



Universidade de Évora - Escola de Ciências e Tecnologia

Mestrado em Engenharia Zootécnica

Dissertação

**Análise genómica da resistência ao maedi-visna vírus em
ovelhas de raça sarda**

Giuseppe Tolu

Orientador(es) | Nicolò Pietro Paolo Macciotta

Évora 2021



Universidade de Évora - Escola de Ciências e Tecnologia

Mestrado em Engenharia Zootécnica

Dissertação

**Análise genómica da resistência ao maedi-visna vírus em
ovelhas de raça sarda**

Giuseppe Tolu

Orientador(es) | Nicolò Pietro Paolo Macciotta

Évora 2021



A dissertação foi objeto de apreciação e discussão pública pelo seguinte júri nomeado pelo Diretor da Escola de Ciências e Tecnologia:

Presidente | Nicolò Pietro Paolo Macciotta (Università degli Studi di Sassari)

Vogais | Antonello Cannas (Università degli Studi di Sassari)
Gianni Battacone (Università degli Studi di Sassari)
Ignazio Floris (Università degli Studi di Sassari)
Salvatore Pier Giacomo Rassu (Università degli Studi di Sassari)

Para minha Mãe e para meu Pai.

ÍNDICE

	PAG.
RESUMO	1
ABSTRACT	2
1. INTRODUÇÃO	3
1.1. Generalidades sobre a patologia	3
<i>1.1.1. Etiologia</i>	8
<i>1.1.2. Modalidades de transmissão</i>	21
<i>1.1.3. Aspectos clínicos</i>	24
<i>1.1.4. Diagnostico clinico e diagnostico de laboratório</i>	26
<i>1.1.5. Profilaxia</i>	31
1.2. Seleção para resistência a Maedi-Visna	36
<i>1.2.1. Relação entre o gene TMEM154 e a resistência genética a Lentivírus</i>	36
<i>1.2.2. Escolhas seletivas e programação de acoplamento</i>	42
<i>1.2.3. Comparação com seleção para resistência a Scrapie (ETS)</i>	46
1.3. Generalidades sobre estudos de associação genome-wide (GWAS)	49
2. MATERIAIS E MÉTODOS	54
2.1. Descrição do rebanho genómico (GG)	54
2.2. Testes serológicos (ELISA) para Maedi-Visna	56
2.3. Genome-wide association studies	61
2.4. Runs of Homozigosity	64
3. RESULTADOS	65
3.1. Genome-wide association studies	65
3.2. Regiões de homozigose	82
4. DISCUSSÃO	87
4.1. Genes encontrados através da análise GWAS	87
4.2. Genes encontrados através da análise ROH	95

5. CONCLUSÕES	96
6. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS	97
7. SITOGRAFIA	120

Análise genômica da resistência ao Maedi-Visna Vírus em ovelhas de raça Sarda

RESUMO

Maedi-Visna é um vírus difundido ao nível mundial que causa uma infecção persistente em ovinos com manifestações clínicas altamente variáveis, caracterizadas por lesões progressivas que afetam pulmões, úbere, articulações e sistema nervoso.

As causas da difusão da infecção na Itália parecem estar correlacionadas à importância que a ovinocultura tem assumido nas últimas décadas para atender ao aumento da demanda por laticínios, e conseqüentemente ao aumento do número de ovinos criados e da produtividade. Além disso, os sistemas agrícolas tradicionais têm contribuído para a propagação do vírus, pois são caracterizados principalmente pelo manejo semi-silvestre, às vezes com condições higiênicas inadequadas e uma troca contínua de animais de um rebanho para outro e de um país para outro, com escassos controles higiênico-sanitários. A prevalência muito alta do Maedi-Visna vírus em explorações de ovinos na Sardenha e sua alta variabilidade genética tornam-no um agente infeccioso potencialmente perigoso que merece a atenção dos profissionais de saúde, engenheiros zootécnicos e criadores.

No momento na Itália, ao contrário do que acontece com o vírus da artrite da encefalite caprina, devido à falta de colaboração dos criadores (que, não observando evidente piora das condições clínicas ou da produtividade dos animais, relutam em praticar qualquer tipo de intervenção) tem sido possível aplicar qualquer tipo de controle e erradicação, mas estão em andamento estudos sobre o assunto. Esta tese surge do desejo de expandir e demonstrar as estratégias para reduzir a prevalência da doença com base na seleção de ovelhas geneticamente resistentes ao Maedi-Visna Vírus em ovelhas de raça Sarda, que descrevi em "Strategie di Selezione genética per la resistenza al Maedi-Visna Virus negli ovini di razza Sarda", trabalho final da Licenciatura em Ciências Agro-Zootécnicas na Università degli Studi di Sassari. Especificamente, um estudo de associação foi realizado usando uma abordagem indireta e um desenho experimental "caso / controle". A positividade aos 12 meses (total de animais analisados: 893; Positivos: 389; Negativos: 504) e a positividade aos 36 meses (total de animais analisados: 986; Positivos: 956; Negativos) foram submetidos à análise GWAS. Os testes foram realizados em 43.390 SNPs autossômicos do Ovine SNP50 BeadChip, cujas posições correspondiam ao Ovine Genome Assembly v4.0. A análise do fenótipo AGE36 apresentou resultados interessantes e em linha com as informações conhecidas.

Palavras-chave: Maedi-Visna Virus; Lentivirus; GWAS; Resistência genética; Análise genômica.

Genomic analysis for resistance to Maedi-Visna Virus in Sardinian dairy sheep

ABSTRACT

Maedi-Visna is a virus widespread on a worldwide scale that determines a persistent infection in sheep characterized by progressive lesions borne by the lungs, breast, joints and nervous system.

The spread of the infection in our Country seems to be correlated with the relevance that the sheep and goat farming has taken over in the last decades to face the increasing in demand for dairy products, and therefore in the increase in the number of sheep raised and their productivity. In addition, traditional farming systems have contributed to the spread of the virus because they are characterized by semi-extensive management, sometimes with poor hygienic conditions and a continuous exchange of animals between flocks and between Countries, without hygienic-sanitary controls.

The very high prevalence of the Maedi-Visna virus in sheep farms in Sardinia and its high genetic variability make it a potentially dangerous infectious agent that deserves the attention of health workers, livestock and breeders. Actually in Italy, contrary to what happens for the Caprine Arthritis Encephalitis Virus, due to the non-cooperation of breeders (not observing any deterioration in clinical conditions or animal productivity, they are reluctant to do any kind of intervention) it has not been possible to apply any type of control and eradication, but researches on this topic are in progress.

This thesis stems from the desire to expand and demonstrate the strategies for reducing the prevalence of the disease based on the selection of sheep genetically resistant to the Maedi-Visna Virus in Sardinian sheep, which I described in "Genetic selection strategies for resistance Maedi-Visna Virus in Sardinian sheep", final work of the Bachelor's Degree in Agro-Zootechnical Sciences. Specifically, an association study was performed using an indirect approach and a "case / control" experimental design. The positivity at the age of 12 months (total animals analyzed: 893; Positive: 389; Negatives: 504) and the positivity at the age of 36 months (total animals analyzed: 986; Positive: 956; Negatives) were subjected to GWAS analysis. : 30). The tests were performed on 43,390 autosomal SNPs of the Ovine SNP50 BeadChip, whose positions corresponded to the Ovine Genome Assembly v4.0. The analysis on the AGE36 phenotype showed interesting results and in line with known information.

Keywords: Maedi-Visna Virus; Lentivirus; GWAS; genetic resistance; Genomic analysis.

1. INTRODUÇÃO

1.1. Generalidades sobre a patologia

A patologia Maedi-Visna, também conhecida como “Ovine Progressive Pneumonia” (Pasick, 1998), foi o primeiro membro de uma categoria de patologias descobertas e descritas por Björn Sigurdsson nel 1952: as infecções lentas (Blacklaws, 2008; Lunardini, 2005). Sigurdsson, primo diretor do Instituto Keldur (Instituto Experimental de Patologia, Universidade da Islândia), foi o primeiro a identificar um novo tipo de patologia em ovinos com evolução insidiosa, lenta e progressiva capaz de causar a morte nos animais afetados (Straub, 2002).

A infecção por Maedi-Visna (MV) foi introduzida na Islândia em 1933 com a importação de 20 carneiros de raça pura Karakul pelo Animal Breeding Department da Universidade de Halle localizado na Alemanha, com o objetivo de melhorar a produção (Blacklaws *et al.*, 2004; Maclachlan *et al.*, 2017; Luján *et al.*, 2019; Lunardini, 2005; Maiztegui, 2006; Minguijón *et al.*, 2015; Pasick, 1998; Peterhans *et al.*, 2004). No 1939 a patologia apareceu pela primeira vez em rebanhos islandeses, onde a transmissão do vírus foi fortemente favorecida pelo sistema de manejo do rebanho, que se caracterizava pelo abrigo de animais durante o período de inverno e pela troca de animais em feiras (Leginagoikoa, 2010).

No 1947, alguns estudos também realizados por Sigurdsson permitiram a identificação de uma forma pulmonar em indivíduos com pneumonia intersticial que ele definiu como Maedi e que em islandês indica dificuldades respiratórias, dispneia (Blacklaws, 2008; Luján *et al.*, 2019; Lunardini, 2005; Maiztegui, 2006). No 1957, o mesmo Sigurdsson identificou uma nova forma caracterizada por sintomas nervosos graves em indivíduos que sofrem de leucoencefalite desmielinizante. Ele chamou essa forma “Visna”, que em islandês indica pericimimento e afeção nervosa (Blacklaws, 2008; Luján *et al.*, 2019; Lunardini, 2005; Maiztegui, 2006). Os dois agentes etiológicos foram isolados e caracterizados nos anos seguintes como cepas de um único vírus com o nome de Maedi-Visna Virus (MVV) (Straub, 2002).

No 1923 o investigador Hadleigh Marsh identificou no Montana (USA) uma patologia pulmonar em ovinos que definiu como “Ovine Progressive Pneumonia” (OPP) e cujo agente etiológico foi isolado e julgado ser sobreposto ao do MVV no 1968 por Kennedy (Kennedy *et al.*, 1968; Pasick, 1998).

A patologia em questão é conhecida em todos os países do mundo com o nome de Maedi-Visna (MV), em homenagem aos primeiros investigadores islandeses (Straub, 2002).

No entanto, existem algumas exceções. Nos Estados Unidos da América (EUA) é conhecida como “Ovine Progressive Pneumonia”, na França como “la Bouhite”, na África do Sul como “Graaf Reinet disease” e como “Zwoegerziekte” na Holanda (Maclachlan *et al.*, 2017).

É possível afirmar com certeza que atualmente a infecção por Maedi-Visna é generalizada em escala global: casos foram identificados na Europa, América do Norte, África, Ásia, enquanto indivíduos seropositivos nunca foram encontrados na Austrália e Nova Zelândia; esta última foi oficialmente definida como livre do MVV seguindo planos nacionais de controle sorológico conduzidos em 1992 (Dousti *et al.*, 2019; Lunardini, 2005; Reina *et al.*, 2009). De acordo com a Organização Mundial de Saúde Animal (OIE - Organisation Internationale des Epizooties, World Organisation for Animal Health), Islanda, Nova Zelândia e Austrália, estão livres de SRLV (<1% dos rebanhos infectados com uma probabilidade de 99%) (Reina *et al.*, 2009).

No que diz respeito à propagação da doença na Europa, a infecção é generalizada em vários países, incluindo a França (diagnosticada em 1976 e introduzida cerca de 20 anos antes com a importação de ovelhas de raça Texel da Holanda (Blacklaws *et al.*, 2004)), Espanha, Alemanha, Hungria (diagnosticada pela primeira vez em 1972 e introduzida com a importação de carneiros de raça Suffolk e Hampshire da Grã-Bretanha (Blacklaws *et al.*, 2004)), Polónia, Holanda, Dinamarca (após a importação de cerca de 2500 ovelhas de raça Texel da Holanda entre 1955 e 1965 (Blacklaws *et al.*, 2004)), Noruega (após a importação de ovelhas de raça Texel da Dinamarca (Maiztegui, 2006)), Finlândia (após a importação de ovelhas da Suécia em 1981 (Blacklaws *et al.*, 2004)), Bélgica, Reino Unido, Turquia e Itália.

Na Islândia, após grandes perdas econômicas com a entrada da doença, planos de erradicação foram colocados em prática que permitiram a eliminação do vírus do País, que está incólume desde 1965 (Leginagoikoa, 2010).

Na Itália, o primeiro isolamento ocorreu em 1985 do plexo coróide de uma ovelha aparentemente saudável (Caporale *et al.*, 1985).

Na Itália, embora o vírus seja muito difundido, não tem sido possível aplicar qualquer tipo de controle e erradicação devido à falta de colaboração dos criadores que, não observando evidente piora das condições clínicas ou da produtividade de seus animais, relutam em praticar qualquer tipo de intervenção. Os possíveis planos de erradicação

seriam baseados na separação dos cordeiros das mães ao nascer, com subsequente alimentação artificial. No entanto, um plano assim concebido, mesmo que limitado apenas à cota de retorno, é trabalhoso e caro, pois permitiria a presença praticamente contínua dos operadores no período das partes.

O último estudo epidemiologicamente relevante na Sardenha foi realizado em 2009 em 307 criações de ovinos, caprinos e mistas (18.598 cabeças testadas) escolhidas de forma a garantir representatividade em relação a todo o território regional (Rolesu *et al.*, 2009). O 89,9% das fazendas de ovinos tinham pelo menos uma cabeça seropositiva com prevalência média (percentagem de animais positivos por rebanho) de 35%. Não existem dados mais recentes recolhidos de forma sistemática, mas é provável que, na ausência de planos de controlo e proibições à circulação de vestuário positivo, a situação se tenha agravado ainda mais nos últimos anos.

Devido a fatores relacionados à adaptação do vírus ao hospedeiro, articulações e uberes também estão entre os órgãos alvo do MVV, além dos sistemas respiratório e nervoso (Lunardini, 2005; Pasick, 1998).

O estado clínico do ubere parece estar comprometido após o início da mastite linfoproliferativa (Capucchio *et al.*, 2003; Preziuso *et al.*, 2001; Preziuso *et al.*, 2003). Relacionando esse aspecto à possível presença de infecções secundárias, é possível hipotetizar um agravamento do quadro sintomatológico com conseqüente diminuição qualitativa e quantitativa da produção de leite (Lunardini, 2005).

Por exemplo, coinfeção com vírus Maedi-Visna e retrovírus ovino Jaagsiekte (Jaagsiekte sheep retrovirus (JSRV)), que causa adenocarcinoma de pulmão ovino (câncer de pulmão contagioso), causa o desenvolvimento de uma doença agravada (Peterhans *et al.*, 2004).

Em comparação com outros países onde os ovinos são criados para a produção de carne e / ou lã, na Itália a criação de raças especializadas para a produção de leite é altamente desenvolvida, em particular a raça Sarda. (Lunardini, 2005). Portanto, é claro que o dano ao aparelho mamário assume considerável importância econômica.

Em geral, pode-se dizer que a infecção pelo vírus Maedi-Visna, juntamente com outras patologias devido a infecções de Small Ruminant Lentiviruses (SRLV), causam perdas direitas, como:

- diminuição na duração da vida produtiva e produção de leite (Maiztegui, 2006; Peterhans *et al.*, 2004) (declínio médio anual na produção de leite igual a 3,2% (Christodoulopoulos, 2005) que pode atingir até valores de 4,6% (Tarlinton *et al.*, 2020)). No entanto, a questão parece ser controversa, pois em alguns estudos não foram encontradas diferenças significativas na produção de leite entre ovelhas leiteiras seropositivas e seronegativas (Reina *et al.*, 2009);
- aumento no conteúdo de células somáticas (SCC) e redução dos níveis de gordura (Christodoulopoulos, 2005; Peterhans *et al.*, 2004) (diminuição média anual na porcentagem de gordura do leite igual a 2% (Christodoulopoulos, 2005)), proteínas e lactose no leite produzido por animais infectados, o que afeta a transformação do leite em vários laticínios;
- menor duração do período de amamentação;
- predisposição a infecções bacterianas (especialmente ao nível do úbere);
- aumento de tratamentos com vermífugos contra parasitas gastrointestinais;
- aumento da taxa de reposição anual (Maiztegui, 2006);
- redução das taxas de concepção (Maiztegui, 2006; Peterhans *et al.*, 2004; Reina *et al.*, 2009);
- na progênie, pode-se observar uma diminuição no peso ao nascer, atraso no ganho de peso e aumento da mortalidade antes do desmame (Peterhans *et al.*, 2004; Reina *et al.*, 2009). As perdas podem variar de 0,3 a 3,0 kg por cordeiro ao desmame (Peterhans *et al.*, 2004);

Estima-se que a infecção por SRLV pode reduzir a produção em até 40% em fazendas comerciais no Reino Unido e em 20% nos Estados Unidos (Yamana *et al.*, 2019).

As perdas indiretas encontradas estão associadas à desvalorização do rebanho e às barreiras comerciais para a movimentação de animais vivos, sêmen e embriões (De Azevedo *et al.*, 2017; Maiztegui, 2006).

De acordo com Peterhans *et al.*, 2004, os principais fatores que influenciam as perdas econômicas são os seguintes:

- desenvolvimento lento de doença clínica causada por infecção por SRLV
- apenas o 30% dos animais infectados desenvolvem doença clínica
- sintomas e perdas econômicas estão relacionados à soroprevalência
- fatores que influenciam a propagação da infecção (consulte o *capítulo 1.1.2*)

Deve-se notar que a análise da literatura indicou que as informações sobre essas perdas por infecções por SRLV são incompletas e, em alguns casos, contraditórias.

1.1.1 Etiologia

Maedi-Visna é uma infecção linfoproliferativa progressiva, insidiosa, persistente e frequentemente fatal de ovelhas causada por um vírus de RNA pertencente à família Retroviridae (Dousti *et al.*, 2019; Illius *et al.*, 2020; Lunardini, 2005). Os gêneros pertencentes a esta família têm como característica comum a presença de uma enzima chamada *transcriptase reversa* que, durante a replicação viral, contribui para o processo de transcrição reversa do genoma formado pelo RNA em DNA (Lunardini, 2005). O nome da família, portanto, deriva da presença desta enzima DNA-polimerase RNA-dependente (Lunardini, 2005).

Como pode ser visto na tabela 1, a família Retroviridae é dividida em duas subfamílias: Orthoretrovirinae (6 gêneros, 49 espécies) e Spumaretrovirinae (5 gêneros, 19 espécies). Dentre os seis gêneros pertencentes à subfamília Orthoretrovirinae está o gênero Lentivirus (10 espécies), composto por múltiplos patógenos que afetam várias espécies animais, incluindo o Maedi-Visna Virus.

Atualmente é preferível falar de Small Ruminant Lentiviruses (SRLV), incluindo no grupo vários genótipos (A, B, C, D, E) e pelo menos 31 subtipos de vírus (Michiels *et al.*, 2020),

Tabela 1. Classificação taxonômica da família Retroviridae.

Família	Subfamília	Gênero	Espécie	
Retroviridae	Orthoretrovirinae	α -retrovirus		
		β -retrovirus		
		δ -retrovirus		
		ϵ -retrovirus		
		γ -retrovirus		
		Lentivirus	Bovine immunodeficiency virus (BIV)	
			Caprine arthritis encephalitis virus (CAEV)	
			Equine infectious anemia virus (EIAV)	
			Feline immunodeficiency virus (FIV)	
			Human immunodeficiency virus 1 (HIV-1)	
		Human immunodeficiency virus 2 (HIV-2)		
		Jembrana disease virus (JDV)		
		Puma lentivirus (PLV)		
		Simian immunodeficiency virus (SIV)		
	Maedi-Visna virus (MVV)			
	Spumaretrovirinae			

Virus Taxonomy: 2019 Release. Berlin, Germany, July 2019. (<https://talk.ictvonline.org>)

O gênero Lentivirus inclui vírus que têm vários caracteres morfológicos em comum: as partículas virais aparecem esféricas com um diâmetro de cerca de 80-100 nm e são fornecidas com um envelope de glicoproteína chamado envelope que deriva da membrana da célula hospedeira no momento de sua liberação, o que ocorre por brotamento (budding) (Lunardini, 2005; Maclachlan *et al.*, 2017). Por esse motivo, os vírus aferentes ao gênero Lentivirus são sensíveis a solventes lipídicos, são inativados a 56 ° C em 10 minutos, mas permanecem ativos por até 4-5 meses a 4 ° C e mantêm a infectividade a -80 ° C por anos. Além disso, são bastante resistentes aos raios UV (Thormar, 1965).

Especificamente, o MVV é lábil ao calor e a solventes orgânicos, como éter e clorofórmio, é estável em pH 7,2-7,9 e pode ser armazenado por vários meses a -70 ° C (Andreani, *et al.*, 1995). É inativado por formol 0,04% e fenol 4% (Andreani, *et al.*, 1995).

Outra característica que distingue os Lentivirus do resto dos vírus é que seu genoma viral, que consiste em RNA linear de fita simples com polaridade positiva e comprimento entre 7 e 10 kb de (kilo base = mil bases), está presente em cópia dupla: o único caso da herança diploide entre os vírus (Lunardini, 2005; Maclachlan *et al.*, 2017; www.pg.izs.it).

Parece que a presença de duas moléculas de RNA genômico determina o aumento da probabilidade de sucesso da síntese de DNA por transcriptase reversa se uma das duas moléculas de RNA estiver danificada (Niccolai, 2014). No entanto, presume-se que apenas uma única molécula de DNA é sintetizada em um ciclo replicativo (Niccolai, 2014). No entanto, também é hipotetizado que esses retrovírus não são realmente diplóides no sentido usual do termo, já que qualquer localização do DNA da progênie contém informação genética derivada de apenas uma das duas moléculas de RNA parentais. Este aspecto determina que está fortemente correlacionado à considerável variabilidade genética que caracteriza os retrovírus. (Niccolai, 2014).

O genoma viral dos Lentivirus é caracterizado pela presença de três genes estruturais, como os genes *gag* (*group-specific antigen*), *pol* (*polymerase*) e *env* (*envelope*) (Alvarez, 2006; Blacklaws, 2008; Lunardini, 2005; Maclachlan *et al.*, 2017; Maiztegui, 2006; Pepin *et al.*, 1998) e outros genes chamados auxiliares ou acessórios cuja presença ou ausência e características podem variar de acordo com as espécies, tais como *vif* (*viral infectivity factor*), *rev* (*regulation of virion protein expression*) e *vpr* presentes em lentivirus de pequenos ruminantes (SRLV) aos quais são adicionados os genes *vpu* (*viral protein U*), *tat* (*transactivator of transcription*), *nef* e *vpx* presentes no vírus da imunodeficiência humana (HIV) (Blacklaws, 2008; Gallegiante Crisafulli, 2012; Lunardini, 2005; Maclachlan *et al.*, 2017; Maiztegui, 2006; Minguijón *et al.*, 2015; Poli *et al.*, 2005).

Esses genes são ladeados por longas sequências de repetição terminais não codificantes (LTRs - non coding long terminal repeat regions) (Dickey *et al.*, 2020).

Especificamente, o gene *gag* codifica proteínas do núcleo viral, incluindo proteínas do capsídeo (p25CA), matriz (p16MA) e do capsídeo do núcleo (p14NC) (Blacklaws, 2008; De Pablo-Maiso *et al.*, 2018; Lunardini, 2005; Maclachlan *et al.*, 2017; Olech *et al.*, 2020a). A proteína p25CA é a mais abundante no vírion (Niccolai, 2014). Além disso, contém três epítomos lineares que causam uma forte resposta de anticorpos durante a infecção e por isso é preciosa para testes de diagnóstico serológico (Olech *et al.*, 2020a). Enquanto a proteína p25CA é relativamente conservada, a proteína p14NC interage diretamente com o RNA viral (De Pablo-Maiso *et al.*, 2018). A proteína p16MA tem a função de garantir a conexão entre o capsídeo e o envelope. (Olech *et al.*, 2020a).

O gene *pol* codifica para enzimas relacionadas à replicação, como protease (PR) (envolvida na maturação de proteínas virais), integrase (IN) (associada ao RNA viral e permite a integração do genoma na forma de DNA bicatenário), dUTPase (aparece ter um papel na redução da frequência das mutações do vírus) e transcriptase reversa ou retrotranscriptase (RT) (catalisa a síntese de DNA viral) (Blacklaws, 2008; De Pablo-Maiso *et al.*, 2018; Lunardini, 2005; Maclachlan *et al.*, 2017; Niccolai, 2014; Olech *et al.*, 2020a; Poli *et al.*, 2005).

O gene *env* codifica a glicoproteína do envelope viral que, após ser atacada por uma protease celular, determina a formação de duas subunidades: a subunidade transmembrana (gp46TM) e a subunidade de superfície (gp135SU) (De Pablo-Maiso *et al.*, 2018; Lunardini, 2005; Maclachlan *et al.*, 2017; Olech *et al.*, 2020a; Poli *et al.*, 2005). A glicoproteína gp135SU tem muitas funções biológicas importantes. Por exemplo, contém domínios responsáveis pelo reconhecimento de recetores de células hospedeiras e, assim, estimula a produção de anticorpos (Olech *et al.*, 2020a). Dada a sua variabilidade genética, determina a variabilidade antigênica dos diferentes subtipos (Olech *et al.*, 2020a). A glicoproteína gp46TM, que permite a fusão do envelope viral com a membrana do hospedeiro, é uma proteína muito mais conservada e é uma boa candidata para uso em testes de diagnóstico ELISA (Olech *et al.*, 2020a).

A figura 1 representa esquematicamente os genes e proteínas estruturais comuns codificados nas partículas de vírions de lentivírus animais, enquanto a figura 2 representa esquematicamente a organização genômica de SRLVs.

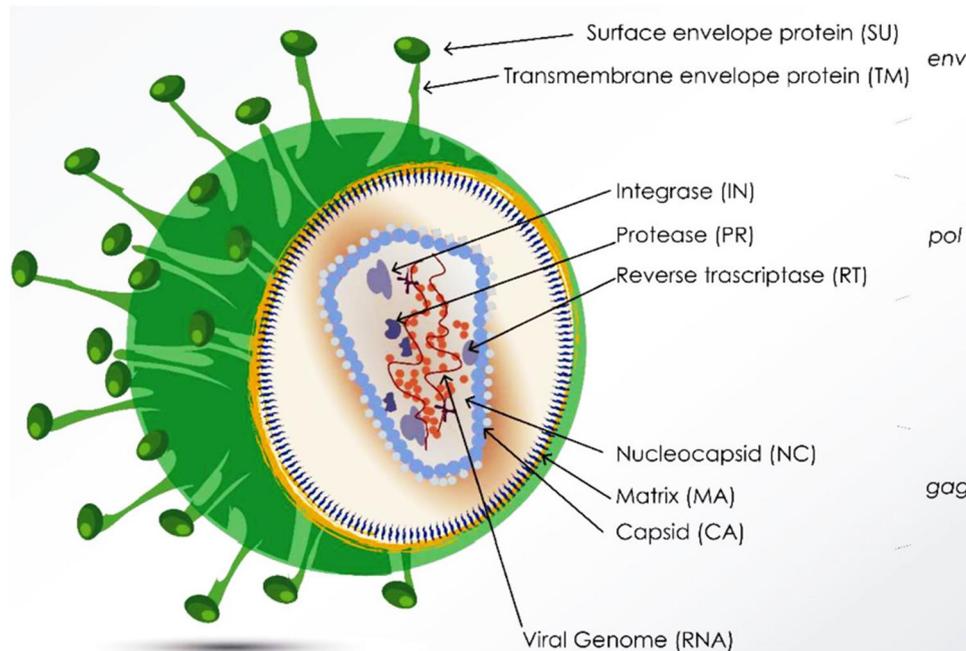


Figura 1. Representação esquemática de partículas vírionicas de lentivírus (De Pablo-Maiso *et al.*, 2018).

SRLV

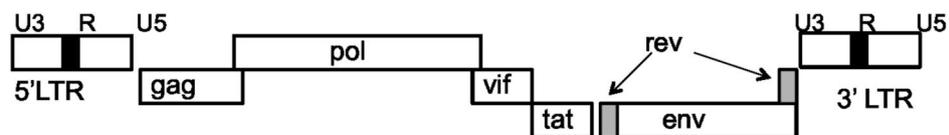


Figura 2. Organização genômica dos SRLV (Stonos *et al.*, 2014).

Nos ovinos, o Maedi-Visna vírus, causa uma infecção latente pelo fato do provírus permanecer por muito tempo integrado no genoma da célula hospedeira, período no qual ocorre a replicação viral em níveis baixos e também o estímulo à produção de anticorpos é bastante limitado (www.pg.izs.it). Na verdade, como a própria palavra diz, a lentivirose se distingue de outras patologias por um estágio pré-clínico bastante longo em que o animal não apresenta os sintomas da doença, mas é capaz de eliminar o vírus e produzir anticorpos específicos que, no entanto, não são capazes de contrastar-lo de forma eficaz. Desta forma, a infecção é capaz de progredir para o estágio clínico propriamente dito (Lunardini, 2005).

O ciclo de replicação do Maedi-Visna vírus foi observado *in vitro* em células do plexo coróideo de carneiro; a fase inicial consiste na interação entre vírus e recetor celular, seguida pela modificação na conformação da glicoproteína de superfície com exposição dos sítios de ligação para os recetores (Lunardini, 2005). É possível que o vírus utilize diferentes recetores celulares para penetrar na célula hospedeira, como por exemplo o recetor do manose que, segundo estudos recentes, parece ser o recetor celular do MVV nos ovinos. (Gomez-Lucia *et. al.*, 2018). Após a fixação da glicoproteína ao recetor celular e a fusão dos lipídios virais com os lipídios celulares, o vírion penetra através da membrana citoplasmática da célula degradada, seguido pelo desprendimento do RNA viral (uncoating) que penetra no citoplasma associado às proteínas virais (Lunardini, 2005). Embora o RNA genómico tenha uma fita positiva, não funciona diretamente como mensageiro, mas é transcrito reversamente pela transcriptase reversa (DNA-polimerase RNA- dependente) em uma fita de DNA (Lunardini, 2005).

A transcriptase reversa também possui atividade de ribonuclease (ribonuclease H), destruindo assim a fita de RNA do híbrido formado e liberando o DNA, sobre o qual é formada a fita complementar. Neste ponto, o dsDNA linear (double stranded DNA) chamado *provirus*, é transportado para o núcleo da célula e, por meio de uma integrase viral, é inserido no genoma celular. Após um período de latência mais ou menos longo, o DNA é ativado e, portanto, produz o mRNA, as várias proteínas enzimáticas e estruturais e o RNA genómico.

A replicação *in vitro* do Maedi-Visna vírus pode ser observada em vários tipos de células, incluindo células sinoviais, células do plexo coróideo ovino ou culturas de macrófagos obtidas de leite e sangue de ovelha. O efeito citopático (ou seja, as alterações morfológicas assumidas por uma célula infetada) que pode ser observado é dado pelo aparecimento de células refrativas e arredondadas e sincícios celulares devido à fusão das membranas plasmáticas (Lunardini, 2005) (Figura 3a e 3b).

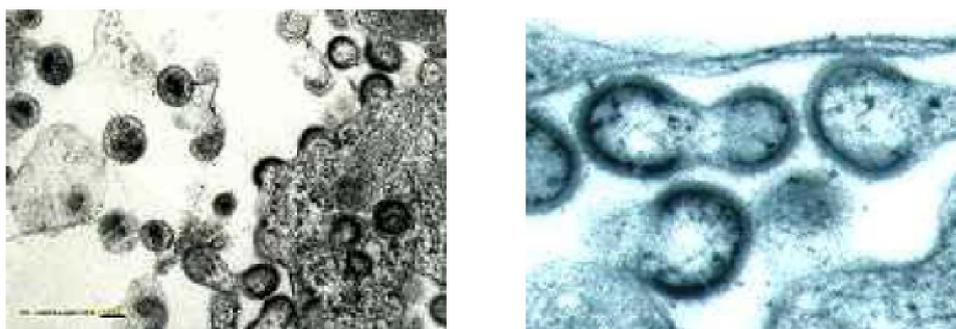


Figura 3a, 3b. Partículas virais em uma cultura de plexo coróide de cordeiro (seção ultrafina, acetato de uranila-citrato de chumbo) (www.izsum.it).

Os lentivíruses possuem uma biodiversidade notável como consequência do seu mecanismo de replicação que determina um elevado número de mutações pontuais (Reczyńska *et al.*, 2018), influenciando propriedades biológicas, como virulência e características de crescimento *in vitro* e propriedades antigênicas de isolados virais (Niccolai, 2014; Tolari, 2000).

Os vírus podem assumir diferentes caracteres, principalmente em relação ao poder citopático, capacidade de induzir anticorpos, patogenicidade e tropismo para os diferentes órgãos:

- Cepas islandesas: possuem alto poder citopático, são capazes de induzir a produção de sincícios em culturas de células em cerca de 24 horas e causar lise celular em 3 dias. Possuem alta capacidade de induzir a produção de anticorpos (anticorpos neutralizantes), são altamente patogênicos e os órgãos mais afetados são os pulmões e o sistema nervoso (Legrottaglie *et al.*, 1996).

- Cepas americanas: têm baixo poder citopático e baixa capacidade de induzir anticorpos, patogenicidade média e tropismo pulmonar, mamário e articular (Legrottaglie *et al.*, 1996)

- Cepas europeias: em comparação com as anteriores, apresentam escassa capacidade de replicação *in vitro* e baixa capacidade de induzir reações de anticorpos.

A patogenicidade é alta nas cepas holandesas, média nas francesas e baixa nas italianas, enquanto no que diz respeito ao tropismo, as cepas holandesas preferem o sistema mamário e as italianas têm envolvimento pulmonar e mamário, assim como os as espanholas (Rizzi *et al.*, 1998).

Come accennato in precedenza, attualmente si preferisce parlare di Small Ruminant Lentivirus (SRLV). In seguito all'analisi filogenetiche effettuate principalmente sulle sequenze delle relative ai geni *gag* e *pol* è possibile suddividere questi virus in 5 genotipi (A, B, C, D, E), a loro volta suddivisibili in almeno 28 sottotipi di virus (Michiels *et al.*, 2020; Shah *et al.*, 2004b). I genotipi e i sottotipi differiscono rispettivamente del 25-37% e 15-27% nella composizione nucleotidica dei loci genomici oggetto di analisi filogenetica (Dickey, *et al.*, 2020).

Sendo capaz de superar a barreira das espécies "ovelha-cabra", os vários subtipos (que não são todas espécies específicas), causam Artrite Encefalite Viral Caprina (CAEV) em caprinos e Maedi-Visna (MV) em ovinos (Olech *et al.*, 2020b).

Embora a capacidade do SRLV de superar frequentemente a barreira das espécies tenha se tornado evidente para ovelhas e cabras, a presença de saltos naturais da barreira de espécies em direção dos ruminantes selvagens não foi demonstrada, levando a resultados algumas vezes contraditórios (Olech *et al.*, 2020b). De fato, há evidências serológicas de infecção por SRLV em ruminantes selvagens, como muflões e íbex, que são os parentes mais próximos respectivamente de ovelhas e cabras (Peterhans *et al.*, 2004). Espécies selvagens como veados (*Cervus elaphus*) ou corço (*Capreolus capreolus*) parecem ser suscetíveis à infecção, embora o vírus possa não ser capaz de se replicar nessas espécies (Luján *et al.*, 2019).

Em consideração da alta presença de ruminantes selvagens, seria apropriado investigar este tópico o mais rápido possível, pois os animais selvagens infectos e os ruminantes domésticos podem representar um reservatório de patógenos uns para os outros.

Em relação à epidemiologia molecular na Europa, foi verificada a presença dos cinco genótipos (A, B, C, D, E) de SRLV descritos abaixo. É necessário conhecer essa classificação, pois além de esclarecer as interações vírus-hospedeiro, é essencial tanto para estudos epidemiológicos moleculares quanto para um diagnóstico preciso, pois influencia a sensibilidade dos testes sorológicos (Minguijón *et al.*, 2015).

Os genótipos A e B são amplamente distribuídos, enquanto os genótipos C, D e E foram reconhecidos em áreas geográficas restritas, respectivamente na Noruega e na Itália (De Pablo-Maiso *et al.*, 2018).

- Genótipo A
 - Historicamente associado às ovelhas
 - Maedi-Visna like virus
 - Geneticamente heterogêneo (22 subtipos caracterizados):
 - A13 - A15 - A21 (apenas ovelhas)
 - A7 - A8 - A10 - A14 - A17 - A20 (apenas cabras)
 - A1 - A2 - A3 - A4 - A5 - A6 - A9 - A11 - A12 - A16 - A18 - A19 - A22 (ambas as espécies)

- Genotipo B
 - Historicamente associado às cabras
 - CAE like virus
 - “Menos” heterogêneo do Genótipo A (5 subtipos):
 - B1: amplamente distribuído (apenas cabras)
 - B2: identificado em ambas as espécies na Europa
 - B3: isolado de ovelhas na Sardenha (Fonni) e Toscana (Volterra), mas também pode infectar cabras.
 - B4: isolado de cabras no Canadá
 - B5: isolado de cabras na Bélgica

- Genotipo C
 - Isolado em ambas as espécies na Noruega

- Genotipo D
 - Isolado em ambas as espécies na Suíça e Espanha

- Genotipo E
 - Isolado em cabras da raça Roccaverano (E1) no Piemonte e da raça Sardo-Maltesa (E2) na Sardenha (Seui)
 - Parece ser estritamente um hospedeiro específico em condições naturais
 - Pouco heterogêneo (2 subtipos):
 - E1: tem baixo potencial patogênico in vivo e ausência de qualquer efeito citopático lentiviral clássico in vitro como consequência da falta de um recetor adequado para a entrada do vírus nos fibroblastos.
 - E2: isolado de indivíduos com sintomas clínicos

(Bertolotti *et al.* 2011; Colitti *et al.*, 2019; Giammarioli *et al.*, 2011; Gomez-Lucia *et al.*, 2018; Grego *et al.*, 2007, Grego *et al.*, 2018; Michiels *et al.*, 2020; Molaee *et al.*, 2020; Niccolai, 2014; Olech *et al.*, 2012; Olech *et al.*, 2018; Olech *et al.*, 2019a; Olech *et al.*, 2019b; Olech *et al.*, 2020a; Reina *et al.*, 2010; Reina *et al.*, 2013; Rosati, 2010; Shah *et al.*, 2004a; Shah *et al.*, 2004b).

Deve-se notar que as informações moleculares relativas aos novos subtipos são continuamente atualizadas com uma intensidade marcada nos últimos anos (De Pablo-Maiso *et al.*, 2018).

A base da classificação atual dos vários subtipos de SRLV foi proposta em 2004 por Shah *et al.* através do utilizo da sequência genética de um fragmento de 1,8 kb na região gag-pol, um fragmento de 1,2 kb na região pol e um fragmento mais pequeno (279 pb) dentro da região da transcriptase reversa (RT) (Michiels *et al.*, 2020). No entanto, nem todos os subtipos foram classificados com base nas informações sobre a sequência de nucleotídeos de todas essas três regiões, como foi o caso dos subtipos A1 a A5, B1, B2 e genótipo C, pois alguns subtipos são classificados com base nas informações sobre a sequência de nucleotídeos em apenas uma dessas regiões ou de apenas uma parte mais pequena de um dos fragmentos inicialmente propostos por Shah *et al.*, nel 2004 (Michiels *et al.*, 2020). A tabela 2 fornece uma visão geral do que acaba de ser descrito

Tabela 2. Visão geral dos subtipos de SRLV.

RT (Reverse Transcriptase Fragment), Frammento di retrotrascittasi; CA (Capsid), Capside; MA (Matrix), Matrice; SU (Surface), Superfície; env (envelope gene).

Subtipos	Numero de adesão na GenBank	Região genómica usada para classificação	Ano	Espécies onde foi determinado o subtipo	País de origem
A1	AF479638	gag-pol (1.8 kbp) pol (1.2 kbp) RT (279 bp)	2004	Ovelhas	Portugal
	HQ84062		2012		Espanha
	M60609		1991		Islândia
	M31646		1990		África do Sul
	NC001452		1987		EUA
A2	AY101611		2002	Ovelhas e Cabras	EUA
	HQ158132				
A3	AY454176		2004	Cabras	Suíça
	AY454186				
	KY358787 KY358788				
A4	AY454163		2004	Ovelhas	Suíça
	AY454200				
	AY445885	Cabras			

A5	AY454175		2004	Cabras	Suíça
	MN233105 MN233107 MN233108		2020	Ovelhas e Cabras	Alemanha
A6	VVU35676 VVU35803 VVU35813	RT (279 bp)	1995	Ovelhas	França
	Cabras				
A7	AY454208	pol (1.2 kbp)	2004	Cabras	Suíça
A8	EF676006 EU010125	gag (684 bp)	2007	Cabras	Itália
	MG554403 MG554404 MG554405 MG554406 MG554408 MH374283 MH374284 MH374285 MH374286 MH374291		2017		
A9	EF676016 EF676017 EF676018 EF676019 EF676020	gag (684 bp)	2007	Ovelhas e Cabras	Itália
A10	HM449450 HM449683	pol (353 bp)	2010	Cabras	Itália
A11	FR693808 FR693820	gag-pol (640 bp)	2011	Cabras	Itália
	MN233124 MN233143 MN233151		2020	Ovelhas	Alemanha
A12	FJ623123 FJ623122	CA (467 bp) MA (327 bp) SU (394 bp)	2012	Ovelhas e Cabras	Polônia
A13	FJ623120 MH790887		2012 2019		

A14	HQ910471	gag-pol (1471 bp) pol (1025 bp)	2008	Cabras	Eslovénia
	JQ610988 JX469608		2013		
A15	JQ611027 JQ611028 JQ611029 JQ611030		2013	Ovelhas	
A16	KY865009	CA (467 bp) env (344 bp)	2018	Cabras	Polônia
	MN233104		2020	Ovelhas	Germania
A17	KY865028 KY865011		2018	Cabras	Polonia
A18*	MH790879 MH790877 MH790880	gag (576 bp)	2019	Ovelhas	Polonia
A18*	MH374287	Full genome partial gag gene	2019	Cabras	Itália
A19	MG554409 MH374287			Ovelhas	
A20	MG554409	gag	2017	Cabras	Itália
A21	MN233106 MN233111 MN233116 MN233118 MN233120 MN233128 MN233132 MN233141 MN233145	gag	2020	Ovelhas	Alemanha
A22	MK098477 MK098478 MK098479 MK098480 MK098481 MK098482		2018	Ovelhas	Iram
	KU170760		2015		Líbano
	KT921318 KT898826				Jordânia

B1	AY454196	gag-pol (1.8 kbp) pol (1.2 kb) RT (279 bp)	2004	Cabras	Suíça
	AY900630		2005		Cina
	EF675997		2007		Itália
	EF676002				
	EF676008				
	EF676010				
	EF676015				
	EF676026				
	GU120138		2012		China
	KT749881		2015		
	HM210570		2011		Mxico
	M33677		1990		EUA
	MG554411		2017		Itália
MG554412					
MG554413					
MH374290	2018				
B2	AY265456	gag-pol (1320 bp) pol (3201 bp) env (2814 bp)	2005	Ovelhas	Itália
	EF676000		2007		
	EF676007				
	EF676009				
	EU010126		2009	Cabras	Espanha
	FJ195346				
	MG554402		2017	Ovelhas	Itália
MG554414	2018				
MH374288					
B3	AF322109	gag-pol (1320 bp) pol (3201 bp) env (2814 bp)	2000	Cabras	Noruega
	JF502416		2011	Ovelhas	Itália
	JF502417				
B4	KC241933	gag (1187 bp)	2012	Cabras	Canada
B5	MN784770 MN784781	pol	2020	Cabras	Bélgica
C	AF322109	gag-pol (1.8 kb) pol (1.2 kb) RT (279 bp)	2004	Ovelhas e Cabras	Noruega
D	AY454269	pol (1.2 kb)	2004	Ovelhas e Cabras	Suíça
	DQ632733		2006		Espanha

E1	EU293537	gag (525 bp)	2009	Cabras	Itália
	EF676025		2007		
E2	FR694921		2011		
	GQ381130		2010		

* Os dois subtipos A18 foram publicados por dois grupos de pesquisa independentes no mesmo mês. Olech *et al.*, (2019a) foram o primeiro grupo que publicou o subtipo A18.

(Bertolotti *et al.* 2011; Colitti *et al.*, 2019; Giammarioli *et al.*, 2011; Gomez-Lucia *et al.*, 2018; Grego *et al.*, 2007, Grego *et al.*, 2018; Kuhar *et al.*, 2013; Michiels *et al.*, 2020; Molaee *et al.*, 2020; Olech *et al.*, 2012; Olech *et al.*, 2018; Olech *et al.*, 2019a; Olech *et al.*, 2019b; Pisoni *et al.*, 2010; Reina *et al.*, 2010; Reina *et al.*, 2013; Rosati, 2010; Santry *et al.*, 2013; Shah *et al.*, 2004a; Shah *et al.*, 2004b; www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/)

1.1.2. Modalidade de transmissão

A principal via de transmissão do MVV é a **horizontal direta** através de aerossóis, secreções nasais e lacrimais que permitem a rápida difusão nas explorações, favorecida também pelo contato próximo em que os animais são forçados a viver nos estábulos (principalmente nos períodos inverniais e/ou em presença de condições climáticas adversas) (Blacklaws *et al.*, 2004; Blacklaws, 2008; Leginagoikoa, 2010; Lunardini, 2005; Maiztegui, 2006; Niccolai, 2014).

Um papel fundamental na difusão do vírus é atribuído à transmissão através da ingestão de colostro e leite de mães infetadas, pois o contato entre mãe e cordeiros pós-parto favorece a disseminação da lentivirose nas explorações e dificulta o controle (Blacklaws *et al.*, 2004; Blacklaws, 2008; Yamana *et al.*, 2019). A alta permeabilidade da parede intestinal dos cordeiros nos primeiros dias de vida favorece muito esta forma de transmissão (Niccolai, 2014).

Além disso, as células epiteliais presentes no colostro e no leite também podem ser uma fonte de infecção, pois permitem que o vírus se replique *in vitro* (Blacklaws *et al.*, 2004). No entanto, alguns autores argumentam que nem todos os subtipos do MVV são transmitidos de forma eficiente pela via lactogênica (Kalogianni *et al.*, 2020), que, portanto, resulta relativamente ineficiente e requer transmissão horizontal para garantir a manutenção de longo prazo do MVV (Leginagoikoa *et al.*, 2006a).

Infrequente, mas possível, é a transmissão do MVV por via venérea através do sêmen de machos contaminados, uma vez que o vírus, presente em todos os fluidos corporais, pode passar para as fêmeas durante o acasalamento (Blacklaws *et al.*, 2004; Lunardini, 2005). Para confirmar isso, alguns estudos encontraram a presença de DNA proviral de SRLV no sêmen e no trato genital de alguns carneiros (Kalogianni *et al.*, 2020). No entanto, a questão é controversa porque Tarlinton *et al.*, 2020, com base nos estudos realizados praticando a inseminação artificial com sêmen de carneiros infectados, afirmam que o risco de transmissão sexual é baixo na maioria das situações.

A transmissão **horizontal indireta** através de veículos, como água contaminada, é bastante rara, pois o vírus tem pouca resistência no ambiente externo, enquanto a transmissão iatrogênica através de instrumentos corados com sangue infetado foi demonstrada (Blacklaws *et al.*, 2004; Lunardini, 2005).

A transmissão **vertical congênita**, ou seja transplacentária, parece confirmada com maior frequência em ovelhas jovens com poucos nascimentos (De La Concha-Bermejillo *et al.*, 1994).

A capacidade do MVV de infectar tecidos fetais foi demonstrada experimentalmente por alguns autores por meio da inoculação do vírus diretamente no feto ou no saco amniótico (Maiztegui, 2006). No entanto, o assunto ainda é controverso (Blacklaws. *et al.*, 2004; Galleggiante Crisafulli, 2012; Lunardini, 2005).

As infecções experimentais, algumas das quais ainda estão em andamento em vários centros de pesquisa, como o Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Sardegna “G. Pegreff”, foram realizadas com sucesso usando diferentes doses e cepas de SRLV e seguindo diferentes vias, incluindo intracerebral, intra-articular, intranasal, intrapulmonar, digestiva, intravenosa e intraconjuntival (Alvarez, 2006; Maiztegui, 2006).

A difusão da infecção pode ser influenciada por uma série de fatores, como:

- idade: ovelhas com menos de 3 anos parecem ser mais receptivas, mesmo que os sintomas apareçam tardiamente (infecção lenta) (Lunardini, 2005).

Muitos estudos mostram o aumento da seropositividade ao MVV com a idade, associado a um maior tempo de exposição (Leginagoikoa, 2010; Maiztegui, 2006). A exposição prolongada a uma alta carga de vírus no ambiente acelera a seroconversão e o aparecimento de lesões, mesmo em cordeiros de um ano de idade. Além disso, os animais mais velhos demonstram um maior potencial de transmissão e são a principal fonte de MVV para os jovens (Leginagoikoa, 2010).

- raça: vários estudos analisaram o efeito da raça na suscetibilidade a infecções ao MVV, enquanto outros autores afirmaram que as diferenças na prevalência podem estar mais relacionadas a fatores de resistência genética associados a certas linhagens familiares do que à raça real (Leginagoikoa, 2010).

Alguns autores holandeses argumentam que a raça Texel é particularmente sensível à infecção por MVV com uma morbidade que atinge 10-20% (Maiztegui, 2006).

De acordo com Heaton *et al.*, (2013) as raças Merino, Rambouillet e Hampshire Down têm altas frequências da variante TMEM154 K35 menos sensível. Isso também acontece nas raças turcas, mas com frequências relativamente baixas (Yamana *et al.*, 2019).

- gestação: o vírus causa aborto em mulheres grávidas ou o nascimento de cordeiros fracos;
- movimentação de animais;
- amamentação;
- condições de criação que podem favorecer a disseminação da infecção:
 - tipo de criação e alta densidade de animais: os resultados obtidos por alguns autores sugerem que a transmissão do MVV é alta em sistemas de criação onde os animais vivem em contato próximo, enquanto o contrário ocorre quando os animais não estão confinados na maior parte do tempo (Blacklaws *et al.*, 2004; Dousti *et al.*, 2019; Leginagoikoa *et al.*, 2006a). Uma alta soroprevalência de SRLV é, portanto, típica em fazendas intensivas, como as de cabras leiteiras na Califórnia, enquanto em alguns grandes sistemas extensivos ela está até ausente, como na Nova Zelândia e Austrália, onde nunca foi relatada, ou muito baixa, como na Patagônia (Dousti *et al.*, 2019; Leginagoikoa *et al.*, 2006a; Maiztegui, 2006).
 - escassa ventilação dos locais de criação;
 - tipo de comedouros: o uso de comedouro bilateral permite que os animais tenham contato "nariz com nariz", aumentando a disseminação do vírus (Leginagoikoa *et al.*, 2006).
- genótipo (consulte o parágrafo 2.1 “Relação entre o gene TMEM154 e a resistência genética aos Lentivírus”)

1.1.3. Aspectos clínicos

A infecção por MVV também é chamada "doença do ovino adulto", pois é caracterizada por um estágio pré-clínico bastante longo (variável, geralmente de 2 a 5 anos) em que o animal não mostra os sintomas da doença, mas é capaz de eliminar o vírus (Blacklaws, 2008; Lunardini, 2005). No entanto, o sistema imunológico não é capaz de eliminar eficazmente o vírus, pois baixas produções de anticorpos ocorrem nesta fase e a infecção pode, portanto, progredir lentamente para a própria fase clínica, que geralmente ocorre por volta dos 2-3 anos de idade com pulmão, nervo, lesões de mama e articulações (Blacklaws *et al.*, 2004; Lunardini, 2005).

É uma doença única causada por dois vírus idênticos, mas com tropismo diferente (Sigurdsson *et al.*, 1952, 1958) e capaz de determinar duas formas clínicas diferentes:

- respiratória (mais frequente);
- nervosa (escassamente relevada);

A forma respiratória manifesta-se clinicamente com um andamento muito lento, os sintomas iniciais (não específicos) são: comprometimento do estado geral e dispneia (dificuldade respiratória) aos esforços (Lunardini, 2005; Maclachlan *et al.*, 2017).

Posteriormente, com o desenvolvimento da doença, ocorrem fadiga, congestão das mucosas, secreção nasal e tosse seca, perda de peso, dispneia constante mesmo em repouso, narinas dilatadas e cabeça estendida no pescoço ("atitude de fome de ar"), incapacidade de seguir o resto do rebanho (Lunardini, 2005; Rizzi *et al.*, 1998).

O quadro pulmonar muitas vezes é agravado pelo aparecimento de infecções bacterianas secundárias, favorecidas pela escassa higiene encontrada em muitas explorações e pelo comprometimento das condições gerais, que contribuem para o aumento da taxa de mortalidade por MVV (Lunardini, 2005).

A forma nervosa é caracterizada por ataxia locomotora (ou seja, perda progressiva da coordenação muscular), rolamento anormal da cabeça, tremores dos músculos faciais (por exemplo, tremor labial), paresia dos membros posteriores, quedas repentinas, caquexia progressiva (perda profunda) e paralisia que torna o animal incapaz de manter a posição quadrúpede e de se alimentar e leva-o progressivamente à morte que pode ocorrer meses ou anos após o início dos sintomas (Andreani, *et al.*, 1995; Lunardini, 2005; Maclachlan *et al.*, 2017).

Os outros órgãos particularmente afetados pelo vírus são representados pelo ubere e pelas articulações, nos quais os sinais clínicos são menos evidentes do que nas duas situações citadas (Lunardini, 2005).

O ubere muitas vezes pode ser afetada por mastite linfoproliferativa (Capucchio *et al.*, 2003; Preziuso *et al.*, 2001), com acúmulo de linfócitos ao redor dos dutos de leite e hiperplasia do tecido conjuntivo.

E' possível observar um endurecimento mono ou bilateral, não doloroso, que só pode ser visto através de um exame cuidadoso de palpação do órgão que é acompanhado por um aumento de volume ao nível do linfonodo (Lunardini, 2005).

Ao nível articular, especialmente na articulação carpo-metacárpica, pode ocorrer um aumento do volume devido ao edema dos tecidos peri-articulares com efeitos proliferativos da sinóvia e outras estruturas articulares, associados à infiltração de linfócitos, macrófagos e células plasmáticas (Andreani, *et al.*, 1995; Lunardini, 2005). Do ponto de vista clínico, o animal apresenta claudicação associada à dor à palpação. Posteriormente, ocorre anquilose articular (ou seja, o cancelamento completo e permanente da articulação) causada pelo aumento do componente fibroblástico e necrose de outras estruturas articulares (Lunardini, 2005).

Também são sinalados aumento da mortalidade neonatal, crescimento deficiente de cordeiros e aborto em mulheres grávidas (Lunardini, 2005).

1.1.4. Diagnóstico clínico e diagnóstico de laboratório

Diagnóstico clínico

O exame clínico, potencialmente útil em outras viroses, não tem significado particular, exceto ao nível indicativo, pois os sintomas são comuns a outras patologias (adenomatose pulmonar e broncopneumonia parasitária) (Lunardini, 2005; Reina *et al.*, 2009).

Na mesa anátomo-patológica, a forma Maedi (mais difundida), mostra aumento do volume dos pulmões e linfonodos mediastinais (Andreani *et al.*, 1995; Maiztegui, 2006), especialmente as traqueobrônquicas (linfadenite / hiperplasia linfoide) (Maclachlan *et al.*, 2017). O peso do pulmão pode aumentar, em casos graves, até 3-4 vezes em comparação com a norma e a impressão das costelas pode ser evidente na superfície (Andreani *et al.*, 1995; Maclachlan *et al.*, 2017; Maiztegui, 2006). A lesão histológica é caracterizada por pneumonia intersticial mononuclear devido ao espessamento dos septos alveolares por hiperplasia de músculo liso e tecido linfático associado a bronquíolos com infiltração linfo-monocítica (Andreani *et al.*, 1995; Lunardini, 2005; Maclachlan *et al.*, 2017).

Os mesmos fatos intersticiais e proliferativos são encontrados na glândula mamária ou no tecido sinovial das articulações (Andreani *et al.*, 1995; Illius *et al.*, 2020).

No caso de Visna as lesões afetam o sistema nervoso central que apresenta encefalomielite generalizada, infiltração por linfócitos, células plasmáticas e macrófagos (afetando principalmente as meninges e espaços perivasculares) e desmielinização da substância branca do cérebro, cerebelo, medula oblonga e medula espinhal (Lunardini, 2005; Leginagoikoa, 2010; Maclachlan *et al.*, 2017; Maiztegui, 2006). Pode-se falar de necrose multifocal (malacia) (Maclachlan *et al.*, 2017).

■ Indireito

O teste sorológico é a técnica mais utilizada para a detecção do Maedi-Visna vírus em animais vivos, embora apresente alguns pontos críticos devido à peculiar resposta imunológica do hospedeiro, pois períodos de "janela" podem ocorrer devido a flutuações de anticorpos contra proteínas antigênicas, tornando os testes nulos e sem efeito (Luján *et al.*, 2019). Além disso, a variabilidade antigênica dos lentivírus caprinos e ovinos isolados na Itália afeta a sensibilidade dos testes serológicos e a possibilidade de surgimento de novas mutações torna necessário o monitoramento contínuo das cepas circulantes.

Atualmente, os testes sorológicos mais utilizados são ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay), teste enzimático baseado numa reação colorimétrica mensurável por espectrofotometria que mostra uma sensibilidade de 99,4% e uma especificidade de 99,3% e AGID (Agar Gel Immunodiffusion), imunodifusão em gel de ágar que tem uma sensibilidade de 76,0% e uma especificidade de 99,8% (Leginagoikoa *et al.*, 2006; Maiztegui, 2006). Os testes ELISA são convenientes, fáceis de implementar e, acima de tudo, apresentam bom desempenho, enquanto os testes AGID são geralmente usados para confirmar os resultados obtidos com os testes ELISA se houver resultados suspeitos (Adjadj *et al.*, 2019). Os testes AGID podem ser considerados tecnicamente simples, mas a interpretação, sendo um tanto subjetiva, requer experiência (Peterhans *et al.*, 2004).

Uma vez que não existe um método de diagnóstico standard para a detecção de SRLV e nenhum dos testes de diagnóstico existentes são capazes de detetar todas as cepas circulantes (Michiels *et al.*, 2020), a combinação de diferentes testes é frequentemente necessária para detetar o estado correto de infecção de pequenos ruminantes.

Um outro teste sorológico utilizável é o Western Blotting (W.B.), muito mais sensível e específico do que os testes ELISA, mas muito caro e impraticável de aplicar rotineiramente (Peterhans *et al.*, 2004; Puggioni, 2005). Na verdade, é rotineiramente usado como um teste confirmatório para soros que apresentam resultados indeterminados com os testes ELISA (Niccolai, 2014; Peterhans *et al.*, 2004). Para a metódica de execução, consultar os textos específicos.

A amostra de sangue é uma intervenção invasiva e estressante para animais, o que aumenta significativamente os custos de amostragem (Adjadj *et al.*, 2019). O leite pode ser amostrado de forma simples e barata e pode representar uma matriz alternativa interessante para realizar uma avaliação preliminar do estado de infecção de um rebanho, pois é suposto ser capaz de fornecer informações sobre a infecção por SRLV semelhantes com aquelas obtidas usando uma matriz sanguínea. Isso se deve ao fato de que monócitos portadores de DNA proviral e alguns anticorpos são transferidos do sangue para o colostro ou leite através da glândula mamária, enquanto uma porção de anticorpos pode ser produzida localmente em quantidades limitadas pelas células B da glândula mamária. No entanto, o soro sanguíneo continua a ser a amostra de escolha, pois é importante identificar animais positivos com a maior sensibilidade (Adjadj *et al.*, 2019).

■ Direita

- Isolamento viral

O isolamento do vírus do animal vivo é realizado através da co-cultura de leucócitos do sangue periférico ou leite em células do plexo coróide ovino. O isolamento post-mortem é obtido por meio de culturas *in vitro* de explantes de órgãos ou tecidos infectados (pulmão, plexo coróide, mama, nódulos linfáticos) (Lunardini, 2005; Niccolai, 2014). Após 2-3 semanas de incubação, o aparecimento do efeito citopático caracterizado pela formação de sincício multinucleado e o aparecimento de células estreladas, é indicativo da presença do vírus (Lunardini, 2005; Maiztegui, 2006). No entanto, o isolamento viral é um processo lento e, em alguns casos, o diagnóstico é dificultado quando nenhum efeito citopático é observado (Reina *et al.*, 2009). Os aspectos críticos da detecção viral dizem respeito ao tipo de tecido amostrado, a baixa carga viral no momento da amostragem (no caso de infecções naturais apenas 1×10^{-6} leucócitos no sangue periférico contêm o genoma viral (Niccolai, 2014)), as propriedades biológicas e a composição genética do vírus (Peterhans *et al.*, 2004).

Para a metódica de execução, consultar os textos específicos.

- Imunohistoquímica (IHC)

A imunohistoquímica é baseada na observação do antígeno viral em diferentes tecidos graças à ligação de anticorpos específicos marcados por uma reação química colorimétrica (Leginagoikoa, 2010; Maiztegui, 2006).

Os anticorpos que atuam contra as proteínas produzidas pelos SRLVs podem ser utilizados em técnicas de imunohistoquímica (IHC) a partir de cortes histológicos ou preparações citocentrífugas para estudar macrófagos alveolares, cérebro, glândula mamária, ovário e epidídimo (Reina *et al.*, 2009).

A laboriosidade, o custo da técnica e a dificuldade em encontrar reagentes comerciais levam ao seu uso apenas em estudos experimentais e não em estudos populacionais. (Leginagoikoa, 2010; Reina *et al.*, 2009).

Para a metódica de execução, consultar os textos específicos.

- Detecção de ácidos nucleicos

- Hibridização *in situ* (HIS)

A hibridização *in situ* permite a detecção de ácidos nucleicos virais (DNA e RNA) em preparações celulares através do uso de sondas oligonucleotídicas radioativas marcadas ou com fluorocromos, como digoxigenina e biotina (Leginagoikoa, 2010; Maiztegui, 2006). Permite localizar o vírus em células e órgãos alvo e em combinação com o IHC permite diferenciar células infectadas em estado latente daquelas que suportam uma infecção produtiva (produção de progênie viral). Assim como no IHC, a laboriosidade e o custo da técnica limitam seu uso apenas em estudos experimentais e não em estudos populacionais. (Leginagoikoa, 2010).

Para a metódica de execução, consultar os textos específicos.

- Reação em cadeia da polimerase (PCR)

A reação em cadeia da polimerase é uma técnica que se baseia na amplificação de fragmentos de DNA através de um certo número de ciclos em diferentes temperaturas durante as quais ocorre a desnaturação do DNA alvo, a hibridização com oligo-nucleótidos sintéticos específicos da sequência alvo (primers) que ligar às extremidades 5' e 3' do fragmento alvo e extensão com uma enzima polimerase e nucleótidos livres a fim de gerar cópias suficientes para facilitar a detecção (Leginagoikoa, 2010; Maiztegui, 2006).

É preferível realizar esta técnica em células mononucleares presentes no sangue periférico, uma vez que leite, colostro, esperma e líquido sinovial oferecem menor

sensibilidade e são menos confiáveis do que o sangue como fonte de DNA de SRLV para PCR (Reina *et al.*, 2009).

A pesquisa do genoma viral por PCR não é uma alternativa ao diagnóstico serológico, mas sim um teste complementar capaz de detetar o vírus antes da seroconversão (Maiztegui, 2006; Peterhans *et al.*, 2004). Os fatores que limitam o uso dessa prática são a baixa carga viral e a heterogeneidade dos isolados, devido ao fato que os lentivírus possuem a capacidade de mutar facilmente o genoma (Maiztegui, 2006; Puggioni, 2005; Reina *et al.*, 2009), bem como custos mais elevados do que outros testes (cerca de 10 vezes mais caro do que ELISA (Leginagoikoa *et al.*, 2006)). Porém, a aplicação de métodos de PCR no diagnóstico de SRLV tem a vantagem de fornecer informações genéticas utilizadas em epidemiologia molecular que auxiliam na determinação dos principais grupos filogenéticos aos quais pertencem os vírus (Grego *et al.*, 2007; Reina *et al.*, 2009). Para a metódica de execução, consultar os textos específicos.

No momento, não há tratamento eficaz para infecções por SRLV, pois, devido à alta taxa de mutação, o desenvolvimento de uma vacina eficaz foi e continuará a ser difícil (Blacklaws, 2008; Niccolai, 2014; Stonos *et al.*, 2014).

Portanto, as únicas formas de luta contra o MVV continuam sendo a prevenção da infecção em bandos ílesos e a reabilitação em bandos infectados.

Isso implica na necessidade de métodos diagnósticos confiáveis e fáceis de implementar.

1.1.5. Profilaxia

A profilaxia da infecção é basicamente do tipo direto, ou seja, baseada no controle das condições ambientais e do estado de saúde das propriedades; atenção especial deve ser dada à entrada de novos animais em bandos gratuitos com verificações cuidadosas antes da compra, para que o vírus não tenha sido introduzido (Lunardini, 2005).

O diagnóstico precoce é essencial para garantir a prevenção e controle eficazes de infecções (Reina *et al.*, 2009).

As principais estratégias de controle de lentivírus são:

- prevenção da infecção em grupos líberos pelo MVV por meio de animais de retorno da mesma exploração e introdução de animais apenas de explorações livres, ou seja, aqueles em que os indivíduos são negativos em 3 verificações sorológicas consecutivas após 6 meses (Lunardini, 2005);
- selecionar o retorno exclusivamente de mulheres seronegativas, pois isso impediria a transmissão lactogênica do vírus (Alvarez, 2006);
- seleção genética: os esforços para erradicar o SRLV em ovelhas e manter um estado de ausência de infecção parecem ser melhorados pelo uso de cepas reprodutivas de substituição que são geneticamente resistentes a infecções por lentivírus (Heaton *et al.*, 2013). Consultar o cap.2;
- remediação por meio de planos regionais ou nacionais de erradicação, entendida como a eliminação total do patógeno de uma população e/ou ambiente (Lunardini, 2005).

A Organização Mundial de Saúde Animal (OIE - Organisation Internationale des Epizooties, World Organisation for Animal Health) formulou as recomendações para a importação de ovinos e caprinos para criação, segundo as quais as autoridades veterinárias dos países importadores devem exigir a apresentação de um certificado veterinário internacional declarando que:

- 1) os animais não mostraram sinais clínicos de Maedi-Visna no dia da expedição;
- 2) os animais com mais de um ano de idade foram submetidos a um teste diagnóstico (AGID, ELISA) para Maedi-Visna com resultados negativos nos 30 dias anteriores a expedição;
- 3) o Maedi-Visna vírus não foi diagnosticado clinicamente ou serologicamente em ovelhas e cabras presentes nos rebanhos de origem nos últimos três anos, e nenhum rebanho ou cabra de um rebanho de saúde inferior foi introduzido nesses rebanhos durante esse período.

Essas recomendações foram refletidas no Código Sanitário de Animais Terrestres (Terrestrial Animal Health Code, 2019) ao Capítulo 14.5, dedicado a Maedi-Visna.

A União Europeia, embora não contemplando disposições específicas que favoreçam o controle ou remediação de bandos infectados, emitiu uma Diretiva, (implementada pela Itália com D.P.R. 30 dezembro 1992, n. 556) a 91/68/CEE (Diretiva do Conselho, de 28 de janeiro de 1991, relativa às condições de saúde animal a serem aplicadas no comércio intracomunitário de ovinos e caprinos que, de acordo com as diretrizes da OIE, regulamenta a circulação de ovinos e caprinos, sêmen e embriões para os países do União. Por outro lado, alguns Estados-Membros ou compartimentos deles (governos locais) elaboraram planos de controle ou de reabilitação bastante heterogêneos, bem como heterogêneos são as condições das populações animais em termos de prevalência da infecção, variedade de raças, endereços de produção. e sistemas de cultivo.

A ação preliminar para a elaboração dum plano de erradicação consiste na determinação da prevalência da infecção, que pode ser obtida através da realização de um teste serológico (ELISA) acompanhado de PCR como teste de confirmação em todos os animais do rebanho. com mais de seis meses. Após verificações periódicas (semestrais), será possível classificar os bandos de acordo com o nível de soroprevalência (Niccolai, 2014).

A reabilitação dos rebanhos infectados prevê diferentes planos de intervenção em relação à prevalência do vírus:

- baixa prevalência (10,0% –39,0%): é necessário abater todos os animais seropositivos e seus descendentes, e realizar verificações serológicas com intervalo de 6 meses entre si até que sejam obtidos 3 resultados negativos consecutivos. Usando este sistema, é possível reduzir a prevalência de 30 a 0% num período de 2-7 anos (Peterhans *et al.*, 2004).

O abate total só pode ser aplicado de forma eficiente em áreas com baixa prevalência de bandos infectados e com um número relativamente baixo de animais (<1 milhão de cabeças), especialmente quando o vírus entra pela primeira vez em um território livre. É absolutamente inaceitável em países com vocação para a criação de ovinos como Espanha, Reino Unido, Itália e Romênia, que possuem um grande número de animais (Reina *et al.*, 2009). Além disso, é bom lembrar que o abate completo pode anular quaisquer ganhos obtidos em programas de seleção genética.

- prevalência média (40,0% - 69,0%): sujeitos que apresentam os sintomas e animais idosos são sacrificados enquanto os cordeiros são separados de suas mães e amamentados com colostro e leite artificial, curados ou de fêmeas não feridas (Reina *et al.*, 2009). A percentagem de animais abatidos anualmente, para implementação dessa estratégia, varia entre 15% e 25% (Niccolai, 2014).

- alta prevalência (> 70,0%): proceder como acima prevendo o retorno com indivíduos jovens e saudáveis (negativo em 3 controles consecutivos) mantidos isolados do resto da fazenda (Reina *et al.*, 2009). Também se poderia optar, mas com dificuldades objetivas de manejo, pela criação de duas unidades epidemiologicamente distintas dentro de uma mesma fazenda infetada, uma com animais seropositivos e outra com seronegativos, tendendo ao esgotamento do rebanho seropositivo em alguns anos (Lunardini, 2005; Reina *et al.*, 2009).

Para a concessão do status de livre de SRLV a um rebanho, o número e a frequência dos testes de controle variam de país para país (Reina *et al.*, 2009). Um método para considerar um rebanho ileso é submetê-lo a 3 testes serológicos realizados com 6 meses de intervalo, que devem dar resultados negativos (Niccolai, 2014).

As intervenções de vacinação não são possíveis, pois foram encontrados obstáculos ao desenvolvimento da vacina devido à integração característica do provírus no DNA das células afetadas, aos complexos mecanismos de imunoproteção e persistência viral, à ampla variação genética das cepas virais e às mutações frequentes às quais se encontram no organismo animal (Pepin *et al.*, 1998; Kalogianni *et al.*, 2020).

Apesar das poucas perspectivas de desenvolver uma vacina eficaz contra o MVV e o CAEV em ovelhas e cabras, vários grupos de pesquisa continuam a defender a viabilidade de pesquisar dessa vacina, apoiando várias estratégias.

O uso de vírions inativados intactos não parece recomendável devido à ineficácia e ao risco questionável de tal produto, que poderia induzir sintomas e lesões ainda mais graves. Em contraste, o uso de vírus atenuados obtidos a partir da deleção de genes selecionados, nomeadamente vif, tat e dUTPase, parece promissor. Veículos bacterianos ou virais para a produção de vacinas recombinantes provaram ser outra abordagem promissora (Blacklaws, 2008; Maiztegui, 2006; Pepin *et al.*, 1998).

Embora a erradicação represente a única possibilidade de controle do vírus, planos para erradicar a infecção nem sempre são viáveis, principalmente devido à desconfiança de muitos criadores que, não detectando sintomas evidentes ou diminuições na produção na fase inicial da doença (ou até perdas não alcança níveis muito altos de mais de 50% (Tarlinton *et al.*, 2020)), não acreditam na real utilidade do programa proposto e não estão dispostos a sacrificar animais aparentemente são ou a assumir os trabalhosos procedimentos de intervenção (separação dos animais, reposição do leite e do colostro) (Lunardini, 2005). Os possíveis planos de erradicação seriam baseados na separação dos cordeiros das mães ao nascimento, com subsequente alimentação artificial. No entanto, um plano assim concebido, mesmo que limitado apenas à cota de retorno, é trabalhoso e caro, pois necessita da presença praticamente contínua dos operadores no período das partes. É precisamente por causa dessa situação que as tentativas de implementar programas de reabilitação muitas vezes fracassaram na Itália, como no caso do levantamento do 1992 na área de Livorno (Seriacopi, 1993), enquanto para CAEV, doença caprina semelhante a Maedi-Visna, a Província Autônoma de Bolzano representa um exemplo virtuoso de controle, tendo passado de uma prevalência de rebanhos infectados de 32% em 2007 para 1,5% em 2015 (Tavella *et al.*, 2017). Sempre falando do CAEV, é justo citar outros exemplos de planos de erradicação voluntária como o plano trienal (2013-2016) aprovado pela Região Autônoma da Sardenha (Anexo a Delib. G.R. n. 39/29 do 26.9.2013), bem como o plano aprovado pela Região Friuli-Venezia Giulia em 2012 e o plano aprovado pela Província Autônoma de Trento em Trentino-Alto Adige em 2005 (Bettini *et al.*, 2016).

Em vez disso, em outros Países, a implementação de programas de reabilitação da espécie ovina foi possível e, em alguns casos, levou à eliminação total do MVV: é o caso da Islândia, o primeiro País a ter que lidar com o infecção de Maedi-Visna que estava dizimando explorações de ovelhas e que em 1967, após rigorosos programas de erradicação, foi declarada livre (Palsson *et al.*, 1976).

Na Noruega, onde a prevalência de rebanhos e animais infectados com MVV era baixa, 9% e 0,4% respectivamente, uma campanha de erradicação foi lançada em 1975 consistindo em conter animais de rebanhos positivos ou rebanhos que entraram em contato com os positivos e eliminá-los gradualmente deles, tornando o País livre de doenças em 1985 (Alvarez, 2006; Maiztegui, 2006).

Na Dinamarca, onde 30% dos rebanhos e 11% dos animais estavam infectados, um programa de controle voluntário foi iniciado em 1979, inicialmente baseado em análises serológicas anuais e posterior eliminação de animais seropositivos e seus descendentes

até a completa ausência da doença em o rebanho. Os animais foram monitorados por dois anos e aqueles que tiveram resultados negativos nesses estudos foram monitorados serologicamente a cada três anos (Alvarez, 2006; Maiztegui, 2006). No 1983, os rebanhos positivos eram de apenas 21% (Maiztegui, 2006).

Na França, planos voluntários foram implementados desde a década de 1980 com o objetivo de reabilitar as explorações afetadas, mas apesar da validade dos protocolos implementados, dificuldades de erradicação foram encontradas em rebanhos altamente infectados (Remond *et al.*, 1985).

Na Holanda, os planos de controle voluntário começaram em 1982 (Maiztegui, 2006).

Mesmo no Reino Unido, os planos aplicados são voluntários desde 1982, onde o Estado impôs o abate de sujeitos seropositivos, porém, assumindo parte dos custos a serem incorridos com o programa e isso tem representado um incentivo para os criadores que aderiram em percentagens elevadas e possibilitaram ter, atualmente, mais de duas mil explorações agrícolas livres (Maiztegui, 2006; Pritchard *et al.*, 2000). No entanto, de 1996 a 2007, 31 fazendas de ovinos e 2 fazendas de cabras perderam o credenciamento devido à introdução de animais infectados por meio do comércio. Isso indica a importância dos testes serológicos realizados antes da venda dos animais (Bettini *et al.*, 2016). No entanto, deve-se notar que muitos Países possuem populações de animais com seroprevalência heterogênea e uma variedade considerável de raças, condições ambientais e características de manejo. Portanto, cada País ou região pode precisar de estratégias de controle diferentes (De Azevedo *et al.*, 2017)

Os avanços obtidos especialmente nos últimos 50 anos foram espetaculares e ajudaram a limitar os efeitos da doença e a eliminar o MVV de grandes áreas geográficas. No entanto, as medidas de controle mais eficazes são, em muitos casos, drásticas, caras e não praticáveis em muitas explorações (Alvarez, 2006). É necessário, portanto, continuar pesquisando e estudando novas alternativas de controle mais adequadas e baseadas em critérios racionais, como esta tese se propõe a fazer.

1.2. Seleção para resistência a Maedi-Visna

1.2.1. Relação entre o gene *TMEM154* e a resistência genética a lentivírus

O termo resistência, de acordo com uma consideração ecológica da interação entre o hospedeiro e o patógeno, refere-se à capacidade do hospedeiro de exercer um certo grau de controle sobre o ciclo de vida do patógeno (Bishop *et al.*, 2014). Esta definição ampla abrange as diferentes maneiras pelas quais uma espécie hospedeira pode ser mais resistente (por exemplo, menos infectada, proliferação reduzida de patógenos uma vez infectados, perda ou transmissão reduzida de infecção). Também implica que a alteração da resistência determina tanto os efeitos que beneficiam o hospedeiro individual quanto os efeitos que beneficiam outros membros da população hospedeira, como a redução da transmissão (Bishop *et al.*, 2014).

Os benefícios de melhorar a resistência dos animais a uma doença infecciosa são muitos, incluindo uma melhoria no seu bem-estar, maior eficiência e produtividade e, portanto, uma redução do impacto ambiental, menos dependência de outras medidas de controle de doenças e melhor percepção pública. No entanto, melhorar a resistência a doenças levanta muitos desafios técnicos e, apesar de seus benefícios aparentes, sua sustentabilidade é frequentemente questionada pelo potencial evolutivo dos patógenos e pelo papel da genética do hospedeiro em sistemas de controle integrados, que muitas vezes não é claro (Bishop *et al.*, 2011).

Deve-se notar que, quando falamos de resistência genética a uma doença, dois significados muito diferentes podem ser atribuídos ao termo resistência. A resistência propriamente dita é a capacidade do animal hospedeiro de exercer controle sobre o ciclo de vida do parasita ou patógeno (Bishop *et al.*, 2014) e, portanto, define a atitude do animal em não contrair a doença.

O segundo significado, que é mais propriamente definido como resiliência, refere-se à produtividade de um animal em presença de infecções (Bishop *et al.*, 2014) e, portanto, a aptidão do animal para continuar a produzir sem problemas particulares e na ausência de manifestações clínicas, uma vez que a doença é contraída. Os estudos de que trata esta tese dizem respeito à resistência genética propriamente dita, ou seja, à capacidade das ovelhas de não ser infetadas com o Maedi-Visna vírus.

Os esforços para tentar erradicar a doença e manter um estado de não infecção pelo MVV poderiam ser facilitados se o repovoamento dos rebanhos ocorresse com animais geneticamente resistentes à infecção por lentivírus. É por isso que nos últimos anos as pesquisas têm se concentrado no estudo dos genes envolvidos na infecção pelo Lentivirus, a fim de identificar quaisquer mutações capazes de induzir resistência à infecção.

No Centro de pesquisa sobre os animais de carne nos Estados Unidos (USMARC, United States Meat Animal Research Center) em Clay Center (Nebraska), foi conduzido um estudo de associação genômica (Genome-Wide Association Study – GWAS) para determinar a presença de quaisquer regiões genômicas que possam explicar a suscetibilidade ou resistência aos Lentivírus (SRLV). Os pesquisadores foram capazes de identificar uma região de DNA significativa implicada na suscetibilidade genética à infecção por Lentivirus (Murphy *et al.*, 2014) utilizando Ovine SNP50 BeadChip array e associando o McNemar's test e o chi-squared test (Heaton *et al.*, 2012).

O Ovine SNP50 BeadChip, desenvolvido graças à colaboração de vários grupos de pesquisa organizados no International Sheep Genomics Consortium (ISGC) e coordenado pelos grupos de pesquisa da Nova Zelândia e Austrália (Usai *et al.*, 2010) tem mais de 54.241 sondas uniformemente espaçadas em todo o genoma com um gap médio de 46kb (quilo base = mil bases) que identificam os SNPs. Cada Bead-Chip é composto por 12 compartimentos, que permitem a análise simultânea de 12 animais. Cada compartimento do BeadChip consiste em “microesferas” (3 microns de diâmetro) contendo as sondas capazes de se ligar à porção do DNA em que o SNP específico está presente. A base complementar específica com fluorescência liga-se em correspondência do SNP. Cada microesfera assume uma cor completamente vermelha ou verde se o indivíduo for homocigoto para um ou outro alelo ou uma mistura das duas cores se o indivíduo for heterocigoto. A fluorescência é então lida através de um scanner e os comprimentos de onda detectados são traduzidos em genótipo por meio de uma comparação com um mapa de comprimentos de onda detectados para cada SNP numa população de referência (Usai *et al.*, 2010). Os Bead-Chip oferecem densidade SNP mais do que suficiente para estudos de associação de todo o genoma e outras aplicações, como Genome-Wide Selection (GWS), determinação do mérito genético, identificação de regiões do genoma associadas a caracteres de interesse (Quantitative Trait Loci, QTL), e estudos genéticos comparativos (www.illumina.com). Especificamente, um único SNP altamente significativo foi identificado para a associação com infecção por SRLV no cromossomo ovino 17 (OAR17): lo SNP OAR17_5388531 (Heaton *et al.*, 2012). Isso foi possível porque o alelo nucleotídico "c" do SNP OAR17_5388531 no BeadChip OvineSNP50 encontra-se numa

situação de forte Linkage Disequilibrium (LD) com o alelo E35 localizado a cerca de 10 kb a cima ($r^2 = 0,98$) (Heaton *et al.*, 2013).

Dentro da região genômica relativa ao SNP destacado, a suscetibilidade genética à infecção por SRLV está associada ao gene ovino TMEM154 (Heaton *et al.*, 2014). Na verdade, o c/t do SNP OAR17_5388531 é localizado no íntron 5 do gene ovino TMEM154, homólogo ao gene humano TMEM154 presente no cromossomo 4 (Heaton *et al.*, 2012). O gene TMEM154, cuja função não foi relatada em nenhuma espécie, codifica uma proteína transmembrana com uma estrutura típica de proteínas de membrana do Tipo 1 e, portanto, tem uma sequência de peptídeo sinal, um domínio de cobertura de membrana, um N terminal no lado extracelular da membrana e o C terminal no lado citoplasmático (Heaton *et al.*, 2014), como mostrado na figura 4.

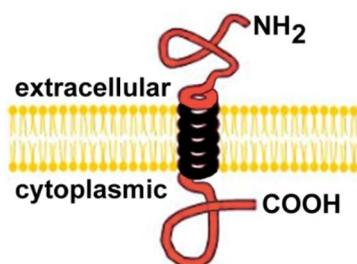


Figura 4. Estrutura típica de uma proteína de membrana Tipo 1 (Heaton *et al.*, 2014).

Apesar da função biológica da proteína TMEM154 e o impacto das mutações do gene TMEM154 sobre a sua função permanecem desconhecidos (Heaton *et al.*, 2013), acredita-se que esta particular proteína transmembrana codificada pelo gene TMEM154 desempenhe um papel na concessão/negação do acesso do vírus ao citoplasma numa célula. Os pesquisadores identificaram várias mutações que codificam as diferenças na estrutura de aminoácidos da proteína TMEM154 e, portanto, no funcionamento da proteína (Heaton *et al.*, 2012). O polimorfismo envolvido na modulação da resistência/suscetibilidade dos ovinos as infecções por Lentivírus está localizado na porção do gene que codifica a parte extracelular da proteína e provoca a substituição do aminoácido glutamato (E) pelo aminoácido lisina (K). O alelo ancestral TMEM154 que codifica um polipeptídeo de 191 aminoácidos com glutamato (E) na posição 35 (E35, variantes 2 ou 3) foi associado à suscetibilidade à infecção, enquanto o alelo mutante codifica uma lisina (K) na posição 35 (K35, variante 1) e foi associado a uma suscetibilidade reduzida à infecção (Gallegiante Crisafulli, 2012).

A partir dos resultados genotípicos obtidos por Heaton *et al.*, (2013) num painel internacional de 75 ovelhas, verificou-se que os dois alelos mais suscetíveis à infecção (haplótipos 2 e 3) são comuns e amplamente distribuídos. No entanto, o haplótipo

TMEM154 mais comum no painel internacional mencionado anteriormente foi o haplótipo 1, menos suscetível à infecção por codificar uma lisina (K) na posição 35, presente com uma frequência de 0,37. Portanto, em muitas populações existe a possibilidade de reduzir a suscetibilidade e, assim, erradicar os SRLVs por meio da seleção de reprodutores (Heaton *et al.*, 2013). A identificação do TMEM154 como o principal gene que influencia a infecção por SRLV levou à pesquisa de polimorfismos causais dentro do gene. O sequenciamento de transcritos de TMEM154 de casos e controles mostrou que as variantes de processamento de mRNA não eram comuns ou estavam associadas à infecção por SRLV. No entanto, o sequenciamento do DNA genômico de mais de 300 ovelhas e 40 raças de todo o mundo revelou 10 mutações missense e duas mutações frameshift (Heaton *et al.*, 2013).

Em estudos de coorte retrospectivos (USMARC) com uma combinação de variáveis não controladas (incluindo idade, raça, condições ambientais, tipo de manejo, frequências alélicas TMEM154, cepas de SRLV e exposição a patógenos) e conduzida em ovelhas em Idaho, Montana, Nebraska e Iowa, a taxa de infecção em ovelhas com uma cópia do TMEM154 variante 2 ou 3 foi aproximadamente três vezes maior do que a das ovelhas sem esses fatores de risco genéticos (Heaton *et al.*, 2014). Um estudo de coorte é um tipo de estudo observacional que consiste em uma análise dos fatores de risco numa amostra de indivíduos sem doença e usa correlações para determinar o risco absoluto dum sujeito de contrair a doença. Esses estudos envolveram uma combinação de variáveis não controladas, incluindo: idade, raça, condições ambientais, tipo de manejo, frequências de alelos TMEM154, cepas de SRLV e exposição a patógenos.

Os SRLVs são geneticamente diversos e têm subtipos (ou seja, "cepas") que parecem ser geograficamente estratificados em muitas localidades do mundo, incluindo os Estados Unidos. Como resultado, as cepas de SRLV que diferem em sua capacidade de infetar ovelhas podem ter evoluído em algumas localidades. Para abordar essa possibilidade, as cepas de SRLV foram caracterizadas em ovelhas naturalmente infetadas e testadas para associações com TMEM154 variantes 1, 2 e 3 (Sider *et al.*, 2013).

Dois subgrupos genéticos predominantes de SRLV foram encontrados em ovelhas USMARC (subgrupos 1 e 2). Ambos os subgrupos eram distintos dos SRLVs que infetaram ovelhas em outras regiões da América do Norte ou noutras partes do mundo.

É importante ressaltar que o subgrupo 2 está associado a ovelhas com TMEM154 variantes 2 ou 3, enquanto o subgrupo 1 está associado a ovelhas apenas com a variante 1. Isso indica que os SRLVs nos Estados Unidos se adaptaram para infetar ovelhas com variantes específicas de TMEM154 e os genótipos de ambos o hospedeiro e o patógeno

influenciam o risco de infecção. Portanto, os esforços para reduzir a prevalência de SRLV aumentando a frequência da variante TMEM154 1 podem ser influenciados por cepas virais que se adaptaram ao genótipo do hospedeiro (Heaton *et al.*, 2014). Também é necessário citar os recentes estudos de associação genética (análogos aos que são apenas descritos) realizados por Cecchi *et al.* (2018) na Toscana em cabras de raça Garfagnina. Após a genotipagem com Goat SNP60 BeadChip e para análises genômicas, uma região genômica foi destacada provavelmente implicada na resistência a infecções por Lentivirus em caprinos. A análise de associação revelou um SNP significativo localizado no cromossomo 18 (CHR18) em 62.360.948 bp (base pair = pares de bases). Esses estudos têm destacado alguns genes que atuam no Sistema Nervoso Central (SNC) e na resposta inflamatória e que podem estar implicados na infecção por SRLV sendo caracterizada pelo aparecimento de lesões inflamatórias também ao nível do SNC (Cecchi *et al.*, 2018).

É possível a resistência genética completa aos SRLVs?

A resistência genética completa a infecções por lentivírus foi documentada com o vírus da imunodeficiência humana 1 (HIV-1) e o recetor de citocina humana CCR5 (Niaf, 2013). O CCR5 é um co-recetor para o HIV-1 e as variantes da proteína naturalmente presentes no CCR5 influenciam a suscetibilidade à influenza do HIV-1 (Niaf, 2013).

Em pessoas que nascem com duas cópias da variante defeituosa, CCR5 Δ 32 (deleção de 32 pares de bases), ocorre a incapacidade de expressar um recetor funcional no nível da membrana celular, resultando em uma alta resistência à infecção por HIV-1 (Galleggiante Crisafulli A., 2012).

A substituição de células-tronco de uma pessoa infectada por células de um doador homocigoto CCR5 Δ 32 levou à cura do HIV-1.

Também a partir de estudos conduzidos em CCR5 ovino, homocigotos apresentando a deleção de 4 pares de bases no CCR5 mostraram níveis provirais reduzidos de SRLV (Alshanbari *et al.*, 2014). A redução nos níveis de MVV provirais é aproximadamente metade daquela de homocigotos e heterocigotos sem deleções.

A grande variabilidade na expressão do CCR5 e suas numerosas funções imunológicas sugerem que essa deleção poderia ter papéis de resistência ou resiliência para muitos outros patógenos ovinos (White *et al.*, 2009).

Se TMEM154 em ovelhas é análogo ao CCR5 em humanos, isso pode explicar a seleção para variantes de frameshift de TMEM154 (Heaton *et al.*, 2013).

Uma advertência para o uso da variação TMEM154 para reduzir a prevalência de SRLV: é importante considerar que algumas ovelhas homocigotas para a variante 1 ainda podem

ter exposição suficiente. Condições adversas de produção, como alta densidade animal, alojamento interno mal ventilado, climas úmidos e a presença de algumas cepas de SRLV, podem aumentar a transmissão e podem exceder a resistência genética fornecida por algumas variantes do TMEM154.

Além disso, foram encontradas deleções nas variantes 4 e 6 que podem reduzir a funcionalidade do gene TMEM154, enquanto os efeitos das variantes 9 e 15 ainda não são conhecidos. Também foi determinado que as variantes 2 e 3 são dominantes sobre a variante 1 para a incidência de infecção por MVV e que ovelhas com uma ou mais cópias das variantes 2 ou 3 têm uma probabilidade de serem infectadas com o vírus MVV 2.85 vezes maior do que em ovelhas sem variantes 2 ou 3 (Heaton *et al.*, 2012).

1.2.2. Escolhas seletivas e programação de acoplamento

Seleção significa classificar os indivíduos disponíveis e escolher os melhores (reprodutores) para produzir a geração futura maximizando a superioridade genética, não esquecendo que a seleção, feita de forma racional, visa maximizar a renda do criador (Pagnacco, 2016)

É possível examinar duas abordagens: intervenção genética num surto e seleção na população para aumentar a resistência à doença. No entanto, deve-se ter cuidado para não confundir essas duas abordagens, pois apresentam lógicas completamente diferentes. A intervenção genética num surto tem como objetivo principal a eliminação da doença com efeito imediato, enquanto a seleção para aumentar a resistência tem como objetivo aumentar a capacidade de proteger-se da doença (que não está presente na exploração) através do aumento do número de animais resistentes ao longo dum determinado período de tempo (Carta *et al.*, 2011).

Deve-se notar que os animais sensíveis devem ser excluídos da reprodução, mas não eliminados da produção.

No estabelecimento de programas de melhoramento para resistência genética ao vírus Maedi-Visna, os seguintes aspectos devem ser levados em consideração:

- tamanho da população
- frequências alélicas iniciais
- presença duma atividade de seleção genética para outras características
- pressão de seleção sobre outros caracteres produtivos (leite, morfologia mamária)
- possíveis efeitos do genótipo TMEM154 em características produtivas

No início da seleção numa exploração o número de carneiros que serão resistentes a partir da análise do genótipo é absolutamente aleatório.

Os dois extremos possíveis que podem ocorrer são:

- a maioria dos carneiros são de genótipo resistente;
- a maioria dos carneiros são de genótipo sensível;

No caso em que maioria dos carneiros serem do genótipo resistente e, portanto, homozigoto K/K ao genótipo TMEM154, há uma boa probabilidade de que a maioria dos carneiros tenha um alto nível de resistência. Isso torna possível aumentar a atitude produtiva dos animais e a eliminação progressiva de carneiros sensíveis da reprodução, prestando atenção aos animais de alto valor. É necessário especificar que para um mesmo

valor genético para os caracteres produtivos, é necessário escolher aqueles com o genótipo mais resistente.

No caso em que a maioria dos carneiros serem de genótipo sensível e, portanto, homocigoto E/E e heterocigoto E/K para o genótipo TMEM154, há uma boa probabilidade de que a maioria das ovelhas tenha um baixo nível de resistência. É necessário, portanto, introduzir novos carneiros resistentes (genótipo K/K) do exterior a exploração, com atenção as aptidões de produção.

De um modo geral, a seleção é mais rápida com frequências intermediárias e em qualquer caso tende a desacelerar com o tempo.

Quanto aos personagens produtivos, o jeito masculino é a maneira mais barata e também a mais eficaz (Carta *et al.*, 2011), como mostrado na figura 5.

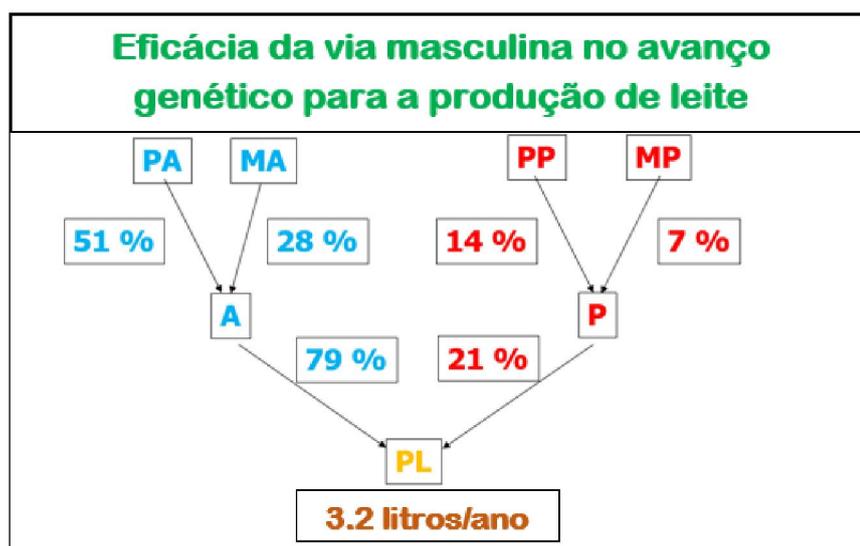


Figura 5. Contribuição das 4 rotas de seleção para o progresso genético anual de ovinos de raça Sarda (Carta *et al.*, 2011).

Somente com a genotipagem dos carneiros é possível conhecer o 50% dos alelos da geração sucessiva. Para conhecer restante 50% é necessário realizar um número de análises aumentado pela proporção reprodutiva entre os sexos (1/40 - 1/100).

Porém, é fundamental estabelecer um banco de DNA também para a população feminina.

A utilização de animais jovens através de práticas de Seleção Genômica permite encurtar o intervalo de geração e obter maiores aumentos genéticos, mas com contraindicações. (Carta *et al.*, 2011).

A ideia básica da seleção genômica era economizar tempo e dinheiro no registro de fenótipos em comparação com a abordagem tradicional, que exigia extensa medição de fenótipos em campo aberto:

- estimar o efeito de segmentos genômicos com matrizes de marcadores densos na porção genotipada e fenotipada da população selecionada (população de referência)
- produzir índices genômicos (GEBV) para candidatos genotipados na seleção

Atualmente, a aplicação de maior sucesso tem sido aquela aplicada aos bovinos leiteiros, reduzindo o intervalo de geração na rota de seleção masculina, mas sem alterar os esquemas tradicionais:

- registro em grande escala de características em populações de touros de referência
- uso extensivo de touros de elite
- seleção limitada na rota de seleção feminina

Em relação ao uso da Seleção Genômica em ovelhas leiteiras, o objetivo não é reduzir o intervalo de geração, mas melhorar a precisão do teste de progênie.

Observam-se:

- teste de progênie menos eficientes
- coleção de fenótipos menos precisos
- escassa difusão da inseminação artificial
- estrutura da população não é ideal para avaliação genética

Os principais limites são:

- menor número de caracteres medidos
- maior custo da análise molecular em relação às informações obtidas
 - bovinos 800.000 SNP x 10-27 caracteres = 10-21.600.000 informações moleculares
 - ovinos 50.000 SNP x 1-5 caracteres = 50.000-250.000 informações moleculares

Uma vez conhecido o genótipo das fêmeas, após a seleção (escolha dos reprodutores) é possível programar o acasalamento (Carta *et al.*, 2011).

De um modo geral, é possível haver três situações:

1. Acoplamento aleatório
2. Acoplamento programado para aumentar o número de indivíduos homocigotos resistentes
3. Acoplamento programado para aumentar o número de indivíduos heterocigotos

Lembre-se de que, em relação a Maedi-Visna, foi demonstrada a existência de três genótipos possíveis no locus E35K do gene TMEM154, mostrado na tabela 4.

Tabela 3. Genótipos do gene TMEM154 e grau de resistência ao vírus Maedi-Visna.

Genótipo		Grau de resistência
K/K	(R/R)	homocigoto resistente
E/K	(S/R)	heterocigoto sensível
E/E	(S/S)	homocigoto sensível

Indivíduos com genótipo K/K são resistentes à doença e transmitem a característica de resistência a todos os seus descendentes, enquanto indivíduos com genótipo E/K são suscetíveis à doença, mas transmitem a característica de resistência para metade de seus descendentes. A partir disso, fica claro que a seleção atuará de forma diferente em relação aos três genótipos.

1.2.3. Comparação com a seleção de resistência a Scrapie (ETS)

- Tanto a resistência a Scrapie (ETS) quanto a resistência ao Maedi-Visna vírus (MVV) são características monogênicas associadas ao gene PrP e ao gene TMEM154, respectivamente.
- Em ambos os casos, é utilizada a genética molecular.
Para a genotipagem ao gene TMEM154, podem ser facilmente utilizadas as amostras biológicas que atualmente chegam aos laboratórios autorizados para genotipagem pelo Plano Nacional de Erradicação da Scrapie.
- Ao fim de diagnosticar Maedi-Visna são usados principalmente os testes serológicos como ELISA e AGID, enquanto não é possível diagnosticar a Scrapie em animais vivos, pois não há teste diagnóstico capaz de detetar esta doença. Esta doença, portanto, só pode ser suspeitada pelo exame dos sintomas clínicos.
No que diz respeito aos estudos genéticos de resistência ao Scrapie, utilizam-se principalmente amostras de sangue, tampões nasais e bolbo capilar, enquanto para estudos genéticos relacionados com a resistência ao MVV utilizam-se principalmente amostras de sangue e tampões nasais.
- A seleção para resistência às doenças pode muitas vezes ter várias consequências ou efeitos colaterais, como efeitos no desempenho da produção ou efeitos na resistência a outras doenças (Bishop, 2015).
A competição com outros objetivos de seleção está sem curso de estudo na seleção para a resistência ao MVV, embora tenha sido demonstrado que a seleção para resistência a Scrapie pode influenciar outros caracteres de interesse como consequência:
 - do efeito direito do PrP o QTL ligados ao PrP;
 - associação com o valor quantitativo por um outro caractere;
 - perda de pressão de seleção sobre um outro caractere;
 - aumento da consanguinidade e redução da variabilidade genética.

- Os indivíduos heterozigotos no caso da resistência a Scrapie são resistentes à doença, enquanto no caso de resistência ao MVV são sensíveis à doença.

Foi comparada o andamento da frequência do alelo ARR e do alelo K na hipótese de utilização de indivíduos ARR/ARR e K/K homozigotos, tendo uma frequência de alelica inicial na população respectivamente de 0,40 e 0,05. Esses aspectos, associados à dificuldade dos criadores em encontrar carneiros homozigotos resistentes ao MVV, ao mesmo tempo, resultam em menor variação do alelo favorável na população do que no caso da ETS.

- Com o Decreto do Departamento de Higiene e Saúde n. 31 do 08.06.2004 foi estabelecido o “Plano Regional de seleção genética para resistência às encefalopatias espongiformes em ovinos” que, entre muitos pontos, previa a adesão obrigatória apenas para criadores inscritos no Livro Genealógico dos ovinos de raça Sarda. Este plano regional foi substituído pelo Decreto do Departamento de Higiene e Saúde e Assistência Social n.º. 615/DecA/4 do 29.04.2009 do “Plano Regional de Luta contra as Encefalopatias Espongiformes e Seleção Genética em Ovinos” que, entre muitos pontos, prevê a adesão obrigatória para todas as explorações da Sardenha e estabelece a impossibilidade de tratamento de carneiros homozigóticos sensíveis (ARQ/ARQ) em toda a região, definindo o 31 de dezembro de 2011 como prazo para seu uso nas explorações (www.regione.sardegna.it/documenti).

No que diz respeito à resistência ao Maedi-Visna vírus, ainda não existe um Plano Regional, mas foi proposto lidar com a lentivirose em dois níveis distintos.

Por um lado, realizar um programa de erradicação de médio/longo prazo, por outro, um programa para as emergências. No primeiro caso é possível repetir o método aplicado com a Scrapie, com a seleção de carneiros homozigotos resistentes (KK) a essa doença, que é um plano sem custo, com boas práticas. Porém, as emergências merecem uma discussão à parte, ou seja, casos em que há perdas vivas, certificáveis e quantificáveis. Nesse caso, deve ser garantida a compensação pelo abatimento e pela perda de renda.

Por outro lado, foi aprovado pela Região da Sardenha um plano trienal (2013-2016) para a erradicação do CAEV (Anexo à Resolução GR n.º 39/29 de 26.9.2013) ao qual podem aderir explorações de cabras e explorações promíscuas (Bettini *et al.*).

- Dentre as várias estratégias previstas no Livro Genealógico dos ovinos de raça Sarda quanto à resistência a Scrapie, é prevista a recuperação de linhagens genéticas válidas para a produção de leite, mas portadoras de alelos sensíveis. No caso da resistência ao Maedi-Visna este aspecto pode ser negligenciado, pois os indivíduos heterozigotos são sensíveis à doença e o número de indivíduos resistentes à doença é muito baixo.

É necessário lembrar os problemas relacionados ao manejo da população selecionada, tais como:

- evitar consanguinidade ou deriva genética
- tamanho insuficiente do Livro Genealógico dos ovinos de raça Sarda para ser capaz de fornecer carneiros para toda a população
- especialização de rebanhos comerciais na produção de carneiros resistentes com consequente competição com o Livro Genealógico dos ovinos de raça Sarda
- existência de raças menos organizadas na seleção de caracteres produtivos, mas resultando mais eficientes em alcançar um maior nível de resistência do que raças com padrões mais organizados

Algumas lições podem ser aprendidas com a seleção de resistência ao Scrapie:

- como por os caracteres produtivos, a seleção através da rota masculina é mais eficaz;
- amostragem e análise devem ser corretos;
- é melhor utilizar animais jovens;
- a seleção é mais rápida ao início;
- programação dos acoplamentos;
- monitoração do efeito sobre os caracteres produtivos;
- organização dum sistema de coleta e armazenamento do material biológico (sangue/tampões nasais) e identificação dos animais;
- os criadores familiarizam com os termos e os resultados da genética molecular, aprendendo como gerir os acoplamentos programados;
- os criadores experimentam a seleção simultânea de características quantitativas influenciados por um único gene;
- colaboração entre instituições de saúde e associações de criadores

1.3. Generalidades sobre estudos de associação genome-wide (GWAS)

Os estudos de associação sobre o genoma inteiro (Genome-wide association studies - GWAS) consistem em testar desde centenas de milhares até milhões de variantes genéticas nos genomas de muitos indivíduos para identificar associações genótipo-fenótipo (Bruscagin, 2011; Manolio *et al.*, 2010; Tam *et al.*, 2019; Zeng *et al.*, 2015).

Essas associações levaram a descobertas sobre a arquitetura da suscetibilidade à doença (por meio da identificação de novos genes e mecanismos fisiopatológicos) e avanços nos cuidados clínicos (por exemplo, a identificação de novos alvos de fármacos e biomarcadores da doença) e na medicina (por exemplo, previsão de risco e otimização de terapias com base nos genótipos), revolucionando o campo da genética de doenças complexas na última década (Manolio *et al.*, 2010; Pearson *et al.*, 2008; Tam *et al.*, 2019; Zeng *et al.*, 2015).

O desenho experimental mais fácil, menos caro e mais amplamente usado para estudos de associação genome-wide até o momento é o desenho de caso-controle, que considera a diferença entre a frequência de variantes genéticas detetadas em indivíduos não emparentados e afetados dum distúrbio (casos) e a mesma frequência medida em indivíduos saudáveis (controles) (Bruscagin, 2011; Manolio *et al.*, 2010; Pearson *et al.*, 2008; Tam *et al.*, 2019; Zeng *et al.*, 2015). Além disso, nesses estudos é possível reunir rapidamente um número suficiente de participantes como casos e controles. (Pearson *et al.*, 2008).

Os estudos de associação podem ocorrer usando duas abordagens: direta e indireta.

Um estudo de associação direta consiste em catalogar e testar uma a uma todas as possíveis variantes causais, cujas frequências são comparadas entre casos (pacientes) e controles, enquanto um estudo de associação indireta é baseado na associação entre doença e polimorfismos (marker) localizados perto de locus estratégicos, empregando mapas de marcadores densos para explorar sistematicamente o genoma (Bruscagin, 2011). O estudo de associação indireta, portanto, aproveita do Linkage Disequilibrium (LD), ou seja, o fenômeno pelo qual dois ou mais alelos adjacentes não segregam independentemente, mas são transmitidos dentro dos blocos de haplótipos (Zara, 2011).

Em qualquer caso, a escolha dos marcadores recai sobre os polimorfismos de nucleotídeo único (SNPs - Single Nucleotide Polimorphism), ou seja, marcadores bialélicos determinados por uma variação do material do gene num único nucleotídeo (mutação pontual) que se estabilizam como resultado do acaso ou da seleção natural (Bruscagin, 2011; Zara, 2011).

O baixo polimorfismo é compensado pela alta frequência com que aparecem no genoma. O polimorfismo pode ser considerado estável se estiver presente na população em proporção superior a 1% enquanto, abaixo desse limite, fala-se duma variante rara (Zara, 2011).

Devido à enorme quantidade de dados e ao grande número de testes estatísticos realizados, a abordagem GWAS apresenta muitos problemas estatísticos e computacionais, bem como problemas de armazenamento e gerenciamento de dados (Pearson *et al.*, 2008; Tam *et al.*, 2019; Zeng *et al.*, 2015).

Um estudo de associação de todo o genoma com um projeto experimental de controle de caso geralmente envolve as seguintes etapas (Zara, 2011):

- a) definição de casos e controles;
- b) coleta de amostras biológicas e dados clínicos;
- c) genotipagem;
- d) controles de qualidade sobre indivíduos e marcadores;
- e) análise da estrutura populacional;
- f) teste de associação;
- g) inferência de marcadores não genotipados;
- h) anotação dos resultados;
- i) inspeção visual das parcelas de chamada para casos e controles;
- j) seleção de marcadores candidatos e regiões correspondentes;
- k) extensão e validação dos resultados;
- l) análises haplotípicas nas regiões selecionadas;
- m) interpretação biológica dos resultados
- n) estudos funcionais.

Os cálculos do tamanho da amostra, que devem ser apropriados ao tipo de estudo, são complicados e exigem suposições sobre o poder dos alelos e sua frequência na população. (Mullen *et al.*, 2009). Os principais fatores que determinam o tamanho da amostra são a força da associação subjacente, que depende tanto do poder do alelo para causar doença, quanto da frequência do alelo na população (nenhum dos quais pode ser conhecido a priori) e do limiar estatística para significância, que depende das correções aplicadas para explicar vários testes (expressa pelo valor p) (Mullen *et al.*, 2009).

A genotipagem é realizada através da hibridização de DNA em chips de quartzo em que sequências de múltiplos oligonucleotídeos foram sintetizadas flanqueando SNPs identificados e marcados de forma diferente dependendo da variante SNP (Mullen *et al.*, 2009).

O controle de qualidade dos dados sobre indivíduos e SNPs, ou seja, verificar e limpar rigorosamente os dados brutos, é extremamente importante antes de qualquer análise de associação (Zeng *et al.*, 2015).

Em relação ao controle de qualidade dos dados sobre os indivíduos, uma das primeiras avaliações consiste na determinação da Call Rate em indivíduos, ou seja, a porcentagem de genótipos nomeados por indivíduo em relação ao total de indivíduos (Zara I., 2011). Normalmente, os indivíduos com percentagens de Call Rate perdida $> 1\% - 5\%$ são removidos, pois envolvem alguns problemas com o processo de genotipagem (Zeng *et al.*, 2015). Então é realizada a verificação das relações parentais anotadas através da execução de testes de verossimilhança entre genótipos reais e genótipos esperados com base na relação parental chamada (Zara, 2011).

No que diz respeito ao controle de qualidade dos dados em SNPs, uma das primeiras avaliações diz respeito à determinação da Call Rate dos SNP, ou seja, a razão entre o número de SNPs aos quais um determinado genótipo foi atribuído e o número total de SNPs presentes no chip (Zara I., 2011).

Normalmente, mesmo neste caso, os indivíduos com percentagens de Call Rate perdida $> 1\% - 5\%$ são removidos (Zara, 2011).

Uma vez que algumas abordagens de análise de associação são desenvolvidas sob a hipótese de Linkage Equilibrium, é útil verificar se os SNPs desviam-se do equilíbrio de Hardy-Weinberg (HWE) (Zara, 2011; Zeng *et al.*, 2015). Para este fim, cada SNP é examinado usando o teste do qui-quadrado e depois, são eliminados os SNPs com valores de P-value a baixo de 10^{-6} (Zeng *et al.*, 2015). O desvio do equilíbrio de Hardy-Weinberg, que pode ocorrer devido à seleção, mutação, fluxos de migração, erro de genotipagem ou associação genética, nos casos é normalmente considerado como um sinal de associação de sinal (Zara, 2011; Zeng *et al.*, 2015).

Outra avaliação relacionada ao controle de qualidade dos dados em SNPs é a determinação da Menor Frequência Alélica (Minor Allele Frequency - MAF), definida como a proporção entre a frequência da variante mais rara com a frequência da variante mais comum de um determinado SNP (Bruscagin, 2011; Zara, 2011). Os SNPs com uma frequência alélica inferior de 1% são excluídos da análise subsequente, pois geralmente indicam erros de genotipagem ou variantes raras (ou seja, locus com MAF $< 1\%$) e podem

causar associações espúrias porque podem aparecer em indivíduos com fenótipos extremos (Zara, 2011; Zeng *et al.*, 2015). São também eliminados os SNPs com excesso de erros mendelianos e com uma taxa de erro excessiva em duplicas (Zara, 2011).

Na análise de associação, a estrutura da população é considerada como um fator de confounding devido à presença de diferenças alélicas entre casos e controles não relacionadas ao fenótipo de interesse e, portanto, a diferenças sistemáticas em ancestrais que podem causar resultados espúrios se não forem levados em consideração (Mullen *et al.*, 2009; Zara, 2011). É uma das razões mais citadas para a não replicação de variantes previamente confirmadas (Zeng *et al.*, 2015). Quando as diferenças na frequência alélica entre o caso e o controle são devidas à presença de uma estrutura (ou seja, subgrupos) dentro de uma população (population structure), presença de ligações familiares entre os sujeitos da amostra (family structure) e presença de correlações, mesmo distantes, entre sujeitos com vínculo familiar superior ao primeiro (cryptic relatedness), há uma situação de estratificação da população (Bruscagin, 2011; Zeng *et al.*, 2015). Normalmente, os estudos de associação genome-wide evitam de amostrar, dentro de um mesmo estudo, indivíduos de diferentes populações com o intuito de evitar a estratificação (Bruscagin, 2011). A análise das componentes principais (Principal Component Analysis - PCA), realizada através o software online EIGENSOFT, representa uma abordagem multivariada que é frequentemente aplicada para detetar diferenças em termos de estruturas genéticas entre subgrupos de indivíduos, pois as matrizes de covariância permitem reduzir o espaço de dados identificando os eixos de maior variação das frequências alélicas e identificando os outliers e, portanto, são uteis para dar uma interpretação geográfica aos dados (Bruscagin, 2011; Zara I., 2011; Zeng *et al.*, 2015).

A análise de associação, realizada comparando a frequência de alelos ou genótipo entre caso e controle, é crítica para o estudo de associação genome-wide (Zeng *et al.*, 2015). No entanto, um dos principais desafios é examinar centenas de milhares de SNPs simultaneamente, mas num contexto típico, o número de SNPs excede em muito o tamanho da amostra (Zeng *et al.*, 2015).

Uma das principais limitações das abordagens genome-wide é a necessidade de adotar um alto nível de significância para levar em conta vários testes (Tam *et al.*, 2019). Isso geralmente é feito usando a correção Bonferroni para verificar a taxa de erro familiar (Family-wide error rate - FWER), ou seja, a probabilidade de rejeitar pelo menos uma hipótese nula quando todos os valores nulos estiverem corretos e manter a taxa de falsos positivos de todo o genoma ao 5%, com base na hipótese de 1 milhão de testes independentes para a variação genética comum (Tam *et al.*, 2019; Zeng *et al.*, 2015).

No entanto, a correção Bonferroni assume independência entre os testes e se mostra excessivamente conservadora na presença de LD (Zara I., 2011). A falsa taxa de descoberta (False Discovery Rate - FDR), controlada através do procedimento step-up linear, é uma outra medida de erro comumente usada, que fornece uma maneira menos conservadora, verificando a proporção prevista de rejeições nulas falsas entre todas as rejeições (Zeng *et al.*, 2015).

A inferência dos marcadores não genotipados permite aumentar o número de marcadores testados, a custos muito baixos em comparação com os dos experimentos (Zara, 2011).

A apresentação visual é útil para compreender os resultados do estudo de associação genome-wide (Zeng *et al.*, 2015). O gráfico quantil-quantil (QQ), muito comum para avaliar a existência da estrutura da população antes e depois da correção, é construído como um gráfico de dispersão das estatísticas qui-quadradas classificadas e observadas do menor ao maior em comparação com os valores teóricos numa hipótese nula de nenhuma associação (Zeng *et al.*, 2015). Se as estatísticas vierem de uma distribuição nula, o gráfico deve seguir a diagonal linearmente (Zeng *et al.*, 2015). Os p-value dos GWAS são geralmente mostrados pelo Manhattan plot, obtido pela distribuição no eixo vertical dos p-value numa escala $-\log_{10}$ (necessário ao fim de destacar os pequenos valores de p-value, que sugerem SNPs potenciais relacionados à doença) e no eixo horizontal a posição física dos SNPs ao longo dos cromossomos, que geralmente são diferenciados por apresentarem cores diferentes (Zeng *et al.*, 2015).

2. MATERIAIS E MÉTODOS

2.1. Descrição do rebanho genómico (GG)

Os dados elaborados nesta tese referem-se aos dados recolhidos pela Agris Sardegna, a Agência da Região da Sardenha para a investigação científica, experimentação e inovação tecnológica nos sectores agrícola, agroindustrial e florestal, na exploração do rebanho genómico (GG) dela constituído. Esta exploração, nomeada "Ovile Sardo" é localizada no Município de Monastir na localidade de "Bassigna - San Gemiliano" (Strada Statale 131, Km 15.400).

A gestão é do tipo clássico semi-extensivo, muito utilizada na Sardenha.

O rebanho tem uma consistência anual que chega a cerca de 1000 cabeças e com uma cota de retorno de cerca de 25% de retorno, a cada ano são geradas 250 filhas de carneiros que representam as principais linhagens da raça Sarda utilizadas no Livro Genealógico das ovelhas de raça Sarda (LG). O objetivo dessas escolhas é construir uma população em miniatura na qual todas as variantes do gene que segregam em toda a população selecionada são introduzidas e replicadas.

O DNA dos animais é atualmente extraído de células de clivagem obtidas com o uso de GenoTube Livestock Swabs (swab nasal) (Figura 6).



Figura 6. GenoTube Livestock Swabs (www.thermofisher.com)

A extração do DNA foi realizada no Laboratório de Biologia Molecular do Agris localizado em Bonassai - Olmedo (SS), S.S. 291 no km 18.600 utilizando o mediante Kit Nexttec™ “DNA Isolation Kit for Tissue and Cells” e utilizando o termomixer "INCU-MIXER MP" produzido pela Benchmark para a incubação das amostras. Este kit permite realizar a lise e posterior purificação do DNA de forma rápida e fácil através do uso dum buffer e duma purificação do DNA numa única etapa (www.nexttec.de). Com este método, são obtidos cerca de 30 ng/μl de DNA usando cerca de 20 mg de tampão nasal.

Apenas em situações particulares são realizadas extrações de DNA do sangue inteiro usando o método salino (método salting out) e o Kit Qiagen “DNeasy Blood & Tissue Kit (250)” com um banho termostático para a incubação das amostras. Com o método salting out, são obtidos aproximadamente 300-500 ng/μl de DNA usando aproximadamente 2 ml de sangue inteiro, enquanto da extração usando o Kit Qiagen são obtidos aproximadamente 30 ng/μl de DNA usando 200 μl de sangue inteiro.

Após a extração, o DNA é analisado através do Illumina OvineSNP50 BeadChip que permite determinar o genótipo individual para cerca de 50.000 polimorfismos de nucleotídeo único (SNPs) espalhados por todos os 26 autossomos das ovelhas.

A análise de DNA de carneiros da LG também está disponível através do OvineHD BeadChip, que permite a análise de aproximadamente 600.000 SNPs. A genotipagem é realizada pelo Istituto di Ricerca Genetica e Biomedica (IRGB) no centro localizado no Bioparco di Sardegna Ricerche (Pula, CA) (www.cnr.it).

Dentre as diversas atividades, o Laboratório de Biologia Molecular Agris realiza PCR real-time com o método TaqMan através “7500 Fast Real-Time PCR System” produzido pela Applied Biosystems (genotipagem para Maedi-Visna e Scrapie) e sequenciamento com o método Sanger através do sequenciador automático “3130xl/ Genetic Analyzer” produzido pela Applied Biosystems e Hitachi. O sequenciamento foi realizado com o método Sanger no DNA de 59 animais entre ovelhas do GG e carneiros do LG.

Além disso, medições fenotípicas precisas são realizadas periodicamente para um grande número de caracteres incluindo as características produtivas, qualitativas, funcionais e características de resistência às principais patologias que afetam a produção ovina (incluindo estrôngilos gastrointestinais, mastite e paratuberculose).

2.2. Testes serológicos (ELISA) para Maedi-Visna

Como descrito no capítulo 1.1.4, o teste imunoenzimático ELISA é um dos testes serológicos mais amplamente usados para a detecção de MVV em animais vivos.

Na primavera de 2016, 860 ovelhas do "Rebanho Genómico" foram submetidas a análises serológicas por meio de testes ELISA para pesquisa do Maedi-Visna vírus em animais vivos, a fim de verificar se o mecanismo de resistência ao Maedi-Visna identificado por vários autores de outras raças também subsistiram na raça da Sarda.

Todos os testes serológicos são realizados pelo Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Sardegna "G. Pegreff" (www.izs-sardegna.it).

A prevalência dentro do rebanho genómico foi bastante elevada (83%), como relatado na tabela 5. Também foi observada uma tendência de aumento da prevalência com o aumento da idade dos animais: 50% em primíparas e mais de 95% em ovelhas adultas, pois evidenciado pelo gráfico na Figura 7.

Tabela 5. Resultados testes ELISA relativos a Primavera 2016.

Ano de nascimento	Idade(meses)	Numero	NEGATIVO	POSITIVO	Prevalência
2009	90	80	2	78	0.98
2010	78	177	5	172	0.97
2011	66	101	3	98	0.97
2012	54	83	7	76	0.92
2013	42	89	1	88	0.99
2014	30	123	21	102	0.83
2015	18	207	104	103	0.50
Total		860	143	717	0.83

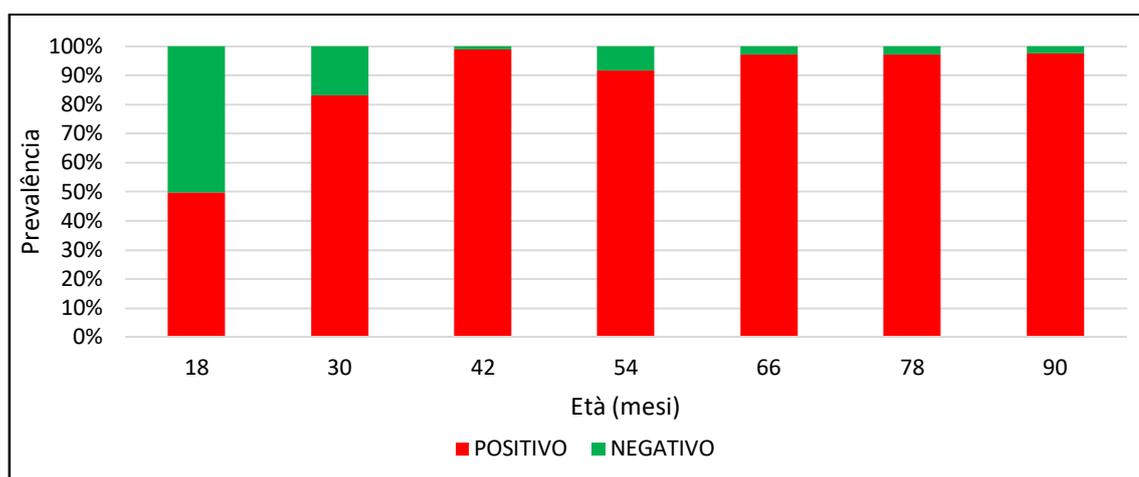


Figura. 7: Aumento da prevalência com o aumento da idade dos animais

A partir da primavera de 2016, foi estabelecido um protocolo de análise serológica para pesquisa do Maedi-Visna vírus que prevê a realização do primeiro teste serológico ELISA aos 12 meses de idade. Posteriormente, os testes serológicos são repetidos a cada seis meses apenas nos animais cujo teste anterior deu resultado NEGATIVO.

Os testes são então realizados:

- em janeiro pela primeira vez em todas as primíparas e em todos os adultos cujos testes anteriores deram um resultado NEGATIVO;
- em junho em todas as primíparas e em todos os adultos cujos testes anteriores deram um resultado NEGATIVO.

De junho de 2016 a janeiro de 2020, foram realizados 2.682 testes ELISA dos quais 2.572 em animais genótipados, num total de 1.823 ovelhas das quais 1.744 com o genótipo Ovine SNP50 BeadChip. Foram então realizados 1.47 testes ELISA/ovelha.

Para fins desta tese, foram considerados apenas os animais com o genótipo Ovine SNP50 BeadChip.

A Tabela 6 mostra a frequência do número de testes ELISA realizados por ovelha.

A Tabela 7 e a Figura 8 mostram a distribuição dos testes ELISA e resultados por faixa etária.

Tabela 6. Frequência do número de testes ELISA realizados por ovelha

n. Testes ELISA	Numero de indivíduos
1	1266
2	256
3	144
4	45
5	25
6	2
7	3
8	3
Total	1744

Tabela 7. Distribuição dos testes ELISA e resultados por faixa etária.

Idade (meses)	NEGATIVOS	POSITIVOS	TOTAL
12	504	389	893
18	283	224	507
24	107	203	310
30	69	134	203
36	30	41	71
42	12	97	109
48	7	8	15
54	10	76	86
60	7	4	11
66	6	91	97
72	2	2	4
78	6	170	176
84	2	3	5
90	3	78	81
96	2	0	2
102	1	0	1
108	1	0	1
TOTAL	1052	1520	2572

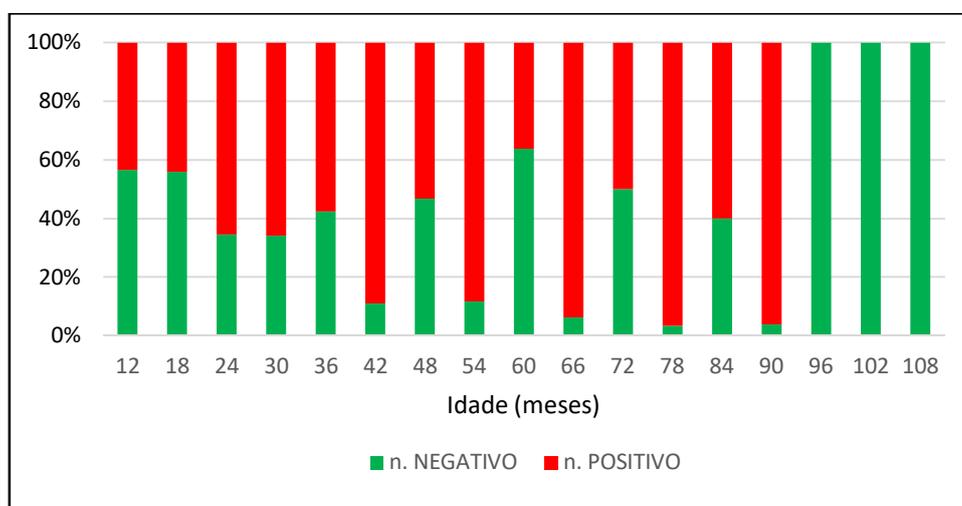


Figura. 8: Histograma referente à distribuição do teste ELISA e resultados por faixa etária.

A Tabela 8 mostra a distribuição da idade no primeiro teste ELISA com resultado POSITIVO e portanto, no último teste realizado.

Tabela 8. Distribuição da idade ao 1º teste ELISA POSITIVO.

Idade (meses) ao 1º teste POSITIVO	Numero de indivíduos
12	389
18	224
24	175
30	133
36	35
42	97
48	4
54	76
60	3
66	91
72	2
78	170
90	78
0*	267
TOTAL	1744

0* = animais que não tiveram nenhum teste com resultado POSITIVO

Os dados mostrados na tabela 8 podem ser enganosos porque:

1. os 708 animais com 1º teste ELISA POSITIVO com idade > 12 meses não foram submetidos a nenhum teste anteriormente, pois eram ovelhas adultas POSITIVAS presentes na primeira amostragem em junho de 2016 e para os quais não é, portanto, possível definir a idade de "positivação";
2. os 267 animais que não tiveram nenhum teste POSITIVO são principalmente animais de 12 e 24 meses de idade na última verificação em janeiro de 2020, enquanto há muito poucos (17) animais "nunca positivos" com mais de 36 meses.

Portanto, apenas para 769 indivíduos é possível determinar o semestre (ou ano para) de positividade, como reportado na tabela 9 e destacado pelo gráfico na figura 9.

Tabela 9. Distribuição de positividade por idade

Idade (meses)	Numero de indivíduos
<12	389
12-18	124
18-24	170
24-30	31
30-36	35
36-42	9
42-48	4
48-54	1
54-60	3
66-72	2
84-90	1
TOTAL	769

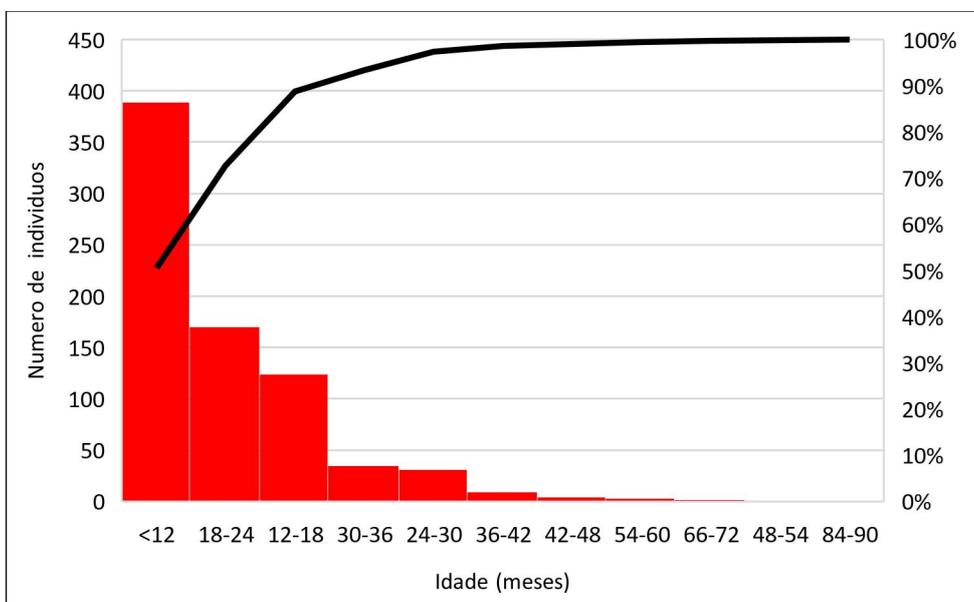


Figura. 9: Gráfico relacionado à distribuição etária de positividade

2.3. Genome-wide association studies

A análise GWAS foi realizada através do uso do software PLINK, que é um conjunto de ferramentas projetado por Shaun Purcell que permite o estudo de grandes conjuntos de dados de genótipos e fenótipos, oferecendo ferramentas complementares para gerenciamento de dados, estatísticas gerais, estimativa de relações entre indivíduos, registro, classificação, fusão e inversão de fitas de DNA, extração de subconjuntos de dados e muitas outras funções versáteis (Purcell *et al.*, 2007).

Especificamente, um estudo de associação foi realizado usando uma abordagem indireta, explorando assim SNPs e Linkage Disequilibrium (LD) e adotando um desenho experimental caso / controle, previamente descrito no capítulo 1.3.

Os fenótipos submetidos à análise GWAS (tabela 10) são de dois tipos:

- AGE12: positividade na idade de 12 meses (ou seja, no primeiro controle)
- AGE36: positividade na idade de 36 meses

Tabela 10. Fenótipos submetidos à análise GWAS

Età (mesi)	NEGATIVOS	POSITIVOS	TOTAL
AGE12	504	389	893
AGE36	10	956	986

O fenótipo dos animais NEGATIVOS foi codificado como 1, enquanto o fenótipo dos animais POSITIVOS foi codificado como 2.

A análise realizada é do tipo “caso/controle”, utilizando um SNP por vez, em que os animais que apresentam positividade para a doença são tratados como caso, enquanto os que não apresentam a doença como controle.

Dado um fenótipo de “caso/controle” por meio do uso do *flag --assoc*, são obtidos os resultados de um teste alélico qui-quadrado (1df chi-square allelic test).

Com o uso do *flag --model*, quatro outros testes são realizados (1df dominant gene action, 1df recessive gene action, 2df genotypic e Cochran-Armitage trend) e, a seguir, combinam os resultados num único file.

Quando o *flag --fischer* ou *--fisher-midp* está presente, o teste exato de Fisher é usado para gerar os p-values corretos (www.cog-genomics.org).

Dos cinco testes disponíveis, foram considerados os seguintes modelos:

- Alélico (1df chi-square allelic test) com D versus d, que realiza uma comparação das frequências dos alelos no caso e no controle, onde D e d são respectivamente o alelo mais frequente e o alelo menos frequente;
- Dominante (1df dominant gene action) com DD e Dd versus dd no caso e controle, onde DD é o genótipo homocigoto dominante, Dd é o genótipo heterocigoto e dd é o genótipo homocigoto recessivo;
- Recessivo (1df recessive gene action) com dd e Dd versus DD no caso e controle.

Para levar em consideração a estrutura da população, os primeiros 10 componentes principais (PCs) foram extraídos do conjunto de SNPs usados. Esses novos PCs foram usados como covariáveis no modelo de associação (por meio do *flag --covar*).

O *flag --logistic* foi usado para realizar a regressão logística usando um fenótipo de caso/controle e algumas covariáveis. Se qualquer um dos *flag* for usado com *--all-pheno*, o tipo de regressão se ajustará automaticamente com base em se o fenótipo atual é caso/controle ou não (www.cog-genomics.org).

Por fim, a correção de Bonferroni para o número de testes realizados (número de SNPs) foi aplicada por meio do *flag --adjust*, que gera um file .adjusted com cada relatório de teste de associação, contendo várias correções básicas de teste múltiplo para os p-valores brutos.

Os testes foram realizados em 43.390 SNPs autossômicos do Ovine SNP50 BeadChip, cujas posições correspondiam ao Oar_v4.0 ou seja ao Ovine Genome Assembly v4.0 (www.ncbi.nlm.nih.gov/assembly/GCF_000298735.2/) lançado em 20 de novembro de 2015 pelo International Sheep Genomics Consortium (ISGC).

A plataforma NCBI Genome Data Viewer (GDV) do National Center for Biotechnology Information é um navegador de genoma que suporta a exploração e análise de conjuntos de genomas eucarióticos anotados, capazes de exibir diferentes tipos de dados moleculares num contexto genômico completo, incluindo anotações de genes, alinhamentos BLAST e dados de estudos experimentais dos bancos de dados NCBI GEO e dbGaP (www.ncbi.nlm.nih.gov). Com o uso desta plataforma, foi realizada uma pesquisa dentro do Ovine Genome Assembly v4.0 (Oar_v4.0 (GCF_000298735.2)) a fim de identificar os genes localizados nas proximidades dos SNPs. Especificamente, foram considerados os genes localizados em 250.000 pares de bases a montante e a jusante do SNP. O GDV também foi utilizado nas mesmas condições para a pesquisa de genes presentes nas Runs of Homozigosity (ROH) mais repetidas para cada fenótipo analisado.

Para identificar o nome completo dos genes identificados no NCBI GDV foi usado GeneCards®, um banco de dados integrativo que fornece informações completas e fáceis de usar sobre todos os genes humanos anotados e previstos (www.genecards.org).

Para a análise estatística e processamento gráfico dos resultados, foi utilizado o ambiente estatístico R por meio do software R studio, que oferece uma grande variedade de técnicas estatísticas (como, por exemplo, modelagem linear e não linear, testes estatísticos clássicos, tempo análise de séries, classificação, agrupamento, ...) e técnicas gráficas e é altamente extensível (www.r-project.org).

2.4. Runs of Homozigosity

As "Runs of Homozigosity" (ROH) são definidos como trechos ininterruptos de DNA onde os genótipos homozigotos seguem um ao outro ininterruptamente e, portanto, representam uma estimativa do grau de autozigosidade em todo o nível do genoma (Gaspa *et al.*, 2014). O início da ROH num indivíduo pode ser o resultado de eventos de consanguinidade: quanto mais longos esses segmentos são, mais provável é que tenha ocorrido consanguinidade recente (Purfield *et al.*, 2012). Portanto, se os acasalamentos entre indivíduos relacionados ocorrerem numa determinada população, a porção de ROH no genoma da prole aumentará. Como a recombinação ao longo do tempo interrompe longos segmentos cromossômicos, o comprimento de um segmento homozigoto depende, em parte, do tempo decorrido pelo último ancestral comum dos pais. Portanto, segmentos homozigotos mais longos são observados numa população inbreed do que em populações outbreed (Gibson *et al.*, 2006).

A extensão e a frequência desses genótipos homozigotos podem, portanto, fornecer informações sobre a ancestralidade dum indivíduo e sua população (Purfield *et al.*, 2012). No entanto, as ROH também podem estar presentes em populações outbreed como resultado de outros fenômenos (por exemplo, mutação incomum, linkage disequilibrium (LD) e taxas de recombinação em certos locais genômicos (Purfield *et al.*, 2012)) (Gaspa *et al.*, 2014). Uma frequência mais alta de haplótipos estendidos comuns também pode ser uma consequência da pressão seletiva nas regiões genômicas envolvidas em papéis funcionais (Gaspa *et al.*, 2014). Portanto, uma vez que a seleção é frequentemente caracterizada por uma redução local na diversidade de haplótipos, os padrões de distribuição de ROH em todo o genoma pode fornecer informações sobre regiões genômicas que foram potencialmente sujeitas a pressões seletivas recentes e/ou antigas (Mastrangelo *et al.*, 2018).

Em humanos, as ROH foram amplamente estudados e representam um método estabelecido para avaliar a evolução da consanguinidade numa população. Além disso, ROH foram correlacionadas com a prevalência de algumas doenças complexas e foram usadas para mapear as variantes recessivas de muitos outros distúrbios com painel SNP de alta densidade (> 500.000 SNPs) (Gaspa *et al.*, 2014; Purfield *et al.*, 2012).

Na genética animal, as ROH são usadas como preditores de níveis de consanguinidade em todo o genoma para caracterizar a distribuição genômica da depressão por consanguinidade sobre um fenótipo e para identificar genes associados a características de interesse econômico presentes nessas regiões (Mastrangelo *et al.*, 2018).

3. RESULTADOS

3.1. Genome-wide association studies

Os resultados da análise de caso/controle (*flag --model*) são mostrados abaixo.

O limite de significância foi estabelecido por meio do logaritmo negativo na base 10 da razão entre 0,05 (limite de significância) e 43390 (número de SNPs analisados):

$$-\log_{10}(0,05 / 43390) \sim 6.$$

As Figuras 10-15 mostram os Manhattan plots das análises de Caso/Controle usando o *flag --model*.

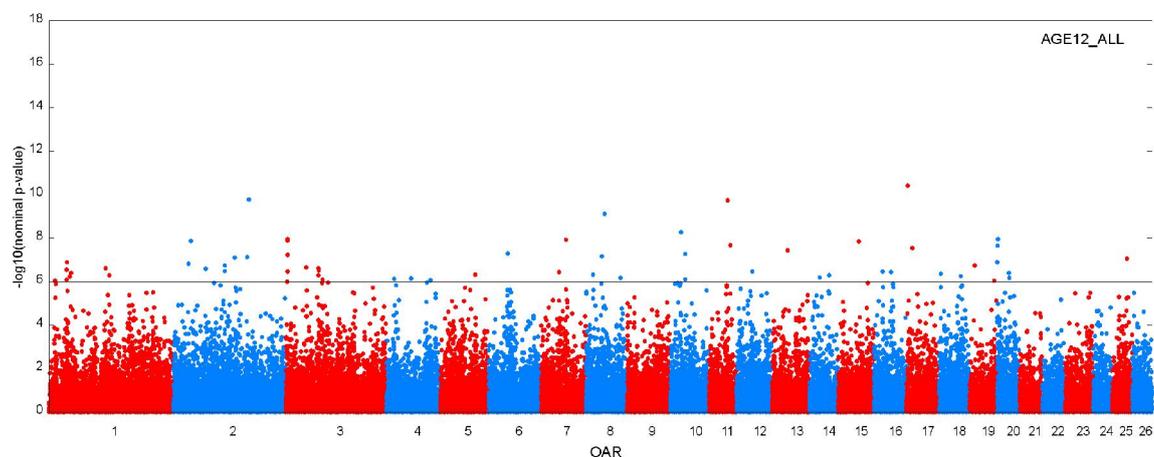


Figura. 10: Positividade aos 12 meses - Análise Caso/Controle - modelo ALLELIC

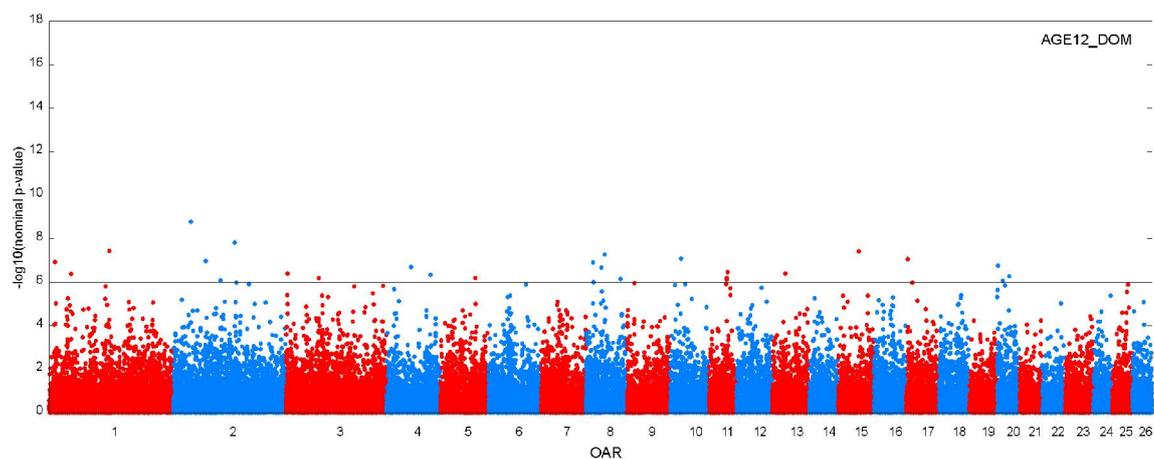


Figura. 11: Positividade aos 12 meses – Análise Caso/Controle – modelo DOMINANT

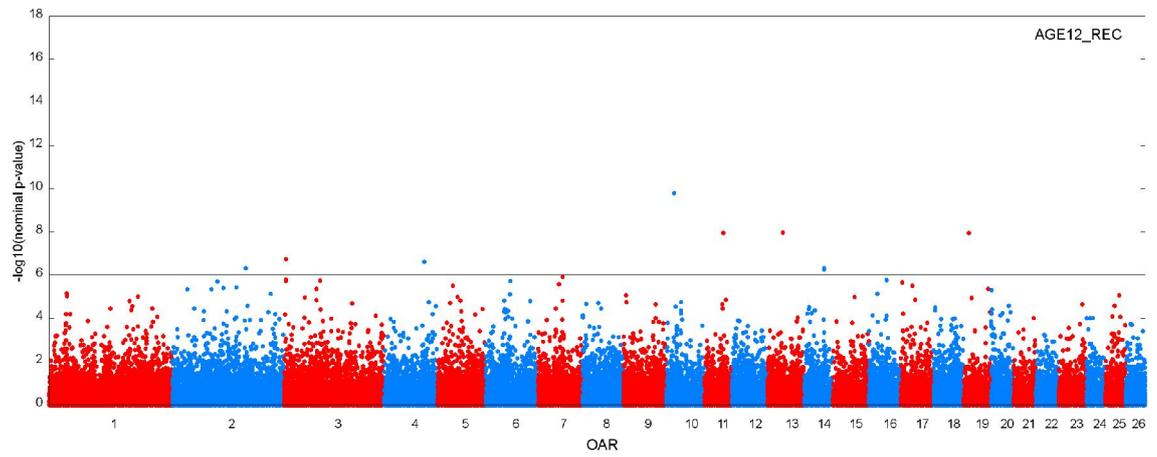


Figura. 12: Positividade aos 12 meses – Análise Caso/Controlo – modelo RECESSIVE

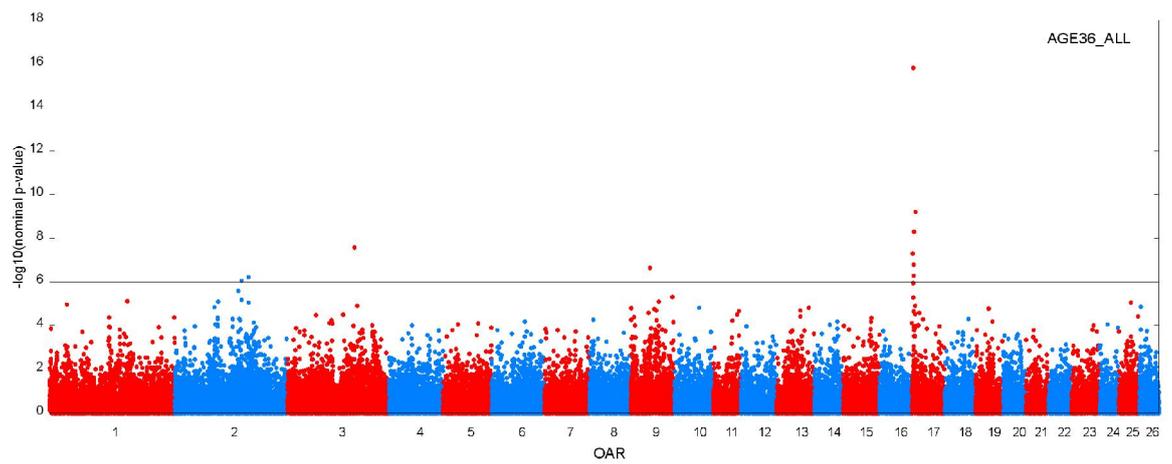


Figura. 13: Positividade aos 36 meses – Análise Caso/Controlo – modelo ALLELIC

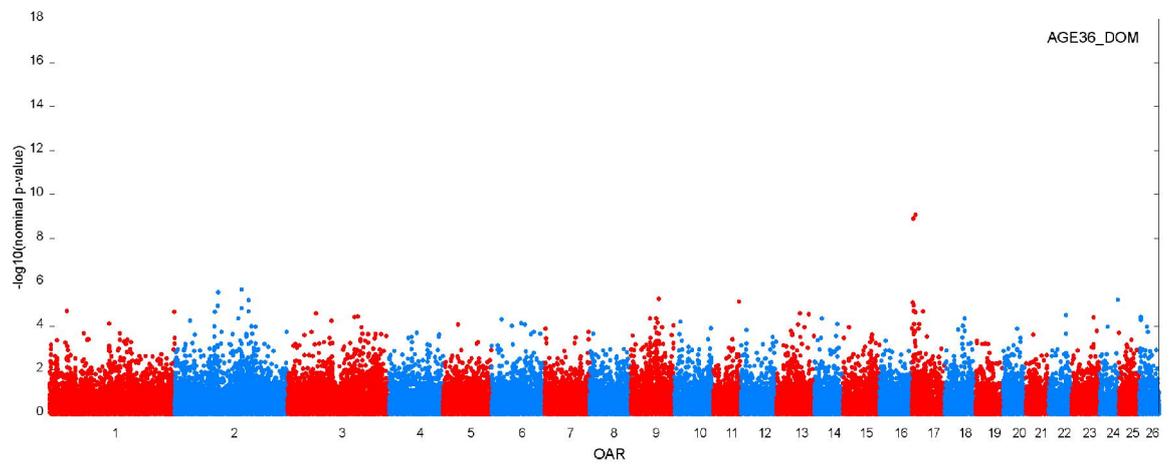


Figura. 14: Positividade aos 36 meses – Análise Caso/Controlo – modelo DOMINANT

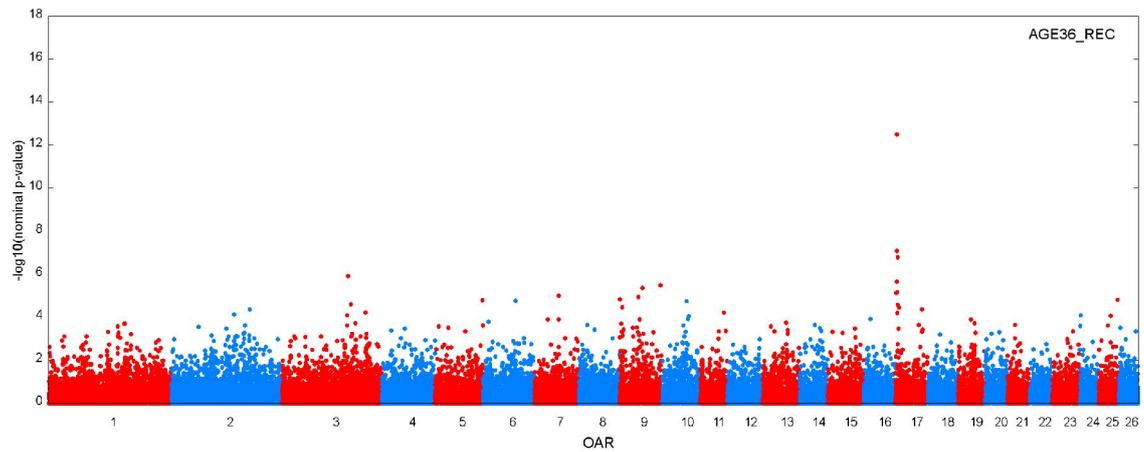


Figura. 15: Positividade aos 36 meses – Análise Caso/Controlo – modelo RECESSIVE

Quanto à análise do fenótipo AGE36, que deveria ser um fenótipo mais adequado para indicar resistência à doença, os resultados são muito mais interessantes e condizentes com as informações conhecidas. Na verdade, os sinais mais significativos foram detetados no início do cromossomo OAR17 onde o gene TMEM154 é encontrado (OAR17: 4836004-4887683), mesmo se o SNP mais significativo for encontrado cerca de 3,5 Mb antes do início do gene.

A região definida pelos 7 SNPs significativos se sobrepõe à localização do gene.

Além disso, no modelo ALLELIC de análise de caso/controlo, três outras regiões no OAR2; OAR3 e OAR9 apresentam sinais significativos, mesmo que de entidade modesta.

Quanto à análise dos resultados com o teste de Fisher (*flag --fisher*), a Tabela 11 mostra os SNPs significativos, após a correção de Bonferroni, para o caractere AGE12.

O maior numero de SNPs foi registrado nos 3 primeiros cromossomos (cerca de 50% do total de SNPs analisados), com o maior número de SNPs analisados (12) no OAR3.

Tabela 11. SNPs significativos com a correção de Bonferroni com o teste de Fisher aplicado à positividade para a doença registrada em 12 meses.

OAR	SNP	BP	BP-250000	BP+250000
17	rs409043994	3512893	3262893	3762893
2	rs420934031	1.67E+08	1.67E+08	1.67E+08
11	rs422823892	41876478	41626478	42126478
8	rs408566388	40540573	40290573	40790573
10	rs399513396	25605506	25355506	25855506
3	rs160482430	4143798	3893798	4393798
20	rs425125908	2855393	2605393	3105393
7	rs430683794	54918513	54668513	55168513
3	rs411678617	4094837	3844837	4344837
2	rs419288371	38197716	37947716	38447716
15	rs398842473	46558574	46308574	46808574
11	rs409833228	48750495	48500495	49000495
20	rs410009571	1705469	1455469	1955469
17	rs404568661	13504923	13254923	13754923
13	rs398134079	34476763	34226763	34726763
6	rs403107701	42363687	42113687	42613687
10	rs429883600	34654598	34404598	34904598
3	rs409285814	4031839	3781839	4281839
8	rs417321193	34300921	34050921	34550921
2	rs418907061	1.64E+08	1.63E+08	1.64E+08
2	rs423213774	1.36E+08	1.36E+08	1.36E+08
25	rs416855556	32851797	32601797	33101797
20	rs427763231	929653	679653	1179653
1	rs423437595	39419693	39169693	39669693
2	rs428511058	32855964	32605964	33105964
19	rs423325134	11717593	11467593	11967593
2	rs420484978	1.14E+08	1.14E+08	1.14E+08
3	rs55630858	46250709	46000709	46500709
1	rs425888699	1.25E+08	1.24E+08	1.25E+08
3	rs411575119	72669403	72419403	72919403
2	rs410403201	71875963	71625963	72125963
1	rs428475339	38108368	37858368	38358368
3	rs429415408	73189245	72939245	73439245
2	rs428776749	1.14E+08	1.14E+08	1.14E+08
12	rs399785728	34505593	34255593	34755593
3	rs414496066	4214974	3964974	4464974

OAR	SNP	BP	BP-250000	BP+250000
16	rs426356857	19372787	19122787	19622787
16	rs406966867	37583063	37333063	37833063
7	rs420061182	39819265	39569265	40069265
20	rs414439350	26755232	26505232	27005232
1	rs428703368	48614702	48364702	48864702
18	rs426815174	4460533	4210533	4710533
8	rs403182177	15227417	14977417	15477417
5	rs430759058	77852762	77602762	78102762
14	rs406414578	43480150	43230150	43730150
1	rs403353571	1.33E+08	1.33E+08	1.34E+08
3	rs422714108	72714731	72464731	72964731
18	rs408711280	49031833	48781833	49281833
1	rs410607201	45514168	45264168	45764168
14	rs401043079	22864239	22614239	23114239
8	rs414600373	75553240	75303240	75803240
20	rs416428526	27936473	27686473	28186473
4	rs429608698	53760451	53510451	54010451
4	rs420095090	16515798	16265798	16765798
10	rs419014728	34163424	33913424	34413424
1	rs417525814	38119753	37869753	38369753
3	rs423476888	81567014	81317014	81817014
4	rs421580373	97031125	96781125	97281125
3	rs424757366	81557115	81307115	81807115
19	rs424428469	54599502	54349502	54849502
1	rs427412199	12699406	12449406	12949406
3	rs421713361	3844176	3594176	4094176
3	rs424832652	94770391	94520391	95020391
4	rs409321869	88737033	88487033	88987033
2	rs400402462	90272355	90022355	90522355
10	rs414560689	17787614	17537614	18037614

Para os 66 marcadores relatados na Tabela 11, foram identificados 460 genes no total. O maior número de genes (99) foi identificado no cromossomo OAR20, o menor número de genes (1) foi identificado no cromossomo OAR6 enquanto nenhum gene foi identificado nos cromossomos OAR9, OAR13, OAR21, OAR22, OAR23, OAR24 e OAR26. Especificamente, foram considerados os genes localizados 250.000 pares de bases a montante e a jusante dos SNPs identificados. No entanto, a Tabela 12 relata apenas 263 genes, pois os restantes 197 genes identificados não codificam para características de interesse zootécnico. Os genes foram relatados com símbolo relativo e nome completo como presentes nos bancos de dados NCBI (www.ncbi.nlm.nih.gov) e GeneCards® (www.genecards.org).

Tabela 12. Genes mapeados na vizinhança de SNPs significativos com o teste de Fisher aplicado à positividade da doença registrada em 12 meses.

OAR	SNP	Gene Acronym	Gene Name
17	rs409043994	RNF175	Ring Finger Protein 175
		SFRP2	Secreted frizzled related protein 2
2	rs420934031	LRP1B	LDL receptor related protein 1B
11	rs422823892	ATP6V0A1	ATPase H ⁺ Transporting V0 Subunit A1
		COASY	Coenzyme A Synthase
		C11H17orf113 (LOC106991400)	chromosome 11 C17orf113 homolog
		DHX58	DExH-Box Helicase 58
		FAM134C	Reticulophagy Regulator Family Member 3
		GHDC	GH3 Domain Containing
		HCRT	Hypocretin Neuropeptide Precursor
		HSD17B1	Hydroxysteroid 17-Beta Dehydrogenase 1
		HSPB9	Heat Shock Protein Family B (Small) Member 9
		KAT2A	Lysine Acetyltransferase 2A
		MLX	MAX Dimerization Protein MLX
		NAGLU	N-Acetyl-Alpha-Glucosaminidase
		NKIRAS2	NFKB Inhibitor Interacting Ras Like 2
		PSMC3IP	PSMC3 Interacting Protein
		PTRF (CAVIN1)	Caveolae Associated Protein 1
		RAB5C	RAB5C, Member RAS Oncogene Family
		STAT3	Signal Transducer And Activator Of Transcription 3
		STAT5A	Signal Transducer And Activator Of Transcription 5A
STAT5B	Signal Transducer And Activator Of Transcription 5B		
ZNF385C	Zinc Finger Protein 385C		
8	rs408566388	FUT9	Fucosyltransferase 9
		UFL1	UFM1 Specific Ligase 1
10	rs399513396	DCLK1	Doublecortin Like Kinase 1
		LOC101106086 (SOHLH2)	spermatogenesis- and oogenesis-specific basic helix-loop-helix-containing protein 2
		SPG20	Spartin
3	rs160482430	AK8	Adenylate Kinase 8
		BARHL1	BarH Like Homeobox 1
		C3H9orf9	sperm acrosome associated 9
		CFAP77	Cilia And Flagella Associated Protein 77
		DDX31	DEAD-Box Helicase 31
		GTF3C4	General Transcription Factor IIIC Subunit 4
SETX	Senataxin		

OAR	SNP	Gene Acronym	Gene Name
20	rs425125908	TSC1	TSC Complex Subunit 1
		TTF1	Transcription Termination Factor 1
		BAG2	BAG Cochaperone 2
		PRIM2	DNA Primase Subunit 2
		RAB23	RAB23, Member RAS Oncogene Family
7	rs430683794	ARPP19	CAMP Regulated Phosphoprotein 19
		BCL2L10	BCL2 Like 10
		FAM214A	Family With Sequence Similarity 214 Member A
		GNB5	G Protein Subunit Beta 5
		MYO5A	Myosin VA
		MYO5C	Myosin VC
3	rs411678617	AK8	Adenylate Kinase 8
		BARHL1	BarH Like Homeobox 1
		C3H9orf9	sperm acrosome associated 9
		CFAP77	Cilia And Flagella Associated Protein 77
		DDX31	DEAD-Box Helicase 31
		GFI1B	Growth Factor Independent 1B Transcriptional Repressor
		GTF3C4	General Transcription Factor IIIC Subunit 4
		TSC1	TSC Complex Subunit 1
		TTF1	Transcription Termination Factor 1
2	rs419288371	APTX	Aprataxin
		CHRNA2	Cholinergic Receptor Nicotinic Alpha 2 Subunit
		DNAJA1	DnaJ Heat Shock Protein Family (Hsp40) Member A1
		EPHX2	Epoxide Hydrolase 2
		PTK2B	Protein Tyrosine Kinase 2 Beta
		SMU1	SMU1 DNA Replication Regulator And Spliceosomal Factor
		STMN4	Stathmin 4
		TRIM35	Tripartite Motif Containing 35
11	rs409833228	B3GNTL1	UDP-GlcNAc:BetaGal Beta-1,3-N-Acetylglucosaminyltransferase
		METRNL	Meteorin Like, Glial Cell Differentiation Regulator
		NOL11	Nucleolar Protein 11
		PITPNC1	Phosphatidylinositol Transfer Protein Cytoplasmic 1
		PSMD12	Proteasome 26S Subunit, Non-ATPase 12
17	rs404568661	HHIP	Hedgehog Interacting Protein
13	rs398134079	MAP3K8	Mitogen-Activated Protein Kinase Kinase Kinase 8
		MTPAP	Mitochondrial Poly(A) Polymerase
10	rs429883600	C1QTNF9	C1q and TNF related 9
		MIPEP	Mitochondrial Intermediate Peptidase

OAR	SNP	Gene Acronym	Gene Name
		SACS	Sacsin Molecular Chaperone
		SGCG	Sarcoglycan Gamma
		SPATA13	Spermatogenesis Associated 13
		TNFRSF19	TNF Receptor Superfamily Member 19
3	rs409285814	AK8	Adenylate Kinase 8
		BARHL1	BarH Like Homeobox 1
		C3H9orf9	sperm acrosome associated 9
		CEL	Carboxyl Ester Lipase
		CFAP77	Cilia And Flagella Associated Protein 77
		DDX31	DEAD-Box Helicase 31
		GFI1B	Growth Factor Independent 1B Transcriptional Repressor
		GTF3C4	General Transcription Factor IIIC Subunit 4
		GTF3C5	General Transcription Factor IIIC Subunit 5
TSC1	TSC Complex Subunit 1		
2	rs423213774	RAPGEF4	Rap Guanine Nucleotide Exchange Factor 4
25	rs416855556	KCNMA1	Potassium Calcium-Activated Channel Subfamily M Alpha 1
20	rs427763231	KHDRBS2	KH RNA Binding Domain Containing, Signal Transduction Associated 2
1	rs423437595	CACHD1	Cache Domain Containing 1
		UBE2U	Ubiquitin Conjugating Enzyme E2 U
2	rs428511058	GAS1	Growth Arrest Specific 1
19	rs423325134	ACAA1	Acetyl-CoA Acyltransferase 1
		ACVR2B	Activin A Receptor Type 2B
		DLEC1	DLEC1 Cilia And Flagella Associated Protein
		EXOG	Exo/Endonuclease G
		MYD88	MYD88 Innate Immune Signal Transduction Adaptor
		OXSRI	Oxidative Stress Responsive Kinase 1
		SCN5A	Sodium Voltage-Gated Channel Alpha Subunit 5
		SLC22A13 (LOC106991756)	solute carrier family 22 member 13
		SLC22A14	Solute Carrier Family 22 Member 14
XYLB	Xylulokinase		
2	rs420484978	ARHGEF4	Rho Guanine Nucleotide Exchange Factor 4
		FAM168B	Family With Sequence Similarity 168 Member B
		PLEKHB2	Pleckstrin Homology Domain Containing B2
3	rs55630858	CCT4	Chaperonin Containing TCP1 Subunit 4
		COMMD1	Copper Metabolism Domain Containing 1
		FAM161A	FAM161 Centrosomal Protein A
		USP34	Ubiquitin Specific Peptidase 34
		XPO1	Exportin 1
		BACH1	BTB Domain And CNC Homolog 1

OAR	SNP	Gene Acronym	Gene Name
1	rs425888699	GRIK1	Glutamate Ionotropic Receptor Kainate Type Subunit 1
2	rs410403201	GLIS3	GLIS Family Zinc Finger 3
1	rs428475339	ALG6	ALG6 Alpha-1,3-Glucosyltransferase
		FOXD3	Forkhead Box D3
3	rs429415408	NRXN1	Neurexin 1
12	rs399785728	DPT	Dermatopontin
3	rs414496066	AK8	Adenylate Kinase 8
		BARHL1	BarH Like Homeobox 1
		CFAP77	Cilia And Flagella Associated Protein 77
		DDX31	DEAD-Box Helicase 31
		GTF3C4	General Transcription Factor IIIC Subunit 4
		NTNG2	Netrin G2
		SETX	Senataxin
		TTF1	Transcription Termination Factor 1
16	rs406966867	RANBP3L	RAN Binding Protein 3 Like
		SLC1A3	Solute Carrier Family 1 Member 3
7	rs420061182	ARF6	ADP Ribosylation Factor 6
		DNAAF2	Dynein Axonemal Assembly Factor 2
		KLHDC1	Kelch Domain Containing 1
		KLHDC2	Kelch Domain Containing 2
		LRR1	Leucine Rich Repeat Protein 1
		MGAT2	Alpha-1,6-Mannosyl-Glycoprotein 2-Beta-N-Acetylglucosaminyltransferase
		NEMF	Nuclear Export Mediator Factor
		POLE2	DNA Polymerase Epsilon 2, Accessory Subunit
		RPL36AL	Ribosomal Protein L36a Like
		RPS29	Ribosomal Protein S29
20	rs414439350	SLC44A4	Solute Carrier Family 44 Member 4
		ABHD16A	Abhydrolase Domain Containing 16A, Phospholipase
		AIF1	Allograft Inflammatory Factor 1
		APOM	Apolipoprotein M
		ATP6V1G2	ATPase H ⁺ Transporting V1 Subunit G2
		BAG6	BAG Cochaperone 6
		C20H6orf25 (MPIG6B)	megakaryocyte and platelet inhibitory receptor G6b
		C20H6orf47	chromosome 20 C6orf47 homolog
		CCHCR1	Coiled-Coil Alpha-Helical Rod Protein 1
		CDSN	Corneodesmosin
		CLIC1	Chloride Intracellular Channel 1
		CSNK2B	Casein Kinase 2 Beta
		DDAH2	Dimethylarginine Dimethylaminohydrolase 2
DDX39B	DEx-D-Box Helicase 39B		

OAR	SNP	Gene Acronym	Gene Name
		EHMT2	Euchromatic Histone Lysine Methyltransferase 2
		GPANK1	G-Patch Domain And Ankyrin Repeats 1
		HSPA1A	Heat Shock Protein Family A (Hsp70) Member 1A
		HSPA1L	Heat Shock Protein Family A (Hsp70) Member 1 Like
		LSM2	LSM2 Homolog, U6 Small Nuclear RNA And MRNA Degradation Associated
		LST1	Leukocyte Specific Transcript 1
		LTA	Lymphotoxin Alpha
		LTB	Lymphotoxin Beta
		LY6G5B	Lymphocyte Antigen 6 Family Member G5B
		LY6G5C	Lymphocyte Antigen 6 Family Member G5C
		LY6G6C	Lymphocyte Antigen 6 Family Member G6C
		LY6G6D	Lymphocyte Antigen 6 Family Member G6D
		LY6G6F	Lymphocyte Antigen 6 Family Member G6F
		MCCD1	Mitochondrial Coiled-Coil Domain 1
		MICA	MHC Class I Polypeptide-Related Sequence A
		MSH5	MutS Homolog 5
		NCR3	Natural Cytotoxicity Triggering Receptor 3
		NEU1	Neuraminidase 1
		NFKBIL1	NFKB Inhibitor Like 1
		POU5F1	POU Class 5 Homeobox 1
		PRRC2A	Proline Rich Coiled-Coil 2A
		PSORS1C2	Psoriasis Susceptibility 1 Candidate 2
		SAPCD1	Suppressor APC Domain Containing 1
		TCF19	Transcription Factor 19
		TNF	Tumor Necrosis Factor
		VAR5	Valyl-TRNA Synthetase 1
		VWA7	Von Willebrand Factor A Domain Containing 7
		ZBTB12	Zinc Finger And BTB Domain Containing 12
18	rs426815174	ALDH1A3	Aldehyde Dehydrogenase 1 Family Member A3
		CHSY1	Chondroitin Sulfate Synthase 1
		GABRG3	Gamma-Aminobutyric Acid Type A Receptor Subunit Gamma3
		LRRK1	Leucine Rich Repeat Kinase 1
		VIMP (SELENOS)	Selenoprotein S
8	rs403182177	CLVS2	Clavesin 2
		TRDN	Triadin
5	rs430759058	ANKRD34B	Ankyrin Repeat Domain 34B
		DHFR	Dihydrofolate Reductase
		FAM151B	Family With Sequence Similarity 151 Member B
		LOC101117931 (FBLL1)	fibrillarilin like 1

OAR	SNP	Gene Acronym	Gene Name
		MSH3	MutS Homolog 3
		RARS	Arginyl-TRNA Synthetase 1
		WWC1	WW And C2 Domain Containing 1
		ZFYVE16	Zinc Finger FYVE-Type Containing 16
14	rs406414578	CHST8	Carbohydrate Sulfotransferase 8
		KCTD15	Potassium Channel Tetramerization Domain Containing 15
1	rs403353571	NCAM2	Neural Cell Adhesion Molecule 2
1	rs410607201	ANKRD13C	Ankyrin Repeat Domain 13C
		CTH	Cystathionine Gamma-Lyase
		HHLA3	HERV-H LTR-Associating 3
		LRRC40	Leucine Rich Repeat Containing 40
		LRRC7	Leucine Rich Repeat Containing 7
		SRSF11	Serine And Arginine Rich Splicing Factor 11
14	rs401043079	IRX5	Iroquois Homeobox 5
		IRX6	Iroquois Homeobox 6
8	rs414600373	ESR1	Estrogen Receptor 1
		SYNE1	Spectrin Repeat Containing Nuclear Envelope Protein 1
20	rs416428526	GABBR1	Gamma-Aminobutyric Acid Type B Receptor Subunit 1
		MOG	Myelin Oligodendrocyte Glycoprotein
		OLA-I (OVAR-1)	BOLA class I histocompatibility antigen, alpha chain BL3-7-like
		PPP1R11	Protein Phosphatase 1 Regulatory Inhibitor Subunit 11
		RNF39	Ring Finger Protein 39
		TRIM10	Tripartite Motif Containing 10
		TRIM14	Tripartite Motif Containing 14
		TRIM15	Tripartite Motif Containing 15
		TRIM26	Tripartite Motif Containing 26
		TRIM31	Tripartite Motif Containing 31
		ZFP57	ZFP57 Zinc Finger Protein
		ZNRD1 (POLR1H)	RNA Polymerase I Subunit H
4	rs429608698	FOXP2	Forkhead Box P2
		MDFIC	MyoD Family Inhibitor Domain Containing
4	rs420095090	ICA1	Islet Cell Autoantigen 1
		NXPH1	Neurexophilin 1
10	rs419014728	MTMR6	Myotubularin Related Protein 6
		NUP58	Nucleoporin 58
		SPATA13	Spermatogenesis Associated 13
1	rs417525814	ALG6	ALG6 Alpha-1,3-Glucosyltransferase
		FOXD3	Forkhead Box D3
		ITGB3BP	Integrin Subunit Beta 3 Binding Protein

OAR	SNP	Gene Acronym	Gene Name
3	rs423476888	EML4	EMAP Like 4
		KCNG3	Potassium Voltage-Gated Channel Modifier Subfamily G Member 3
		MTA3	Metastasis Associated 1 Family Member 3
		PKDCC	Protein Kinase Domain Containing, Cytoplasmic
4	rs421580373	EXOC4	Exocyst Complex Component 4
3	rs424757366	EML4	EMAP Like 4
		KCNG3	Potassium Voltage-Gated Channel Modifier Subfamily G Member 3
		MTA3	Metastasis Associated 1 Family Member 3
		PKDCC	Protein Kinase Domain Containing, Cytoplasmic
19	rs424428469	ATP2B2	ATPase Plasma Membrane Ca ²⁺ Transporting 2
		SLC6A11	Solute Carrier Family 6 Member 11
1	rs427412199	FHL3	Four And A Half LIM Domains 3
		INPP5B	Inositol Polyphosphate-5-Phosphatase B
		POU3F1	POU Class 3 Homeobox 1
		SF3A3	Splicing Factor 3a Subunit 3
		UTP11L	UTP11 Small Subunit Processome Component
3	rs421713361	AK8	Adenylate Kinase 8
		CEL	Carboxyl Ester Lipase
		DDX31	DEAD-Box Helicase 31
		GBGT1	Globoside Alpha-1,3-N-Acetylgalactosaminyltransferase 1 (FORS Blood Group)
		GFI1B	Growth Factor Independent 1B Transcriptional Repressor
		GTF3C4	General Transcription Factor IIIC Subunit 4
		GTF3C5	General Transcription Factor IIIC Subunit 5
		RALGDS	Ral Guanine Nucleotide Dissociation Stimulator
		TSC1	TSC Complex Subunit 1
3	rs424832652	CCT7	Chaperonin Containing TCP1 Subunit 7
		EXOC6B	Exocyst Complex Component 6B
		NOTO	Notochord Homeobox
		PRADC1	Protease Associated Domain Containing 1
		RAB11FIP5	RAB11 Family Interacting Protein 5
		SFXN5	Sideroflexin 5
		SMYD5	SMYD Family Member 5
		SPR	Sepiapterin Reductase
4	rs409321869	GPR37	G Protein-Coupled Receptor 37
2	rs400402462	DMRTA1	DMRT Like Family A1

A Tabela 13, por outro lado, mostra os SNPs significativos para o caráter AGE12 analisado com o modelo linear corrigido para a estrutura da população.

Todos os marcadores relatados na Tabela 13 são significativos para a correção de Bonferroni.

Ressalta-se que o menor número de marcadores reportados em relação à análise anterior se deve à correção para a estrutura populacional, descrita no capítulo 1.3.

Tabela 13. SNPs significativos com o modelo linear, e correção para a estrutura populacional, aplicada à positividade para a doença registrada em 12 meses.

OAR	SNP	BP	BP-250000	BP+250000
8	rs399087381	390197	140197	640197
12	rs409369958	6611949	6361949	6861949
17	rs405136354	59364698	59114698	59614698
12	rs411935946	5378322	5128322	5628322
3	rs398298116	2.14E+08	2.13E+08	2.14E+08
8	rs414191862	1095062	845062	1345062
20	rs425125908	2855393	2605393	3105393
15	rs398842473	46558574	46308574	46808574
7	rs430262434	48859164	48609164	49109164
5	rs430759058	77852762	77602762	78102762
8	rs408566388	40540573	40290573	40790573
2	rs419288371	38197716	37947716	38447716
7	rs415451015	48826315	48576315	49076315
16	rs426217111	20449710	20199710	20699710
2	rs410403201	71875963	71625963	72125963

Para os 15 marcadores relatados na Tabela 13, foram identificados 120 genes no total.

Os genes relatados foram identificados apenas nos cromossomos OAR2, OAR3, OAR5, OAR7, OAR8, OAR12, OAR15, OAR16, OAR17 e OAR20, com o maior número de genes (36) no cromossomo OAR15 e o menor número de genes (1) no cromossomo OAR17.

Especificamente, foram considerados os genes localizados 250.000 pares de bases a montante e a jusante dos SNPs identificados. No entanto, a Tabela 14 relata apenas 47 genes, uma vez que os restantes 73 genes identificados não codificam para características de interesse zootécnico.

Tabela 14. Genes mapeados nas proximidades de SNPs significativos com modelo linear, e correção para a estrutura da população, aplicada à positividade para a doença registrada aos 12 meses.

OAR	SNP	Gene Acronym	Gene Name
8	rs399087381	CD109	CD109 Molecule
		SLC17A5	Solute Carrier Family 17 Member 5
12	rs411935946	KCNT2	Potassium Sodium-Activated Channel Subfamily T Member 2
		LAX1	Lymphocyte Transmembrane Adaptor 1
3	rs398298116	ANKRD54	Ankyrin Repeat Domain 54
		BAIAP2L2	BAR/IMD Domain Containing Adaptor Protein 2 Like 2
		C3H2orf23	chromosome 3 C22orf23 homolog
		EIF3L	Eukaryotic Translation Initiation Factor 3 Subunit L
		GALR3	Galanin Receptor 3
		GCAT	Glycine C-Acetyltransferase
		MAFF	MAF BZIP Transcription Factor F
		MICALL1	MICAL Like 1
		PICK1	Protein Interacting With PRKCA 1
		PLA2G6	Phospholipase A2 Group VI
		POLR2F	RNA Polymerase II, I And III Subunit F
		SLC16A8	Solute Carrier Family 16 Member 8
		SOX10	SRY-Box Transcription Factor 10
TMEM184B	Transmembrane Protein 184B		
20	rs425125908	BAG2	BAG Cochaperone 2
		PRIM2	DNA Primase Subunit 2
		RAB23	RAB23, Member RAS Oncogene Family
7	rs430262434	ADAM10	ADAM Metallopeptidase Domain 10
		AQP9	Aquaporin 9
		LIPC	Lipase C, Hepatic Type
5	rs430759058	ANKRD34B	Ankyrin Repeat Domain 34B
		DHFR	Dihydrofolate Reductase
		FAM151B	Family With Sequence Similarity 151 Member B
		LOC101117931 (FBLL1)	fibrillarilin like 1
		MSH3	MutS Homolog 3
		RARS	Arginyl-TRNA Synthetase 1
		WWC1	WW And C2 Domain Containing 1
ZFYVE16	Zinc Finger FYVE-Type Containing 16		
8	rs408566388	FHL5	Four And A Half LIM Domains 5
		FUT9	Fucosyltransferase 9

OAR	SNP	Gene Acronym	Gene Name
		UFL1	UFM1 Specific Ligase 1
		APTX	Aprataxin
2	rs419288371	CHRNA2	Cholinergic Receptor Nicotinic Alpha 2 Subunit
		DNAJA1	DnaJ Heat Shock Protein Family (Hsp40) Member A1
		EPHX2	Epoxide Hydrolase 2
		PTK2B	Protein Tyrosine Kinase 2 Beta
		SMU1	SMU1 DNA Replication Regulator And Spliceosomal Factor
		STMN4	Stathmin 4
		TRIM35	Tripartite Motif Containing 35
7	rs415451015	ADAM10	ADAM Metallopeptidase Domain 10
		AQP9	Aquaporin 9
		LIPC	Lipase C, Hepatic Type
16	rs426217111	RAB3C	RAB3C, Member RAS Oncogene Family
2	rs410403201	GLIS3	GLIS Family Zinc Finger 3

O teste de Fisher também foi aplicado ao fenótipo AGE36, e 12 marcadores foram significativos (Tabela 15). Todos os marcadores relatados na Tabela 15 são significativos para a correção de Bonferroni.

Tabela 15. SNPs significativos com correção de Bonferroni com teste de Fisher aplicado à positividade da doença registrada em 36 meses

OAR	SNP	BP	BP-250000	BP+250000
17	rs409043994	3512893	3262893	3762893
17	rs403605177	8452040	8202040	8702040
17	rs414338245	4870602	4620602	5120602
17	rs162073597	4887416	4637416	5137416
3	rs403388864	1.48E+08	1.48E+08	1.49E+08
17	rs404220973	2421182	2171182	2671182
17	rs416353213	4152520	3902520	4402520
9	rs430470521	41845152	41595152	42095152
17	rs426349602	4392773	4142773	4642773
2	rs418907061	1.64E+08	1.63E+08	1.64E+08
2	rs411586536	1.48E+08	1.48E+08	1.48E+08
17	rs422323411	2758982	2508982	3008982

Para os 12 marcadores relatados na Tabela 15, foram identificados 43 genes no total. Os genes relatados foram detetados apenas nos cromossomos OAR2, OAR3, OAR9 e OAR17, com o maior número de genes (34) no cromossomo OAR17 e o menor número de genes (2) no cromossomo OAR9. Especificamente, foram considerados os genes localizados 250.000 pares de bases a montante e a jusante dos SNPs identificados. No entanto, a Tabela 16 relata apenas 29 genes, pois os restantes 14 genes identificados não codificam para características de interesse zootécnico.

Tabela 16. Genes mapeados perto de SNPs significativos com o teste de Fisher aplicado à positividade da doença registrada aos 36 meses.

OAR	SNP	Gne Acronym	Gene Name
17	rs409043994	RNF175	Ring Finger Protein 175
		SFRP2	Secreted frizzled related protein 2
17	rs414338245	ARFIP1	ADP Ribosylation Factor Interacting Protein 1
		FBXW7	F-Box And WD Repeat Domain Containing 7
		TIGD4	Tigger Transposable Element Derived 4
		TMEM154	Transmembrane Protein 154
17	rs162073597	ARFIP1	ADP Ribosylation Factor Interacting Protein 1
		FBXW7	F-Box And WD Repeat Domain Containing 7
		TIGD4	Tigger Transposable Element Derived 4
		TMEM154	Transmembrane Protein 154
3	rs403388864	CPNE8	Copine 8
		PTPRR	Protein Tyrosine Phosphatase Receptor Type R
17	rs404220973	FGA	Fibrinogen Alpha Chain
		FGG	Fibrinogen Gamma Chain
		LRAT	Lecithin Retinol Acyltransferase
		RBM46	RNA Binding Motif Protein 46
17	rs416353213	LOC101122892 (TMEM131L)	transmembrane 131 like
		MND1	Meiotic Nuclear Divisions 1
		TRIM2	Tripartite Motif Containing 2
9	rs430470521	BHLHE22	Basic Helix-Loop-Helix Family Member E22
17	rs426349602	ARFIP1	ADP Ribosylation Factor Interacting Protein 1
		FHDC1	FH2 Domain Containing 1
		MND1	Meiotic Nuclear Divisions 1
		TRIM2	Tripartite Motif Containing 2
2	rs411586536	RBMS1	RNA Binding Motif Single Stranded Interacting Protein 1
17	rs422323411	DCHS2	Dachsous Cadherin-Related 2
		FGA	Fibrinogen Alpha Chain
		FGB	Fibrinogen Beta Chain
		FGG	Fibrinogen Gamma Chain
		PLRG1	Pleiotropic Regulator 1

A Tabela 17, por outro lado, mostra os SNPs significativos para o caráter AGE36 analisado com o modelo linear corrigido para a estrutura da população. Apenas um marcador excedeu o limite de correção de Bonferroni.

Tabela 17. SNPs significativos com o modelo linear e correção para a estrutura da população, aplicada à positividade da doença registrada aos 36 meses.

OAR	SNP	BP-250000	BP+250000
17	rs409043994	3262893	3512893

Para o único marcador relatado na Tabela 17, nenhum gene que codifica para características de interesse zootécnico foi identificado.

3.2. Regiões de homozigose

Quanto ao fenótipo AGE12, foram analisados os genótipos de 893 animais, sendo 389 POSITIVOS e 504 NEGATIVOS, para a pesquisa de ROH.

O número de regiões identificadas foi igual a 1558 (1313 ROH diferentes) em 711 animais sendo 315 POSITIVOS e 396 NEGATIVOS.

O número médio de ROH por animal resultou igual a $2,20 \pm 1,30$ e especificamente $2,17 \pm 1,36$ e $2,21 \pm 1,25$ para animais POSITIVOS e NEGATIVOS respectivamente.

Tabela 18. Número de animais com ROH e número de ROH por animal

	POSITIVOS	NEGATIVOS	TOTAL
Animais analisados	389	504	893
Animais com ROH	315	396	711
ROH totais	684	874	1558
ROH/animal	2.17 ± 1.36	2.21 ± 1.25	2.20 ± 1.30

A ROH mais repetido encontrado em 10 animais cai no cromossomo OAR8 (56554730-62060591 bp). Destes 10 animais, 3 eram POSITIVOS (30%), enquanto 7 eram NEGATIVOS (70%).

Tabela 19.

Fenótipo	mediaSNP	devSNP	mediaMb	devMb
NEGATIVOS	159.	68.3	7.68	3.38
POSITIVOS	162.	68.9	7.83	3.42

Dentro da ROH mais repetido relacionado ao fenótipo AGE12, que cai no cromossomo OAR8 (56554730-62060591 bp), 64 genes foram identificados.

A Tabela 20 relata apenas 33 genes, pois os restantes 31 genes identificados não codificam para caracteres de interesse zootécnico.

Tabela 20. Genes presentes no ROH mais repetido relacionado ao fenótipo AGE12, que cai no cromossomo OAR8 (chr8: 56554730-62060591).

Gene Acronym	Gene Name
AHI1	Abelson Helper Integration Site 1
ALDH8A1	Aldehyde Dehydrogenase 8 Family Member A1
ARG1	Arginase 1
BCLAF1	BCL2 Associated Transcription Factor 1
CTGF	Cellular Communication Network Factor 2
ENPP1	Ectonucleotide Pyrophosphatase/Phosphodiesterase 1
ENPP3	Ectonucleotide Pyrophosphatase/Phosphodiesterase 3
EYA4	EYA Transcriptional Coactivator And Phosphatase 4
HBS1L	HBS1 Like Translational GTPase
IFNGR1	Interferon Gamma Receptor 1
IL20RA	Interleukin 20 Receptor Subunit Alpha
IL22RA2	Interleukin 22 Receptor Subunit Alpha 2
MAP3K5	Mitogen-Activated Protein Kinase Kinase Kinase 5
MAP7	Microtubule Associated Protein 7
MED23	Mediator Complex Subunit 23
MOXD1	Monooxygenase DBH Like 1
MTFR2	Mitochondrial Fission Regulator 2
MYB	MYB Proto-Oncogene, Transcription Factor
PDE7B	Phosphodiesterase 7B
PEX7	Peroxisomal Biogenesis Factor 7
RPS12	Ribosomal Protein S12
SGK1	Serum/Glucocorticoid Regulated Kinase 1
SLC18B1	Solute Carrier Family 18 Member B1
SLC2A12	Solute Carrier Family 2 Member 12
SLC35D3	Solute Carrier Family 35 Member D3
STX7	Syntaxin 7
TAAR1	Trace Amine Associated Receptor 1
TAAR5	Trace Amine Associated Receptor 5
TAAR9	Trace Amine Associated Receptor 9
TBPL1	TATA-Box Binding Protein Like 1
TCF21	Transcription Factor 21
VNN1	Vanin 1
VNN2	Vanin 2

Quanto ao fenótipo AGE36, foram analisados 986 animais, sendo 956 POSITIVOS e 30 NEGATIVOS. O número de ROHs identificados foi igual a 1682 (1402 ROHs diferentes) em 795 animais, dos quais 775 POSITIVOS e 20 NEGATIVOS.

O número médio de ROH por animal foi igual a $2,211 \pm 1,25$ e especificamente $2,12 \pm 1,26$ e $1,9 \pm 0,9$ para animais POSITIVOS e NEGATIVOS, respectivamente.

Tabela 21. Número de animais com ROH e número de ROH por animal

	POSITIVOS	NEGATIVOS	TOTAL
Animais analisados	956	30	986
Animais com ROH	775	20	795
ROH totais	1644	38	1682
ROH/animal	2.12 ± 1.26	1.9 ± 0.9	2.211 ± 1.25

A ROH mais repetido foi encontrada em 11 animais no cromossomo OAR6 (87928585-93818026 bp); esses animais foram todos positivos para infecção.

Tabela 22.

Fenótipo	mediaSNP	devSNP	mediaMb	devMb
NEGATIVOS	178.	81.6	8.69	4.09
POSITIVOS	160.	66.5	7.75	3.30

Dentro da ROH mais relacionado ao fenótipo AGE36, que se enquadra no cromossomo OAR6 (87928585-93818026 pb), 71 genes foram identificados.

A Tabela 23 relata apenas 45 genes, pois os 26 genes identificados restantes não codificam para caracteres de interesse zootécnico.

Tabela 23. Genes presentes no ROH mais repetido relacionado ao fenótipo AGE36, que cai no cromossomo OAR6 (chr6: 87928585-93818026).

Gene Acronym	Gene Name
AFM	Afamin
AFP	Alpha Fetoprotein
ALB	Albumin
ANXA3	Annexin A3
AREG	Amphiregulin
ART3	ADP-Ribosyltransferase 3 (Inactive)
BMP2K	BMP2 Inducible Kinase
BTC	Betacellulin
C6H4orf26 (ODAPH)	odontogenesis associated phosphoprotein
CCDC158	Coiled-Coil Domain Containing 158
CCNG2	Cyclin G2
CCNI	Cyclin I
CDKL2	Cyclin Dependent Kinase Like 2
CNOT6L	CCR4-NOT Transcription Complex Subunit 6 Like
CXCL1	C-X-C Motif Chemokine Ligand 1
CXCL8	C-X-C Motif Chemokine Ligand 8
CXCL9	C-X-C Motif Chemokine Ligand 9
CXCL10	C-X-C Motif Chemokine Ligand 10
CXCL11	C-X-C Motif Chemokine Ligand 11
CXCL13	C-X-C Motif Chemokine Ligand 13
EPGN	Epithelial Mitogen
EREG	Epiregulin
FAM47E	Family With Sequence Similarity 47 Member E
FRAS1	Fraser Extracellular Matrix Complex Subunit 1
G3BP2	G3BP Stress Granule Assembly Factor 2
GK2	Glycerol Kinase 2
MRPL1	Mitochondrial Ribosomal Protein L1
MTHFD2L	Methylenetetrahydrofolate Dehydrogenase (NADP+ Dependent) 2 Like
NAA11	N-Alpha-Acetyltransferase 11, NatA Catalytic Subunit
NAAA	N-Acylethanolamine Acid Amidase
NUP54	Nucleoporin 54
PAQR3	Progesterin And AdipoQ Receptor Family Member 3
PARM1	Prostate Androgen-Regulated Mucin-Like Protein 1
PF4	Platelet Factor 4
PPEF2	Protein Phosphatase With EF-Hand Domain 2
RASSF6	Ras Association Domain Family Member 6
RCHY1	Ring Finger And CHY Zinc Finger Domain Containing 1
SCARB2	Scavenger Receptor Class B Member 2
SDAD1	SDA1 Domain Containing 1
SEPT11	Septin 11
SHROOM3	Shroom Family Member 3
SOWAHB	Sosondowah Ankyrin Repeat Domain Family Member B
STBD1	Starch Binding Domain 1

Gene Acronym	Gene Name
THAP6	THAP Domain Containing 6
USO1	USO1 Vesicle Transport Factor

4. DISCUSSÃO

4.1. Genes encontrados através da análise GWAS

Os caracteres quantitativos, cuja expressão é mensurável numa escala métrica (variabilidade contínua), dependem de um grande número de genes (controle poligênico), cada um dos quais contribui para a manifestação do caráter de uma forma muito pequena (efeito infinitesimal) e de uma forma aditivo em comparação com outros genes (Bittante *et al.*, 2007; Pagnacco, 2016). A maioria dos caracteres de interesse zootécnico são quantitativos (Bittante *et al.*, 2007). No entanto, alguns caracteres de interesse zootécnico são qualitativos, não mensuráveis numa escala métrica (variabilidade descontínua). Além disso, eles são controlados de forma simples por um ou alguns genes (genes principais) que, portanto, têm um grande efeito no caractere (Pagnacco, 2016). A resistência a doenças cai principalmente na segunda classe de caracteres.

Vários genes encontrados no presente estudo já foram relacionados a características de interesse zootécnico.

Em relação à glândula mamária, após estudos em ovelhas de raça Hu, Zhang *et al.*, (2019) argumentam que a expressão do gene *ESR1* aumenta para promover o desenvolvimento da glândula mamária quando o tecido mamário essencial começa a expansão durante a gestação (Zhang *et al.*, 2019). Além disso, o gene *EXOC6B*, localizado no cromossomo ovino OAR3 e no cromossomo bovino BTA11, é um gene candidato para a morfologia e função da glândula mamária (Pausch *et al.*, 2012). Seu produto é um componente do exocisto e pode, portanto, influenciar a geração da superfície apical e do lúmen durante a formação da glândula mamária (Pausch *et al.*, 2012). O gene *LRP1B* também pode estar correlacionado com o número de tetas em ovelhas (Tao *et al.*, 2021).

Marete *et al.*, (2018) identificaram o gene *GNB5* como um dos candidatos para velocidade de ordenha em bovinos.

Em relação à produção de leite, o gene *GHDC* (OAR11), altamente expresso na glândula mamária, está relacionado às características da produção de leite (Raven *et al.*, 2016).

Estudos realizados em relação aos aspectos qualitativos do leite relatam que, em bovinos, o gene *NCAM2* é um dos genes associados ao conteúdo de gordura e proteína do leite (Zsolnai *et al.*, 2021). Na verdade, pode ser usado como um marcador genético molecular para melhorar o teor de gordura do leite de vacas Holstein (Ding *et al.*, 2020). Khan *et*

al., (2020), em vez disso, relatam a associação do gene *MMR* ao metabolismo e regulação das variáveis do leite. O gene *ARFIP1* também é um dos genes associados à produção de leite e ao conteúdo de gordura em vacas Holstein (Boitard *et al.*, 2021). Banos *et al.*, (2019), em vez disso, relatam que o gene *DNAJAI* ovino pode estar envolvido na síntese e produção de leite, pois é altamente expresso tanto na glândula mamária quanto no transcriptoma do leite. Na verdade, é um dos genes que foram selecionados como genes candidatos para a produção de leite em ovelhas de raça Chios (Banos *et al.*, 2019).

Segundo Xie *et al.*, (2017), a expressão de transportadores de aminoácidos, determinada pela expressão do gene *SLC1A3*, altera a regulação do uso de aminoácidos e diminui a qualidade do leite em vacas leiteiras.

Há evidências sólidas de que as mutações *STAT5A* estão associadas à letalidade embrionária em bovinos; isso parece ocorrer muito antes de qualquer outro polimorfismo embrionário letal relatado anteriormente em mamíferos (Khatib *et al.*, 2008; Khatib *et al.*, 2009). Na verdade, o gene *STAT5A* é o primeiro a ser associado à produção de leite e à fertilidade (Khatib *et al.*, 2008; Khatib *et al.*, 2009). Foram encontradas associações entre genótipos *STAT5A* e características relacionadas à produção de carne em bovinos (Brym *et al.*, 2004).

Em ovelhas, *ALDH1A3* é um dos genes correlacionados com características de energia e metabolismo digestivo (Kim *et al.*, 2016), enquanto *CEL* é um gene que codifica uma lipase responsável pelo processo catabólico de lipídios e, portanto, está relacionado ao metabolismo de lipídios. Este último foi identificado em bovinos (Srivastava *et al.*, 2020) e ovinos (Suárez-Vega *et al.*, 2016).

O gene *MGAT2* codifica uma enzima envolvida em muitas funções fisiológicas, como absorção de gordura intestinal, montagem de lipoproteínas, formação de tecido adiposo, transdução de sinal, saciedade e lactação (Qu *et al.*, 2011). Variações na expressão de *MGAT2* podem contribuir para diferenças na eficiência metabólica e propensão para ganho de peso (Qu *et al.*, 2011). Portanto, em bovinos, o gene *MGAT2* é um candidato a características quantitativas relacionadas à absorção de gordura na dieta, síntese e armazenamento de lipídios (Qu *et al.*, 2011).

De acordo com Ren *et al.*, (2019) *LRRC40* é um dos genes que desempenham papéis vitais no crescimento e saúde de ovinos.

A família de receptores de glutamato, que inclui *GRIK1*, está envolvida na mediação da transmissão sináptica excitatória e desempenha um papel fundamental na função cognitiva (Flori *et al.*, 2012). A sinalização do glutamato também está envolvida nas alterações na diferenciação e atividade dos osteoclastos e osteoblastos no osso (Flori *et al.*, 2012). O gene *GRIK1* pode, portanto, estar associado a características de conformação corporal em bovinos (Yan *et al.*, 2020), enquanto em ovinos parece estar envolvido no processo de resposta à dor, assim como o gene *GABRG3* (Deng *et al.*, 2018). Em cabras, este o último aspecto foi associado ao gene *KCNG3* (Deng *et al.*, 2018).

Estudos em ovelhas mostraram expressão reduzida do gene *STAT3* no coração de fetos expostos à restrição de nutrientes, mas também pode desempenhar um papel na hipertrofia cardíaca em resposta à superalimentação no início da gestação (Dong *et al.*, 2008). Embora o *STAT3* seja considerado importante para a indução da hipertrofia celular, sua ativação, que ocorre por fosforilação, coincide com a involução da glândula mamária (Colitti *et al.*, 2009) e não leva necessariamente à hipertrofia cardíaca. De fato, uma expressão reduzida do gene *STAT3* também é observada em fetos com restrições nutricionais nos quais a hipertrofia cardíaca está ausente (Dong *et al.*, 2008). De acordo com estudos conduzidos por Wu *et al.*, (2018) em bovinos, o gene *STAT3* codifica uma proteína citoplasmática ubíqua expressa em vários tecidos metabólicos que desempenha um papel crítico na regulação mediada pela leptina do metabolismo energético (Wu *et al.*, 2018) e no armazenamento de lipídios (Song *et al.*, 2015). Do feto ao adulto, a expressão de *STAT3* aumenta significativamente nos tecidos muscular, adiposo, cardíaco, do fígado e do baço ($P < 0,01$), enquanto diminui no intestino, pulmões e rúmen ($P < 0,01$) (Wu *et al.*, 2018). Portanto, uma vez que sua eliminação interfere na homeostase normal do peso corporal e no metabolismo da glicose, as variantes genéticas de *STAT3* em bovinos afetam diretamente o tamanho corporal e as características qualitativas da carcaça (Wu *et al.*, 2018) e podem ser usadas como um marcador genético para pecuária de corte (Song *et al.*, 2015).

Em bovinos, o gene *SYNE1* foi identificado como um gene relacionado a características de carcaça e como responsável pela distrofia muscular (De Vos *et al.*, 2018), enquanto o gene *BAIAP2L2* foi relatado como um gene relacionado ao escore moiré (Wang *et al.*, 2019) e o gene *APOM* como um gene relacionado com o transporte do β -caroteno e, portanto, com a cor da gordura (Tian, 2012).

Alguns estudos relataram uma associação entre *HSP90AA1*, *DNAJAI* e *HSPBI* e maciez da carne em bovinos (Malheiros *et al.*, 2018). Especificamente, o gene *DNAJAI* está negativamente associado à maciez da carne em bovinos Nelore, embora tenha sido identificado com menor expressão em amostras de carne de alta qualidade (maciez, sabor e suculência), como o músculo Longissimus thoracis de gado Charolês (Malheiros *et al.*, 2018). O gene *MYO5A* também é um dos genes associados às características qualitativas da carcaça de bovinos de corte (Braz *et al.*, 2018).

Os genes *RAB11FIP5* e *SFXN5*, ambos localizados no cromossomo bovino 11, já foram descritos como associados à força de cisalhamento, método utilizado para avaliar a maciez da carne (Sbardella *et al.*, 2021). Além disso, regulam funções importantes para características reprodutivas, como fertilidade e precocidade sexual em bovinos (Sbardella *et al.*, 2021).

O gene *KAT2A* foi associado ao desenvolvimento da estrutura muscular em ovelhas (Cheng *et al.*, 2020).

O gene *TRDN* foi proposto como um gene candidato para peso aos 6 meses em ovelhas (Xia *et al.*, 2016), enquanto de acordo com Shin *et al.*, (2016) poderia estar associado a mudanças na deposição de gordura intramuscular em bovinos pretos japoneses e Holstein. Em vez disso, mais investigações são necessárias para confirmar a correlação do gene *SYNE1* e os caracteres ligados com o peso corporal em ovelhas (Gholizadeh *et al.*, 2015). Por outro lado, *KCNMA1* foi associado ao tamanho reduzido em ovelhas de raça Rahmani (Farahani *et al.*, 2020).

Os caracteres comportamentais foram também estudados várias vezes. Na verdade, o gene *NRXN1* foi proposto como um gene candidato para características comportamentais em bovinos com temperamento moderado (Paredes-Sánchez *et al.*, 2020).

Em vários estudos, as variações de nucleotídeos do gene *MYO5A* foram identificadas como responsáveis pela mudança na cor da pelagem em porcos, ovelhas (Cesarani *et al.*, 2019) e bovinos (Jia *et al.*, 2019), pois desempenha um papel importante no armazenamento de melanina em melanossomos e na transferência de melanossomos para queratinócitos (Pagnacco, 2016). O gene *SOX10*, envolvido na migração de melanoblastos, diferenciação e sobrevivência de melanócitos, também foi associado à cor e padrão da pelagem em ovelhas (Pagnacco, 2016; Rochus *et al.*, 2019), enquanto o gene

DMRTA1 foi associado ao crescimento e outros parâmetros relacionados à lã (Mohammadi *et al.*, 2020).

Em relação aos aspectos relacionados à reprodução, o gene *SMYD5* é um dos genes que influencia a prolificidade e características reprodutivas em ovinos (Nosrati *et al.*, 2019), assim como o gene *KHDRBS2* é capaz de influenciar a fertilidade de cabras e vacas de raça Brahman (De León *et al.*, 2019). No entanto, em ovelhas, o gene *KHDRBS2* está associado à percepção sensorial (Wang *et al.*, 2020).

Ortega *et al.*, (2016) relatam que uma mutação na região do promotor *HSPAIL*, resultando numa deleção de uma citosina (C), foi associada à termotolerância em células mononucleares do sangue periférico expostas ao estresse térmico. A mesma mutação foi associada ao desenvolvimento embrionário acima do estágio de blastocisto em embriões cultivados (Ortega *et al.*, 2016). Portanto, é possível que a herança desse alelo possa aumentar a resistência do embrião ao choque térmico (Ortega *et al.*, 2016). Em ovelhas, o gene *HSPAIL* está relacionado à ligação de espermatozoides à zona pelúcida (Serrano *et al.*, 2019).

O gene *SPATA13* também pode estar envolvido na espermatogênese em bovinos, uma vez que regula a organização do citoesqueleto de actina, e também é necessário para a migração celular induzida pelo fator de crescimento de hepatócitos e renovação celular (Ashkar *et al.*, 2016).

Estudos em cabras mostraram alta expressão de *HSPB9* em células espermato gênicas, incluindo espermatogônias, espermátocitos e espermátides no túbulo seminífero convoluto, e alta expressão de *HSPB10* em espermátides alongadas, respectivamente. A expressão relativa de *HSPB9* e *HSPB10* nos testículos apresentou tendência a aumentar com a idade e permanecer num nível constante após a maturidade sexual. *HSPB9* e *HSPB10* têm expressão significativamente maior na estação de monta ($P < 0,05$) e na estação quente ($P < 0,01$), com os maiores níveis de expressão detectados entre maio e julho ($P < 0,01$). Ambos *HSPB9* e *HSPB10* são resultados regulados positivamente por estresse de alta temperatura nos testículos ($P < 0,05$). Presume-se que *HSPB9* e *HSPB10* podem estar envolvidos na resposta ao estresse térmico devido às circunstâncias. Portanto, *HSPB9* e *HSPB10*, que exibem uma expressão específica para o tempo e para o tecido, podem estar intimamente relacionadas à reprodução masculina e à tolerância ao calor (Xun *et al.*, 2015). Ainda em relação ao estresse, o gene *CCT4* é um dos genes

identificados no ROH de bovinos de tração (*Bos indicus*) e parece estar associado à tolerância ao estresse (Dixit *et al.*, 2020) assim como o gene *OXSR1* em bovinos (Carvalho *et al.*, 2019).

Foi relatado que *HSPA1A* protege células, tecidos e órgãos do estresse, promovendo o dobramento de polipeptídeos nascentes e corrigindo o dobramento incorreto de proteínas desnaturadas (Kerekoppa *et al.*, 2015). A expressão de *HSPA1A* induzida por choque térmico desempenha um papel na via antiapoptótica (Kerekoppa *et al.*, 2015). Portanto, *HSPA1A* é um gene candidato para a identificação de marcadores genéticos e para a seleção assistida por marcadores para melhorar a tolerância térmica e o desempenho reprodutivo em bovinos (Kerekoppa *et al.*, 2015). Devido à relação negativa entre a atividade do gene *HSPA1A* e o pH final da carne (pHu), altos níveis de HSP70 (codificado pelo gene *HSPA1A*) são muito importantes na indústria da carne, pois levam a efeitos prejudiciais que podem afetar a qualidade geral de carne (Stempa *et al.*, 2020). Além disso, foi demonstrada uma correlação negativa entre *HSPA1A* e a qualidade da carne de bovinos expostos ao estresse pré-abate (Stempa *et al.*, 2020). Estudos conduzidos em cordeiros Merino indicam que os indivíduos mais estressados durante o período pré-abate produziram níveis plasmáticos de *HSPA1A* e lactato mais elevados (Stempa *et al.*, 2020). A correlação do gene *HSPA1A* com estresse e citocinas também foi demonstrada em vacas leiteiras da Frísia (Diler, 2019).

Os genes *TRIM* são conhecidos por terem uma função relacionada nas respostas imunes adaptativas e inatas (Tijjani *et al.*, 2019). Em bovinos, o gene *TRIM15* é um dos genes relacionados às respostas inatas (Tijjani *et al.*, 2019). Também em ovelhas, o gene *TRIM15* demonstrou regular a sinalização imune inata e inflamatória (Ma *et al.*, 2020), bem como o gene *LRPIB* é um dos genes candidatos relacionados ao sistema imunológico e à adaptação ao clima, mas também por características de leite (Eydivandi *et al.*, 2021; Li *et al.*, 2020).

Em bovinos, o gene *UFL1* desempenha um papel vital em várias células e tecidos, influenciando vários processos celulares, como reparo de DNA, tradução de proteínas, viabilidade celular, progressão do ciclo celular, transdução de sinal, apoptose, autofagia e respostas imunes e antivirais (Kuang *et al.*, 2019). Portanto, desempenha um papel crucial na homeostase celular e na resposta à inflamação, pois é um regulador crucial do estresse celular que pode possuir efeitos antiinflamatórios e citoprotetores nas células epiteliais mamárias (Wang *et al.*, 2020).

Os genes *ANKRD54*, *GCAT* e *POLR2F* estão entre os genes candidatos para lesão de casco em gado holandês canadense (Malchiodi *et al.*, 2018).

PTK2B é uma proteína que regula a resposta imune humoral e a homeostase de células imunes inatas e que desempenha um papel importante na suscetibilidade/tolerância à mastite bovina clínica (Yang *et al.*, 2019), bem como o gene *XYLB* em vacas holandesas canadenses (Grossi *et al.*, 2014).

É provável que o gene *FGA* desempenhe um papel importante dentro do mecanismo de defesa do hospedeiro contra a mastite por *S. aureus* (Ju *et al.*, 2018).

O TNF- α é uma das citocinas pró-inflamatórias e pró-imunes mais importantes, que desempenha um papel fundamental na iniciação, regulação e perpetuação da resposta inflamatória (Cheng *et al.*, 2016), mas também no desenvolvimento da mama glândula, corpo lúteo, células de síntese e apoptose (Korotkevich *et al.*, 2014). O polimorfismo g.27534932A> C do gene TNF- α foi significativamente associado à tuberculose bovina em gado Holstein (Cheng *et al.*, 2016), mas associações significativas entre TNF- α e LTF e imunidade à mastite também são relatadas (Wojdak - Maksymiec *et al.*, 2013) e na progressão da infecção pelo vírus da leucemia bovina (Korotkevich *et al.*, 2014). Em ovinos, o fator TNF- α é muito importante para controlar a replicação do parasita *Oestrus ovis* e infecções crônicas latentes por *Neospora caninum* e *Toxoplasma gondii* (Attia *et al.*, 2020). De fato, níveis significativamente mais altos de TNF- foram registrados em ovelhas infestadas do que em ovelhas não infestadas (Attia *et al.*, 2020).

Em bovinos, o gene *COMMD1*, além de estar associado a características produtivas, está associado à tripanotolerância (Taye *et al.*, 2011).

O gene *MSH3* apresenta níveis de expressão aumentados após a infecção, uma vez que este gene está envolvido em todo o processo de resposta à infecção, desde o reconhecimento de locais de incompatibilidade em células infectadas até seu último reparo (Bai *et al.*, 2020). Isso sugere que os genes *MMR* são ativados pela infecção pelo vírus da imunodeficiência bovina (bovine leukemia virus - BLV) (Bai *et al.*, 2020).

O gene *MYD88* em ovelhas pode estar associado à seropositividade/seronegatividade para vários agentes infecciosos, como Small Ruminant Lentivirus, *C. abortus* o *M. avium* subsp. *paratuberculosis* (Sarafidou *et al.*, 2013). Parece que a substituição de aminoácidos de G em R no códon 520 é capaz de causar uma mudança de polaridade que pode afetar

a estrutura e função de *LRR17*, interferindo na ligação do ligante, e pode ser usada em estudos que examinam a susceptibilidade/resistência a infeções por Small Ruminant Lentivirus em ovelhas (Sarafidou *et al.*, 2013).

A atividade dos produtos proteicos dos genes *GPR37*, *GIMAP2* e *SSC5D* foi descrita em relação à resposta imunitária em humanos e outros animais, pois estão envolvidos em vários processos celulares, bem como em várias doenças, incluindo infecção lentiviral (Pławińska-Czarnak *et al.*, 2021). Em relação à infecção por Small Ruminant Lentivirus em cabras, Pławińska-Czarnak *et al.*, (2021) encontraram uma menor expressão no grupo de cabras seropositivas para SRLV em comparação com cabras seronegativas para SRLV, causando desregulação de citocinas pró-inflamatórias e anti-inflamatórias e uma diminuição na atividade de macrófagos.

Em confirmação do que está descrito nesta tese após a análise realizada no fenótipo AGE36, dois dos 12 marcadores mostrados na Tabela 15 (rs414338245 e rs162073597) caem na vizinhança do gene *TMEM154* localizado no cromossomo ovino OAR17.

Como descrito no capítulo 1.2.1, embora a função biológica da proteína *TMEM154* e o impacto das mutações no gene *TMEM154* que a codifica permaneçam desconhecidos (Heaton *et al.*, 2013), acredita-se que esta proteína transmembrana particular desempenhe um papel na concessão/negação do acesso do vírus ao citoplasma de uma célula.

4.2. Genes encontrados através da análise ROH

Os genes *AHII*, *MAP7* e *PDE7B* estão entre os genes candidatos para lesão de casco em bovinos Holstein canadenses (Malchiodi *et al.*, 2018).

Os genes *IL22RA2*, *MAP3K5*, *MTFR2* e *SLC35D3*, por outro lado, foram associados à persistência da lactação bovinos Holstein canadenses (Do *et al.*, 2017).

Também em bovinos da raça Holstein, o gene *ALDH8A1* foi associado à regulação hormonal (Xi, *et al.*, 2015), mas também a doenças respiratórias bovinas (Neupane *et al.*, 2018) e à cor da gordura (Tian, 2012).

VNN1 e *VNN2* estão relacionados à resistência à mastite bovina (Strillacci *et al.*, 2014).

O gene *ARG1* está associado à resistência a *Haemonchus contortus* em raças de ovelhas de lã (Jacobs *et al.*, 2016) e foi correlacionado com a resposta do hospedeiro à infecção bacteriana (He *et al.*, 2016).

Em ovelhas, o gene *MOXD1* está associado à percepção sensorial (Wang *et al.*, 2020).

Os genes *ANXA3* e *CXCL* foram associados à resistência a *Haemonchus contortus* em raças de ovelhas de lã (Jacobs *et al.*, 2016).

O gene *CXCL10* também foi associado a respostas inflamatórias em ovelhas Florida Native expostas a infecções naturais por *H. contortus* (Estrada-Reyes *et al.*, 2019).

Gao *et al.*, (2017) propuseram uma associação potencial do gene *ART3* com proteínas do leite e características de gordura em vacas leiteiras.

Raven *et al.*, (2016), em vez propôs uma associação potencial do gene *EPGN* para a produção de leite e o intervalo entre os partos.

O gene *PARMI* foi associado por Serrano *et al.*, (2021) com algumas características de fertilidade, como concepção de novilhas, taxa de prenhez das filhas e vida produtiva de touros em gado holandês, enquanto em ovelhas foi associado à qualidade do esperma e especificamente, o número de espermatozoides ejaculados.

5. CONCLUSÕES

Este trabalho teve como objetivo a análise genômica da resistência ao Maedi-Visna vírus em ovinos de raça Sarda. Especificamente, um estudo de associação foi realizado usando uma abordagem indireta (SNPs e Linkage Disequilibrium). A análise realizada é do tipo "caso/controle", utilizando um SNP por vez, em que os animais que apresentam positividade para a doença são tratados como caso, enquanto os que não apresentam a doença como controle. A positividade aos 12 meses (total de animais analisados: 893; Positivos: 389; Negativos: 504) e a positividade aos 36 meses (total de animais analisados: 986; Positivos: 956; Negativos) foram submetidos à análise de GWAS. Os testes foram realizados em 43.390 SNPs autossômicos do Ovine SNP50 BeadChip. A análise do fenótipo AGE36, que deveria ser um fenótipo mais adequado para indicar resistência à doença, mostrou resultados interessantes e em linha com as informações conhecidas. Na verdade, os sinais mais significativos foram detectados no início do cromossomo OAR17 onde o gene *TMEM154* é encontrado (OAR17: 4836004-4887683), mesmo se o SNP mais significativo for encontrado cerca de 3,5 Mb antes do início do gene. Embora a função biológica da proteína *TMEM154* e o impacto das mutações no gene *TMEM154* que a codifica permaneçam desconhecidos, acredita-se que esta proteína transmembrana particular desempenha um papel na concessão/negação do acesso do vírus ao citoplasma de uma célula. A região definida pelos 7 SNPs significativos se sobrepõe à posição do gene. Além disso, no modelo ALLELIC de análise de caso/controle, três outras regiões no OAR2; OAR3 e OAR9 apresentam sinais significativos, mesmo que de entidade modesta. Certamente não é possível pensar na erradicação da doença causada pelo MVV com o abate de animais positivos dada a consistência numérica das ovelhas na Sardenha, mas é necessário um trabalho perspicaz cujo objetivo deve ser a eliminação gradual de animais infectados. É evidente a importância da aplicação de protocolos de monitoramento e erradicação contra a infecção causada pelo MVV, explorando o polimorfismo E35K no gene *TMEM154* e na via masculina (carneiros homocigotos resistentes), apesar da variante resistente ser muito rara. Em qualquer caso, é necessário agir prontamente, pois outros países poderiam usar a infecção pelo MVV como pretexto para impedir a exportação de produtos derivados de ovinos, que são significativamente importantes para a economia de toda a ilha e não só. Isso poderia ser feito pela França e pela Suíça, que já estão trabalhando na erradicação da doença, mas também pelos países do Oriente que já solicitaram os parâmetros de saúde de nossos produtos em outras ocasiões.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Adjadj N. R., Vicca J., Michiels R., De Regge N., (2019) “(Non-)Sense of Milk Testing in Small Ruminant Lentivirus Control Programs in Goats. Comparative Analysis of Antibody Detection and Molecular Diagnosis in Blood and Milk”. *Viruses* 2020, 12, 3. DOI:10.3390/v12010003

- Alavarez V. (2006) “Estudio epidemiológico y experimental de la transmisión y control del Maedi-Visna en ovino lechero de raza Latxa del País Vasco”. Tesis Doctoral N°56, Universidad de León, Facultad de Veterinaria, Departamento de Sanidad Animal.

- Alshanbari F. A., Mousel M. R., Reynolds J. O., Herrmann-Hoesing L. M., Highland M. A., Lewis G. S. and White S. N., (2014) “Mutations in *Ovis aries* TMEM154 are associated with lower small ruminant lentivirus proviral concentration in one sheep flock”. *Animal Genetics*. 45, 565–571 DOI: 10.1111/age.12181

- Andreani E., Flammini C.F., Gentile G., Mandelli G., (1995) “Retroviridae”. *Trattato di Malattie Infettive degli Animali a cura di Farina R., e Scatozza F.* UTET, 1995. 48, 801-805

- Ashkar F. A., Revay T., Rho N., Madan P., Dufort I., Robert C., Favetta L.A., Schmidt C., King W. A., (2016) “Thyroid hormones alter the transcriptome of in vitro-produced bovine blastocysts”. *Zygote*. 2016 Apr;24(2):266-76. DOI: 10.1017/S096719941500016

- Attia M. M., El-Gameel S. M., & Ismael E., (2020) “Evaluation of tumor necrosis factor-alpha (TNF- α); gamma interferon (IFN- γ) genes and oxidative stress in sheep: immunological responses induced by *Oestrus ovis* (Diptera: Oestridae) infestation”. *Journal of Parasitic Diseases*, 44(2), 332-337.

- Bai L., Hirose T., Assi W., Wada S., Takeshima S. N., & Aida Y., (2020) “Bovine Leukemia Virus Infection Affects Host Gene Expression Associated with DNA Mismatch Repair”. *Pathogens*, 9(11), 909.

- Banos G., Clark E. L., Bush S. J., Dutta P., Bramis G., Arsenos G., Hume D.A., Psifidi A., (2019). “Genetic and genomic analyses underpin the feasibility of concomitant genetic improvement of milk yield and mastitis resistance in dairy sheep”.
PLoS One. 2019 Nov 25;14(11):e0214346. DOI: 10.1371/journal.pone.0214346.

- Bertolotti L., Mazzei M., Puggioni G., Carrozza M.L., Dei Giudici S., Muz D., Juganaru M., Patta C., Tolari F., Rosati S., (2011) “Characterization of new small ruminant lentivirus subtype B3 suggests animal trade within the Mediterranean Basin”.
Journal of General Virology (2011), 92, 1923–1929 DOI 10.1099/vir.0.032334-0

- Bettini A., Stifter E., Tavella A., (2016) “Piani di risanamento volontari e obbligatori”.
www.researchgate.net

- Bishop S. C., Axford R.F.E., Nicholas F.W., Owen J.B., (2011) “Breeding for Disease Resistance in Farm Animals”. 3rd Edition, ©CAB International.

- Bishop S. C., Woolliams J.A., (2014) “Genomics and disease resistance studies in livestock”. *Livestock Science* 166 pp. 190–198
<http://dx.doi.org/10.1016/j.livsci.2014.04.034>

- Bishop S.C., (2015) “Genetic resistance to infections in sheep”.
Veterinary Microbiology 181, pp 2–7 <http://dx.doi.org/10.1016/j.vetmic.2015.07.013>

- Bittante G., Andrighetto I., Ramanzin M., (2007). “Fondamenti di zootecnica. Miglioramento genetico, nutrizione e alimentazione”. 7 ed. Editore Liviana Scolastica.

- Blacklaws B.A., Berriatua E., Torsteinsdottir S., Watt N.J., de Andres D., Klein D., Harkiss G.D., (2004) “Transmission of small ruminant lentiviruses”. *Veterinary Microbiology* 101 (2004) 199–208 DOI:10.1016/j.vetmic.2004.04.006

- Blacklaws, B. A. (2008). Visna-Maedi Viruses. *Encyclopedia of Virology*, 423–432.
DOI:10.1016/b978-012374410-4.00533-1

- Boitard S., Paris C., Sevane N., Servin B., Bazi-Kabbaj K., & Dunner S., (2021). “Gene banks as reservoirs to detect recent selection: the example of the Asturiana de los Valles bovine breed”. *Front Genet.* 2021 Feb 2;12:575405. DOI: 10.3389/fgene.2021.575405

- Braz C., Baldi Rey F., de Albuquerque L., & Nunes de Oliveira H., (2018). “295 Genes regulated by eQTLs affect biological pathways involved in carcass and meat quality traits in Nelore”. *Journal of Animal Science*, 96(suppl_3), 111-111.

- Bruscin G., (2011). “Studio di associazione Genome Wide: Preprocessing e Selezione SNPs”. Tesi di Laurea, Corso di Laurea Magistrale in Bioingegneria, Facoltà di Ingegneria, Università degli Studi di Padova.

- Brym P., Kamiński S., & Rusc A., (2004). “New SSCP polymorphism within bovine STAT5A gene and its associations with milk performance traits in Black-and-White and Jersey cattle”. *Journal of Applied Genetics*, 45(4), 445-452.

- Christodoulopoulos G., (2005) “Maedi–Visna: Clinical review and short reference on the disease status in Mediterranean countries”.
Small Ruminant Research 62 (2006) 47–53 DOI:10.1016/j.smallrumres.2005.07.046

- Caporale V.P., Lelli R., Rutili D., (1983) “Isolation of Visna-Maedi virus from the choroid plexus of an apparently healthy sheep in Italy”.
Veterinary Research Communications, 9, 115-122.

- Capucchio M. T., Sanna E., Sanna M. P., Farigu S., Minelli R., Guarda F. (2003) “Maedi-Visna virus detection in ovine third eyelids”.
Journal of Comparative Pathology, 129, 37-43.

- Carta A., Salaris S. L., (2011). “Strategie per la selezione genetica per la resistenza alla Scrapie e i caratteri produttivi”. Convegno “Il progetto Pilota per la selezione genetica degli ovini in provincia di Siena: una praticabile prospettiva strategica di prevenzione delle EST”. 3 Marzo 2011, Siena.

- Carvalho M. E., Baldi F. S., Alexandre P. A., Santana M. H. A., Ventura R. V., Bueno R. S., ... & Ferraz J. B. S. (2019). “Genomic regions and genes associated with carcass quality in Nelore cattle”. *Genetics and Molecular Research*, 18(1), 1-15.

- Cecchi F., Dadousis C., Bozzi R., Fratini F., Russo C., Bandecchi P., Cantile C., Mazzei M., (2018) “Genome scan for the possibility of identifying candidate resistance genes for goat lentiviral infections in the Italian Garfagnina goat breed”. *Tropical Animal Health and Production*, pp 1-5. DOI: 10.1007/s11250-018-1728-y

- Cesarani A., Sechi T., Gaspa G., Usai M. G., Sorbolini S., Macciotta N. P. P., & Carta A., (2019). “Investigation of genetic diversity and selection signatures between Sarda and Sardinian Ancestral black, two related sheep breeds with evident morphological differences”. *Small Ruminant Research*, 177, 68-75.

- Cheng Y., Huang C., & Tsai H. J., (2016) “Relationship of bovine TNF- α gene polymorphisms with the risk of bovine tuberculosis in Holstein cattle”. *Journal of Veterinary Medical Science*, 78(5), 727-732.

- Cheng J., Zhao H., Chen N., Cao X., Hanif Q., Pi L., Hu L., Chaogetu B., Huang Y., Lan X., Lei C., Chen H., (2020) “Population structure, genetic diversity, and selective signature of Chaka sheep revealed by whole genome sequencing”. *MC Genomics*. 2020 Jul 29;21(1):520. DOI: 10.1186/s12864-020-06925-z.

- Colitti M., & Farinacci M., (2009). “Cell turnover and gene activities in sheep mammary glands prior to lambing to involution”. *Tissue and Cell*, 41(5), 326-333.

- Colitti B., Coradduzza E., Puggioni G., Capucchio M.T., Reina R., Bertolotti L., *et al.* (2019) “A new approach for Small Ruminant Lentivirus full genome characterization revealed the circulation of divergent strains”. *PLoS ONE* 14(2): e0212585. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0212585>

- De Azevedo D.A.A., Santos V.W.S., Sousa A.L.M., Peixoto R.M., Pinheiro R.R., Andrioli A., Teixeira M.F.S., (2017) “Small ruminant lentiviruses: economic and productive losses, consequences of the disease”. *Arq. Inst. Biol.*, v.84, 1-10, e0552016, 2017 DOI: 10.1590/1808-1657000552016

- De La Concha-Bermejillo A., Brodie S.B., Magnus-Corral S., De Martini J.C. (1994) “Studies on semen infection and prenatal transmission of ovine lentivirus”. World Association of Veterinary Microbiologists, Immunologists and Specialists in Infectious Diseases, 45.

- De León C., Manrique C., Martínez R., & Rocha J. F., (2019) “Genomic association study for adaptability traits in four Colombian cattle breeds”. Genet. Mol. Res, 18.

- Deng X., Wang D., Wang S., Wang H., Zhou H., (2018) “Identification of key genes and pathways involved in response to pain in goat and sheep by transcriptome sequencing”. Biol Res. 2018 Aug 17;51(1):25. DOI: 10.1186/s40659-018-0174-7.

- De Pablo-Maiso L., Doménech A., Echeverría I., Gómez-Arrebola C., De Andrés D., Rosati S., Gómez-Lucia E., Reina R., (2018). “Prospects in Innate Immune Responses as Potential Control Strategies against Non-Primate Lentiviruses”. Viruses 2018, 10, 435 DOI:10.3390/v10080435

- De Vos J., (2018). “A Genome wide association study of carcass traits based on Real Time Ultrasound in South African Nguni cattle”.
Doctoral dissertation, University of Pretoria

- Dickey A. M., Smith T. P., Clawson M. L., Heaton M. P., Workman A. M. (2020). “Classification of small ruminant lentivirus subtype A2, subgroups 1 and 2 based on whole genome comparisons and complex recombination patterns”. F1000Research, 9(1449), 1449. DOI:10.12688/f1000research.27898.1

- Diler A., (2019). “Effects of the floor type on the gene expression of HSPA1A and cytokines in Holstein dairy cows”. Indian Journal of Animal Research, 53(3), 412-416

- Ding X., Zhang Z., Hu R., Wen Y., Huang Y., Shi Q., Feng Y., Wang E., Lei C., He H., (2020). “A molecular marker of milk composition traits in NCAM2 gene of Chinese Holstein”. Anim Biotechnol. 2020 Dec 14:1-6. DOI:10.1080/10495398.2020.1772802.

- Dixit S.P., Singh S., Ganguly I., Bhatia A.K., Sharma A., Kumar N.A., Dang A.K., and Jayakumar S., (2020). “Genome-wide runs of homozygosity revealed selection signatures in *Bos indicus*”. *Frontiers in genetics*, 11, 92. DOI:10.3389/fgene.2020.0009

- Do D.N., Bissonnette N., Lacasse P., Miglior F., Sargolzaei M., Zhao X., & Ibeagha-Awemu E.M., (2017). “Genome-wide association analysis and pathways enrichment for lactation persistency in Canadian Holstein cattle”. *Journal of Dairy Science*, 100(3), 1955-1970.

- Dong F., Ford S.P., Nijland M.J., Nathanielsz P.W., Ren J., (2008). “Influence of maternal undernutrition and overfeeding on cardiac ciliary neurotrophic factor receptor and ventricular size in fetal sheep”. *The Journal of nutritional biochemistry*, 19(6), 409-414. DOI: 10.1016/j.jnutbio.2007.06.003.

- Dousti M., Sayyari M., Esmailnejad A., (2019) “Histopathological, serological, molecular and electron microscopy detection of Maedi-Visna infection in sheep population in the West of Iran”. *Iranian Journal of Veterinary Research, Shiraz University (IJVR)*, 2020, Vol. 21, No. 2, Ser. No. 71, Pages 103-108
DOI: 10.22099/IJVR.2019.34360.5070

- Eydivandi S., Roudbar M. A., Karimi M. O., & Sahana G., (2021). “Genomic scans for selective sweeps through haplotype homozygosity and allelic fixation in 14 indigenous sheep breeds from Middle East and South Asia”. *Scientific reports*, 11(1), 1-18.

- Estrada-Reyes ZM, Rae O, Postley C, Jiménez Medrano MB, Leal Gutiérrez JD, Mateescu RG., (2019). “Association study reveals Th17, Treg, and Th2 loci related to resistance to *Haemonchus contortus* in Florida Native sheep”. *J Anim Sci*. 2019 Nov 4;97(11):4428-4444. DOI: 10.1093/jas/skz299.

- Flori L., Gonzatti M.I., Thevenon S., Chantal I., Pinto J., Berthier D., Aso P.M., Gautier M., (2012) “A quasi-exclusive European ancestry in the Senepol tropical cattle breed highlights the importance of the slick locus in tropical adaptation”. *PLoS One*. 2012;7(5):e36133. DOI: 10.1371/journal.pone.0036133.

- Galleggiante Crisafulli A., (2012). “Studio della variabilità del gene caprino CCR5: analisi propedeutica all’individuazione di polimorfismi coinvolti nella resistenza alla lentivirus (CAEV)”. Tesi di Specializzazione, Scuola di Specializzazione in Biochimica Clinica, Facoltà di Farmacia, Università degli Studi di Pisa, 16, 17.

- Gao Y, Jiang J, Yang S, Hou Y, Liu GE, Zhang S, Zhang Q, Sun D., (2017). “CNV discovery for milk composition traits in dairy cattle using whole genome resequencing”. *BMC Genomics*. 2017 Mar 29;18(1):265. DOI: 10.1186/s12864-017-3636-3.

- Gaspa G., Marras G., Sorbolini S., Ajmone Marsan P., Williams J. L., Valentini A., Dimauro C., Macciotta N. P. P. (2014). “Genome-wide Homozygosity in Italian Holstein cattle using HD SNP panel”. 10th World Congress of Genetics Applied to Livestock Production (pp. 1-3). DOI: 10.13140/2.1.1142.7200

- Giammarioli M., Bazzucchi M., Puggioni G., Brajon G., Dei Giudici S., Taccori F., Feliziani F., De Mia G.M., (2011) “Phylogenetic analysis of small ruminant lentivirus (SRLV) in Italian flocks reveals the existence of novel genetic subtypes”. *Virus Genes* (2011) 43:380-384 DOI:10.1007/S11262-011-0653-1

- Gholizadeh M., Rahimi-Mianji G., & Nejati-Javaremi A., (2015). “Genomewide association study of body weight traits in Baluchi sheep”. *Journal of genetics*, 94(1), 143-146.

- Gibson J., Morton N. E., & Collins A. (2006). “Extended tracts of homozygosity in outbred human populations”. *Human Molecular Genetics*, Volume 15, Issue 5, 1 March 2006, Pages 789–795. DOI:10.1093/hmg/ddi493

- Gomez-Lucia E., Barquero N., Domenech A., (2018). “Maedi-Visna virus: current perspectives”. *Veterinary Medicine: Research and Reports* 2018;9 11–21

- Grego E., Bertolotti L., Quasso A., Profiti M., Lacerenza D., Muz D., Rosati S., (2007) “Genetic Characterization of Small Ruminant Lentivirus in Italian Mixed Flocks: Evidence for a Novel Genotype Circulating in a Local Goat Population”. *J. Gen. Virol.* 2007, 88, 3423–3427.

- Grego E., Reina R., Lanfredini S., Tursi M., Favole A., Profiti M., Lungu M.M., Perona G., Gay L., Stella M.C., DeMeneghi D., (2018). “Viral load, tissue distribution and histopathological lesions in goats naturally and experimentally infected with the Small Ruminant Lentivirus Genotype E (subtype E1 Roccaverano strain)”. *Research in Veterinary Science* 118 (2018) 107–114

- Grossi D. A., Abo-Ismael M. K., Koeck A., Miller S. P., Stothard P., Plastow G., ... & Schenkel F., (2014). “Genome-wide association analyses for mastitis in Canadian Holsteins”. In *Proceedings of the 10th World Congress of Genetics Applied to Livestock Production*.

- He Y., Song M., Zhang Y., Li X., Song J., Zhang Y., & Yu Y., (2016). “Whole-genome regulation analysis of histone H3 lysin 27 trimethylation in subclinical mastitis cows infected by *Staphylococcus aureus*”. *BMC genomics*, 17(1), 1-12

- Heaton M.P., Clawson M.L., Chitko-Mckown C.G.; Leymaster K.A., Smith T.P., Harhay G.P., White S.N., Herrmann-Hoesing L.M.; Mousel M.R., Lewis G.S., *et al.*, (2012). “Reduced lentivirus susceptibility in sheep with TMEM154 mutations”. *PLoS Genet*, 8(1):e1002467. DOI:10.1371/journal.pgen.1002467

- Heaton M. P., Kalbfleisch T. S., Petrik D. T., *et al.*, (2013) “Genetic testing for THEM154 mutations associated with lentivirus susceptibility in sheep”. *PLoS ONE*, 8:e55490. 10.1371/journal.pone.0087823

- Heaton M.P., Leymaster K.A., and Clawson M.L., *et al.*, (2014) “Association of TMEM154 missense mutations with lentiviral infection and virus subtypes in sheep”. 10th World Congress on Genetics Applied to Livestock Production. 18-22 August, Vancouver, BC, Canada

- Illius A.W., Lievaart-Peterson K., McNeilly T.N., Savill N.J. (2020) “Epidemiology and control of maedi-visna virus: Curing the flock”. *PLoS ONE* 15 (9): e0238781. DOI:10.1371/journal.pone.0238781

- Jacobs J.R., Sommers K.N., Zajac A.M., Notter D.R., & Bowdridge S.A., (2016). “Early IL-4 gene expression in abomasum is associated with resistance to *Haemonchus contortus* in hair and wool sheep breeds”. *Parasite immunology*, 38(6), 333-339.

- Jia P., Cai C., Qu K., Chen N., Jia Y., Hanif Q., Liu J., Zhang J., Chen H., Huang B., Lei C., (2019) “Four Novel SNPs of *MYO1A* Gene Associated with Heat-Tolerance in Chinese Cattle”. *Animals (Basel)*. 2019 Nov 13;9(11):964. DOI:10.3390/ani9110964.

- Ju Z., Jiang Q., Liu G., Wang X., Luo G., Zhang Y., Zhang J., Zhong J., Huang J., (2018). “Solexa sequencing and custom micro RNA chip reveal repertoire of micro RNAs in mammary gland of bovine suffering from natural infectious mastitis”. *Animal genetics*, 49(1), 3-18. DOI: 10.1111/age.12628.

- Kalogianni A. I., Bossis I., Ekateriniadou L. V., and Gelasakis A. I., (2020)“Etiology, Epizootiology and Control of Maedi-Visna in Dairy Sheep: A Review”. *Animals* 2020,10, 616. DOI: 10.3390/ani10040616

- Kennedy R.C., Eklund C.M., Lopez C., Hadlow W.S. (1968) “Isolation of a virus from the lungs of Montana sheep affected with progressive pneumonia”. *Virology*, 35, 483-484. DOI:10.1016/0042-6822(68)90228-6

- Kerekoppa R. P., Rao A., Basavaraju M., Geetha G. R., Krishnamurthy L., Rao T.V.N., ... & Mukund K., (2015). “Molecular characterization of the HSPA1A gene by single-strand conformation polymorphism and sequence analysis in Holstein-Friesian crossbred and Deoni cattle raised in India”. *Turkish Journal of Veterinary and Animal Sciences*, 39(2), 128-133.

- Khaltabadi Farahani A. H., Mohammadi H., & Moradi H., (2020). “Gene set enrichment analysis using genome-wide association study to identify genes and pathways associated with litter size in various sheep breeds”. *Animal Production*, 22(3), 325-335.

- Khan M.Z., Liu L., Zhang Z., Khan A., Wang D., Mi S., Usman T., Liu G., Guo G., Li X., Wang Y., Yu Y., (2020). “Folic acid supplementation regulates milk production variables, metabolic associated genes and pathways in perinatal Holsteins”. *J Anim Physiol Anim Nutr (Berl)*. 2020 Mar;104(2):483-492. DOI: 10.1111/jpn.13313.

- Khatib H., Monson R. L., Schutzkus V., Kohl D. M., Rosa G. J. M., & Rutledge J. J. (2008). “Mutations in the STAT5A gene are associated with embryonic survival and milk composition in cattle”. *Journal of dairy science*, 91(2), 784-793.

- Khatib H., Maltecca C., Monson R. L., Schutzkus V., & Rutledge J. J. (2009). “Monoallelic maternal expression of STAT5A affects embryonic survival in cattle”. *BMC genetics*, 10(1), 1-10.

- Kim E. S., Elbeltagy A. R., Aboul-Naga A. M., Rischkowsky B., Sayre B., Mwacharo J. M., & Rothschild M. F. (2016). “Multiple genomic signatures of selection in goats and sheep indigenous to a hot arid environment”. *Heredity*, 116(3), 255-264.

- Korotkevich O. S., Lyukhanov M. P., Petukhov V. L., Yudin N. S., Sebezhko O. S., Konovalova T. V., & Kamaldinov E. V., (2014). “Single nucleotide polymorphism in dairy cattle populations of West Siberia”. In *Proceeding of the 10th World Congress on Genetics Applied to Livestock Production* (p. 487).

- Kuang M., Li L., Li C., & Wang G., (2019). “Protective effects of UFL1 against endoplasmic reticulum stress-induced autophagy in bovine mammary epithelial cells”. *Cell Stress and Chaperones*, 24(6), 1115-1125.

- Kuhar U., Barlic-Maganja D., Grom J., (2013) “Phylogenetic Analysis of Small Ruminant Lentiviruses Detected in Slovenia”. *Vet. Microbiol.* 2013;162:201–206. DOI: 10.1016/j.vetmic.2012.08.024

- Leginagoikoa I., Juste R.A., Barandika J., Amorena B., de Andres D., Lujan L.L., Badiola J.J., Berriatua E., (2006a) “Extensive rearing hinders Maedi – Visna Virus (MVV) infection in sheep”- *Veterinary Research* 37 (2006) 1-12

- Leginagoikoa I., Daltaubuit-Test M., Alvarez V., Arranz J., Juste R.A., Amorena B., de Andrés D., Luján L.L., Badiola J.J., Berriatua E., (2006) “Horizontal Maedi-Visna virus (MVV) infection in adult dairy-sheep raised under varying MVV-infection pressures investigated by ELISA and PCR” - *Research in Veterinary Science* 80 (2006) 235-24

- Leginagoikoa I., (2010) “Epidemiologia y diagnóstico de la infección por el Virus Maedi Visna en diferentes sistemas de explotación ovinos españoles”.

Tesis Doctoral, Universidad de León, Facultad de Veterinaria, Departamento de Sanidad Animal.

- Legrottaglie R., Barsotti G., Martini M., Rizzi V., Agrimi P. (1996) “Ricerche sull’infezione da virus Maedi-Visna (MVV) su alcuni parametri di produttività in ovini di razza Sarda”. Atti Convegno Nazionale S.I.P.A.O.C., XIII, 109-110.

- Li H., Wu X. L., Tait Jr R. G., Bauck S., Thomas D. L., Murphy T. W., & Rosa G.J.M., (2020). “Genome-wide association study of milk production traits in a crossbred dairy sheep population using three statistical models”. *Animal Genetics*, 51(4), 624-628.

- Luján L., Pérez M., de Andrés D., Reina R., (2019) “Pulmonary lentivirus infection in sheep”. *Small Ruminant Research* 181 (2019) 87–90

DOI: 10.1016/j.smallrumres.2019.05.006

- Lunardini L., (2005). “Studio trasversale sull’eventuale correlazione tra sieropositività nei confronti di Maedi-Visna e mastiti in ovini della provincia di Massa Carrara”.

Tesi di Laurea, Corso di Laurea Magistrale in Medicina Veterinaria, Facoltà di Medicina Veterinaria, Università degli Studi di Pisa.

- Ma L., Li Y., Ma X., & Hehua E.E.R., (2020). “Genome-wide SNPs and indels characteristics of three chinese domestic sheep breeds from different ecoregions”. *Livestock Science*, 240, 104122.

- Maclachlan N.J. and Dubovi E.J. (2017). “Retroviridae”. *Fenner's veterinary virology*, 269–297. Elsevier Academic Press.

DOI:10.1016/b978-0-12-800946-8.00014-3

- Maiztegui V. Á. (2006) “Estudio epidemiológico y experimental de la transmisión y control del virus Maedi-Visna en ovino lechero de raza latxa del País Vasco”.

Tesis Doctorales nº56, Universidad de León, Facultad de Veterinaria, Departamento de Sanidad Animal.

- Malchiodi, F., Schenkel, F. S., Christen, A. M., Kelton, D. F., & Miglior, F., (2018). “Genome-wide association study and functional analysis of infectious and horn type hoof lesions in Canadian Holstein cattle”. In World Congress on Genetics Applied to Livestock Production.

- Malheiros J.M., Enríquez-Valencia C.E., da Silva Duran B.O., de Paula T.G., Curi R.A., de Vasconcelos Silva J.A.I.I., Dal-Pai-Silva M., de Oliveira H.N., Chardulo L.A.L., (2018). “Association of CAST2, HSP90AA1, DNAJA1 and HSPB1 genes with meat tenderness in Nellore cattle”. *Meat science*, 138, 49-52.

- Manolio T. A. (2010). “Genome-wide association studies and assessment of the risk of disease”. *New England journal of medicine*, 363(2), 166-176.

- Marete A., Sahana G., Fritz S., Lefebvre R., Barbat A., Lund M.S., Guldbbrandtsen B., Boichard D., (2018). “Genome-wide association study for milking speed in French Holstein cows”. *J Dairy Sci.* 2018 Jul;101(7):6205-6219. DOI: 10.3168/jds.2017-14067.

- Mastrangelo S., Ciani E., Sardina M.T., Sottile G., Pilla F., Portolano B., and Bi.Ov. Ita Consortium (2018) “Runs of homozygosity reveal genome-wide autozygosity in Italian sheep breeds”. *Anim Genet.* 2018 Feb;49(1):71-81. DOI:10.1111/age.12634.

- Michiels R., Adjadj N. R. and De Regge N., (2020) “Phylogenetic Analysis of Belgian Small Ruminant Lentiviruses Supports Cross Species Virus Transmission and Identifies New Subtype B5 Strains”. *Pathogens* 2020, 9, 183. DOI: 10.3390/pathogens9030183.

- Minguijón E., Reina R., Pérez M., Polledo L., Villoria M., Ramírez H., Leginagoikoa I., Badiola J.J., García-Marín J.F., de Andrés D., Luján L., Amorena B., Juste R.A., (2015) “Small ruminant lentivirus infections and diseases”. *Veterinary Microbiology* 181 (2015) 75–89. <http://dx.doi.org/10.1016/j.vetmic.2015.08.007>

- Molaee, V., Bazzucchi, M., De Mia, G. M., Otarod, V., Abdollahi, D., Rosati, S., & Lühken, G. (2020) “Phylogenetic analysis of small ruminant lentiviruses in Germany and Iran suggests their expansion with domestic sheep”. *Scientific reports*, 10(1), 1-12.

- Mohammadi H., Rafat S.A., Moradi Shahrababak H., Shodja J., & Moradi M.H., (2020). “Genome-wide association study and gene ontology for growth and wool characteristics in Zandi sheep”. *Journal of Livestock Science and Technologies*, 8(2), 45-55.

- Murphy T. W., Thomas D. L., Taylor T. A., Maroney M. J., and Nelson K. M. (2014) “The relationship of OPP infection to TMEM154 genotype in a Midwestern sheep flock”. 10th World Congress of Genetics Applied to Livestock Production. 18-22 August, Vancouver, BC, Canada

- Mullen S. A., Crompton D. E., Carney P. W., Helbig I., Berkovic, S. F. (2009). “A neurologist’s guide to genome-wide association studies”. *Neurology*, 72(6), 558-565.
- Naif H.M., (2013) “Pathogenesis of HIV Infection”. *Infect Dis Rep*. 5:e6

- Neupane M., Kiser J.N., Bovine Respiratory Disease Complex Coordinated Agricultural Project Research Team, & Neibergs, H. L., (2018). “Gene set enrichment analysis of SNP data in dairy and beef cattle with bovine respiratory disease”. *Animal genetics*, 49(6), 527-538.

- Nicolai L., (2014) “Variabilità degli SRLV in Italia”. Tesi di Laurea, Corso di Laurea Magistrale in Medicina Veterinaria, Facoltà di Medicina Veterinaria, Università degli Studi di Pisa

- Olech M., Rachid A., Croisé B., Kuźmaka J., Valas S., (2012) “Genetic and antigenic characterization of small ruminant lentiviruses circulating in Poland”. *Virus Research* Volume 163: 528-536

- Olech M., Valas S., Kuźmak J., (2018) “Epidemiological survey in single-species flocks from Poland reveals expanded genetic and antigenic diversity of small ruminant lentiviruses”. *PLoS ONE* 13(3): e0193892. DOI:10.1371/journal.pone.0193892

- Olech M., Maciej M., Kuźmak J., (2019a) “Molecular analysis of small-ruminant lentiviruses in Polish flocks reveals the existence of a novel subtype in sheep”. *Archives of Virology* 164, pages1193–1198(2019) DOI: 10.1007/s00705-019-04161-9

- Olech M. and Kuźmak J., (2019b) “Genetic variability of small ruminant lentiviruses in sheep and goats from single-species flocks from Poland”. *Virus Evolution*, 2019, Vol. 5, Suppl. 1

- Olech M., Kuźmak, J. (2020a) “Molecular Characterization of Small Ruminant Lentiviruses of Subtype A5 Detected in Naturally Infected but Clinically Healthy Goats of Carpathian Breed”. *Pathogens* 2020, 9, 992. DOI: 10.3390/pathogens9120992

- Olech M., Osiński Z., Kuźmak J., (2020b) “Seroprevalence of small ruminant lentivirus (SRLV) infection in wild cervids in Poland”. *Preventive Veterinary Medicine* 176 (2020) 104905 DOI:10.1016/j.prevetmed.2020.104905

- OIE - Terrestrial Animal Health Code. 28th Edition, 2019. Chapter 14.5.

- Pagnacco G. (2016) “Genetica animale - Applicazioni zootecniche e veterinarie”. 2 ed. Casa Editrice Ambrosiana.

- Ortega M.S., Rocha-Frigoni N.A., Mingoti G.Z., Roth Z., & Hansen P.J., (2016). “Modification of embryonic resistance to heat shock in cattle by melatonin and genetic variation in HSPA1L”. *Journal of dairy science*, 99(11), 9152-9164.

- Palsson P. A. (1976) “Maedi and Visna in sheep”. In *Slow virus diseases of animals and man*. R. H. Kimberlin Ed., North Holland Publishing Co-Amsterdam-Oxford, 17-43.

- Paredes-Sánchez F.A., Sifuentes-Rincón A.M., Casas E., Arellano-Vera W., Parra-Bracamonte G.M., Riley D.G., Welsh T.H. Jr., Randel R.D., (2020). “Novel genes involved in the genetic architecture of temperament in Brahman cattle”. *PLoS One*. 2020 Aug 21;15(8):e0237825. DOI:10.1371/journal.pone.0237825.

- Pasick J. (1998) “Maedi-visna virus and caprine arthritis-encephalitis virus: distinct species or quasispecies and its implications for laboratory diagnosis”. *Can J Vet Res*. 1998;62(4):241-244.

- Pławińska-Czarnak J., Majewska A., Zarzyńska J., Bogdan J., Kaba J., Anusz K., & Bagnicka E., (2021). “Gene Expression Profile in Peripheral Blood Nuclear Cells of Small Ruminant Lentivirus-Seropositive and Seronegative Dairy Goats in Their First Lactation”. *Animals*, 11(4), 940.

- Poli G., Cocilovo A., Dall’Ara P., Martino P.A., Ponti W. (2005) “Microbiologia e immunologia veterinaria”. UTET Scienze Mediche, Milano.

- Pearson T. A., & Manolio T. A. (2008). “How to interpret a genome-wide association study”. *Jama*, 299(11), 1335-1344.

- Pepin M., Vitu C., Russo P., Mornex J.F., Peterhans E. (1998) “Maedi-visna virus infection in sheep: a review”. *Vet Res.* 1998 May-Aug;29(3-4):341-367.

- Peterhans E., Greenland T., Badiola J., Harkiss G., Bertoni G., Amorena B., Eliaszewicz M., Juste R.A., Krabnig R., Lafont J.P., Lenihan P., Pétutsson G., Pritchard G., Thorley J., Vitu C., Mornex J.F., Pépin M., (2004) “Routes of transmission and consequences of small ruminant lentiviruses (SRLVs) infection and eradication schemes”. *Vet. Res.* 35 (2004) 257–274 257 © INRA, EDP Sciences, 2004
DOI: 10.1051/vetres:2004014

- Pisoni G., Bertoni G., Manarolla G., Vogt H.R., Scaccabarozzi L., Locatelli C., Moroni P., (2010) “Genetic Analysis of Small Ruminant Lentiviruses Following Lactogenic Transmission”. *Virology*. 2010;407:91–99. DOI: 10.1016/j.virol.2010.08.004

- Preziuso S., Bandecchi P., Rossi G., Taccini E., Renzoni G., Braca G. (2001) “Infezione sperimentale da Maedi/Visna Virus: osservazioni anatomo-istopatologiche ed immunoistochimiche in pecore dopo tre anni dall’inoculazione”. *Atti della Società Italiana delle Scienze Veterinarie*, LV, 141-142.

- Preziuso S., Taccini E., Rossi G., Renzoni G., Braca G. (2003) “Experimental Maedi Visna Virus Infection in sheep: a morphological, immunohistochemical and PCR study after three years of infection”. *European Journal of Histochemical*, 47, 373-378.

- Pritchard G.C., Done S. H., Dawson M. (2001) “Multiple cases of maedi and visna in flock in East Anglia”. *Veterinary Research*, 148, 218-219.

- Puggioni G. (2015) “Lentivirus dei piccoli ruminanti: Caratteristiche dei Test Diagnostici, ceppi virali circolanti in Sardegna e attività di ricerca dell’IZS Sardegna”. 9 giugno 2015, Cagliari.

- Purcell S., Neale B., Todd-Brown K., Thomas L., Ferreira M. A., Bender D., Maller J., Sklar P., de Bakker P.I., Daly M.J., Sham, P. C. (2007) “PLINK: a tool set for whole-genome association and population-based linkage analyses”. *The American journal of human genetics*, 81(3), 559-575. DOI: 10.1086/519795

- Purfield D. C., Berry D. P., McParland S., & Bradley D. G. (2012). “Runs of homozygosity and population history in cattle”. *BMC Genet* 13, 70 (2012). DOI:10.1186/1471-2156-13-70

- Qu L., Yang M., Zhu J., Liu J., Li M., Zhang L., ... & Chen H., (2011). “SNPs in the coding region of bovine MGAT2 gene are associated with body weight and weight gain”. *Genes & Genomics*, 33(3), 267-272.

- Raven L.A., Cocks B.G., Kemper K.E., Chamberlain A. J., Vander Jagt C. J., Goddard M.E., & Hayes B.J., (2016). “Targeted imputation of sequence variants and gene expression profiling identifies twelve candidate genes associated with lactation volume, composition and calving interval in dairy cattle”. *Mammalian genome*, 27(1-2), 81-97.

- Reczyńska D., Zalewska M., Czopowicz M., Kaba J., Zwierzchowski L., Bagnicka E., (2018) “Small ruminant lentivirus infection influences expression of acute phase proteins and cathelicidin genes in milk somatic cells and peripheral blood leukocytes of dairy goats”. *Vet Res* (2018) 49:113 DOI: 10.1186/s13567-018-0607-x

- Reina R., Berriatua E., Luján L., Juste R., Sánchez A., de Andrés D., Amorena B., (2009) “Prevention strategies against small ruminant lentiviruses: An update”. *The Veterinary Journal*, Volume 182, Issue 1, October 2009, Pages 31-37 DOI: 10.1016/j.tvjl.2008.05.008

- Reina R., Bertolotti L., Dei Giudici S., Puggioni G., Ponti N., Profiti M., Patta C., Rosati S., (2010) “Small ruminant lentivirus genotype E is widespread in Sarda goat.”. *Veterinary Microbiology* 2010: 144(1-2):24-31 DOI: 10.1016/j.vetmic.2009.12.020
- Reina R., De Andrés D., Amorena B., (2013) “Immunization against Small Ruminant Lentiviruses”. *Viruses* 2013, 5, 1948-1963. DOI: 10.3390/v5081948
- Remond M., Laurenadie B. (1985) “Maedi-Visna infection in France. Results of serological examinations and trial of eradication”. *Agriculture Proceedings Workshop Edinburgh-Reykjavik*.
- Ren W., Badgery W., Ding Y., Guo H., Gao Y., & Zhang J., (2019). “Hepatic transcriptome profile of sheep (*Ovis aries*) in response to overgrazing: novel genes and pathways revealed”. *BMC genetics*, 20(1), 1-11.
- Rizzi V., Legrottaglie R., Agrimi P. (1998) “Espressione del virus Maedi-Visna nella secrezione mammaria di pecore di razza Sarda”. *Atti XIII Congresso Nazionale S.I.P.A.O.C. 16-19 Aprile 1998, Palermo. pp 54-157.*
- Rochus C.M., Westberg Sunesson K., Jonas E., Mikko S., & Johansson A.M., (2019). “Mutations in ASIP and MC1R: dominant black and recessive black alleles segregate in native Swedish sheep populations”. *Animal genetics*, 50(6), 712-717.
- Rolesu S., Aloï D., Ponti N., Piazza G., Ruiu A., Ladu M., Cossu P., Murgia M. C., Addis G., Crobeddu S., Puggioni G., (2009) “Prevalenza delle infezioni da lentivirus dei piccoli ruminanti in Sardegna”. *Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Sardegna, Cagliari. <https://www.researchgate.net/publication/233761581>*
- Rosati S. (2010) “Recenti acquisizioni in tema di lentivirus dei piccoli ruminanti”. *Atti XIX Congresso Nazionale S.I.P.A.O.C. 22-25 Settembre 2010, Pesaro-Coriano. pp.11-12.*
- Sarafidou, T., Stamatis, C., Kalozoumi, G., Spyrou, V., Fthenakis, G. C., Billinis, C., & Mamuris, Z. (2013). “Toll like receptor 9 (TLR9) polymorphism G520R in sheep is associated with seropositivity for small ruminant lentivirus”. *PloS one*, 8(5), e63901.

- Santry L.A., de Jong J., Gold A.C., Walsh S.R., Menzies P.I., Wootton S.K., (2013) “Genetic Characterization of Small Ruminant Lentiviruses Circulating in Naturally Infected Sheep and Goats in Ontario, Canada”. *Virus Res.* 2013;175:30–44.
doi: 10.1016/j.virusres.2013.03.019

- Sbardella, A. P., Watanabe, R. N., da Costa, R. M., Bernardes, P. A., Braga, L. G., Baldi Rey, F. S., ... & Munari, D. P. (2021). “Genome-Wide Association Study Provides Insights into Important Genes for Reproductive Traits in Nelore Cattle”. *Animals*, 11(5), 1386.

- Seriacopi L., Agrimi P., Renzoni G., (1993) “Tentativi di controllo della diffusione dell’infezione da Virus Maedi-Visna in alcune greggi ovine in Provincia di Livorno”. Tesi di laurea alla Facoltà di Medicina Veterinaria, Università di Pisa.

- Serrano, M., Ramón, M., Calvo Lacosta, J. H., Freire, F., Vázquez, J. M., Jiménez, M. A., & Arranz, J. J., (2019). “Genome-wide association study of sperm traits in Assaf rams”. *Animal*. 2021 Feb;15(2):100065. DOI: 10.1016/j.animal.2020.100065.

- Serrano M, Ramón M, Calvo JH, Jiménez MÁ, Freire F, Vázquez JM, Arranz JJ., (2021). “Genome-wide association studies for sperm traits in Assaf sheep breed”. *Animal*. 2021 Feb;15(2):100065. DOI: 10.1016/j.animal.2020.100065.

- Shah C., Huder J.B., Böni J., Schönmann M., Mühlherr j., Lutz H., Schüpbach J., (2004a) “Direct Evidence for Natural Transmission of Small-Ruminant Lentiviruses of Subtype A4 from Goats to Sheep and Vice Versa”. *Journal of Virology*, July 2004, pp. 7518-7522 DOI: 10.1128/JVI.78.14.7518-7522.2004

- Shah C., Böni, J., Huder J.B., Vogt H.R., Mühlherr J., Zanoni R.; Miserez R., Lutz H., Schüpbach J. (2004b). “Phylogenetic Analysis and Reclassification of Caprine and Ovine Lentiviruses Based on 104 New Isolates: Evidence for Regular Sheep-to-Goat Transmission and Worldwide Propagation through Livestock Trade”. *Virology* 2004, 319, 12–26.

- Shin, S. C., & Chung, E. R. (2016). “Identification of differentially expressed genes between high and low marbling score grades of the longissimus lumborum muscle in Hanwoo (Korean cattle)”. *Meat science*, 121, 114-118.

- Sider L.H., Heaton M.P., Chitko-McKown C.G., *et al.*, (2013) “Small ruminant lentivirus genetic subgroups associate with sheep TMEM154 genotypes”. *Vet. Res.*, 44:64

- Sigurdsson B., Grimsson H., Palsson P.A. (1952) “Maedi, a chronic progressive infection of sheep lungs”. *Journal of Infectious Diseases*, 90, 233-241.

- Sigurdsson B., Palsson P.A. (1958) “Visna of sheep. A slow demyelinating infection”. *British Journal of Experimental Pathology*, 39, 519-528

- Song, N., Gui, L. S., Xu, H. C., Wu, S., & Zan, L. S. (2015). “Identification of single nucleotide polymorphisms of the signal transducer and activator of transcription 3 gene (STAT3) associated with body measurement and carcass quality traits in beef cattle”. *Genetics and molecular research: GMR*, 14(3), 11242-11249.

- Srivastava S, Srikanth K, Won S, Son JH, Park JE, Park W, Chai HH, Lim D., (2020). “Haplotype-Based Genome-Wide Association Study and Identification of Candidate Genes Associated with Carcass Traits in Hanwoo Cattle”. *Genes (Basel)*. 2020 May 14;11(5):551. DOI: 10.3390/genes11050551.

- Stempa, T., & Bradley, G. (2020). “Effect of Sex and Breed on HSPA1A, Blood Stress Indicators and Meat Quality of Lambs”. *Animals (Basel)*. 2020 Aug 27;10(9):1514. DOI: 10.3390/ani10091514.

- Stonos N., Wootton S.K., Karrow N., (2014) “Immunogenetics of Small Ruminant Lentiviral Infections”. *Viruses* 2014, 6, 3311-3333
DOI: 10.3390/v6083311

- Straub O. C. (2002) “Maedi-Visna virus infection in sheep. History and present knowledge”. *Comparative Immunology, Microbiology & Infectious Diseases*, 27, 1-5.

- Strillacci MG, Frigo E, Schiavini F, Samoré AB, Canavesi F, Vevey M, Cozzi MC, Soller M, Lipkin E, Bagnato A., (2014). “Genome-wide association study for somatic cell score in Valdostana Red Pied cattle breed using pooled DNA”. *BMC Genet.* 2014 Oct 6;15:106. DOI: 10.1186/s12863-014-0106-7.
- Suárez-Vega, A., Gutiérrez-Gil, B., & Arranz, J. J., (2016). “Transcriptome expression analysis of candidate milk genes affecting cheese-related traits in 2 sheep breeds”. *Journal of dairy science*, 99(8), 6381-6390.
- Tam V., Patel N., Turcotte, M., Bossé Y., Paré G., & Meyre D. (2019). “Benefits and limitations of genome-wide association studies”. *Nature Reviews Genetics*, 20(8), 467-484.
- Tarlinton R., Jones S., Davies P., Lovatt F., Dunham S., (2020) “The Impact of MaediVisnaon Breeding Flocks”. *ACCESS MICROBIOLOGY* Volume 2, Issue 7A <https://doi.org/10.1099/acmi.ac2020.po0069>
- Tavella A., Bettini A., Ceol M., Zambotto P., Stifter E., Kusstatscher N., Lombardi R., Nardeli S., Beato M.S., Capello K., Bertoni G., (2017) “Achievements of an eradication programme against caprine arthritis encephalitis virus in South Tyrol, Italy”. *Veterinary Record*: first published as 10.1136/vr.104503 on 6 November 2017
- Taye M, Lee W, Jeon S, Yoon J, Dessie T, Hanotte O, Mwai OA, Kemp S, Cho S, Oh SJ, Lee HK, Kim H., (2017). “Exploring evidence of positive selection signatures in cattle breeds selected for different traits”. *Mammalian Genome*, 28(11), 528-541.
- Tao L, He XY, Wang FY, Pan LX, Wang XY, Gan SQ, Di R, Chu MX., (2021). “Identification of genes associated with litter size combining genomic approaches in Luzhong mutton sheep”. *Animal Genetics* 2021 May 17. DOI: 10.1111/age.13078.
- Thormar H. (1965) “A comparison of Visna and Maedi viruses. 1.- Physical, Chemical and Biological properties.” *Res Vet Sci*, 6:117-29
- Tian, R., (2012). “Genomic approach to understanding variation in bovine fat colour” Doctoral dissertation. University of Adelaide, School of Animal and Veterinary Sciences.

- Tijjani, A., Utsunomiya, Y. T., Ezekwe, A. G., Nashiru, O., & Hanotte, O., (2019). “Genome sequence analysis reveals selection signatures in endangered trypanotolerant West African Muturu cattle”. *Frontiers in genetics*, 10, 442

- Tolari F. (2000) “Maedi-Visna ovina: eziologia, diagnosi, prevenzione e risanamento”. *Summa*, 17, 23-25.

- Usai M.G., Sechi T., Casu S., Carta A., (2010) “Utilizzo degli OVINE SNP50 BEADCHIP:esperienze applicative e prospettive per il miglioramento genetico”. *Atti XIX Congresso Nazionale S.I.P.A.O.C. 22-25 Settembre 2010, Pesaro-Coriano. pp.17-19.*

- Wang J, Zhou H, Hickford JGH, Hao Z, Shen J, Luo Y, Hu J, Liu X, Li S., (2020). “Comparison of the transcriptome of the ovine mammary gland in lactating and non-lactating Small-Tailed Han Sheep”. *Frontiers in Genetics*, 2020 May 21;11:472.

- Wang X, Li C, Wang Y, Li L, Han Z, Wang G., (2020). “UFL1 alleviates LPS-induced apoptosis by regulating the NF- κ B signaling pathway in Bovine Ovarian Granulosa Cells”. *Biomolecules*, 10(2), 260.

- Wang Z, Zhu B, Niu H, Zhang W, Xu L, Xu L, Chen Y, Zhang L, Gao X, Gao H, Zhang S, Xu L, Li J., (2019). “Genome wide association study identifies SNPs associated with fatty acid composition in Chinese Wagyu cattle”. *Journal of animal science and biotechnology*, 10(1), 1-13.

- Wang Z, Guo J, Guo Y, Yang Y, Teng T, Yu Q, Wang T, Zhou M, Zhu Q, Wang W, Zhang Q, Yang H., (2020). “Genome-Wide Detection of CNVs and Association With Body Weight in Sheep Based on 600K SNP Arrays”. *Front Genet.* 2020 Jun 9;11:558.

- White S.N., Mousel M.R., Reynolds J.O., Lewis G.S. and Herrmann-Hoesing L.M., (2009) “Common promoter deletion is associated with 3.9-fold differential transcription of ovine CCR5 and reduced proviral level of ovine progressive pneumonia virus”. *Animal Genetics*, 40, 583–589

- Wojdak-Maksymiec, K., Szyda, J., & Strabel, T. (2013). “Parity-dependent association between TNF- α and LTF gene polymorphisms and clinical mastitis in dairy cattle”. *BMC veterinary research*, 9(1), 1-8.
- Xia J, Qi X, Wu Y, Zhu B, Xu L, Zhang L, Gao X, Chen Y, Li J, Gao H., (2016). “Genome-wide association study identifies loci and candidate genes for meat quality traits in Simmental beef cattle”. *Mamm Genome*. 2016 Jun;27(5-6):246-55. ■
- Xi Y.M., Yang Z., Wu F., Han Z. Y., & Wang G. L. (2015). “Gene expression profiling of hormonal regulation related to the residual feed intake of Holstein cattle”. *Biochemical and biophysical research communications*, 465(1), 19-25.
- Xie ZL, Ye PS, Zhang YS, Shen XZ., (2015). “Effect of high-concentrate diet on amino acid transporter expression and milk quality in Holstein dairy cows”. *Genet Mol Res*. 2015 May 18;14(2):5246-57.
- Xun W, Shi L, Cao T, Zhao C, Yu P, Wang D, Hou G, Zhou H., (2015). “Dual functions in response to heat stress and spermatogenesis: characterization of expression profile of small heat shock proteins 9 and 10 in goat testis”. *Biomed Res Int*. 2015;2015:686239.
- Yamana Y., Keleş M., Aymaz R., Sevim S., Sezenler T., Önalı A.T., Kaptan C., Başkurt A., Koncagül S., Önerc Y., Öztürk E. E., İriadam M., Ün C., Heaton M.P., (2019) “Association of TMEM154 variants with visna/maedi virus infection in Turkish sheep”. *Small Ruminant Research* 177 (2019) 61–67.
<https://doi.org/10.1016/j.smallrumres.2019.06.006>
- Yan Z, Wang Z, Zhang Q, Yue S, Yin B, Jiang Y, Shi K., (2020) “Identification of whole-genome significant single nucleotide polymorphisms in candidate genes associated with body conformation traits in Chinese Holstein cattle”. *Anim Genet*. 2020 Feb;51(1):141-146
- Yang F, Chen F, Li L, Yan L, Badri T, Lv C, Yu D, Zhang M, Jang X, Li J, Yuan L, Wang G, Li H, Li J, Cai Y., (2019). “Three Novel Players: PTK2B, SYK, and TNFRSF21 Were Identified to Be Involved in the Regulation of Bovine Mastitis Susceptibility via GWAS and Post-transcriptional Analysis”. *Front Immunol*. 2019 Aug 6;10:1579.

- Zara I., (2011). “Studi di associazione genetica e disegno sperimentale caso-controllo. Applicazioni allo studio del Diabete di Tipo 1 e della Sclerosi Multipla nella popolazione sarda”. Collana di Seminari per la Valorizzazione dei Risultati della Ricerca al CRS4. Aula Magna Dipartimento di Fisica. Cittadella Universitaria di Monserrato. 30 Marzo 2011.

- Zhang, L., Peng, F., Yu, F., Wan, L., & Zhou, Z. Q., (2019). “Expression of ESR1, PRLR, GHR, and IGF1R in mammary glands of Hu sheep with four teats.” *Czech Journal of Animal Science*, 64(2), 49-58.

- Zeng P., Zhao Y., Qian C., Zhang L., Zhang R., Gou J., Liu J., Liu L., Chen F. (2015). “Statistical analysis for genome-wide association study”. *Journal of biomedical research*, 29(4), 285

- Zsolnai A, Kovács A, Kaltenecker E, Anton I., (2021). “Identification of markers associated with estimated breeding value and horn colour in Hungarian Grey cattle”. *Anim Biosci*. 2021 Apr;34(4):482-488.

3. SITOGRAFIA

- <https://www.pg.izs.it>
- <https://www.izs-sardegna.it>
- www.izsum.it
- www.izsvenezie.it
- <https://www.iss.it>
- <https://www.ara.sardegna.it>
- <https://www.sardegnaagricoltura.it>
- <https://www.regione.sardegna.it/documenti>
- <https://www.sba.uniss.it>
- <https://eu.alma.exlibrisgroup.com>
- <https://etd.adm.unipi.it>
- <https://www.sipaoc.it>
- <https://iris.unito.it>
- <https://talk.ictvonline.org>
- <https://www.researchgate.net>
- <https://www.ruminantia.it>

- <https://www.infettivibrescia.it>

- <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed>

- <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank>

- <https://www.mdpi.com/journal>

- <https://link.springer.com>

- <https://www.oie.int>

- <https://www.elsevier.com>

- <https://www.sciencedirect.com>

- <https://www.illumina.com>

- <https://www.thermofisher.com>

- <https://www.qiagen.com>

- <https://www.sheepmap.org/>

- <https://www.nexttec.de>

- <https://www.r-project.org>

- <https://www.cog-genomics.org>

- <https://www.genecards.org>

AGRADECIMENTOS

Agradeço a todos os que me ajudaram na redação com sugestões, críticas e observações: minha gratidão vai para eles, ainda que assuma a responsabilidade por todos os erros contidos nesta tese.

Em primeiro lugar, agradeço ao Professor Nicola Macciotta e ao Dr. Antonello Carta pela ajuda e a disponibilidade que me dispensaram durante toda a carreira acadêmica e durante a elaboração da tese.

Agradeço ao Dr. Alberto Cesarani da Seção de Ciências Zootécnicas do Departamento de Agricultura pelo apoio recebido durante o processamento dos dados e a elaboração da tese.

Agradeço ao Dr. Mario Graziano Usai do setor "Genética e biotecnologia" da AGRIS Sardegna que disponibilizou os dados das ovelhas objeto do estudo.

Agradeço à Dra Marcella Sechi e à equipe do Gabinete de Relações Internacionais da Università degli Studi di Sassari que me apoiaram durante este percurso acadêmico.

Agradeço aos Professores do Mestrado em Engenharia Zootécnica e em particular aos Professores Fernando Paulo de Sousa e Sá Correia Marques e a todo o pessoal do Gabinete de Apoio à Mobilidade da Universidade de Évora.

Agradeço a todos os colegas que conheci durante estes anos acadêmicos e em particular àqueles que sempre compartilharam comigo alegrias e tristezas, sacrifícios e sucessos.

Um caloroso agradecimento a Patrizia e Ignazio, bem como a todos os familiares (adquiridos e não) e amigos que estiveram perto de mim também durante esta longo percurso.

Um imenso e especial agradecimento à Simona que com Amor, Paciência e Confiança sempre me apoiou ao longo dos anos, apesar das muitas dificuldades e dos muitos quilômetros que nos separaram fisicamente neste último dos meus percursos académicos.

Estas poucas linhas certamente não são suficientes, mas um grande agradecimento aos meus pontos de referência. Aqueles que, ajudando-me a enfrentar melhor ainda este difícil caminho, apoiando-me e encorajando-me nos momentos difíceis e alegrando-se comigo nos mais belos, permitiram a concretização deste objetivo.

“A Família não é uma coisa importante. É tudo.” (cit. Michael J. Fox)