade de técnicas são utilizadas para detectar infecções causadas pelo MVV. Estas se baseiam na detecção de anticorpos ou do vírus (PETERHANS et al., 2004). Os testes sorológicos são os mais comumente utilizados (PÉPIN et al., 1998), pois a presença de anticorpos demonstra indiretamente a existência de infecção (CALLADO et al., 2001).

Sendo assim, essa enfermidade pode ser diagnosticada diretamente através da detecção do vírus, utilizando as técnicas de cultivo celular para o isolamento do vírus, microscopia eletrônica, reação em cadeia de polimerase (PCR), hibridização *in situ*, histopatologia e imunohistoquímica ou através do diagnóstico indireto utilizando os testes sorológicos, imunodifusão em gel de agarose, imunofluorescência indireta, dot-

blot e imunoadsorção enzimática (ELISA) para detecção de anticorpos (DANTAS et al., 2005).

O diagnóstico baseado em sinais clínicos não deve ser utilizado, uma vez, que esses podem aparecer mais tarde na vida do animal, não são específicos (REINA et al., 2009) e uma pequena proporção de animais os desenvolve (ANDRÉS et al., 2005).

### 2.9.1 IMUNODIFUSÃO EM GEL DE AGAROSE (IDGA)

É o teste mais comumente utilizado para triagem sorológica de rotina (ANDRÉS et al., 2005), pois apresenta uma alta especificidade (VAREA et al., 2001). É recomendado pela Organização Mundial de Saúde Animal (OIE), por ser de fácil aplicabilidade e não exigir equipamentos nem instalações sofisticadas. O IDGA é a forma de diagnóstico mais utilizado em todo mundo, principalmente em programas de controle da doença (MOOJEN, 2001).

No entanto, a identificação de animais na fase inicial da infecção é limitada, uma vez que esta técnica apresenta pouca sensibilidade, pois se observa uma baixa concentração de anticorpos nesta fase da doença (BRODIE et al., 1998; DE LA CONCHA-BERMEJILLO, 1997).

A técnica consiste na reação de precipitação, esta resulta na formação de uma linha única de identidade entre o antígeno e o anticorpo existente no soro do animal testado, tendo como padrão linhas únicas formadas entre os soros de referência positivos (CUTLIP et al., 1977).

O teste utiliza o vírus completo, que foi produzido a partir do concentrado do sobrenadante de culturas celulares infectadas com o vírus Maedi-Visna, detectando anticorpos contra os antígenos do núcleo p25 (p28 em CAEV) e antígenos do envelope gp135 do MVV (ANDRÉS et al., 2005).

### 2.9.2 HISTOPATOLOGIA

O exame anátomo histopatológico tem sido utilizado para auxiliar o diagnóstico de infecções por lentivírus de pequenos ruminantes (PINHEIRO, 2001). Esse exame é capaz de informar a natureza, gravidade, extensão, evolução e intensidade das lesões, além de sugerir ou até mesmo indicar a causa da afecção (VASCONCELOS, 1988).

Georgsson & Pálsson (1971) realizaram um estudo histopatológico em ovinos infectados natural e experimentalmente com MVV e obtiveram como principais achados uma inflamação intersticial crônica com densa infiltração celular, hiperplasia do

músculo liso no septo alveolar e hiperplasia linfóide perivascular e peribronquial. A análise histopatológica passou a ser utilizada como um auxílio ao diagnóstico, uma vez que essas lesões não são patognomônicas. Ou seja, dificuldades de interpretação podem surgir em amostras de tecido que haja suspeita do vírus, no caso de uma pneumonia intersticial leve, onde essa pode assemelhar-se aquelas causadas por outros patógenos, como nematoides pulmonares, pneumonia por micoplasma e pneumonias exsudativas, esta ocasionada a partir de infecções bacterianas secundárias, sendo complicada por lesões do vírus ou adenomatose pulmonar ovina, que é uma proliferação neoplásica de células epiteliais, comumente vistos nos rebanhos de ovinos, onde essa pode estar em associação com a infecção pelo MVV. Portanto, em tais casos, são necessários diagnósticos etiológicos mais precisos. (BENAVIDES et al., 2006).

### 2.9.3 IMUNOHISTOQUÍMICA

A imunohistoquímica é muito valiosa na investigação de inúmeras doenças infecciosas de ovinos e, juntamente com a história adequada, dados clínicos e patológicos permitem ao patologista fazer um diagnóstico definitivo em muitos casos (DAGLEISH et al., 2010).

Ela é um conjunto de procedimentos que utiliza anticorpos como reagentes específicos para a detecção de antígenos presentes nos tecidos. Os antígenos podem representar constituintes celulares normais ou pertencer a um elemento estranho à célula. Ela é uma técnica essencialmente qualitativa cujo objetivo fundamental é o encontro e localização topográfica de antígenos nos tecidos. Os anticorpos empregados podem ser mono ou policlonais. Em vez de anticorpos purificados, muitas vezes se utiliza um anti-soro como reagente primário, implicando a presença de anticorpos policlonais. A principal vantagem dos anticorpos monoclonais é a sua elevada especificidade (BRASILEIRO FILHO et al., 2000).

Prezioso et al., (2003) analisando ovinos infectados experimentalmente com MVV, através da técnica de imunohistoquímica, verificaram a presença de imunomarcadores citoplasmáticos nas células pulmonares, linfonodos pulmonar, e úbere dos animais infectados independentemente da severidade das lesões.

A imunohistoquímica também poderá ser realizada pela técnica de *tissuemicroarray*(TMA), onde utilizando uma lâmina obtida a partir de um bloco de TMA, é possível conhecer a expressão de um determinado marcador ou uma determinada amplificação ou translocação cromossômica em várias amostras ao custo

de uma única reação. Essa técnica foi descrita em 1998, no qual se trata da construção de um bloco de parafina contendo fragmentos cilíndricos de amostras teciduais ou tumorais obtidos de dezenas ou centenas de blocos de parafina originais. Os cilindros teciduais ou tumorais são dispostos no bloco receptor seguindo uma ordem predeterminada (ANDRADE et al., 2007).

O emprego do TMA apresenta grande potencialidade, permitindo boa concordância diagnóstica comparando com a microscopia convencional e imunohistoquímica. É um método eficiente para avaliar a sensibilidade e especificidade dos anticorpos utilizados na determinação da origem ou do tipo de células, principalmente em tumores humanos pela imunohistoquímica (ROCHA et al., 2006; HSU et al. 2002).

#### 2.9.4 ISOLAMENTO EM CULTIVO CELULAR

O isolamento viral em cultivo celular é considerado um teste padrão de diagnóstico em virologia, no entanto essa técnica apresenta algumas restrições, uma vez que ela é laboriosa, apresenta elevado custo, necessita da implantação de cultivos celulares especiais, além da sua incapacidade em detectar vírus que não causem efeito citopático (KNOWLES, 1997). O isolamento do vírus pode ser feito em células da membrana sinovial de caprinos (MSC), células fibroblásticas do plexo coróide ovino, células TIGEF (TEIXEIRA et al., 1997), dentre outras.

Os principais efeitos citopáticos ocasionados pelo vírus é a formação de sincícios e/ou lise celular, resultando na destruição de grande parte da monocamada celular. *In vitro*, células infectadas têm a propriedade de induzir a fusão celular e posterior formação do sincício em células não infectadas, porém estas se unem através de receptor para glicoproteína de superfície presente na célula infectada (DANIEL et al., 1984; GONDA et al., 1987). Posteriormente, os sincícios tendem a se dissociar ou desintegrar-se, sendo o monitoramento diário um fator crítico na observação da formação dos mesmos (PAWLISCH & MAES, 1984).

#### 2.9.5 REAÇÃO EM CADEIA DE POLIMERASE (PCR)

As técnicas moleculares de diagnóstico, principalmente a reação em cadeia da polimerase (PCR), têm sido utilizadas para identificar a susceptibilidade de diferentes tipos celulares frente à infecção pelo MVV, bem como o papel destes grupos celulares na persistência da enfermidade no organismo animal. A reação em cadeia de polimerase

tem sido utilizada em alguns laboratórios de forma mais restrita, pois é ainda um teste caro, porém possui alta sensibilidade e especificidade, sendo indicado para animais de valor e para aqueles que o resultado de outros testes não tenha sido conclusivo (SILVA & LIMA, 2007).

Trabalhos demonstram o sucesso do uso da técnica da PCR na detecção do DNA proviral do MVV, logo ela permite a identificação por amplificação direta de parte do ácido nucléico viral específica de fluidos e tecidos de um animal infectado (PINHEIRO, 2001).

A detecção de infecção do MVV através da PCR é indicativa de uma infecção persistente e é dependente da quantidade amplificada da sequência alvo e da especificidade do *primer*. Entretanto, esta técnica poderá ser utilizada em programas de erradicação, quando identificar os animais não diagnosticados por sorologia. Devido ao alto custo e aos resultados discordantes entre os testes sorológicos, sugere-se que a PCR seja empregada para esclarecer resultados sorológicos indeterminados ou negativos (KNOWLES, 1997).

Devido à alta variabilidade genômica do MVV, a escolha dos *primer* em genes relativamente conservados como *pol*, *gag* e da LTR, combinado a condições de reação para a máxima sensibilidade é decisiva para detecção de um grande espectro de cepas de campo (ZANONI, 1998).

## 2.10 CONTROLE E PROFILAXIA

Como não há medicamentos eficazes e nem existem vacinas para esta doença; devido às enormes dificuldades apresentadas pela biologia da interação entre lentivírus e do seu hospedeiro, por exemplo, variação genética do vírus, os mecanismos complexos de imunoproteção e persistência vírica (PÉPIN et al., 1998), o sacrifício dos animais soropositivos e clinicamente afetados é necessário para controle da doença (PATEL et al., 2012).

Programas de controle ou erradicação dessa enfermidade, por ter impacto econômico positivo, têm sido adotados voluntariamente em vários países (DANTAS, 2004), onde periodicamente são realizados testes sorológicos utilizando a imunodifusão em gel de agar (IDGA) ou ELISA representando um método padrão de detecção de animais infectados com MVV (PÉPIN et al., 1998). O IDGA é realizado principalmente, em intervalos de seis meses, até obter-se um mínimo de três testes negativos (DANTAS, 2004). O teste sorológico ELISA associado com o teste molecular

PCR servem também como técnicas de confirmação para os lentivírus, sendo aplicadas em rebanhos, a fim de consolidar o estado livre de lentivírus de pequenos ruminantes (SRLV) (REINA et al., 2009).

Dentre as medidas de controles adotadas para a erradicação do MVV nos rebanhos podem-se citar: separação dos cordeiros das suas mães imediatamente após o nascimento; administração de colostro tratado termicamente (56°C durante 60 min) e leite pasteurizado aos cordeiros ou utilização de fêmeas livres do vírus durante amamentação desses animais; remoção dos animais soropositivos dos rebanhos (PÉPIN et al., 1998); adoção de medidas de biossegurança no comércio de animais e durante as exposições (REINA et al., 2009); evitar o contato de animais sadios com secreções de animais soropositivos; usar material estéril, como seringas e agulhas, instrumentos cirúrgicos e tatuadores (CALLADO et al., 2001).

### 3 JUSTIFICATIVA

Diferentes técnicas de diagnósticos são utilizadas para detecção do vírus Maedi-Visna, dentre essas, podemos citar: o isolamento do vírus por cultivo celular, microscopia eletrônica, imunohistoquímica, reação em cadeia de polimerase, imunodifusão em gel de agarose, imunofluorescência indireta e ELISA.

Dentre essas, a Imunohistoquímica proporciona uma grande vantagem, ela é capaz de detectar antígenos específicos nos tecidos, a partir da presença de imunomarcção no interior das lesões teciduais produzidas pelo progresso da doença e, portanto determinar se o agente patogênico presente no tecido é o agente que está causando a lesão e, conseqüentemente, a doença, caracterizando o isolamento da doença.

Técnicas como a reação em cadeia da polimerase (PCR) são extremamente sensíveis e podem ser utilizadas para detectar muitos ácidos nucleicos de diferentes patógenos, tanto qualitativamente como quantitativamente, mesmo presente em pequenas quantidades. Entretanto, a detecção do DNA desses agentes nem sempre significa dizer que o agente patogênico é o causador da doença, logo a sensibilidade dos métodos baseados em PCR pode ser vulnerável tanto ao meio ambiente quanto a contaminação laboratorial. Portanto, a visualização da marcação por Imunohistoquímica no tecido afetado fornece um diagnóstico mais preciso, haja vista que a PCR é incapaz de determinar essa imunomarcção.

Diante do exposto e pelo fato que não há muitos relatos do vírus Maedi-Visna (MVV) em rebanhos de ovinos cearenses e que atualmente não há muitas evidências da exata dimensão da ocorrência da doença, como por exemplo: suas manifestações clínicas, a presença do vírus nesses rebanhos e até mesmo os prejuízos econômicos causados pelo vírus para o agronegócio cearense. Existe a proposta de detectar através da Imunohistoquímica realizada pela técnica de *tissuemicroarray*, a imunomarcção em pulmões de ovinos obtidos em abatedouros, logo esse método poderá ser útil no auxílio do diagnóstico da doença.

#### 4 HIPÓTESE CIENTÍFICA

Pulmões ovinos provenientes de abatedouros, que apresentam lesões sugestivas para doença Maedi-Visna são positivos quando detectados o DNA pró-viral por Nested-PCR/ou antígenos presentes nos tecidos através da Imunohistoquímica.

## 5 OBJETIVOS

### 5.1 OBJETIVO GERAL

Aplicar as técnicas de morfologia em pulmões ovinos como recurso de diagnóstico para o vírus Maedi-Visna.

### 5.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Diagnosticar o vírus Maedi-Visna pela técnica de *tissue-microarray*.
- Detectar o DNA pró-viral do vírus Maedi-Visna em lavado bronco-alveolar por Nested-PCR.
- Comparar os resultados da Nested-PCR com a Imunohistoquímica para Maedi-Visna.
- Analisar as principais lesões microscópicas pulmonares de ovinos comprovadamente positivos por Nested-PCR.

## CAPÍTULO 1

**IMUNOHISTOQUÍMICA PELA TÉCNICA DE *TISSUE*  
*MICROARRAY* DE PULMÕES OVINOS PARA DETECÇÃO DO  
VÍRUS MAEDI-VISNA**

IMMUNOHISTOCHEMISTRY BY *TISSUE MICROARRAY* TECHNIQUE  
OF SHEEP LUNGS FOR THE DETECTION OF MAEDI-  
VISNA VIRUS

Igor Ciríaco Barroso<sup>1</sup>, Maria Fátima da Silva Teixeira<sup>2\*</sup>, Janaina Serra Azul Monteiro Evangelista<sup>2</sup>, Raymundo Rizaldo Pinheiro<sup>3</sup>, Gabrielle Rosemblit Martins<sup>1</sup>, Daniel de Araújo Viana<sup>4</sup> e Glayciane Bezerra de Moraes<sup>1</sup>

**ABSTRACT.**

Maedi-Visna (MV) is a progressive and slow multisystem disease caused by maedi-visna virus (MVV). It is characterized by chronic interstitial non-purulent inflammation of lungs, joints, mammary glands and central nervous system. Also, it is able to induce weight loss, chronic interstitial pneumonia, encephalitis, mastitis, arthritis and lymphadenopathy in the animals. This study aimed to characterize the main microscopic lesions and detect by immunohistochemistry using *tissue microarray* technique Maedi-Visna virus in sheep lung samples obtained from a slaughterhouse in the Metropolitan Region of Fortaleza. Therefore, the lungs were collected from 58 ovine mongrel (SRD), regardless of sex and age. Lungs that had gross lesions suggestive of Maedi-Visna were chosen. After this procedure, lung fragments sliced in transversal and longitudinal cuts of 2x2cm were removed and stored in vials containing 10% formalin neutral and buffered. Of the 13 samples selected for histopathological study, the most frequent microscopic lesions were edema, chronic inflammation, bleeding, hypertrophy of smooth muscle fibers, BAL hyperplasia, congestion, atelectasis and alveolar macrophages. Lesions as hypertrophy of smooth muscle fibers, congestion and atelectasis were observed in all lungs. Three samples were positive for immunohistochemistry. Thus the histopathological lesions found were suggestive of

Maedi-Visna. Immunohistochemistry allowed the demonstration of viral agent in lung sections processed by *tissue microarray* technique.

**KEYWORDS:** *Tissue Microarray*, Histopathology, Nested-PCR, Lung, Maedi-Visna

---

<sup>1</sup>Médico Veterinário, Programa de Pós-graduação em Ciências Veterinárias, Universidade Estadual do Ceará (UECE), Av. Paranjana, 1700, 60120-000, Fortaleza, CE, Brasil.

<sup>2\*</sup>Médico Veterinário, *Dra.* Programa de Pós-graduação em Ciências Veterinárias, Universidade Estadual do Ceará (UECE), Av. Paranjana, 1700, 60120-000, Fortaleza, Ceará, Brasil. Email: [labovirfavetuece@yahoo.com.br](mailto:labovirfavetuece@yahoo.com.br)

<sup>3</sup>Médico Veterinário, Embrapa Caprinos e Ovinos, Departamento de Sanidade Animal, Laboratório de Patologia Clínica e de Virologia, Sobral, CE, Brasil.

<sup>4</sup>Médico Veterinário, Programa de Pós-graduação em Biotecnologia, Universidade Estadual do Ceará (UECE), Av. Paranjana, 1700, 60120-000, Fortaleza, Ceará, Brasil.

## **RESUMO.**

Maedi-Visna (MV) é uma doença multissistêmica, progressiva e lenta causada pelo vírus Maedi-Visna (MVV). Ela se caracteriza por uma inflamação intersticial crônica não purulenta nos pulmões, articulações, glândula mamária e no sistema nervoso central. Sendo capaz de induzir nos animais uma perda de peso crônica, pneumonia intersticial, encefalite, mastite, artrite e linfadenopatia. O trabalho teve o objetivo de caracterizar as principais lesões microscópicas e detectar através da Imunohistoquímica realizada pela técnica de *tissuemicroarray* o vírus Maedi-Visna em amostras pulmonares de ovinos obtidos em abatedouro da Região Metropolitana de Fortaleza. Para tanto, foram coletados pulmões de 58 animais da espécie ovina, sem raça definida (SRD), independente do sexo e idade. Onde foram escolhidos pulmões que apresentavam lesões macroscópicas sugestivas de Maedi-Visna. Após, esse procedimento, foram retirados fragmentos pulmonares de 2x2cm em cortes transversais e longitudinais, onde esses foram armazenados em frascos contendo formalina a 10%, neutra e tamponada. Das 13 amostras selecionadas para o estudo histopatológico, as lesões microscópicas mais frequentes foram presença de edema, inflamação crônica, hemorragias, hipertrofia das fibras musculares lisas, hiperplasia do BALT, congestão, atelectasia e a presença de macrófagos alveolares. As lesões como hipertrofia das fibras

musculares lisas, congestão e atelectasia foram evidenciadas em todos os pulmões. Três amostras foram positivas para a imunohistoquímica. Dessa forma as lesões histopatológicas encontradas foram sugestivas de Maedi-Visna. A técnica de imunohistoquímica permitiu a demonstração do agente viral em secções de pulmão processado pela técnica de *tissuemicroarray*.

**PALAVRAS CHAVE:** *TissueMicroarray*, Histopatologia, Nested-PCR, Pulmão, Maedi-Visna

## INTRODUÇÃO

Maedi-Visna (MV) é uma doença multissistêmica, progressiva e lenta causada pelo o vírus Maedi-Visna (MVV). Este vírus pertence à família *Retroviridae* do gênero *Lentivirus*, o qual está inserido no grupo dos lentivíruspequeno ruminantes (LVPR) juntamente com o vírus da artrite encefalite caprina (CAEV) (Polledo et al., 2012).

Essa enfermidade acomete animais adultos, através da via oral e respiratória, no qual ocorre uma lenta progressão da doença, onde suas manifestações clínicas aparecem em animais adultos. A doença é caracterizada por uma inflamação intersticial crônica não purulenta nos pulmões, articulações, glândula mamária e no sistema nervoso central (SNC) (Sigurdsson et al., 1957; Dawson, 1987; Benavides et al., 2009 ).

O MVV infecta principalmente células da linhagem monocítico-fagocitária, embora também tenham sido identificadas em outros tipos de células (Brodie et al., 1995; Ryan et al., 2000; Preziuso et al., 2003).

Em rebanhos com baixa prevalência de infecção, os sinais clínicos geralmente não são detectados, portanto há uma necessidade de um diagnóstico *post-mortem*, da forma pulmonar, baseado no reconhecimento das principais lesões macroscópicas e microscópicas, no entanto estas alterações patológicas não são patognomônicas. Portanto, em tais casos, são necessários métodos mais precisos de diagnóstico ( Azizi et al., 2012).

A Imunohistoquímica é um procedimento de diagnóstico que apresenta uma grande vantagem, pois ela é capaz de localizar o patógeno no interior das lesões teciduais produzidas pelo progresso da doença e, portanto determinar se o agente patogênico presente no tecido é o agente que está causando a lesão e, conseqüentemente, a doença (Dagleish et al., 2010).

Além disso, a imunohistoquímica poderá ser realizada pela técnica de *tissuemicroarray*. Esta apresenta múltiplas vantagens em relação ao corte tradicional, entre elas: grande economia de reagentes e de tempo para a realização das reações; uniformização das reações e facilidade na interpretação comparativa dos casos de uma pesquisa; possibilidade de repetição das reações em múltiplos níveis do bloco; simplificação do trabalho das linhas de pesquisa pela utilização do bloco em mais de um projeto (Andrade et al., 2007).

Diante do exposto, propõe-se caracterizar as principais lesões microscópicas e detectar através da Imunohistoquímica realizada pela técnica de *tissuemicroarray*, a presença do vírus em pulmões de ovinos obtidos em abatedouros. Esse método poderá ser útil no auxílio do diagnóstico da doença, haja vista que apresenta um alto nível de sensibilidade e reprodutibilidade.

## MATERIAL E MÉTODOS

Todos os procedimentos realizados em animais atenderam as normas de biossegurança estabelecidas, onde estes foram analisados e aprovados pela Comissão de Ética para o Uso de Animais (CEUA) (registro nº 11224777-6/57) da Universidade Estadual do Ceará.

Foram coletados pulmões de 58 animais da espécie ovina, sem raça definida (SRD), independente do sexo e idade, provenientes de um abatedouro da Região Metropolitana de Fortaleza, Estado do Ceará. Os pulmões foram selecionados durante a fase de inspeção em detrimento do abate de rotina. Foram escolhidos aqueles que apresentavam lesões macroscópicas indicativa do vírus, como: pulmões não colapsados quando aberto o tórax, ou que apresentavam lesões focais ou multifocais branco-acinzentadas, ou de consistência densa e borrachosa, ou que apresentavam lobos de coloração variando de amarelo-acinzentado até azul-acinzentado. Foram descartados os espécimes que apresentavam nódulos purulentos sugestivos de bactérias e outros agentes. Os pulmões coletados foram acondicionados em caixas de material isotérmicos e transportados sobre refrigeração ao Laboratório de Virologia da UECE para posterior análise.

Cada órgão foi devidamente higienizado externamente com água corrente potável, solução de hipoclorito a 2% e água destilada. Após, esse procedimento, foram retirados fragmentos pulmonares de 2x2cm em cortes transversais e longitudinais, e armazenados em frascos contendo formalina a 10%, neutra e tamponada.

Para a análise histopatológica e o teste de imunohistoquímica foram utilizadas cinco amostras comprovadamente positivas e oito negativas pelo método de diagnóstico Nested-PCR, totalizando-se treze amostras. Dentre as amostras negativas pelo teste foram escolhidas aquelas que mais se aproximavam das características macroscópicas sugestivas da doença.

A Nested-PCR foi realizado segundo Castro (1998), adaptado, para o vírus Maedi-Visna. No qual, o material obtido do lavado bronco-alveolar foi centrifugado a 3000 rpm por 1 min, e o pellet obtido foi ressuspensão em 2 ml de tampão hipertônico por 2 min a temperatura ambiente seguido por centrifugação a 2500 rpm por 10 min, por duas vezes. O DNA celular foi extraído de 1 ml do pellet com 250 µl de tampão de PCR e homogeneizado. O material foi incubado a 56°C por 60 min com 2,5 µl de proteinase K em banho-maria. A proteinase K foi desnaturada a 95°C por 10 min. O DNA extraído foi estocado a -20°C até sua utilização.

Os primers utilizados para amplificar o gene *gag* foram desenhados e confeccionados de acordo com Saltarelli et al. (1990). Os primers externos GEX5 (5'-CAAGCAGCAGGAGGGAGAAGCTG-3') e GEX3 (5'-TCCTACCCCCATAATTTGATCCAC-3') foram utilizados na primeira amplificação, e os primers internos GIN5 (5'-GTTCCAGCAACTGCAAACAGTAGCAATG-3') e GIN3 (5'-ACCTTTCTGCTTCTTCATTTAATTTCCC-3') foram utilizados na segunda amplificação.

A amplificação foi realizada usando o termociclador (Biocycler Peltier ThermalCycler®) sob as seguintes condições: desnaturação inicial a 94°C por 5 min, seguido de desnaturação a 94°C por 1 min, anelamento dos primers a 56°C por 1 min e extensão do DNA a 72°C por 45 s com extensão final a 72°C por 7 min. O primeiro e segundo round da PCR foram realizados em 35 ciclos sob as mesmas condições anteriores.

Para cada amplificação, um controle positivo e um controle negativo de MVV cepa K1514 foram utilizados em paralelo com as amostras. Após a amplificação, os produtos de PCR foram separados por eletroforese em gel de agarose a 1% contendo brometo de etídio em tampão Tris-Acetato-EDTA (TAE) e visualizados em um transiluminador.

Para a preparação das lâminas e posterior análise histopatológica, os fragmentos pulmonares foram desidratados em séries crescentes de etanol, diafanizados e incluídos em parafina para obtenção de cortes seriados à espessura de 4µm, após esse

procedimento as lâminas foram coradas pela técnica da Hematoxilina-Eosina (HE) e em seguida, examinadas ao microscópio óptico. A análise histopatológica foi realizada por apenas um observador, onde este avaliou as principais lesões representativas do vírus.

A gravidade das lesões foi classificada de acordo Benavides et al. (2006), onde esta foi adaptada, no qual utilizou-se critérios previamente estabelecidos: pulmões sem lesões (-), com lesões discretas (+), com lesões moderadas (++) e com lesões graves (+++).

Para construção do TMA foram selecionadas, nas lâminas histopatológicas, três áreas de interesse, na qual continham lesões representativas do vírus. A seguir, essas áreas selecionadas foram circundadas com uma caneta marcadora permanente.

Como se fosse à imagem de um espelho, os blocos de parafina foram colocados sobre os respectivos cortes histológicos nas lâminas, e a mesma área, previamente marcada em cada uma das lâminas histológicas foi marcada nos blocos de parafina com a caneta marcadora, sendo que estes passaram a ser denominados de blocos doadores.

Após escolhidas às três áreas de cada um dos blocos, os números correspondentes a cada amostra foram ordenados de acordo com um protocolo de montagem, os quais serviram de guia para a ordenação do TMA (Fig. 1). Só a partir desse procedimento o material foi para a confecção dos blocos de TMA.

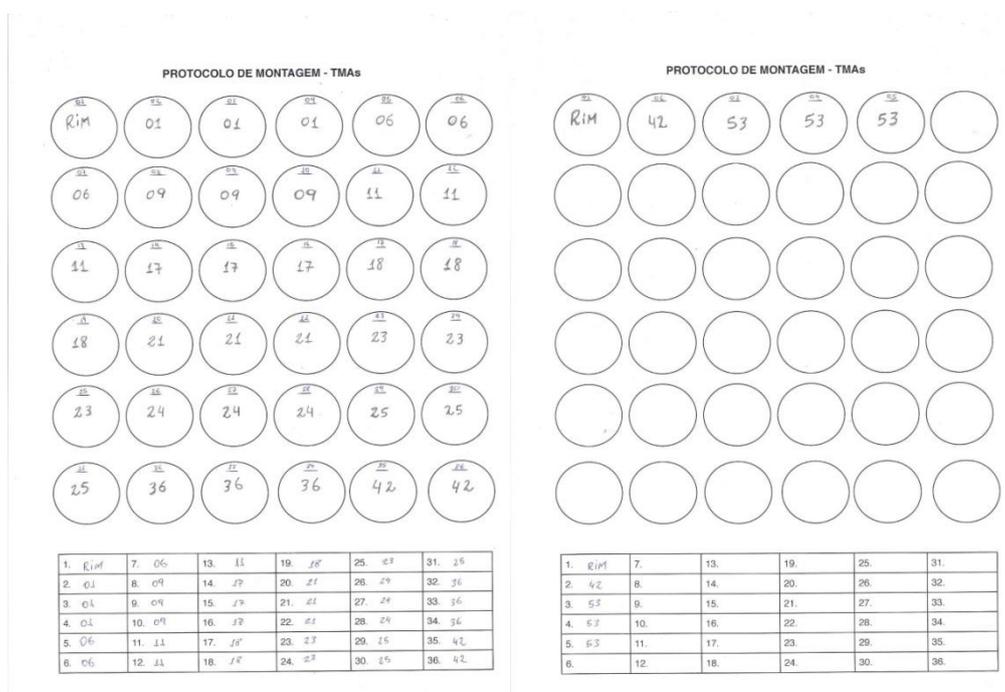


Figura 1. Guia de montagem dos *tissuemicroarrays*.

A construção dos blocos de TMA seguiu a técnica preconizada por Kononenet al. (1998), modificada, no qual foram confeccionados novos blocos de parafina, a partir de um bloco molde contendo 36 poços de 2,0 mm de diâmetro, esse foi denominado de bloco receptor. Com o uso de agulhas de biópsia de 2,0 mm de diâmetro foram retirados três cilindros dos blocos doadores que continham lesões representativas do vírus, totalizando 39 cilindros. Para guiar a leitura no microscópio foram retirados dois cilindros de amostras de tecidos diferente dos utilizados no trabalho. Por fim, os cilindros foram distribuídos em dois blocos receptores, com espaçamentos de 2,2 mm entre os centros dos cilindros.

Após a confecção dos blocos de TMA, esses foram seccionado em micrótomo com 4µm de espessura. Os cortes obtidos foram aderidos em lâminas silanizadas e identificados. Após esse procedimento, as lâminas foram coradas com Hematoxilina de Harris para demonstração da qualidade das amostras obtidas para o TMA. Em seguida, os demais cortes histológicos foram encaminhados para a imunohistoquímica.

Para a realização da imunohistoquímica as lâminas de TMA foram levadas a estufa a 65°C por 30 min. Posteriormente, os cortes foram desparafinizados e reidratados. Foram colocados em imersão em dois banhos de xileno, sendo o primeiro e o segundo por 10 min cada, seguidos por mais três banhos de 5 min em etanol absoluto, 5 min em álcool a 95% e 10 min em álcool a 70% e posteriormente lavadas em de 0,1M tampão fosfato salino (PBS, pH 7,2) por mais 5 min.

A recuperação antigênica foi realizada por aquecimento da amostra em tampão de citrato 10mM (pH 6,0) em banho maria por 30 min em 96°C. Posteriormente, as lâminas foram resfriadas por 20 min, ainda no tampão, e lavadas em PBS por 5 min.

Após a recuperação antigênica foi realizado o bloqueio da peroxidase endógena em banho de 3% de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> diluído em água destilada durante 10 min. Em seguida, os cortes foram lavados por duas vezes em PBS por 5min, seguido do bloqueio com leite desnatado (Molico®) a 5% durante 30 min.

Foi realizado a incubação com o anticorpo primário (soro de animal positivo para MVV cedido pela Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária ovinos e caprinos) diluído em 1:10 a temperatura ambiente durante 60 min.

Em seguida, procedeu-se sem a lavagem das lâminas com a incubação do anticorpo policlonal IgG anti-ovino conjugado a peroxidase (Sigma Chemical Co) diluído a 1:100, durante 30 min. Após, as lâminas foram lavadas duas vezes em PBS por 5min.

Para a revelação foi utilizado 3,3'-Diaminobenzidine (DAB) (Sigma ChemicalCo) durante 2min, sendo posteriormente, lavados em água da torneira. Após, os cortes foram contracorados em Hematoxilina de Harris, desidratados e montados com lamínula e resina.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

Das 13 amostras selecionadas para o estudo histopatológico, as lesões microscópicas mais frequentes foram presença de edema, inflamação crônica, hemorragias, hipertrofia das fibras musculares lisas, hiperplasia do BALT, congestão, atelectasia e a presença de macrófagos alveolares. Estas lesões foram descritas de acordo com a gravidade como verificada na Tab. 1.

Tabela 1. Principais lesões histopatológicas pulmonares representativas do MVV, de acordo com sua gravidade. Pulmões sem lesões (-), com lesões discretas (+), com lesões moderadas (++) e com lesões graves (+++).

Amostras (Pulmões)	Edema	Inflamação Crônica	Hemorragia	Hipertrofia das fibras musculares lisas	Hiperplasia do BALT	Congestão	Atelectasia	Macrófagos Alveolares
01	(-)	(+++)	(+)	(++)	(+)	(+)	(+)	(++)
06	(-)	(-)	(++)	(-)	(-)	(+)	(+)	(+)
09	(+)	(+++)	(+)	(++)	(+)	(+)	(+)	(+)
11	(+)	(-)	(++)	(+)	(++)	(+)	(+)	(-)
17	(+)	(+)	(+)	(+)	(-)	(+)	(+)	(+)
18	(-)	(-)	(+)	(++)	(+)	(+)	(+)	(+)
21	(-)	(+)	(+)	(-)	(++)	(+)	(+)	(+)
23	(+)	(+)	(-)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)
24	(+)	(+)	(+)	(-)	(+)	(+)	(+)	(+)
25	(-)	(-)	(-)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)
36	(++)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)
42	(+)	(+)	(+)	(-)	(-)	(+)	(+)	(+)
53	(+)	(-)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)

Estes achados são semelhantes aos encontrados por Araújo *et al.*, 2004 em pulmão de ovinos positivos para MVV coletados em abatedouro, cuja principais lesões histopatológicas foram espessamento dos septos interalveolares, áreas de atelectasia e agregado linfóide.

Outros autores também verificaram alterações histopatológicas compatíveis com o vírus presentes neste trabalho como leucócitos no espaço perivascular; hiperplasia nas áreas ao redor dos vasos, brônquios e bronquíolos; espessamento do septo interalveolar causando uma pneumonia intersticial, hiperplasia do músculo liso das vias aéreas

terminais e áreas de atelectasia (Georgsson and Pálsson, 1971, Angelopoulou *et al.*, 2006, Benavides *et al.*, 2006, Aziziet *al.*, 2012).

As alterações como hipertrofia das fibras musculares lisas, congestão e atelectasia foram evidenciadas em todos os pulmões. Identificou-se também, uma moderada hiperplasia do músculo liso (Fig. 2A) e células de revestimento dos alvéolos sendo substituído por epitélio cuboide (Fig. 2B).

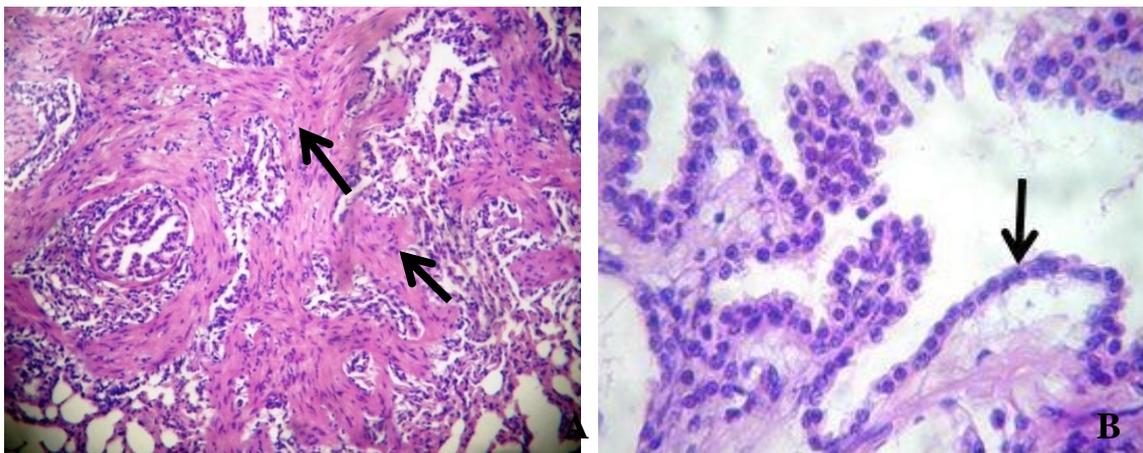


Figura 2. A - Fotomicrografia evidenciando a hiperplasia do músculo liso (Setas). M.O. 200X.(H&E). B - Fotomicrografia das células de revestimento dos alvéolos tumefeitas e tornando-se cubóides (Seta). M.O. 400X. (H&E). Laboratório Bio-Ciência, Fortaleza, Ceará, 2013.

Esses achados corroboram com os relatados por Jones (2000), que observou em ovinos infectados com o MVV a perda da elasticidade e da compressibilidade, como também a cor acinzentada, causadas por um grande aumento na espessura das paredes alveolares. A musculatura lisa dos dutos alveolares hiperplásica e as células de revestimento dos alvéolos sofrendo tumefação e tornando-se cuboide.

Apesar dos achados histopatológicos serem compatíveis com lesões causadas pelo vírus Maedi-Visna, outras enfermidades pulmonares também podem apresentar as mesmas características como as pneumonias causadas por nematoides e micoplasma, adenomatose pulmonar, pneumonia exudativas causadas por infecções bacterianas secundárias (Aziziet *al.*, 2012). Assim, é necessário um diagnóstico definitivo da doença associando as lesões histopatológicas microscópicas em conjunto com um histórico clínico, bem como testes sorológicos e técnicas moleculares (Christodouloupolos, 2006).

Dentre as amostras pulmonares analisadas através da imunohistoquímica, os pulmões 11, 17 e 24 foram positivos para a técnica como verificado na tab. 2.

Tabela 2. Amostras pulmonares positivas e negativas para o teste de imunohistoquímica em comparação com a técnica de Nested-PCR

Amostras (pulmões)	Imunohistoquímica	Nested-PCR
01	negativo	positivo
06	negativo	negativo
09	negativo	negativo
11	positivo	positivo
17	positivo	positivo
18	negativo	negativo
21	negativo	negativo
23	negativo	positivo
24	positivo	negativo
25	negativo	negativo
36	negativo	positivo
42	negativo	negativo
53	negativo	negativo

A imunomarcção ocorreu no citoplasma de células localizadas no septo interalveolar. (Fig.3). Esse achado está de acordo com o obtido por Pereira (1995), Serakides et al. (1996), Preziuso et al. (2003) e Carrozza et al. (2003), os quais também obtiveram imunomarcção em células presentes no septo interalveolar e em outras não encontradas no presente trabalho como macrófagos. A imunomarcção de apenas uma célula encontra paralelo em relato de Blacklaw et al. (1994), no qual em fragmentos de pulmões coletados durante surtos de Maedi-Visna, apenas uma ou duas células antígeno-positivas eram encontradas por cortes corados pela técnica de imunohistoquímica. Em todas as etapas deste processo foram utilizadas lâminas controle de negativo para possível detecção de marcações inespecíficas do anticorpo secundário.

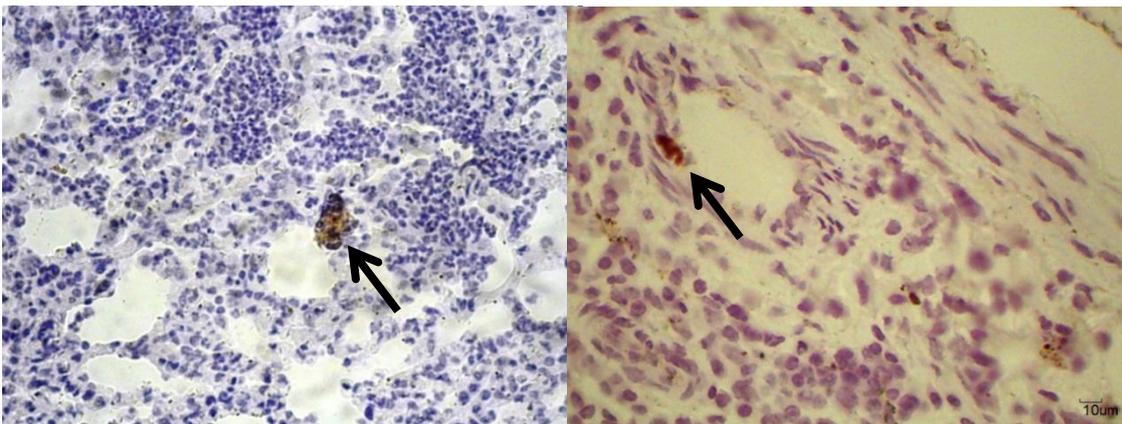


Figura 3 – Fotomicrografia da imunohistoquímica pela técnica de *tissuemicroarray* de pulmões ovino acometido de Maedi-Visna, contracoloração com Hematoxilina de Harris (Setas). M.O.400X.

A análise imunohistoquímica das amostras 1, 23 e 36 não apresentaram imunomarcações positivas para a presença do vírus Maedi-Visna, mesmo se tratando de amostras pulmonares nas quais este vírus foi detectado por Nested-PCR. Este fato pode estar associadas à limitação de análise desta técnica, por utilizar apenas uma parte do tecido coletado, como relatado por Andrade et al. (2007), em que a maior preocupação dos críticos na utilização do TMA é a representação da lesão, considerando a pequena amostra estudada.

### CONCLUSÕES

As lesões histopatológicas descritas foram sugestivas de Maedi-Visna. A análise de imunohistoquímica através da técnica de *tissuemicroarray* permitiu a demonstração indireta do agente viral em secções pulmonares de ovinos.

### AGRADECIMENTOS

A Universidade Estadual do Ceará por disponibilizar condições técnica e pessoal para realização deste trabalho. A Fundação Cearense de Apoio ao Desenvolvimento Científico e Tecnológico (FUNCAP), ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e a Financiadora de Estudos e Projetos (FINEP) pelo apoio financeiro. A Histologia das alterações provocadas por veneno de serpentes e plantas (HISTOVESP) e a Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (EMBRAPA)Caprinos e Ovinos pela colaboração.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ANGELOPOULOU, K.; BRELLOU, G. D.; VLEMMAS, I. Detection of maedi-visna virus in the kidneys of naturally infected sheep. *Journal of comparative pathology*, v. 134, n. 4, p. 329–35, 2006.
- ANDRADE, V. P. D.; CUNHA, I. W. D.; SILVA, E. M. D.; et al. O arranjo em matriz de amostras teciduais (*tissue microarray*): larga escala e baixo custo ao alcance do patologista. *Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial*, v. 43, p. 55–60, 2007.
- ANDRÉS, D. D.; KLEIN, D.; WATT, N. J.; et al. Diagnostic tests for small ruminant lentiviruses. *Veterinary microbiology*, v. 107, n. 1-2, p. 49–62, 2005.
- ARAÚJO, S. A. C.; DANTAS, T. V. M.; SILVA, J. B. A.; et al. Identificação do maedi-visna vírus em pulmão de ovinos infectados naturalmente. *Arquivos do Instituto Biológico*, v. 71, p. 431–436, 2004.
- AZIZI, S.; TAJBAKHS, E.; FATHI, F.; et al. Maedi in slaughtered sheep: a pathology and polymerase chain reaction study in southwestern Iran. *Tropical animal health and production*, v. 44, n. 1, p. 113–118, 2012.
- BENAVIDES, J.; GARCÍA-PARIENTE, C.; FUERTES, M.; et al. Maedi-visna: the meningoencephalitis in naturally occurring cases. *Journal of Comparative Pathology*, v. 140, n. 1, p. 1–11, 2009.
- BENAVIDES, J.; GARCÍA-PARIENTE, C.; GELMETTI, D.; et al. Effects of fixative type and fixation time on the detection of Maedi Visna virus by PCR and immunohistochemistry in paraffin-embedded ovine lung samples. *Journal of Virological Methods*, v. 137, n. 2, p. 317–24, 2006.
- BLACKLAWS, B.A.; BIRD, P.; ALLEN, D.; MCCONNELL, I. Circulating cytotoxic T lymphocyte precursors in maedi-visna virus infected sheep. *Journal of General Virology*, v.75, p.1589-1596, 1994.

BRODIE, S. J.; PEARSON, L.; ZINK, M.; et al. Ovine lentivirus expression and disease. Virus replication, but not entry, is restricted to macrophages of specific tissues. *American Journal Pathology*.v. 146, p. 250-263, 1995.

CARROZZA, M. L.; MAZZEI, M.; BANDECCHI, P.; et al. In situ PCR-associated immunohistochemistry identifies cell types harbouring the Maedi-Visna virus genome in tissue sections of sheep infected naturally. *Journal of Virology Methods*, v. 107, p. 121-127, 2003.

CASTRO, R.S. *Lentivírus de pequenos ruminantes: ensaios imunoenzimáticos, perfil sorológico e inferências filogenéticas*.1998. 90f. Tese (Doutorado em Ciência Veterinária) - Universidade Federal e Minas Gerais, Belo Horizonte.

CHRISTODOULOPOULOS, G. Maedi-Visna: Clinical review and short reference on the disease status in Mediterranean countries. *Small Ruminant Research*, v. 62, n. 1-2, p. 47-53, 2006.

DAGLEISH, M. P.; BENAVIDES, J.; CHIANINI, F. Immunohistochemical diagnosis of infectious diseases of sheep. *Small Ruminant Research*, v. 92, n. 1-3, p. 19-35, 2010.

DAWSON, M. Pathogenesis of maedi-visna. *Veterinary Record*. v. 120, p. 451-454, 1987.

GEORGSSON, G.; PÁLSSON, P. A. The Histopathology of Maedi: A Slow, Viral Pneumonia of Sheep. *Veterinary Pathology Online*, v. 8, p. 63-80, 1971.

JONES, T. C. (6ªEd). *Patologia Veterinária*. São Paulo: Manole, 2000. p341.

KONONEN, J.; BUBENDORF, L.; KALLIONIEMI, A.; et al. *Tissue microarrays* for high-throughput molecular profiling of tumor specimens. *Nat. Med*, v. 4, n. 7, p. 844-7, 1998.

POLLEDO, L.; GONZÁLEZ, J.; BENAVIDES, J.; et al. Patterns of lesion and local host cellular immune response in natural cases of ovine maedi-visna. *Journal of comparative pathology*, v. 147, n. 1, p. 1-10, 2012.

PREZIUSO, S.; TACCINI, E.; ROSSI, G.; et al. Experimental maedi visna virus infection in sheep: a morphological, immunohistochemical and PCR study after three years of infection. *European Journal of Histochemistry*, v.47, n.4, p.373-378, 2003.

PEREIRA, M.F. *Artrite-encefalite caprina a vírus (CAE) - estudo anatomopatológico e imuno-histoquímico em cabras naturalmente infectadas*. Belo Horizonte: 1995. 64f. (Mestrado em Ciência Veterinária) – Escola de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte.

RYAN, S.; TILEY, L.; MCCONNELL, I.; BLACKLAWS, B. Infection of Dendritic Cells by the Infection of Dendritic Cells by the Maedi-Visna Lentivirus. *Journal of Virology*, v. 74, n. 21, p. 10096–10103, 2000.

SALTARELLI, M.; QUERAT, G.; KONINGS, D. A.; et al. Nucleotide sequence and transcriptional analysis of molecular clones of CAEV which generate infectious virus. *Virology*, 179:347–364, 1990.

SIGURDSSON, B.; PALSSON, P.; GRIMSSON, H. Visna, a demyelinating transmissible disease of sheep. *Journal of Neuropathology & Experimental Neurology*, v. 16, n. 3, p. 389-403, 1957.

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 Medicina Veterinária Zootecnia*, v.48, n.4, p.415-424, 1996.

## 6 CONCLUSÕES

1. A imunohistoquímica realizada pela técnica de *tissuemicroarray* poderá ser útil como método no auxílio do diagnóstico da doença, pois essa se utiliza de um grande número de amostra e pequena quantidade de reagente.

2. As imunomarcações obtidas pela técnica de *tissuemicroarray* foram específicas demonstrando indiretamente o agente viral em secções pulmonares de ovinos.

## 7 PERSPECTIVAS

São necessários novos estudos que visem aperfeiçoar o uso da técnica de *tissuemicroarray* para a identificação do agente viral em tecido pulmonar, sendo este trabalho segundo a literatura consultada, o pioneiro na detecção do vírus Maedi-Visna em pulmões ovinos.

São necessários mais estudos comparando resultados adquiridos, a partir, de amostras frescas, conservadas em formol e criopreservadas para a validação da técnica.

## 9 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADAMS, D. S.; KLEVJER-ANDERSON, P.; CARLSON, B. S.; MCGUIRE, T. C. Transmission and control of caprine arthritis-encephalitis virus. *American Journal Veterinary Research*, v. 44, p. 1670-1675, 1983.

ALMEIDA, N. C. Isolamento e identificação do vírus Maedi-Visna através de microscopia eletrônica de transmissão de animal comprovadamente soropositivo pelo IDGA. 2003. 68p. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal) – Faculdade de veterinária, Universidade Estadual do Ceará.

ANDRADE, V. P. D.; CUNHA, I. W. D.; SILVA, E. M. D.; AYALA, F.; SATO, Y.; FERREIRA, S. D. S.; NASCIMENTO, C. F.; SOARES, F. A. O arranjo em matriz de amostras teciduais (*tissuemicroarray*): larga escala e baixo custo ao alcance do patologista. *Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial*, v. 43, n. 1, p. 55–60, 2007.

ANDRÉS, D.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, n. 1-2, p. 49–62, 2005.

ANGELOPOULOU, K.; BRELLOU, G. D.; VLEMMAS, I. Detection of maedi-visna virus in the kidneys of naturally infected sheep. *Journal of comparative pathology*, v. 134, n. 4, p. 329–335, 2006.

ARAÚJO, S. A. C. Estudo histológico de pulmões de ovinos sorologicamente positivos para Maedi-Visna. 2004. 78p. Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias) - Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinária, Universidade Estadual do Ceará, Fortaleza

ARAÚJO, S. A. C.; DANTAS, T. V. M.; SILVA, J. B. A.; RIBEIRO, A. L.; RICARTE, A. R. F.; TEIXEIRA, M. F. S. Identificação do maedi-visna vírus em pulmão de ovinos infectados naturalmente. *Arquivos do Instituto Biológico*, v. 71, p. 431–436, 2004.

AZIZI, S.; TAJBAKSHI, E.; FATHI, F.; ORYAN, A.; MOMTAZ, H.; GOODARZI, M. Maedi in slaughtered sheep: a pathology and polymerase chain reaction study in southwestern Iran. *Tropical animal health and production*, v. 44, n. 1, p. 113–118, 2012.

BENAVIDES, J.; GARCÍA-PARIENTE, C.; FUERTES, M.; FERRERAS, M. C.; GARCÍA-MARÍN, J. F.; JUSTE, R. A.; PEREZ, V. Maedi-visna: the

meningoencephalitis in naturally occurring cases. *Journal of Comparative Pathology*, v. 140, n. 1, p. 1–11, 2009.

BENAVIDES, J.; GARCÍA-PARIENTE, C.; GELMETTI, D.; FUERTES, M.; FERRERAS, M. C.; GARCÍA-MARÍN, J. F.; PEREZ, V. Effects of fixative type and fixation time on the detection of Maedi Visna virus by PCR and immunohistochemistry in paraffin-embedded ovine lung samples. *Journal of Virological Methods*, v. 137, n. 2, p. 317–24, 2006.

BERTONI, G.; ZAHNO, M. L.; ZONONI, R.; VOGT, H. R.; PETERHANS, E.; RUFF, G.; CHEEVERS, W. P.; SONIGO, P.; PANCINO, G. Antibody reactivity to the immunodominant epitopes of the caprine arthritis-encephalitis virus gp 38 transmembrane protein associates with the development of arthritis. *Journal Virology*, v. 68, p. 7139-7147, 1994.

BLACKLAWS, B. A.; BERRIATUA, E.; TORSTEINSDOTTIR, S.; WATT, N. J.; ANDRES, D. DE.; 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. 359–69, 2012.

BLACKLAWS, B. A.; BIRD, P.; ALLEN, D.; MCCONNELL, I. Circulating cytotoxic T lymphocyte precursors in maedi-visna virus-infected sheep. *Journal General of Virology*, v. 75, p. 1589-1596, 1994.

BRASILEIRO FILHO, G.; BARBOSA, A. J. A.; MIRANDA, D. Métodos de estudo em patologia. In: BRASILEIRO FILHO, G. Bogliolo Patologia. Guanabara Koogan, 2000. 6-18.

BRAUN, M. J.; CLEMENTS, J.E.; GONDA, M. A. The visna virus genome: evidence for a hypervariable site in the env gene and sequence homology among lentivirus envelope proteins. *Journal of Virology*, v. 61, n. 12, p. 4046–4054, 1987.

BRODIE, S. J.; CONCHA-BERMEJILLO, A.; SNOWDER, G. D. Current concepts in the epizootiology, diagnosis, and economic importance of ovine progressive pneumonia in North America: a review. *Small Ruminant Research*, v. 27, p. 1-17, 1998.

BRODIE, S. J.; PEARSON, L. D.; ZINK, M. C.; BICKLE, H. M.; ANDERSON, B. C.; MARCOM, K. A.; DEMARTINI, J. C. Ovine lentivirus expression and disease. *Virus*

replication, but not entry, is restricted to macrophages of specific tissues. *American Journal Pathology*, v. 146, p. 250-263, 1995.

BURKALA, E. J.; NARAYANI, I.; HARTANINGSIH, N.; KERTAYADNYA, G.; BERRYMAN, D. I.; WILCOX, G. E. Recombinant Jembrana disease virus proteins as antigens for the detection of antibody to bovine lentiviruses. *Journal of Virological Methods*, v. 74, n. 1, p. 39–46, 1998.

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 Virology Methods*, v. 107, p. 121-127, 2003.

CASTRO, R.S. *Lentivírus de pequenos ruminantes: ensaios imunoenzimáticos, perfil sorológico e inferências filogenéticas*. 1998. 90f. Tese (Doutorado em Ciência Veterinária) - Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte.

CALLADO, A. K. C.; CASTRO, R. S.; TEIXEIRA, M. F. S. Lentivírus de pequenos ruminantes (CAEV e Maedi-visna): revisão e perspectivas. *Pesquisa Veterinária Brasileira*, v. 21, n. 3, p. 87–97, 2001.

CAPUCCHIO, M. T.; SANNA, E.; SANNA, M. P.; FARIGU, S.; MINELLI, R.; GUARDA, F. Maedi-Visna Virus Detection in Ovine Third Eyelids. *Journal of Comparative Pathology*, v. 129, n. 1, p. 37–43, 2003.

CAREY, N.; DALZIEL, R. G. The biology of Maedi-Visna virus - an overview. *British Veterinary Journal*, v. 149, p. 437–454, 1993.

CHEEVERS, W.; MCGUIRE, T.; NORTON, L. K.; CORDERY-COTTER, R.; KNOWLES, D. Failure of neutralizing to regulate CAE lentivirus expression *in vivo*. *Virology*, v. 196, p. 835-839, 1993.

CHRISTODOULOPOULOS, G. Maedi-Visna: Clinical review and short reference on the disease status in Mediterranean countries. *Small Ruminant Research*, v. 62, n. 1-2, p. 47–53, 2006.

CLEMENTS, J. E.; ZINK, M. C. Molecular biology and pathogenesis of animal lentivirus infections. *Clinical Microbiology reviews*, v. 9, n. 1, p. 100–17, 1996.

CRAWFORD, T. B.; ADAMS, D. S.; CHEEVERS, W. P.; CORK, L. C. Chronic arthritis in goats caused by a retrovirus. *Science*, v. 207, p. 997-999, 1980.

CORTEZ-ROMERO, C.; PELLERIN, J. L.; ALI-AL-AHMAD, M. Z.; CHEBLOUNE, Y.; GALLEGOS-SÁNCHEZ, J.; LAMARA, A.; PÉPIN, M.; FIENI, F. The risk of small ruminant lentivirus (SRLV) transmission with reproductive biotechnologies: state-of-the-art review. *Theriogenology*, v. 79, n. 1, p. 1-9, 2012.

CUTLIP, R. C.; LEHMKUHL, H. D.; SCHMERR, M. J.; BROGDEN, K. A. Ovine progressive pneumonia (maedi-visna) in sheep. *Veterinary Microbiology*, v. 17, n. 3, p. 237-50, 1988.

CUTLIP, R. C.; JACKSON, T. A.; LAIRD, G. A. Immunodiffusion test for ovine progressive pneumonia. *American Journal Veterinary Research*, v. 38, p. 1081- 1084, 1977.

DAGLEISH, M. P.; BENAVIDES, J.; CHIANINI, F. Immunohistochemical diagnosis of infectious diseases of sheep. *Small Ruminant Research*, v. 92, n. 1-3, p. 19-35, 2010.

DAL PIZZOL, M.; RAVAZZOLO, A. P.; GONÇALVES, I. P. D.; HOTZEL, I.; FERNANDES, J. C. T.; MOOJEN, V. Maedi-Visna: evidência de ovinos infectados no Rio Grande do Sul, Brasil, 1987-1989. *Arquivos da Faculdade de Veterinária UFRGS*, v. 17, p. 65-76, 1989.

DAWSON, M. Pathogenesis of maedi-visna. *Veterinary Record*. v. 120, p. 451-454, 1987.

DANIEL, M. D.; KING, N. W.; LETVIN, N. L. A new type D retrovirus isolated from macaques with an immunodeficiency syndrome. *Science*, v. 223, p. 602-605, 1984.

DANTAS, T. V. M. Desenvolvimento e padronização de ELISA indireto para diagnóstico de Maedi-Visna vírus de ovinos. 2004. 77p. Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias) - Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinária, Universidade Estadual do Ceará, Fortaleza, 2004.

DANTAS, T. V. M.; ARAÚJO, S. A. C.; SILVA, J. B. A.; RICARTE, A. R. F.; TEIXEIRA, M. F. Formas de diagnóstico da Maedi-Visna. *Ciência Animal*, v. 15, n. 2, p. 89-97, 2005.

DE LA CONCHA-BERMEJILLO, A. Maedi-Visna and ovine progressive pneumonia. *Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice*, v. 13, n. 1, p. 13-33, 1997.

FIELDS, B. N.; KNIPE, D. M.; HOWLEY, P. M.; CHANOCK, R. M.; MELNICK, J.L.; MONATH, T. P.; ROIZMAN, B.; STRAUS, S. E. Retroviridae: The viruses and their replication. *Fields Virology. Lippincott-Raven*, v. 1, p. 1767-1847, 1996.

GEORGSSON, G.; PÁLSSON, P. A. The Histopathology of Maedi: A Slow, Viral Pneumonia of Sheep. *Veterinary Pathology Online*, v. 8, p. 63–80, 1971.

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

GONDA, M. A.; BRAUN, M. J.; CARTER, S. G. Characterization and molecular cloning of a bovine lentivirus related to human immunodeficiency virus. *Nature*, v. 330, p. 388-395, 1987.

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

HAASE, A. T.; GARAPIN, A. C.; FARAS, A. J.; VARMUS, H. E., BISHOP, J. M. Characterization of nucleic acid of the visna virus RNA dependent DNA polymerase. *Virology*, v. 57, p. 251-258, 1974.

HSU, F. D.; O NIELSEN, T.; ALKUSHI, A.; DUPUIS, B.; HUNTSMAN, D.; LIU, C. L.; RIJN, M. V.; GILKS, C. B. Tissue Microarrays Are an Effective Quality Assurance Tool for Diagnostic Immunohistochemistry. *Modern Pathology*, v.15, n.12, p.1374–1380, 2002.

IBGE. Produção da Pecuária Municipal. v. 38, p. 1–61, 2010.

IBGE. Produção da Pecuária Municipal. v. 39, p. 1–60, 2011.

ICTV. International Committee on Taxonomy of Viruses. 2012. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/ICTVdb/Ictv/index.htm>> Acesso em 20 jul. 2013.

JONES, T. C.; HUNT, R. D.; KING, N. W. Patologia Veterinária. 6a ed. São Paulo: Manole. 2000. p. 341.

KATSOULOS, P. D.; CHRISTODOULOPOULOS, G.; KONTOPIDIS, G.; MINAS, A.; TZIVARA, A.; KRITAS, S. K. Leukocyte counts in bronchoalveolar lavage fluid obtained from normal and Maedi-Visna-infected sheep. *Veterinary Clinical Pathology*, v. 38, n. 3, p. 397–402, 2009.

KNOWLES, D. P. JR. Laboratory diagnostic tests for Retrovirus infections of small ruminants. *Veterinary Clinical North American: Food Animal Practices*, v. 13, p. 1-11, 1997.

KONONEN, J.; BUBENDORF, L.; KALLIONIEMI, A.; BÄRLUND, M.; SCHRAML, P.; LEIGHTON, S.; TORHORST, J.; MIHATSCH, M. J.; SAUTER, G.; KALLIONIEMI, O. P. *Tissue microarrays* for high-throughput molecular profiling of tumor specimens. *Nature Medicine*, v. 4, n. 7, p. 844-7, 1998.

LAGO, N.; LÓPEZ, C.; PANADERO, R.; CIENFUEGOS, S.; PATO, J.; PRIETO, A.; DÍAZ, P.; MOURAZOS, N.; FERNÁNDEZ, G. Seroprevalence and risk factors associated with Visna/Maedi virus in semi-intensive lamb-producing flocks in northwestern Spain. *Preventive veterinary medicine*, v. 103, n. 2-3, p. 1–7, 2012.

LAIRMORE, M. D.; POULSON, J. M.; ADDUCCI, T. A.; DEMARTINI, J. C. Lentivirus-induced lymphoproliferative disease. Comparative pathogenicity of phenotypically distinct ovine lentivirus strains. *The American Journal of Pathology*, v. 130, n. 1, p. 80–90, 1988.

LEE, W. C.; MCCONNELL, I.; BLACKLAWS, B. A. Electron microscope studies of the replication of a British isolate of maedi visna virus in macrophages and skin cell lines. *Veterinary Microbiology*, v. 49, n. 95, p. 93–104, 1996.

LEE, W. C.; MCCONNELL, I.; BLACKLAWS, B. A. Cytotoxic activity against maedi-visna virus-infected macrophages. *Journal of Virology*, v. 68, n. 12, p. 8331–8338, 1994.

LEROUX, C.; CORDIER, G.; MERCIER, I.; CHASTANG, J.; LYON, M.; QUÉRAT, G.; GREELAND, T.; VIGNE, R.; MORNEX, J. F. Ovine aortic smooth muscle cells allow the replication of visna-maedi virus in vitro. *Archives Virology*, v. 140, p. 1-11, 1995.

LEROUX, C.; MORNEX, J.F. Retroviral infections in sheep and the associated diseases. *Small Ruminant Research*, v. 76, n. 1-2, p. 68–76, 2008.

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

MACKENZIE, R. W.; OLIVER, R. E.; ROONEY, J. P. A successful attempt to raise goat kids free of infection with caprine arthritis encephalitis virus in an endemically infected goat herd. *New Zealand Veterinary Journal*, v. 35, p. 184-186, 1987.

MOOJEN, V. Maedi-Visna dos ovinos. In: RIET-CORRÊA, F. Doenças de Ruminantes e Eqüinos. São Paulo: Varela, v.1, p. 138-144, 2001.

NARAYAN, O.; CLEMENTS, J. E. Biology and pathogenesis of lentiviruses. *The Journal of General Virology*, v. 70, p. 1617-39, 1989.

NARAYAN, O.; CLEMENTS, J. E.; STRANDBERG, J. D.; CORK, L. C.; GRIFFIN, D. E. Biological characterization of the virus causing leukoencephalitis and arthritis in goats. *Journal General of Virology*, v. 50, n. 1, p. 69-79, 1980.

PALSSON, P. A. Maedi-visna in sheep. *Slow Virus Diseases of Animal and Man*, Kimberlin R.H ed. Amsterdam, p. 17-43, 1976.

PATEL, J. R.; HELDENS, J. G. M.; BAKONYI, T.; RUSVAI, M. Important mammalian veterinary viral immunodiseases and their control. *Vaccine*, v. 30, n. 10, p. 1767-1781, 2012.

PAWLISCH, R. A.; MAES, R. K. Caprine arthristis-encephalitis virus isolated from Michigan goats. *American Journal Veterinary Research*, v. 45, p. 1808-1811, 1984.

PEREIRA, M. J. Estudo da infecção pelos lentivírus dos pequenos ruminantes em caprinos de Trás-os-Montes e Alto Douro. Vila Real, 2009. 73p. Dissertação (Ciências Veterinárias) - Mestrado Integrado em Medicina Veterinária, Universidade de Trás-os-Montes e Alto Douro.

PEREIRA, M.F. *Artrite-encefalite caprina a vírus (CAE) - estudo anatomopatológico e imuno-histoquímico em cabras naturalmente infectadas*. Belo Horizonte: 1995. 64f. (Mestrado em Ciencia Veterinária) – Escola de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte.

PETERHANS, E.; GREENLAND, T.; BADIOLA, J.; HARKISS, G.; BERTONI, G.; AMORENA B.; ELIASZEWICZ, M.; JUSTE, R. A.; KRAßNIG, R.; LAFONT, J. P.;

LENIHAN, P.; PÉTURSSON, G.; PRITCHARD, G.; THORLEY, J.; VITU, C.; MORNEX, J. F.; PÉPIN, M. Routes of transmission and consequences of small ruminant lentiviruses ( SRLVs ) infection and eradication schemes. *Veterinary Research.*, v. 35, p. 257–274, 2004.

PINHEIRO, R. R. Vírus da artrite encefalite caprina: Desenvolvimento e padronização de ensaios imunoenzimáticos (ELISA e *Dot-Blot*) e estudo epidemiológico no Estado do Ceará. Belo Horizonte, 2001. 115p. Tese (Doutorado em Ciência Animal) – Escola de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais.

POLLEDO, L.; GONZÁLEZ, J.; BENAVIDES, J.; MORALES, S.; MARTÍNEZ-FERNÁNDEZ, B.; DELGADO, L.; REINA, R.; GLARIA, I.; PÉREZ, V.; FERRERAS, M. C.; GARCÍA MÍRIAN, J. F. Patterns of lesion and local host cellular immune response in natural cases of ovine maedi-visna. *Journal of Comparative Pathology*, v. 147, n. 1, p. 1–10, 2012.

PREZIUSO, S.; MAGI, G. E.; VALENTE, C.; CUTERI, V. Detection of the Maedi Visna Virus in the popliteal lymph nodes of sheep infected by the respiratory route. *Veterinary Research Communications*, v. 33, p. 153–155, 2009.

PREZIUSO, S.; TACCINI, E.; ROSSI, G.; RENZONI, G.; BRACA, G. Experimental Maedi Visna Virus Infection in sheep: a morphological, immunohistochemical and PCR study after three years of infection. *European Journal of Histochemistry*, v. 47, n. 4, p. 373–8, 2003.

PÉPIN, M.; VITU, C.; RUSSO, P.; MORNEX, J. F.; PETERHANS, E. Maedi-visna virus infection in sheep: a review. *Veterinary Research*, v. 29, n. 3-4, p. 341–67, 1998.

REINA, R.; BERRIATUA, E.; LUJÁN, L.; JUSTE, R.; SÁNCHEZ, A.; ANDRÉS, D. D.; AMORENA, B. Prevention strategies against small ruminant lentiviruses: an update. *The Veterinary Journal*, v. 182, n. 1, p. 31–7, 2009.

REYBURN, T. H.; ROY, J. D.; BLACKLAWS, A. B.; SARGAN, R. D.; WATT, J. N.; MCCONNELL, I. Characteristics of the T cell-mediated immune response to maedivisna virus. *Virology*, v. 191, p. 1009-1012, 1992.

RODRIGUES, A. S. Padronização e utilização de testes sorológicos como ferramentas para controle da artrite encefalite caprina em rebanho leiteirosemi-intensivo. 2012. 88p. Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias) - Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinária, Universidade Estadual do Ceará, Fortaleza.

ROCHA, R. M.; ANDRADE, V. P.; NUNES, C. B.; ROCHA, G. F. S.; SANCHES, F. S. F.; OLIVEIRA, F. N.; GOBBI, H. Construção de arrays de tecido com equipamento alternativo e de baixo custo para estudo imuno-histoquímico de tumores mamários. *Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial*, v. 42, n. 6, p. 477-82, 2006.

RYAN, S.; TILEY, L.; MCCONNELL, I.; BLACKLAWS, A. B. Infection of Dendritic Cells by the Infection of Dendritic Cells by the Maedi-Visna Lentivirus. *Journal of Virology*, v. 74, n. 21, p. 10096–10103, 2000.

SALTARELLI, M.; QUERAT, G.; KONINGS, D. A.; VIGNE, R.; CLEMENTS, J. E. Nucleotide sequence and transcriptional analysis of molecular clones of CAEV which generate infectious virus. *Virology*, v.179, p.347-64, 1990.

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 Medicina Veterinária Zootecnia*, v.48, n.4, p.415-424, 1996.

SILVA, J. B. A.; LIMA, P. M. Lentivírus de Pequenos Ruminantes: caracterização etiológica, infectividade, controle, prevenção e diagnóstico. *Acta Veterinaria Brasilica*, v. 1, p. 111–117, 2007.

SIGURDSSON, B.; PALSSON, P.; GRIMSSON, H. Visna, a demyelinating transmissible disease of sheep. *Journal of Neuropathology & Experimental Neurology*, v. 16, n. 3, p. 389-403, 1957.

SIGURDSSON, B. Observations on three slow infections of sheep. Maedi, paratuberculosis, rida a slow encephalitis of sheep with general remarks on infections which develop slowly and some of their special characteristics. *Brazilian Veterinary Journal*, v. 110, p. 255, 1954.

SIGURDSSON, B.; THORMAR, H.; PALSSON, P. A. Cultivation of visna virus in tissue culture. *Archives Gesante Virusforsch*, v. 10, p. 368-381, 1960.

SMALL, J. A.; BIEBERICH, C.; GHOTBI, Z.; HESS, J.; SCANGOS, G. A.; CLEMENTS, J. E. The Visna Virus Long Terminal Repeat Directs Expression of a Reporter Gene in Activated Macrophages, Lymphocytes, and the Central Nervous Systems of Transgenic Mice. *Journal of Virology*, v. 63, n. 5, p. 1891–1896, 1989.

STRAUB, O. C. Maedi – Visna virus infection in sheep . *History and present knowledge. Comparative Immunology, Microbiology & Infectious Diseases*, v. 27, p. 1–5, 2004.

TEIXEIRA, M. F. S.; VERONIQUE, L.; MSELLI-LAKAHL, L.; CHETTAB, A.; CHEBLOUNE, Y.; MORNEX, J. F. Immortalization of caprine fibroblasts permissive for replication of small ruminant lentiviruses. *American Journal Veterinary Research*, v. 56, n. 6, p. 579-584, 1997.

VAREA, R.; MONLEON, E.; PACHECO, C.; LUJAN, L.; BOLEA, R.; VARGAS, M. A.; VAN EYNDE, G.; SAMAN, E.; DICKSON, L.; HARKISS, G.; AMORENA, B.; BADIOLA, J. J. Early detection of maedi-visna (ovine progressive pneumonia) virus seroconversion in field sheep samples. *Journal Veterinary Diagnostic Investigation*, v. 13, p. 301-307, 2001.

VASCONCELOS, A. C. Necropsia e remessa de material para laboratório em medicina veterinária. Brasília: MEC, 1988.

ZANONI, R. G. Phylogenetic analysis of small ruminant lentiviruses. *Journal General of Virology*, v. 79, p. 1951-1961, 1998.

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. 240–6, 2002.

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

ZINK, M.C.; NARAYAN, O.; KENNEDY, P. G. E.; CLEMENTS, J.E. Pathogenesis of visna/maedi and caprine arthritis-encephalitis: new leads on the mechanism of restricted virus replication and persistent inflammation. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, v. 15, p. 167–180, 1987.