



UNIVERSIDADE ESTADUAL DO CEARÁ

RICHARD ELAINO DE OLIVEIRA FERRAZ

**DETECÇÃO DO VÍRUS DA ARTRITE ENCEFALITE CAPRINA EM
SÊMEN TRATADO DE REPRODUTORES SOROPOSITIVOS.**

FORTALEZA - CEARÁ

2009

UNIVERSIDADE ESTADUAL DO CEARÁ

RICHARD ELAINO DE OLIVEIRA FERRAZ

**DETECÇÃO DO VÍRUS DA ARTRITE ENCEFALITE CAPRINA EM
SÊMEN TRATADO DE REPRODUTORES SOROPOSITIVOS.**

FORTALEZA - CEARÁ

2009

RICHARD ELAINO DE OLIVEIRA FERRAZ

**DETECÇÃO DO VÍRUS DA ARTRITE ENCEFALITE CAPRINA EM
SÊMEN TRATADO DE REPRODUTORES SOROPOSITIVOS.**

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

Área de Concentração: Reprodução e Sanidade Animal.

Linha de Pesquisa: Reprodução e sanidade de pequenos ruminantes.

Orientadora: Profa. Dra. Maria Fátima da Silva Teixeira.

Fortaleza

2009

RICHARD ELAINO DE OLIVEIRA FERRAZ

**DETECÇÃO DO VÍRUS DA ARTRITE ENCEFALITE CAPRINA EM
SÊMEN TRATADO DE REPRODUTORES SOROPositivos.**

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

Aprovada em: 27/07/2009

BANCA EXAMINADORA

Profa. Dra. Maria Fátima da Silva Teixeira
Orientador – UECE

Profa. Dra. Suzana Aparecida Costa Araújo
Examinadora-UFPB

Profa. Dra. Valeska Shelda P. de Melo.
Examinadora- UECE

Dedico este trabalho a minha filha
Sarah de Souza Fortuna Ferraz.

AGRADECIMENTOS

A Deus, por me guiar, consolar e dar saúde para conquistar os meus objetivos;

Ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias (PPGCV), todos os colegas, professores e funcionários do PPGCV que contribuíram de alguma maneira para a realização deste experimento;

A todos os funcionários, pesquisadores e estagiários da EMBRAPA caprinos que me apoiaram durante minha estada em Sobral durante os últimos meses;

À FUNCAP pelo apoio financeiro fundamental para a execução do trabalho;

Ao professor e coordenador do PPGCV Marcos Fábio Gadelha Rocha pela excelência de seu trabalho a frente de nosso Programa;

Ao Dr. José Ferreira Nunes e a sua equipe do Núcleo Integrado de Biotecnologia pelo apoio laboratorial;

Ao Dr. Vicente José de Figueiredo Freitas pela concessão de um animal experimental;

Aos colegas de laboratório Cyntia, Igor, Esmale, Mariana, Suzana, Tânia, Valeska, Edmara, D'ávila e Aryana;

Aos colegas veterinários Dra. Maria Nilza dos Reis Saraiva, Dr. Júlio César, Dra. Nilza Dutra Alves, Dra. Rafaela Machado e Dra. Bruna Soares por terem me apoiado nesta caminhada. Deus abençoe enormemente todos vocês;

A minha mãe Tereza Ferraz, minhas irmãs Ronala Ferraz e Raysa Ferraz, por terem me dado o mais importante: o amor da família e a crença que eu ia conseguir concluir mais esta caminhada;

Ao meu cunhado Tiago e a Socorro Aguiar e família por terem me dado os apoios mais essenciais durante os primeiros momentos desta caminhada;

Ao meu primo Gilberto Rodrigues, sua esposa Silmara e seus filhos pela torcida, apoio familiar e principalmente por acreditarem em mim;

A minha professora, orientadora e amiga Dra. Fátima Teixeira, pela oportunidade, confiança e dedicação que depositou em mim, representando muitas vezes o papel de mãe para a realização deste sonho;

A todos que direta ou indiretamente me ajudaram e foram enviados por Deus para me auxiliar e consolar durante o tempo da execução deste trabalho.

RESUMO

Os procedimentos de lavagem do sêmen têm sido testados visando minimizar o risco desta forma de transmissão. O objetivo deste trabalho foi avaliar a influência dos procedimentos de lavagem com tripsina na detecção do CAEV usando Nested-PCR como técnica de diagnóstico. Onze coletas de sêmen de sete reprodutores soropositivos foram realizadas. As coletas foram fracionadas em três alíquotas: na primeira (T1) o ejaculado foi lavado com solução Krebs-Ringer-Fosfato; a segunda (T2) foi lavada com solução de tripsina a 0,025%; e o grupo controle (C) no qual as amostras de sêmen não foram submetidas aos procedimentos de lavagem. No grupo T1 foram detectadas 5 (45,45%) amostras positivas e no grupo T2 apenas 2 (18%) resultados foram positivos. O DNA proviral foi detectado em 3 (27%) das 11 amostras que não foram submetidas a nenhum procedimento de lavagem. Os resultados mostraram que houve influência dos diferentes tratamentos do sêmen na detecção do DNA-proviral através da PCR.

Palavras chave: transmissão, sêmen, tripsina, CAEV.

ABSTRACT

The washing procedures of the semen have been tested to minimized risk of this transmission way. The aim of this study was to evaluate the influence of the washing procedures with trypsin in the detection of CAEV proviral-DNA using Nested-PCR how diagnostic technique. Eleven semen collections of seven soropositive reproducers were accomplished. The collections were fractioned in three aliquots: in the first one (T1) the ejaculate was washed with Krebs-Ringer-Fosfato solution; the second (T2) one was washed with 0,025% trypsin solution; and the control group (C) which the semen samples were not submitted to washing procedures. The results showed that the group T1 was detected 5 (45,45%) positive samples and in the group T2 only 2 (18%) results was positive. The proviral-DNA was detected in 3 (27%) of the 11 samples which was not submitted to washing procedure (control group). The statistic analyze showed that was influence of the different treatments of semen in the detection of proviral-DNA through PCR technique

Keywords: transmittion, semen, trypsin, CAEV.

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 Amplificação de DNA proviral por Nested-PCR de sêmen integral caprino soropositivo.....	51
FIGURA 2 Amplificação de DNA proviral por Nested-PCR de sêmen caprino soropositivo submetido à lavagem com solução Krebs-Ringer-Fosfato.....	52
FIGURA 3 Amplificação de DNA proviral por Nested-PCR de sêmen caprino soropositivo submetido à lavagem com tripsina a 0,025%.....	53

LISTA DE ABREVIATURAS

CAE – Artrite encefalite Caprina
CAEV - Vírus da Artrite encefalite Caprina
CNPc – Centro Nacional de Pesquisas com Caprinos
DNA – Ácido Desoxirribonucleico
ELISA - Enzyme Linked Immunosorbent Assay
env - gene que codifica proteínas do envelope do CAEV
gag - gene que codifica proteínas do nucleocapsídeo
HIV – Vírus da Imunodeficiência Humana
IDGA – Imunodifusão em gel de Agarose
Kb - Kilobase
pb – Pares de base
OIE – Organização Internacional de Epizootias
PBS – Solução salina tamponada
PCR - *polymerase chain reaction*
pol - gene que codifica enzimas virais
RNAm – Ácido ribonucleico
RNA_t – Ácido ribonucleico transportador
DTT – dithiothreitol
Vif - genes acessórios do CAEV
tat - genes acessórios do CAEV
FIV - Fertilização *in Vitro*
TRA - Técnicas de Reprodução Assistida
VIF – Vírus da Imunodeficiência felina
LVPR –Lentivirus de pequenos ruminantes
BIV – Vírus da imunodeficiência bovina
SIV – Vírus da imunodeficiência símia
AIEV – Vírus da anemia infecciosa equina
RT – transcriptase reversa
TCID₅₀ – doses infectantes de cultura de tecido 50%

SRD – sem padrão racial definido
SNC – Sistema Nervoso Central
MVV – Maedi-Visna Vírus
dNTP - desoxirribonucleotídeos fosfatados
IFI – imunofluorescência indireta
BVDV – vírus da diarreia viral bovina
EAV – vírus da artrite equina
BTV – vírus da língua azul (*Bluetongue vírus*)
IA –inseminação artificial
IETS – Sociedade internacional de transferência de embriões
CBRA – colégio brasileiro de reprodução animal
TBE - Tris/Borato/EDTA
EDTA - ácido etilenodiamino tetra-acético
SPTZ - espermatozóides
BHV – Herpesvirus Bovino

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	13
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	
2.1 ETIOLOGIA.....	15
2.2 EPIDEMIOLOGIA.....	16
2.3 SINAIS CLÍNICOS.....	17
2.4 TRANSMISSÃO.....	18
2.5 PATOGENIA.....	21
2.6 DIAGNÓSTICO.....	22
2.7 CONTROLE.....	28
2.8 DESINFECÇÃO DE SÊMEN.....	30
3 JUSTIFICATIVA.....	32
4 HIPÓTESE CIENTÍFICA.....	34
5 OBJETIVOS	
5.1 OBJETIVOS GERAL.....	35
5.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	37
6 ARTIGO CIENTÍFICO.....	35
7 CONCLUSÕES	54
8 PERSPECTIVAS	55
9 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	55

1 INTRODUÇÃO

A Artrite Encefalite Caprina (CAE) é uma doença crônica progressiva de incubação lenta, causada por vírus pertencente ao gênero *Lentivirus* e família Retroviridae e cujas manifestações clínicas principais incluem: artrite, mamite, pneumonia em animais adultos e encefalite em jovens (CRAWFORD et al, 1980; ALMEIDA et al., 2003).

Uma das medidas de controle da infecção é a avaliação sorológica semestral do rebanho através da Imunodifusão em Gel de Agarose (IDGA) e eliminação dos reprodutores soropositivos. Esta medida acarreta prejuízos econômicos para a cadeia produtiva da caprinocultura o que tem gerado o interesse de aproveitamento do germoplasma por meio do desenvolvimento de protocolos de eliminação de agentes patógenos do sêmen tornando-o viável para utilização em técnicas reprodutivas (OIE, 1996; ANDRIOLI et al., 2003).

As propriedades antimicrobianas da tripsina, amilase, beta-glucuronidase e catalase foram pouco investigadas (PICKETT et al., 1978; ANDRIOLI (2001). O uso de tripsina em meios de lavagem dos embriões tem demonstrado ser eficiente na remoção de vírus envelopados (STRINGFELLOW, 1998; ANDRIOLI, 2001). Bielanski et al. (1989) utilizaram a tripsina na tentativa de inativar o BHV-1. O vírus não foi isolado de nenhuma amostra tratada com tripsina utilizando um sistema de cultivo celular (Bielanski et al., 1989). STRINGFELLOW (1998) avaliou a utilização da tripsina na solução de lavagem de embriões, obtendo resultados satisfatórios na eliminação do agente viral.

A eficácia do método de lavagem utilizando a tripsina foi confirmado por Guerin et al. (1993). Nesse mesmo estudo foi proposto que o vírus não está no citoplasma, mas associado a membrana do espermatozóide. Loskutoff et al. (2005) propôs um método de remoção para HIV, HCV, e HBV usando 0.25% de tripsina, além de uma centrifugação por gradiente de densidade com Percoll. O procedimento testado se mostrou efetivo em reduzir a presença viral a nível indetectáveis ou que não fossem clinicamente relevantes.

Andrioli et al. (2006) obtiveram 53,6% de detecção do DNA-proviral do CAEV em sêmen não lavado, enquanto que apenas 17,9% das amostras se mostraram positivas quando utilizada a solução de Krebs-Ringer-Fosfato, na proporção de nove partes da solução para uma parte de sêmen, com centrifugação a 2.000 g durante 10 minutos. Neste experimento

foi adicionado diluente à base de leite desnatado, glicose e glicerol, ao sêmen lavado. Os resultados deste trabalho demonstram que a utilização de uma técnica de lavagem pode diminuir a carga viral do CAEV no sêmen.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 ETIOLOGIA

O Vírus da Artrite Encefalite Caprina (CAEV) é um lentivírus que juntamente com o vírus Maedi-Visna são denominados Lentivírus de Pequenos Ruminantes (LVPRs). Este grupo heterogêneo é composto por espécies com potencial patogênico e grupo de hospedeiros não bem definidos (LEROUX et al., 1997).

Os LVPR são vírus RNA pertencentes à família Retroviridae e subfamília Lentivirinae que alberga o gênero *Lentivirus*, do qual fazem parte, além dos LVPR, os vírus das imunodeficiências felina (VIF), bovina (BIV), símia (SIV) e humana (HIV-1, HIV-2), o vírus da anemia infecciosa equina (AIEV) (HAASE, 1986; CLEMENTS e PAYNE, 1994) e o vírus da doença de Jembrana (BURKALA et al., 1998).

Os LVPRs são envelopados, medem de 80 a 100 nm de diâmetro e possuem uma grande quantidade de ácidos siálicos em sua superfície. Seu material genético é constituído de duas moléculas idênticas de RNA (CLEMENTS e PAYNE, 1994; CALLADO et al., 2001).

Os LVPR podem ser divididos pelo menos em dois grupos biologicamente distintos. O vírus protótipo do grupo I é o visna, vírus islandês cepa K1514. O vírus neste grupo replica-se rapidamente, causando lise em culturas primárias de células de membrana sinovial de caprinos (MSC) e de células do plexo coróide de ovinos (CPC). Este sofre variação antigênica e induz a produção de anticorpos neutralizantes pelo hospedeiro (LEROUX et al., 1997).

O protótipo do grupo II é o vírus CAEV cepa Cork. O gene *tat* é dispensável para o CAEV in vivo, para o estabelecimento da infecção e patogênese (ZINK e JONHSON, 1994).

Uma classificação para os LVPRs foi baseada em seqüências genéticas dos genes *gag* e *pol*. De acordo com essa classificação os LVPRs seriam divididos em quatro grupos A a D, diferindo entre si de 25% a 37% nas seqüências gênicas citadas acima. Os grupos A e B são divididos em subtipos que diferem 15 a 27% entre si, sendo que o grupo A contém pelo menos 7 subtipos A1 a A7 e o grupo B em dois subtipos B1 e B2 (SHAH et al., 2004).

Os subtipos A5, A7 e B1 foram isolados de ovinos, os grupos C e D, isolados de caprinos, enquanto os subtipos A3, A4, A6 e B2 foram isolados tanto de caprinos quanto ovinos. Foi observada transmissão horizontal natural de caprinos para ovinos do subtipo B1 (PISONI et al., 2005).

Foi evidenciado, através de estudo filogenético, que após o alinhamento das cinco seqüências BRCNPC com as já disponíveis em bancos de dados genéticos, foi revelado que estas estão mais relacionadas com subtipo B1 do grupo CAEV do que com as do MVV (FEITOSA, 2007).

Através da ação da transcriptase viral é fabricado o DNA proviral que é constituído de duas regiões terminais não codificantes (*long terminal repeats* ou “LTRs”), entre as quais se situa os genes codificantes da proteínas estruturais (*gag* e *env*) e enzimas virais (*pol*), além de pequenas fases abertas de leitura (*open reading frames* ou ORFs), com os genes acessórios *tat*, *vif* (ou Q) e *rev*, codificantes de proteínas reguladoras envolvidas na replicação viral (CLEMENTS e PAYNE, 1994; CALLADO et al., 2001).

O gene *pol* codifica proteínas de atividade enzimática e o *gag* proteínas do nucleocapsídeo, ambos são altamente variáveis, possivelmente devido à pressão imunológica sobre as glicoproteínas virais de superfície por ele codificados (RAVAZZOLO et al., 2001).

A enzima transcriptase reversa (RT) possui uma baixa afinidade, a qual não apresenta atividade de reparo (exonuclease) e aliada à recombinação com o genoma de células co-infectadas, contribui para uma elevada taxa de mutação viral (LEROUX et al., 1997).

2.2 EPIDEMIOLOGIA

O CAEV foi isolado de caprinos em 1980, embora a artrite-encefalite caprina (CAE) tenha sido descrita pela primeira vez na década de setenta, nos EUA (CORK et al., 1974). O CAEV infecta caprinos em várias fases do desenvolvimento. Não há predileção por faixa etária, sexo, raça ou produção (LARA et al., 2005).

Atualmente, estas enfermidades já se encontram distribuídas mundialmente. No Brasil, estudos sorológicos têm revelado a ocorrência de lentivírus (MVV e CAE) em

vários Estados. Os LVPR foram identificados nos Estados de Minas Gerais, Rio de Janeiro, Bahia, Ceará, Rio Grande do Sul, Pernambuco e Paraíba (CASTRO et al, 1994; ASSIS e GOUVEIA, 1994; MOOJEN et al., 1986; BANDEIRA et al., 2008).

Em Fortaleza, onde se concentra a maior parte do rebanho caprino leiteiro do estado do Ceará, encontrou-se uma soroprevalência de 40,7% para o CAEV em caprinos destinados à exploração leiteira (MELO e FRANK, 1997). Na microrregião de Angicos no Rio Grande do Norte, foram detectados 2,71% de caprinos soropositivos (SILVA et al, 2005).

2.3 SINAIS CLÍNICOS

O período de incubação das LVPR é variável, sendo que o aparecimento de doença clínica e a produção de significativa patologia induzida pelo vírus podem ocorrer meses ou anos após a infecção (LARSEN et al., 1982; NARAYAN e CLEMENTS, 1989). A manifestação sintomatológica dos LVPR pode ser evidenciada pelos sinais de artrite, encefalite, mamite e pneumonia que podem ocorrer de forma isolada ou simultânea (FRANKE, 1998).

A forma artrítica é o quadro clínico mais freqüente da CAE, caracteriza-se por uma artrite degenerativa crônica, envolvendo principalmente o carpo e o tarso (CRAWFORD et al., 1980).

A forma encefalítica é observada com maior freqüência em animais de dois a quatro meses de idade. Os animais apresentam inicialmente fraqueza e andar inseguro que progride para paralisia progressiva da musculatura dos membros posteriores e membros anteriores. O quadro final da doença se caracteriza por decúbito, opistótomo e movimentos de pedalagem (FRANKE, 1998).

A pneumonia crônica é de ocorrência esporádica sendo mais comum em ovinos infectados com MVV, ocorrendo com maior freqüência em animais acima de um ano de idade, podendo também ocorrer em animais jovens e em caprinos (CORK e NARAYAN, 1980).

A forma mamítica caracteriza-se por uma lesão intersticial, provocando o endurecimento e a atrofia da glândula mamária. Em algumas propriedades chega a atingir

mais de 60% das cabras, resultando em grave perda econômica pela redução ou mesmo supressão da produção de leite (FRANKE, 1998).

2.4 TRANSMISSÃO

A principal forma de transmissão da CAE é a ingestão de leite ou colostro de fêmeas infectadas com o vírus uma vez que o mesmo infecta os macrófagos que estão presentes nestas secreções (CALLADO et al, 2001). Todavia, outras vias de transmissão são possíveis como a transmissão sexual através do sêmen, a transmissão vertical, contato direto entre animais e por transferência de embriões (AHMAD et al., 2008).

O contato direto entre os animais pode ser uma forma importante de transmitir a infecção, assim como a ingestão do colostro. A concentração de animais e o alojamento durante o inverno resultam em elevação das taxas de infecção (PÁLSSON, 1976).

A infecção do vírus da imunodeficiência felina (VIF-NCSU₁) através da inseminação artificial foi documentada (HOLLY et al., 1998). A ocorrência da transmissão materno-fetal foi reportada por experimentos nos quais filhotes de felinos foram separados das mães imediatamente após o nascimento e mantidos isolados e alimentados com leite livre do vírus e substitutos do leite. Cinco por cento dos 40 filhotes nascidos de fêmeas infectadas naturalmente soroconverteram em 8 semanas (EAST et al., 1993).

A transmissão do CAEV pela via digestiva através da ingestão do colostro foi observada em 50% dos animais recém-nascidos alimentados com uma única refeição contendo 2×10^7 TCID₅₀ do vírus. Ingestões menores provaram não ter poder infeccioso, sugerindo que 2×10^7 TCID₅₀ estava próximo da dose oral mínima infectante. A soroconversão após inoculação intravenosa foi mais eficiente (4 semanas após infecção) em doses menores (2×10^6 TCID₅₀) e mais eficientemente (100%) quando comparada com outras rotas de infecção (EAST et al., 1993).

Isso indica que pelo menos dois animais foram infectados antes ou durante o processo de parto. Quando os animais soronegativos foram postos em contato íntimo com os infectados, 10% se tornaram soropositivos em 20 semanas. Isso sugere que a transmissão por contato também ocorre entre caprinos infectados e susceptíveis (CALDAS et al., 2000; EAST et al., 1993).

A importância do ambiente intra-uterino para a transmissão da doença ainda é alvo de controvérsia. No entanto este ambiente pode provê condições favoráveis para infecção (LAMARA et al., 2002). Trabalhos demonstraram que as células epiteliais do oviduto caprino podem ser infectadas *in vitro* com o CAEV, porém nenhum experimento foi capaz de concluir se essa mesma possibilidade se dá em células *in vivo*. O CAEV tem sido identificado por meio de PCR em ovidutos e tecidos de 11 dentre 25 caprinos (FIENI et al., 2002, 2003).

In vivo o CAEV tem como células alvo monócitos e macrófagos (NARAYAN e CLEMENTS, 1989), no entanto o DNA-proviral foi identificado em outros tecidos tais como uterino, oviduto e no meio de lavagem uterina de animais naturalmente infectados (ANDRIOLI, 2001; FIENI et al., 2002). O CAEV é capaz de infectar células ovarianas *in vivo*, porém esta infecção não é observada em todos os animais acometidos pela enfermidade (FIENI et al, 2003; AHMAD et al, 2005).

Um estudo dos folículos pré-antrais pela microscopia eletrônica constatou estruturas íntegras em folículos normais de cabras soropositivas para o CAEV, e os folículos pré-antrais oriundos de fêmeas infectadas naturalmente com o CAEV, apresentaram ultra-estruturalmente alterações degenerativas somente nas células da granulosa (RICARTE , 2005).

Travassos et al. (1998) e Andrioli et al. (1999) acharam o CAEV no sêmen de caprinos infectados naturalmente e experimentalmente. Os mesmos resultados foram observados por Ahmad et al. (2008) e de acordo com Andrioli et al. (2001) a utilização de reprodutores caprinos pode ter um papel relevante na contaminação e disseminação do LVPR para rebanhos nativos e SRD explorados no Nordeste do Brasil.

PETERSON et al. (2008) observaram a presença de DNA proviral na fração composta de agregados e partes de espermatozóides de sêmen de animais infectados separado pelo gradiente de Percoll. Nesse mesmo trabalho foi encontrado DNA proviral em *debris* citoplasmáticos, macrófagos e células originárias de órgãos sexuais. Outros autores destacam a possibilidade do vírus estar presente no sêmen na forma livre e não nos espermatozóides (NASH et al., 1995; TRAVASSOS et al., 1999).

Em pequenos ruminantes, vários patógenos foram detectados no sêmen, com transmissão potencial ou comprovada (HARE, 1985; THIBIER e GUÉRIN, 2000),

incluindo os lentivírus que infectam caprinos e ovinos (CONCHA-BERMEJILLO et al., 1995; ANDRIOLI et al., 1999; TRAVASSOS et al., 1999; PREZIUSO et al., 2003). Outros lentivírus responsáveis por infecções em bovinos, felinos, primatas e humanos, foram igualmente detectados no sêmen (MERMIN et al., 1991; JORDAN et al., 1995; NASH et al., 1995).

Este alarme crescente está relacionado às implicações epizootiológicas da presença de microrganismos no sêmen, implicações estas que não só estão relacionadas à infecção exclusiva da fêmea receptora ou do coletivo da exploração pecuária, como também na possível introdução de doenças exóticas no país importador (SILVA et al, 2005).

Em humanos, a transmissão dos lentivírus pelo sêmen depende do estágio da doença, do estado imunológico ou nutricional do paciente e da associação com outras enfermidades (ALEXANDER, 1990). Em caprinos, pouco se conhece sobre fatores que interferem na presença dos LVPR no sêmen, porém como os lentivírus infectam monócitos e macrófagos (NASH et al., 1995; QUAYLE et al., 1997), a presença de inflamações ou infecções no órgão reprodutor poderia desencadear o maior fluxo destas células inflamatórias, resultando em aumento da carga viral no sêmen.

Em reprodutores caprinos e ovinos a eliminação do DNA proviral apresenta caráter intermitente sugerida por alguns autores como uma eliminação sazonal ligada ao aumento da atividade sexual e estresse durante a estação reprodutiva (PETERSON et al., 2008; ANDRIOLI et al., 2006).

O sêmen pode infectar-se por patógenos procedentes dos testículos, epidídimo, glândulas anexas, da uretra ou do prepúcio, ou os patógenos podem ganhar acesso ao sistema reprodutor, pelo sangue e líquidos tissulares extravasados para este sistema, nas bacteremias ou viremias, ou no caso de qualquer inflamação ou infecção nestes órgãos. Além disso, o sêmen pode contaminar-se no meio externo, por microorganismos presentes no ambiente, na pele do reprodutor, nos materiais não adequadamente esterilizados utilizados na sua coleta e manipulação, e no caso da congelação em nitrogênio líquido, a partir de outras amostras contaminadas (HARE, 1985; THIBIER e GUÉRIN, 2000).

Além disso, fatores como lesões, inflamações e infecções no órgão reprodutor podem desencadear maior fluxo de células sangüíneas para o sêmen, juntamente com os patógenos, e ainda outros fatores como o estágio da doença, o estado imunológico ou

nutricional e a associação com outras enfermidades (CONCHA-BERMEJILLO et al., 1995; ANDRIOLI, 2001).

2.5 PATOGENIA

O CAEV causa doença de caráter crônico com grande período de latência (CLEMENTS e PAYNE, 1994). Após atingir o organismo, ocorre uma viremia e o vírus irá infectar as células mononucleares do sangue periférico (CORK e NARAYAN, 1980).

A disseminação do vírus aos múltiplos órgãos envolvidos na doença ocorre via monócitos infectados que não expressam o vírus. Os monócitos infectados chegam ao cérebro, pulmões, articulações e outros órgãos, onde maturam para macrófagos. A diferenciação em macrófagos ativa a expressão do gene viral e os vírus são então produzidos nestes órgãos (CLEMENTS e PAYNE, 1994). A infecção das células do sistema imune, em especial macrófagos, é a base para a doença multissistêmica vista em todas as infecções lentivirais. As principais alterações patológicas causadas pelo CAEV encontram-se no sistema nervoso central (SNC), articulações, pulmões e glândula mamária (AL-ANI e VESTWEBER, 1984 ; HAASE, 1986).

O exame histológico de tecidos pulmonares e mamários de ovinos naturalmente infectados com MVV apresentaram infiltração difusa de células linfóides e macrófagos no interstício pulmonar, com acúmulo peribronquiolar e perivascular local. A glândula mamária mostrou pronunciada hiperplasia linfóide e infiltração de células mononucleares (CARROZZA et al., 2003).

Um estudo histopatológico em pulmões de ovinos sorologicamente positivos para MVV apresentou lesões sugestivas da infecção, como aderências entre os lobos pulmonares, entre as pleuras parietais e viscerais e entre a pleura visceral, diafragma e pericárdio, extensas áreas de hepatização dorsocaudais além de áreas de congestão, edema e atelectasia (ARAÚJO et al, 2004).

2.6 DIAGNÓSTICO

A infecção por CAEV, geralmente persistente e assintomática, pode causar afecção multissistêmica, com manifestações clínicas de pneumonia, artrite, mamite ou encefalite, de evolução geralmente crônica, com agravamento progressivo das lesões, perda de peso e debilidade até a morte (CUTLIP et al. 1988). No entanto, a confirmação do diagnóstico é realizada por testes laboratoriais (PINHEIRO, 2001) que podem envolver vários métodos, entre eles: isolamento do vírus por cultivo celular, Reação em Cadeia de Polimerase (PCR), imunodifusão em gel de agarose (IDGA), imunofluorescência indireta e ELISA. Alguns métodos como Western blot, eletroforese, imunohistoquímica, microscopia eletrônica são mais utilizados em laboratório para casos suspeitos, para pesquisa entre outros casos especiais (DANTAS, 2004).

- **Imunodifusão em Gel de Agarose (IDGA)**

A imunodifusão em gel de agarose (IDGA) é a forma de diagnóstico mais utilizado em todo mundo. É o teste recomendado pela OIE por ser de fácil aplicabilidade, não exigir equipamentos nem instalações sofisticadas é de alta especificidade, o que acaba credenciando-o para a realização dos diagnósticos de triagem (VAREA et al., 2001; MOOJEN et al, 1995; ALKAN e TAN, 1998).

De acordo com Tortora et al. (2000), os testes de imunodifusão consistem em reações de precipitação, realizados em gel de ágar em uma placa de Petri ou em uma lâmina de microscópio. Nestes desenvolve-se uma linha de precipitação visível entre os orifícios no ponto em que é alcançada a relação ótima entre antígeno e anticorpo.

Muitos fatores dirigem o diagnóstico sorológico de animais infectados com LVPR, incluindo uma variação no tempo relativo ao início da infecção, especificidade da proteína viral de anticorpos do soro e sua quantidade, efeitos da cepa viral e diferenças baseadas nos hospedeiros com relação à resposta imunológica para infecção (DeMARTINI et al., 1999).

- **Reação em Cadeia de Polimerase (PCR)**

As últimas décadas de aperfeiçoamento de técnicas de biologia molecular permitiram surgir formas de diagnóstico baseadas no estudo do sequenciamento e expressão de genes específicos. A Reação em Cadeia da Polimerase (*polymerase chain reaction* - PCR) é uma modalidade de diagnóstico na qual se obtém o enriquecimento de um fragmento específico de DNA por meio de sua duplicação em modo exponencial (SILVA-PEREIRA, 2003).

Esta técnica se mostra bastante sensível pois uma única molécula de DNA pode ser amplificada e ser detectada posteriormente na realização de eletroforese em gel de agarose. Para esta reação utiliza-se da enzima DNA polimerase termoestável, sendo realizada em um termociclador, que permite a repetição de ciclos de diferentes temperaturas, nas quais as três fases da PCR (desnaturação, anelamento e extensão/polimerização) ocorrem em cadeia (SILVA-PEREIRA, 2003).

As três etapas básicas da PCR são: a desnaturação térmica da fita dupla do DNA molde sob altas temperaturas (cerca de 95°C); o anelamento de oligonucleotídeos sintéticos (*primers*) (temperatura reduzida para cerca de 55°C), que são complementares à região que flanqueiam o fragmento a ser amplificado (região 5'), funcionando como iniciadores de reação de polimerização a cada uma das fitas de DNA molde; e a polimerização das novas fitas de DNA a partir de cada um dos iniciadores (temperatura elevada para 72°C), que utiliza cada um dos quatro dNTP (A, T, C e G) e íons de Mg^{2+} . A repetição das três fases da PCR permite o acúmulo exponencial dos fragmentos de DNA de interesse em aproximadamente 2^n , onde n é igual ao número de ciclos realizados, que geralmente varia de 30 a 35 (SILVA-PEREIRA, 2003).

A reação em cadeia de polimerase tem sido utilizada em alguns laboratórios de forma mais restrita, pois é ainda um teste caro, porém possui alta sensibilidade e especificidade, sendo indicado para animais de alto valor zootécnico e para aqueles que o resultado de outros testes não tenham sido conclusivos (RIET-CORREA, 2001). Vários trabalhos têm demonstrado com sucesso o uso da técnica de PCR na detecção do DNA proviral dos LVPR. A PCR permite a identificação por amplificação direta de parte do ácido nucléico viral específica de fluidos e tecidos de um animal infectado (ANDRIOLI, 2001).

A técnica de PCR foi utilizada para detectar o DNA proviral do vírus da artrite encefalite caprina em amostras biológicas de diversos tecidos. Esta técnica pode ser utilizada para detectar o vírus no leite, em pulmões, linfonodos mesentéricos, medula óssea, membrana sinovial, glândula mamária de animais soro-positivos clinicamente afetados mas não naqueles saudáveis e soronegativos (BARLOUGH et al., 1994).

Alguns sistemas, com iniciadores derivados das seqüências dos genes *gag* ou *pol*, foram desenvolvidos para detecção de DNA proviral ou RNA viral em leucócitos, células do leite, lavados brônquio-alveolares, líquidos sinoviais e células obtidas por tripsinização de monocamadas ou explantes (RIMSTAD et al., 1993; BARLOUGH et al., 1994; LEROUX et al., 1997; CASTRO et al., 1998).

Como alternativa para aumentar a quantidade do produto amplificado e permitir sua visualização pela coloração com brometo de etídio, tem-se usado a nested PCR (BARLOUGH et al., 1994; LEROUX et al., 1995), pois geralmente os produtos amplificados só são detectados após hibridização com sonda específica (RIMSTAD et al., 1993; BARLOUGH et al., 1994; LEROUX et al., 1997).

Também foi realizada a comparação entre a PCR e o ELISA. Resultados indeterminados para o teste de ELISA podem ser testados pela técnica de PCR, uma vez que resultados negativos para ELISA podem gerar resultados positivos para PCR provavelmente devido à demora na soroconversão (HOLLY et al., 1998).

A detecção de infecção por LVPR através de PCR é indicativa de uma infecção persistente e é dependente da quantidade amplificada da seqüência alvo e da especificidade do *primer*. Entretanto, esta técnica poderá ser utilizada em programas de erradicação, quando identificar os animais não diagnosticados por sorologia. Devido ao alto custo e aos resultados discordantes entre testes sorológicos e PCR, sugere-se que a PCR seja empregada para esclarecer resultados sorológicos indeterminados ou negativos (KNOWLES, 1997; RUTKOSKI et al., 2001).

Vários trabalhos têm demonstrado com sucesso o uso da técnica de PCR na detecção do DNA proviral dos LVPR, permitindo a identificação do vírus pela amplificação direta de parte do ácido nucléico viral específica de fluidos e tecidos de um animal infectado (RIMSTAD et al., 1993).

Devido à restrição da expressão gênica, ou durante a fase precoce da infecção, vários animais infectados por LVPR são soronegativos por períodos bastante variados. Nesses casos a PCR tem se apresentado como potencial alternativa na identificação de animais com sorologia negativa ou dúbia (RIMSTAD et al., 1993).

- **Isolamento Viral**

Outra técnica de diagnóstico para CAE consiste no isolamento e identificação do vírus por meio do cultivo de tecido, incluindo a explantação de tecidos articulares, pulmonares, do sistema nervoso e de glândula mamária; e o co-cultivo em células de membrana sinovial de cultivo primário caprino com células sangüíneas, colostro, leite, lavado brônquio-alveolar e líquido cefalorraquidiano (CORK e NARAYAN, 1980; CALLADO, 2001), sendo as culturas primárias de células de membrana sinovial as mais usadas para o isolamento e caracterização biológica do CAEV (CRAWFORD et al., 1980; SIGURDSSON et al., 1960).

Apesar do diagnóstico determinante do vírus da infecção ativa pelo LVPR ser alcançado quando do isolamento deste agente em cultivo celular, esta técnica é demorada, dispendiosa e requer a implantação e manutenção de cultivos celulares especiais (KNOWLES, 1997).

Geralmente os LVPR podem ser isolados de animais vivos pelo co-cultivo de células como leucócitos do sangue periférico, células somáticas de leite, com células de plexo coróide ovinas para MVV ou células de membrana sinovial caprina para o CAEV (PINHEIRO, 2001).

- **Reação de Imunofluorescência Indireta (IFI)**

São poucos os trabalhos empregando IFI no diagnóstico dos LVPR. No Brasil, Reischak (2000) desenvolveu uma IFI utilizando três vírus brasileiros de caprinos e um de ovino e comparou com o teste do IDGA usando antígeno do MVV. Neste trabalho verificou-se que em amostras de soro caprino e ovino a IFI detectou mais animais

soropositivos que o IDGA, sendo que foram observados resultados diferentes de acordo com as cepas virais e os tipos celulares empregados.

Em condições experimentais a IFI tem apresentando um potencial como teste alternativo e complementar para o diagnóstico dos LVPR. Esse ensaio consiste em tornar visível a reação antígeno-anticorpo por meio de uma anti-imunoglobulina marcada com fluorocromos. Estes são substâncias que têm a capacidade de absorver energia luminosa, tornando-se excitadas por um curto espaço de tempo (10^{-9} a 10^{-7} segundos), para em seguida emití-la em forma de fluorescência ao retornarem ao seu estado normal. Os fluorocromos mais comumente empregados são derivados da rodamina, que emitem fluorescência vermelha, e o isotiocianato de fluoresceína que emite fluorescência verde (MADRUGA et al., 2001).

A IFI é recomendada pela OIE, e tem sido utilizada no diagnóstico de infecção em ovinos e caprinos, utilizando-se como antígeno isolados brasileiros de lentivírus. Entretanto, na IFI a exposição à fonte de luz ultravioleta é desgastante, tornando o técnico mais susceptível a erros e, conseqüentemente na precisão do teste, assim a IDGA permanece como teste de escolha para o diagnóstico da CAE, devido à maior facilidade de execução e leitura e, por requerer infra-estrutura laboratorial mínima (REISCHAK, 2000).

- **ELISA (Enzyme Linked Immunosorbent Assay)**

A baixa sensibilidade da IDGA vem despertando o interesse pelo desenvolvimento dos ensaios imunoenzimáticos (ELISA), onde as reações antígeno-anticorpo são detectadas por meio da conjugação de um destes componentes com uma enzima, que posteriormente age sobre o substrato, produzindo uma coloração, que pode ser detectada visualmente ou mensurada por espectrofotometria. Estas técnicas imunoenzimáticas normalmente, utilizam uma superfície sólida para imobilização do antígeno ou anticorpo, permitindo que se realize a remoção por lavagem dos componentes que não reagiram (MADRUGA et al., 2001).

É um ensaio amplamente utilizado para a detecção e/ou quantificação de anticorpos em amostras de soro, com destaque em estudos soropidemiológicos. A especificidade dessa prova é garantida principalmente pela qualidade do antígeno adsorvido

à placa (MADRUGA et al., 2001). Permite a detecção de estirpes de um mesmo vírus que embora sejam sorologicamente relacionadas apresentam maior variação entre si. Neste utilizam-se duas IgGs, uma para reconhecer o antígeno e outra (anti-IgG) produzida em diferentes espécies de animal que reconhece a primeira IgG, com a qual se ligará (ALMEIDA e LIMA, 2001).

Motha e Ralston (1994) desenvolveram um ELISA para pesquisa de anticorpos no leite ou colostro, demonstrando poucas vantagens práticas em relação aos testes com soro, uma vez que se aplica apenas em animais em lactação. Vários métodos de ELISA indiretos usando vírus inteiro ou proteínas MVV recombinantes têm sido descritos (REYBURN et al., 1992; CAREY et al., 1993).

Vários ELISAs vêm sendo desenvolvidos para o diagnóstico dos LVPR, os quais utilizam antígenos do CAEV (CASTRO et al., 2001; DANTAS et al., 2008), ou proteína interna e/ou transmembranária recombinante do CAEV (RIMSTAD et al., 1994). O uso de proteínas recombinantes tem causado problemas de resultados falso positivos, o que tem resultado na substituição desse tipo de antígeno pelos do vírus completo (ZANONI et al., 1994).

- **Outras formas de diagnóstico**

O diagnóstico laboratorial de LVPR pode ser determinado pela detecção qualitativa de anticorpos contra as principais proteínas virais, como as técnicas de Western blot e imunoprecipitação (KNOWLES, 1997; ARAGÃO et al., 2008). Estes métodos juntamente com a eletroforese, imunohistoquímica, microscopia eletrônica e hibridização *in situ* (ZINK et al., 1994; BROWN, 1998) são utilizados geralmente em pesquisas e em alguns casos para identificação de animais suspeitos (KNOWLES, 1997) ou para auxiliar o diagnóstico de infecções por LVPR (PINHEIRO, 2001).

2.7 CONTROLE

Não existe tratamento nem vacina contra os LVPR com isso o controle das lentivirose é muito difícil, devendo-se evitar a entrada de animais infectados no plantel e fazer exames periódicos do rebanho, para que os animais doentes possam ser identificados e separados dos sadios ou mesmo eliminados do rebanho (CASTRO, 1998).

Na Suíça realizou-se a elaboração de um programa nacional de saneamento da CAE devido ao forte impacto causado pela forma mastítica da doença (FRANKE, 1998). No Brasil, as medidas de controle empregadas são de caráter individualizado e descontínuo nas diversas regiões e estados. Em vários países, os programas de controle da CAE, geralmente são realizados por adesão voluntária, através do bloqueio das vias de transmissão do vírus a partir de rebanhos infectados (OIE, 1996).

Um programa de controle da CAE deverá levar em consideração as rotas de transmissão da doença, como a transmissão materno-fetal, a transmissão horizontal e a intramamária (EAST et al., 1993). Outra importante medida é a restrição do trânsito dos animais que pode representar um risco de disseminação da doença. Evidência disso é o aparecimento desta enfermidade em países imediatamente após importação de animais vivos. Há vários exemplos na literatura para infecção pelo MVV; contudo é visto que o CAEV é o mais disseminado pelo movimento de caprinos leiteiros (DAWSON, 1989).

Contudo as medidas de controle mais empregadas são baseadas no diagnóstico sorológico periódico dos animais, com separação ou eliminação dos positivos, associado ao uso de certas práticas de manejo para prevenção da disseminação do CAEV, como controle da entrada e trânsito de animais para propriedades controladas, feiras e exposições, separação das crias imediatamente após o nascimento, evitando-se o contato com secreções e isolamento dos adultos, administração de colostro artificial e/ou termizado de mães não infectadas ou de fêmeas bovinas, aleitamento artificial com leite termizado de mães não infectadas, sucedâneos ou outros substitutos do leite, entre outras medidas, contribuem para redução da incidência do CAEV (OIE, 1996).

As práticas de manejo adotadas nos programas de controle podem dificultar futuras intervenções da doença, pois a separação e eliminação dos animais soropositivos podem contribuir para a seleção de animais que respondem a infecção com baixos títulos ou que

soroconvertem tardiamente, e ainda de amostras virais pouco indutoras de resposta humoral (CALLADO et al., 2001).

Franke (1998) sugeriu a formação de um rebanho de animais negativos separados dos positivos quando a prevalência for maior que 30% de forma a buscar o saneamento da propriedade através de um rigoroso manejo sanitário de ambos os grupos e da gradativa eliminação do grupo dos animais infectados

Nos plantéis suspeitos ou sabidamente positivos, devem-se separar os cabritos imediatamente após o nascimento, evitando ao máximo seu contato com as secreções da mãe; administrar colostro de cabras soronegativas por IDGA, tratado a 56⁰C por 60 min, ou mesmo de vaca; alimentar os cabritos com leite de vaca ou leite de cabras pasteurizado; testar os cabritos a cada seis meses e eliminar os positivos (CASTRO, 1998).

Uma preocupação crescente está relacionada ao emprego da inseminação artificial, que tornou possível o intercâmbio de material genético, mas aumentou as possibilidades da contaminação do sêmen por agentes patogênicos e a sua disseminação (ANDRIOLI et al., 2006).

Os microrganismos patogênicos veiculados por meio da inseminação artificial ou de outras biotécnicas, não precisam atravessar as barreiras imunológicas da mucosa vaginal ou cervical das fêmeas receptoras, mas são introduzidos diretamente no útero das mesmas (CONCHA-BERMEJILLO et al., 1997).

Medidas de controle sanitário para impedir a disseminação de agentes patógenos via sêmen, vem sendo desenvolvidas por meio da submissão deste a tratamentos de lavagem, para diminuir o risco de contaminação das fêmeas que o recebessem (ANDRIOLI et al., 2006).

Na tentativa de criar novos métodos de controle e evitar perdas de animais de alto valor genético soropositivos para o CAEV, cogita-se o uso de métodos físicos para separar os espermatozóides do fluido seminal, visando a eliminação dos patógenos. Entretanto, existe pouco conhecimento sobre o risco da transmissão de agentes patogênicos pelo sêmen, podendo este ser uma fonte de entrada de agentes infecciosos, fazendo-se necessário um levantamento dos riscos de transmissão de patógenos e a definição de estratégias para atuação conjunta e homogênea de criadores e técnicos envolvidos (ANDRIOLI et al., 2003).

Os métodos de desinfecção para controle de microrganismos em sêmen e embriões humanos e de animais de produção já foram revisados. Em sua maioria esses procedimentos incluem metodologias aceitas internacionalmente e envolvem a utilização de enzimas, antibióticos, anticorpos, ozônio, fotoinativação, acidificação e até uso de compostos antivirais (BIELANSKI et al., 1992).

No entanto nenhuma dessas técnicas disponíveis podem ser recomendadas universalmente para desinfecção do sêmen com vistas a tornar este fluido livre de microrganismos potencialmente patogênicos. Em humanos, lavagens por gradientes de centrifugação parecem ser efetivos em diminuir a carga microbiológica no sêmen (BIELANSKI et al., 1992).

O método de lavagem de sêmen foi pesquisado por Andrioli et al. (2006), sendo observado 53,6% de resultados positivos para CAEV no sêmen não lavado e apenas 17,9% de amostras positivas para aqueles submetidos ao procedimento de lavagem. Os resultados deste trabalho demonstram o risco da infecção por monta natural e conduz à observação de que a utilização de uma técnica de lavagem diminui a carga viral, porém não elimina o CAEV no sêmen.

2.8 DESINFECÇÃO DO SÊMEN

Dependendo do grau de diluição do sêmen, esse procedimento diminui a concentração de contaminantes; em um determinado nível ele pode minimizar o risco de transmissão de doenças. Os procedimentos de lavagem descritos abaixo são primariamente aplicados a preparação do sêmen para a FIV (NICHOLSON et al., 2000; HANABUSA et al., 2000).

Através dos anos, várias técnicas de lavagem têm sido desenvolvidas para sêmen humanos e animais, sendo a mais importante forma de controle da disseminação de microrganismos. O principal propósito da técnica é separar a fração espermática com alta motilidade do plasma seminal para então permitir a fertilização. Procedimentos como a centrifugação, *swim-up*, gradientes Percoll contínuos e descontínuos, gradientes com albumina, sendo utilizados para obter o preparado purificado de espermatozóides para FIV

e outras Técnicas de Reprodução Assistida (TRA) (NICHOLSON et al., 2000; HANABUSA et al., 2000).

A técnica de *swim up* envolve a sobreposição de um pequeno volume de amostra de sêmen com um volume maior de um meio de cultura apropriado e em seguida incubado durante 1 hora. Subsequentemente, espermatozóides móveis, que migram ativamente no meio “sobreposto” (*overlying*), são aspirados e então lavados por centrifugação (NICHOLSON et al., 2000; HANABUSA et al., 2000).

A centrifugação em gradiente de Percoll envolve a transferência de uma aliquota de sêmen para duas colunas de gradiente Percoll, seguido de breve centrifugação (10 minutos). Espermatozóides são coletados dos fundos do tubo antes da lavagem por centrifugação. Contudo, procedimentos de centrifugação e lavagem, as concentrações de soluções separadas e os métodos de coleta de espermatozóides móveis variam entre pesquisadores. Além disso, sabe-se que a taxa de eliminação dos microrganismos variam. Contudo, quando usado com antibióticos, essa técnica reduz significativamente ou remove a carga bacteriana e viral em humanos (NICHOLSON et al., 2000; HANABUSA et al., 2000).

Para aprimorar a técnica e controlar a contaminação microbiana durante o processamento do sêmen, o uso de um gradiente de tubo duplo e modificações foi descrito e envolve a inserção de um dispositivo dentro de um tubo padrão para prevenir a contaminação do espermatozóide durante a aspiração através do Percoll (LOSKUTOFF et al., 2005; POLITCH et al., 2004).

A técnica de *swim-up* baseada em meio contendo ácido hialurônico foi ainda mais efetivo em remover bactérias (KARLSTROM et al., 1991). Em 1992 foi descrito um caso bem sucedido de lavagem de sêmen que resultou no nascimento de uma criança saudável fruto de um pai HIV positivo e uma mãe soronegativa (SEMPRINI et al., 1992).

Na prática clínica é estabelecido que, em humanos, a combinação dos métodos de lavagem e gradiente de densidade são procedimentos efetivamente sanitários para eliminação de patógenos e manutenção de uma gestação viável (KATO et al., 2006; GARRIDO et al., 2004).

Estudos com suínos mostraram que procedimentos de lavagem usando três colunas de gradientes de densidade com Percoll, com ou sem tripsina, foram eficientes em eliminar a carga viral (MORFELD et al., 2005).

Já estudo com bovinos mostraram resultados insatisfatórios em remover o BVDV e BIV, enquanto os experimentos com equinos infectados com o vírus da artrite equina (equine arteritis vírus-EAV) mostraram resultados favoráveis. Porém, como o vírus foi adicionado ao sêmen permanece a dúvida, se o vírus seria eliminado naturalmente através do sêmen de garanhões naturalmente infectados (MORRELL et al., 2006; AFSHAR e EAGLESOME, 1990).

A acidificação é um método particularmente efetivo em eliminar determinados vírus do sêmen. É estabelecido que, com exceção do adenovírus e enterovírus a maioria dos vírus são inativados a um pH entre 5 e 6 (FENNER et al., 1987). O vírus da língua azul dos bovinos (*Bluetongue virus* - BTV) e o vírus da rubéola são inativados em 1 minuto em pH abaixo de 6.0; O vírus da encefalomielite do leste e oeste e *Semliki Forest viruses* seguem o exemplo do BTV em sua sensibilidade a pH baixo assim como outros arbovírus (ANDREWES, 1964). A utilização da acidificação transitória do sêmen foi empregada para destruir os vírus pH-lábeis. De acordo com os resultados dos experimentos esta técnica pode ajudar na inseminação de embriões fecundados com sêmen tratados com ácidos (BIELANSKI et al., 1991).

A utilização do ozônio também foi testada em um trabalho para desinfetar sêmen de touros, causando uma considerável redução no número de microrganismos vivos com o mínimo de efeito sobre a motilidade de espermatozoides (GRADIL et al., 1995). É preciso saber também que na prática os resultados obtidos para um microrganismo não pode ser extrapolado para outro sem uma pesquisa que comprove (BRINKHOF, 2007).

3 JUSTIFICATIVA

Muitos reprodutores de alto valor zootécnico podem eventualmente reagir como soropositivos no teste de IDGA para a artrite encefalite caprina, cujo destino final é a eliminação do animal do rebanho. Com a finalidade de minimizar os prejuízos decorrentes dessa condição de controle exigida do reprodutor com status positivo, o uso de biotécnicas reprodutivas surge como uma alternativa para o resgate e utilização do material genético desses animais, entretanto, a transmissão de patógenos pelo sêmen é bastante relevante, uma vez que na inseminação artificial (IA) várias fêmeas são inseminadas com um único

ejaculado, podendo causar grande prejuízo econômico, principalmente quanto à possibilidade de introdução de novas cepas de microrganismos mais virulentas em um rebanho inteiro (ANDRIOLI et al., 2003).

Por isso é necessário um controle de qualidade na produção de sêmen que abrangesse não só características relacionadas com a viabilidade físico-química, mas também o controle sistemático de agentes infecciosos, sobretudo de vírus como o da artrite encefalite caprina.

Uma medida sanitária ideal para impedir a disseminação via sêmen, seria submeter o sêmen a um protocolo experimental onde o mesmo não oferecesse perigos de contaminação as fêmeas que o recebessem.

O uso de tripsina em meios de lavagem dos embriões tem demonstrado ser eficiente na remoção de vírus envelopados que não são removidos pela lavagem sem a enzima (STRINGFELLOW, 1998), como no caso de ANDRIOLI (2001) que não detectou o vírus da artrite encefalite caprina (CAEV) pelas técnicas de isolamento viral e pela Reação em Cadeia da Polimerase Nested (PCRn), em amostras de embrião lavado, embrião não lavado e na solução do último lavado dos embriões.

Baseado nas regras adotadas pelo IETS (STRINGFELLOW, 1998) para controle de embriões de fêmeas positivas, que obteve excelentes resultados na eliminação do vírus neste tipo de procedimento, será proposta uma medida similar para aplicação em sêmen de reprodutores soropositivos para CAE, testando dois diferentes protocolos de lavagem, com finalidade de obter ejaculados livres do CAEV e viáveis para inseminação artificial.

4 HIPOTESE CIENTIFICA

A tripsina na solução de lavagem de sêmen infectado com CAEV diminui a detecção do DNA proviral deste vírus quando utilizada a Nested-PCR como técnica diagnóstica.

5 OBJETIVOS

5.1 OBJETIVO GERAL

Testar a tripsina na solução de lavagem de sêmen infectado com CAEV.

5.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Avaliar a viabilidade do sêmen de animais soropositivos para o IDGA.

Utilizar a técnica de Nested-PCR para detectar o DNA-proviral do CAEV em sêmen de animais soropositivos para o IDGA após lavagem com solução de Krebs-Ringer-Fosfato e solução com tripsina a 0,025%.

Detecção do vírus da artrite encefalite caprina em sêmen de animais tratado com solução de tripsina.

Detection of viral genomes of caprine arthritis-encephalitis virus (CAEV) in semen of goats washed with trypsin solution.

Richard Elaino de Oliveira Ferraz; Maria Fátima da Silva Teixeira; Alice Andrioli; Raymundo Rinaldo Pinheiro; Valeska Shelda Pessoa de Melo; Kelma Costa de Souza; Ana Patrícia Souza de Lima; Diana Magalhães de Oliveira.

Revista Brasileira de Reprodução Animal (2008)

RESUMO – O controle da disseminação da Artrite Encefalite Caprina (CAE) pelo sêmen precisa ser melhor esclarecido. Procedimentos de lavagem do sêmen têm sido testados visando minimizar o risco desta forma de transmissão. O objetivo deste trabalho foi avaliar a influência dos procedimentos de lavagem com tripsina na detecção do CAEV usando Nested-PCR como técnica de diagnóstico. Onze coletas de sêmen de sete reprodutores soropositivos foram realizadas. As coletas foram fracionadas em três alíquotas: na primeira (T1) o ejaculado foi lavado com solução Krebs-Ringer-Fosfato; a segunda (T2) foi lavada com solução de tripsina a 0,025%; e o grupo controle no qual as amostras de sêmen não foram submetidas aos procedimentos de lavagem. Os resultados mostraram que o DNA proviral foi detectado em 3 (27%) das 11 amostras que não foram submetidas a nenhum procedimento de lavagem. No grupo T1 foram detectadas 5 (45,45%) amostras positivas e no grupo T2 apenas 2 (18%) resultados foram positivos. A análise estatística mostrou que houve influência dos diferentes tratamentos do sêmen na detecção do DNA-proviral através da PCR.

Palavras chave: transmissão, sêmen, tripsina, CAEV.

ABSTRACT - The control of the caprine arthritis-encephalitis virus (CAEV) through the semen needs to be more investigated. Washing procedures of the semen have been tested to minimized risk of this transmittion way. The aim of this study was to evaluate the influence

of the washing procedures with trypsin in the detection of CAEV proviral-DNA using Nested-PCR how diagnostic technique. Eleven semen collections of seven soropositive reproducers were accomplished. The collections were fractioned in three aliquots: in the first one (T1) the ejaculate was washed with Krebs-Ringer-Fosfato solution; the second (T2) one was washed with 0,025% trypsin solution; and the control group (C) which the semen samples were not submitted to washing procedures. The results showed that the proviral-DNA was detected in 3 (27%) of the 11 samples which was not submitted to washing procedure (control group). In the group T1 was detected 5 (45,45%) positive samples and in the group T2 only 2 (18%) results was positive. The statistic analyze showed that was influence of the different treatments of semen in the detection of proviral-DNA through PCR technique

Keywords: transimition, semen, trypsin, CAEV.

Introdução

O Vírus da Artrite Encefalite Caprina, classificado como Lentivírus de Pequenos Ruminantes (LVPRs) (LEROUX et al., 1997), foi isolado de caprinos em 1980, embora a artrite-encefalite caprina (CAE) tenha sido descrita pela primeira vez na década de setenta nos EUA (CORK et al, 1974). Este vírus infecta caprinos em várias fases do desenvolvimento, não havendo predileção por faixa etária, sexo, raça ou produção (KLEVJER-ANDERSON et al., 1990; LARA et al., 2005). O aparecimento de doença clínica pode ocorrer meses ou anos após a infecção, sendo que as formas de apresentação mais freqüentes incluem: artrite, encefalite, mamite e pneumonia (FRANKE, 1998).

Embora a principal forma de transmissão da CAE seja a ingestão de leite ou colostro de fêmeas infectadas com o vírus (CALLADO et al, 2001), alguns autores apontam para a possibilidade da transmissão sexual através do sêmen (ALI AL AHMAD et al., 2008). Este alarme crescente está relacionado às implicações epizootiológicas da presença de microrganismos no sêmen, implicações estas que não só estão relacionadas à infecção exclusiva da fêmea receptora ou do coletivo da exploração pecuária, como também na possível introdução de doenças exóticas no país importador (SILVA et al, 2005).

Em pequenos ruminantes, vários patógenos foram detectados no sêmen, com transmissão potencial ou comprovada (HARE, 1985; THIBIER e GUÉRIN, 2000), incluindo os lentivírus que infectam caprinos e ovinos (CONCHA-BERMEJILLO et al., 1995; ANDRIOLI et al., 1999; TRAVASSOS et al., 1999; PREZIUSO et al., 2003). Outros lentivírus responsáveis por infecções em bovinos, felinos, primatas e humanos, foram igualmente detectados no sêmen (MERMIN et al., 1991; JORDAN et al., 1995; NASH et al., 1995).

Outros autores destacam a possibilidade do vírus estar presente no sêmen na forma livre e não nos espermatozóides (NASH et al., 1995; TRAVASSOS et al., 1999). Travassos et al. (1998) e Andrioli et al. (1999) verificaram o CAEV no sêmen de caprinos infectados naturalmente e experimentalmente. Os mesmos resultados foram observados por Ali Al Ahmad et al. (2008) e de acordo com Andrioli et al. (2001) a utilização de reprodutores caprinos pode ter um papel relevante na contaminação e disseminação do LVPR para rebanhos nativos e SRD explorados no Nordeste do Brasil.

Em reprodutores caprinos e ovinos a eliminação do DNA proviral apresenta caráter intermitente (ANDRIOLI et al., 2006). O sêmen também pode infectar-se por patógenos procedentes dos testículos, epidídimo, glândulas anexas, da uretra ou do prepúcio, ou os patógenos podem ganhar acesso ao sistema reprodutor, pelo sangue e líquidos tissulares extravasados para este sistema, nas bacteremias ou viremias, ou no caso de qualquer inflamação ou infecção nestes órgãos (HARE, 1985; THIBIER e GUÉRIN, 2000).

Na tentativa de criar novos métodos de controle e evitar perdas de animais de alto valor genético soropositivos para o CAEV, cogita-se o uso de métodos físicos para separar os espermatozóides do fluido seminal, visando a eliminação dos patógenos. Entretanto, existe pouco conhecimento sobre o risco da transmissão de agentes patogênicos pelo sêmen fazendo-se necessário um levantamento dos riscos de transmissão de patógenos (ANDRIOLI et al., 2003).

Os métodos de desinfecção para controle de microrganismos em sêmen e embriões humanos e de animais de produção já foram revisados (BIELANSKI et al., 1992). O método de lavagem de sêmen foi pesquisado por Andrioli et al. (2006). O principal propósito da técnica é separar a fração espermática com alta motilidade do plasma seminal para então permitir a fertilização. Procedimentos como a centrifugação, “swim-up”,

gradientes Percoll contínuos e descontínuos, gradientes com albumina, etc., são utilizados para obter o preparado purificado de espermatozóides tanto para Fertilização *in Vitro* (FIV) como para outras Técnicas de Reprodução Assistida (TRA) (JORDAN et al., 1995; GARRIDO et al., 2004; FENNER et al., 1987; BIELANSKI et al., 1991).

O uso de biotécnicas reprodutivas surge como uma alternativa para o resgate e utilização do material genético desses animais (ANDRIOLI et al., 2003). Entretanto, como a transmissão de patógenos pelo sêmen é relevante, faz-se necessário um controle da qualidade sanitária na produção de sêmen. Uma medida razoável seria submeter o sêmen a um protocolo experimental onde o mesmo oferecesse perigos mínimos de contaminação às fêmeas que o recebessem.

O uso de tripsina em meios de lavagem dos embriões tem demonstrado ser eficiente na remoção de vírus envelopados que não são removidos pela lavagem sem a enzima (STRINGFELLOW, 1998; ANDRIOLI, 2001). Baseado nas regras adotadas pelo IETS (STRINGFELLOW, 1998), será proposta uma medida similar para aplicação em sêmen de reprodutores soropositivos para CAE, testando dois diferentes protocolos de lavagem, com finalidade de obter espermatozóides livres do CAEV.

Material e Métodos

Animais

Foram utilizados 7 machos caprinos das raças Canindé, Moxotó, Anglo-Nubiana e Sâanen todos criados sob sistema semi-intensivo, mantidos na Empresa Brasileira de Pesquisas Agropecuárias do Centro Nacional de Pesquisas com Caprinos Embrapa-CNPC. Esses animais fazem parte de um grupo de soropositivos para IDGA e portadores dos sintomas de emaciação e artrite crônica. Foi realizada a Nested-PCR para detectar o genoma do CAEV no sêmen desses animais.

Coletas de sêmen

Onze coletas foram realizadas no Laboratório de Tecnologia de Sêmen – LTS utilizando-se da técnica de vagina artificial e uma fêmea caprina como manequim. As amostras foram levadas ao laboratório para análise dos principais parâmetros, a saber: volume e quantidade total de espermatozóides por ejaculado, concentração de espermatozóides por mililitro de sêmen, vigor e motilidade dos espermatozóides de acordo com as metodologias propostas por Coelho et al. (2006) e Colégio Brasileiro de Reprodução Animal - CBRA (1998).

Lavagens

As lavagens foram realizadas em dois tratamentos, a saber: um com solução de Krebs-Ringer-Fosfato (T1) e o outro (T2) preparado com 9 ml de solução Krebs-Ringer-Fosfato adicionada de 1ml de solução de tripsina 0,25% (GIBCO - EDTA). Foi utilizado como grupo controle (C) uma alíquota de sêmen a qual não foi submetida a nenhum dos tratamentos de lavagem.

Para cada tratamento foi utilizada uma alíquota de 0,3 mL de sêmen, adicionando-se 2,7 mL das soluções Krebs-Ringer-Fosfato (T1) e Krebs-Ringer-Fosfato adicionado a tripsina (T2). Em seguida a suspensão foi centrifugada a 4000g por 10 min duas vezes, após este procedimento os sobrenadantes eram descartados.

Esses pelets foram visualizados em microscopia ótica para avaliação do vigor e motilidade e em seguida encaminhados para o laboratório de Biologia Molecular para extração do DNA.

Filtração do sêmen

Após as lavagens, cada amostra foi submetida a passagem nas colunas de Sephacryl e retirada das impurezas. Primeiramente realizou-se lavagem das colunas com 200 µl de

solução tampão acetato de sódio 3M, pH 6,0 e centrifugou-se a 1600g por 4 minutos, sendo este procedimento realizado duas vezes.

Em seguida transferiu-se 100 µl do sêmen nas seringas a ser analisado e centrifugou-se a 1600 g por 4 minutos. As amostras foram armazenadas a 4° C para uso subsequente.

Extração do DNA

Para extração do DNA utilizou-se 200µl de solução Chelex 100 a 5% a qual foi depositada em cada eppendorf, nos quais foram colocadas as amostras. Em seguida adicionou-se 7 µl de dithiothreitol DTT (1M) em cada eppendorff. Neste frasco, adicionou-se 2µl de proteinase K (10µg/µl) misturando gentilmente e finalmente as amostras de sêmen na quantidade de 3µl (SANTURDE et al., 1996; WALSH et al., 1991).

A seguir procedeu-se a incubação a 56° C (banho-maria) por 60 minutos, seguido de agitação mecânica por 5-10 segundos e centrifugação por 10 segundos a 15000g. Os tubos foram colocados em água a 100 °C por 8 minutos para desnaturação da proteinase K e depois agitado no vortex por 10 segundos. As amostras foram centrifugadas por 3 minutos a 15000 g e armazenadas a 4° C para serem utilizados na reação de PCR.

Reação de PCR

Foram utilizados dois pares de iniciadores derivados a partir das seqüências das regiões *gag* da amostra padrão CAEV- Cork (SALTARELLI et al., 1990), sendo os iniciadores externos P1 (5' CAAGCAGCAGGAGGGAGAAGCTG-3', nucleotídeos 953 a 975) e P2 (5'TCCTACCCCCATAATTTGATCCAC-3' nucleotídeos 1249 a 1226) descritos por Barlough et al. (1994) resultando na amplificação de um fragmento de DNA de 297 pb. Os iniciadores internos P3 (5' GTTCCAGCAACTGCAAACAGTAGCAATG-3' nucleotídeos 997-1024) e P4 (5'ACCTTTCTGCTTCTTCATTTAATTTCCC3'-nucleotídeos 1181 a 1154) foram utilizados na segunda amplificação, resultando em um

χ Nas reações de amplificação foi realizada em termociclador (Programmable Thermal

Controller, PTC-100, MJ Research, Inc.), constituindo de um ciclo inicial para desnaturação das fitas de DNA, de 94°C por 5 minutos; seguidos 35 ciclos: 94°C - 1 minuto, 56°C - 1 minuto, 72°C - 45 segundos; com extensão final a 72°C por 7 minutos. As amostras amplificadas e os controles positivo e negativo, juntamente com o marcador molecular, foram submetidos à eletroforese em gel de agarose 1% em TBE (Tris, borato e EDTA 0,1X), coradas com brometo de etídio e visualizadas em transluminador de luz ultravioleta.

Análise Estatística

Na análise estatística utilizou-se o teste χ^2 - Quadrado para comparar as dispersões nos diferentes tratamentos.

Resultados e Discussão

A concentração média dos espermatozóides foi de 4,2 milhões de espermatozóides por mililitro; o vigor de 4 e a motilidade de 90%. Os parâmetros quantitativos e qualitativos observados no sêmen dos animais estiveram dentro dos padrões sugeridos para utilização na inseminação artificial descritos por NUNES (2002), HAFEZ e HAFEZ (2004) e CBRA (1998).

No grupo controle, composto por alíquotas de sêmen integral não submetido a lavagens, observou-se três resultados positivos: 1, 2 e 4 (27%) (Figura 1). No grupo T1 foram detectados 5 resultados positivos: 4, 6, 9, 10 e 11 (45%) (Figura 2), enquanto o grupo T2 apresentou resultados positivos em duas amostras: 5 e 7 (18%) (Figura 3). Apenas nas amostras 3 e 8 de todos os tratamentos não foi detectado qualquer DNA proviral. Utilizou-se o teste Qui-Quadrado para comparar a dispersão nos diferentes tratamentos. Como o valor de χ^2 obtido foi maior que o χ^2_{tab} conclui-se que os desvios são significativos. Portanto, os ejaculados submetidos aos 2 tratamentos (T1 e T2) reagem diferentemente ao teste. Portanto, a detecção do DNA-proviral do CAEV é influenciada pelas técnicas de tratamento de sêmen empregadas neste trabalho.

O DNA-proviral foi encontrado em 9 amostras: 1, 2, 4, 5, 6, 7, 9, 10 e 11, concluindo que 72% das amostras continham o DNA-proviral do CAEV. Esses resultados estão de acordo com outros trabalhos que encontraram o DNA proviral do HIV em 60 a 80% das amostras provenientes de homens não tratados (LERUEZ-VILLE et al., 2006). Pode-se dizer que a PCR do grupo controle deixou de detectar 6 amostras certamente infectadas: 5, 6, 7, 9, 10 e 11.

No que concerne às técnicas de lavagem podemos concluir que em alguns casos o procedimento de lavagem com tripsina pode diminuir a detecção do genoma viral. Teoricamente, há diferença entre o percentual de detecção do genoma no sêmen nos diferentes tratamentos, embora não se possa afirmar a superioridade do tratamento com tripsina em relação ao outro.

Em relação aos achados positivos predominantes no grupo tratado com solução de Krebs-Ringer-Fosfato, pode-se supor que esta solução aumente a detecção do DNA-proviral do CAEV no sêmen quando utilizada a Nested-PCR como técnica diagnóstica. Este resultado sugere a utilização desta solução no protocolo de Nested-PCR atualmente adotado para a investigação da presença do vírus nos ejaculados.

É possível que o vírus não tenha sido detectado em algumas amostras por ter sido efetivamente eliminado da amostra de sêmen. É conhecido que os vírus possuem suscetibilidade a inúmeros fatores do meio ambiente que influenciam na sua viabilidade como a faixa de pH, umidade, etc. (FENNER et al., 1987; BIELANSKI et al., 1991). Alguns fatores, que interferem na viabilidade dos vírus (ex.:pH), podem influenciar muito entre as amostras submetidas ou não a processos de lavagem. Há a hipótese de que o vírus possa ter sido inativado em amostras onde o mesmo foi encontrado.

Com relação aos resultados negativos podemos pensar que existem fatores que tornam o teste menos sensível, resultando em falsos negativos. A primeira hipótese se refere a um fenômeno anteriormente descrito por ANDRIOLI et al. (2006) os quais afirmam a natureza intermitente da eliminação do vírus pelo sêmen de animais natural e artificialmente infectados.

Outra hipótese é que apenas uma pequena quantidade de células como macrófagos possam estar presentes no sêmen desses animais. Portanto, há uma diminuição da sensibilidade da técnica secundária à baixa quantidade de DNA proviral integrado

disponível à detecção (PAULA, 2008). Outra hipótese é que pode haver falha dos “primers” em detectar as variantes virais ou “*quasispecies*” (LEUROUX et al., 1997).

Andrioli et al. (2006) sugeriram que a presença de DNA proviral em sêmen de caprinos não é constante ou pode estar em quantidades mínimas indetectáveis. Peterson et al. (2008) trabalhando com gradientes de Percoll encontraram o DNA proviral em 55% das amostras em frações do sêmen que consistiam de *debris* citoplasmáticos e de macrófagos.

A importância da presença de células infectadas para que haja detecção do DNA proviral foi sugerida por Andrioli et al. (2006) ao afirmar que a presença do vírus no sêmen está relacionada a danos testiculares provavelmente porque a quantidade dessas células aumente durante a infiltração de macrófagos secundária à inflamação.

Podemos propor que algumas discrepâncias podem refletir a variação amostral, falha ou baixa sensibilidade da técnica de PCR quando utilizada para detectar o CAEV no sêmen. Há a possibilidade desse material genômico não estar sob uma forma detectável pela PCR, como não haver macrófagos ativados ou não haver material genético do vírus integrado ao genoma do hospedeiro naquela porção da alíquota.

BIBLIOGRAFIA CONSULTADA

ALI AL AHMAD, M.Z. FIENI, F. PELLERIN, J.L. GUIGUEN, F. CHEREL, Y. CHATAGNON, G. BOUZAR, A.B. CHEBLOUNE, Y. Detection of viral genomes of caprine arthritis-encephalitis virus (CAEV) in semen and in genital tract tissues of male goat Theriogenology 69 (2008) 473–480.

ANDRIOLI, A. Vírus da Artrite Encefalite Caprina: PCR e isolamento viral em amostras de sêmen, fluido uterino e embriões. Belo Horizonte: UFMG, 2001. Tese (Doutorado em Ciências Veterinárias)- Escola de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais, 2001. 68p.

ANDRIOLI, A.; GOUVEIA, A. M. G.; PINHEIRO, R. R.; ROCHA, M. A.; MARTINS, A.; SANTOS, D. O. Detecção do DNA pro-viral do lentivírus caprino em sêmen de bodes naturalmente infectados. Revista Brasileira de Reprodução Animal, V. 32, p. 101-106, 1999.

ANDRIOLI, A.; GOUVEIA, A.M.G.; PINHEIRO, R.R. Seleção de sêmen de reprodutores portadores do vírus da artrite encefalite caprina através da técnica de reação em cadeia da polimerase. Sobral, Comunicado Técnico. EMBRAPA-CNPC, n.50, 2003. 23 p.

ANDRIOLI, A., GOUVEIA, A.M.G., MARTINS, A.S., PINHEIRO, R.R, SANTOS, D.O.. Fatores de risco na transmissão do lentivírus caprino pelo sêmen. Pesq. agropec. bras., v.41, n.8, p.1313-1319, 2006.

BARLOUGH, J.; EAST, N.; ROWE, J.D.; HOOSEAR, K.V.;DEROCK, E.; BIGORNIA, L.; RIMSTAD, E. Double-nested polymerase chain reaction for detection of caprine arthritis encephalitis chain reaction for detection of caprine arthritis encephalitis virus proviral DNA in blood, milk, and tissues of infected goats. Journal of Virological Methods, v.50, p.101-113, 1994.

BIELANSKI A, EASTMAN P, HARE WCD. Transitory acidification of semen as a potential method for the inactivation of some pathogenic microorganisms. Effect on fertilization and development of ova in superovulated heifers. Theriogenology 1991;36:33–40.

BIELANSKI, A.; DUBUC, C.; HARE, W.C.D. Failure to remove bovine diarrhea virus (BVDV) from bull semen by swim-up and other separatory sperm techniques associated with in vitro fertilization. Reproduction in Domestic Animals, v.27, p.303-306, 1992.

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

CBRA. Manual para exame andrológico e avaliação de sêmen animal. Colégio Brasileiro de Reprodução Animal, 2º Edição, Belo Horizontes: CBRA, 49 p., 1998.

COELHO, L.A.;SASA,A.;NADER,C.E.; CELEGUINI, E.C.C. Característica do ejaculado de caprinos sob estresse calórico em câmaras bioclimática. Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia, v58, n.4, p. 544-549, 2006.

CONCHA – BERMEJILLO, A., BRODIE, S. J., MAGNUS – CORRAL, S., BOWEN, R. A., DOMARTINI, J. C., Pathologic and serological responses of isogeneic twin lambs to phenotypically distinct lentiviruses. Journal Acquired immune deficient syndrome Human Retrovirol. v. 8, p. 116-123, 1995.

CORK, L.C.; HADLOW, W.J.; CRAWFORD, T.B. et al., Infectious leucoencephalomyelitis of young goats. J. Infect. Dis., v. 129, n. 2, p. 134-141, 1974.

FRANKE, C. R. Controle sanitário da artrite-encefalite caprina. Salvador: EDUFBA, 1998. 70p.

FENNER F, BACHMANN PA, GIBS EPJ, MURPHY FA, STRUDDERT MJ, WHITE DO. Veterinary virology: structure and composition of viruses. New York: Academic Press; 1987. p. 3–19.

GARRIDO N, MESEGUER M, BELLVER J, REMOHI J, SIMON C, PELLICER A. Report of the results of a 2 year programme of spermwash and ICSI treatment for human immunodeficiency virus and hepatitis C virus serodiscordant couples. Hum Reprod 2004;19:2581–6.

HARE, W.C.D. Enfermedades transmissibles por el semen y las tecnicas de transferencia de embriones. France: Office International des Epizooties, 1985. 83p.

JORDAN, H.L.; HOWARD, J.; TOMPKINS, W.A.; KENNEDYSTOSKOPF, S. Detection of feline immunodeficiency virus in semen from seropositive domestic cats (*Felis catus*). Journal of Virology, v.69, p.7328-7333, 1995

KLEVJER-ANDERSON, P.; ADAMS, D.S.; ANDERSON, L.W.; BANKS, K.L.; MCGUIRE, T.C. A sequential Study of virus expression in retrovirus-induced arthritis of goats. *Journal of General Virology*, v.64, p.2396-2398, 1990.

LARA, M.C.C.S.H.; BIRGEL-JUNIOR, E.H.; GREGORY, L.; BIRGEL, E.H.. Aspectos clínicos da artrite encefalite dos caprinos. *Arquivo Brasileiro de Medicina veterinária e zootecnia*, v. 57, n.6, p. 736-740, 2005.

LEROUX, C. CHASTANG, J., GREENLAND, T., MORNEX, J.F. Genomic heterogeneity of small ruminant lentiviruses: existence of heterogeneous populations in sheep and of the same lentiviral genotypes in sheep and goats. *Arch. Virol.*, (142), 1125-1137, 1997.

LERUEX-VILLE, M.; DULIOUST, E.; GALIMAND, J.; GUIBERT, J.; JOUANET, P.; ROUZIOUX, C. Virus et sperm: implications pour l'assistance médicale à la procréation (AMP). *Immuno-analyse & Biologie spécialisée*, v.21, p.181-188, 2006.

LOSKUTOFF, N.M.; HUYSER, C.; SINGH, R.; WALKER D.L.; THORNHILL, A.R.; MORRIS, L.; WEBBER, L. Use of a novel washing method combining multiple density gradients and trypsin for removing human immunodeficiency virus-1 and hepatitis C virus from semen. *Fertility and Sterility*, v.84, n.4, 2005.

MERMIN, J.H., HOLODNIY, M., KATZENSTEIN, D.A., MERIGAN, T.C. Detection of human immunodeficiency virus DNA and RNA in semen by the polymerase chain reaction. *Journal Infectious Diseases*, v.164, n.4, p.769-72, 1991.

NASH, J.W.; HANSON, L.A.; COATS, K.C. Bovine immunodeficiency virus in stud bull semen. *American Journal of Veterinary Research*, v.56, p.760-763, 1995.

PAULA, N.R.O. Parâmetros Clínicos, Hematológicos, Sorológicos e Reprodutivos em Reprodutores Natural e Artificialmente Infectados com CAEV. Tese de Doutorado. Fortaleza, Ceará. 2008.

PETERSON, K.;BRINKHOF J.;HOUWERS, D.; COLENBRANDEN, B.; GADELA, B. Presence of pro-lentiviral DNA in male sexual organs and ejaculates of small ruminants. *Theriogenology*, (69), pag. 433-442, 2008.

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

RIMSTAD, E., EAST, N. E., TORTEN, M., HIGGINS, J., DEROCK, E., PEDERSEN, N. C. Delayed seroconversion following naturally acquired caprine arthritis-encephalitis virus infection in goats. *American Journal of Veterinary Research*, v.54, p.1858-1862, 1993.

SALTARELLI, M.; QUERAT, G.;KONINGS, D.DA;VIGIXE, R.CLEMENSTS, J.E. Nucleotide and transcriptional analisis of molecular clones of CAEV which generate infections vírus. *Virology* 179, 347-364,1990.

SANTURDE, G.; DA SILVA, N. VILLARES, R. Rapid end high sensitivity test for direct detection of bovine herpesvirus-1 genome in clinical samples. *Veterinary Microbiology*, v. 49, n. 1-2, p. 81-92, 1996.

SILVA, J.B.A., NETO, C.F., MARIA ISABELA CARLOS DANTAS, BARRETO JÚNIOR, R.A., SOUZA, C.H., DIAS, R.V.C., TEIXEIRA, M.F.S. Artrite Encefalite Caprina em reprodutores da micro-região de Angicos no estado do Rio Grande do Norte. *Revista Ciência Animal*, v. 15, n. 1, p. 53-56, 2005.

STRINGFELLOW, D. A. Recomendações para o manuseio sanitário de embriões obtidos in vivo. In: STRINGFELLOW, D.A., SEIDEL, S.M. (Eds.). *Manual da Sociedade Internacional de Transferência de Embriões*. 3.ed. Jaboticabal: SBTE, p. 83-96,1998.

THIBIER, M.; GUÉRIN, B. Hygienic aspects of storage and use of semen for artificial insemination. *Animal Reproduction Science*, v.62, p.233-251, 2000.

TRAVASSOS, C. E.; BENOÎT, C.; VALAS, S.; da SILVA, A. G.; PERRIN, G. Caprine arthritis-encephalitis vírus in sêmen of naturally infected bucks. *Small Ruminant Research*, v.32, n.2, p.101-106, 1999.

TRAVASSOS, C., BENOIT, C., VALAS, S., DA SILVA, A., PERRIN, G. Detection of caprine arthritis encephalitis virus in sperm of experimentally infected bucks. *Vet. Res.* 29, 579–584, 1998.

WALSH, P.S.; METZGER, D.A.; HIGUCHI, R. Chelex 100 as a medium for simple extraction of DNA for PCR-based typing from forensic material. *Biotechniques*, v.10, p.506-513, 1991.

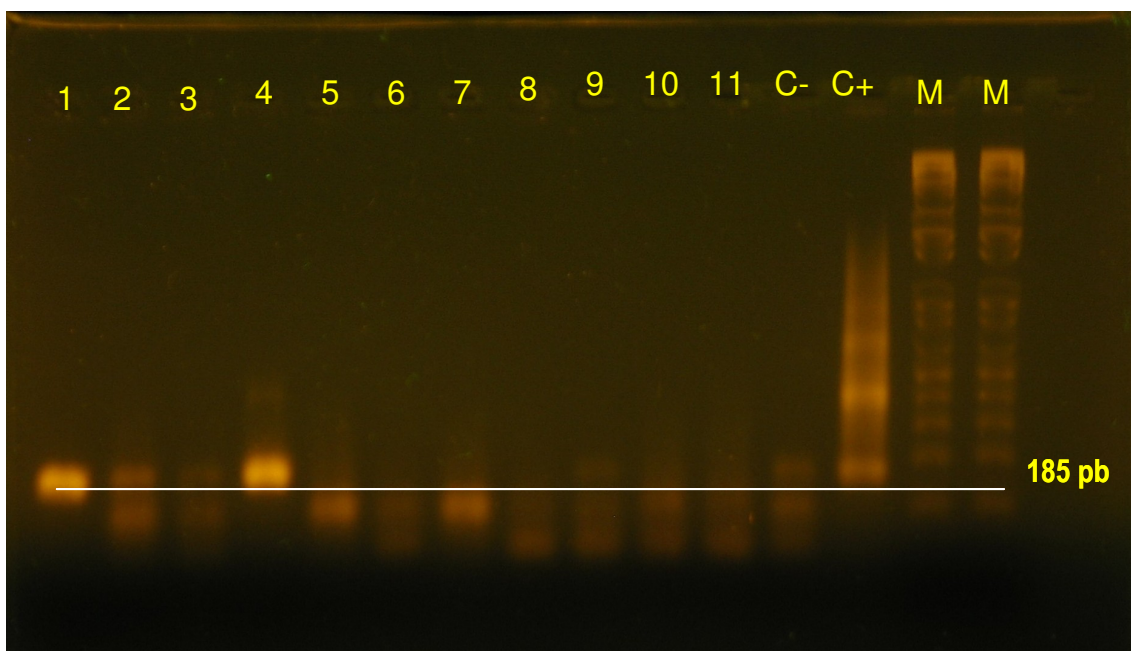


Fig.1. Amplificação de DNA proviral por Nested-PCR de sêmen integral caprino soropositivo. O produto da PCR foi corado com brometo de etídio e submetido a eletroforese em gel de agarose 1% em TBE. M: marcador molecular. Bandas 1-11: coletas de 1 à 11. C+: controle positivo (células infectadas com cepa CAEV-Cork). C-: controle negativo (água destilada).

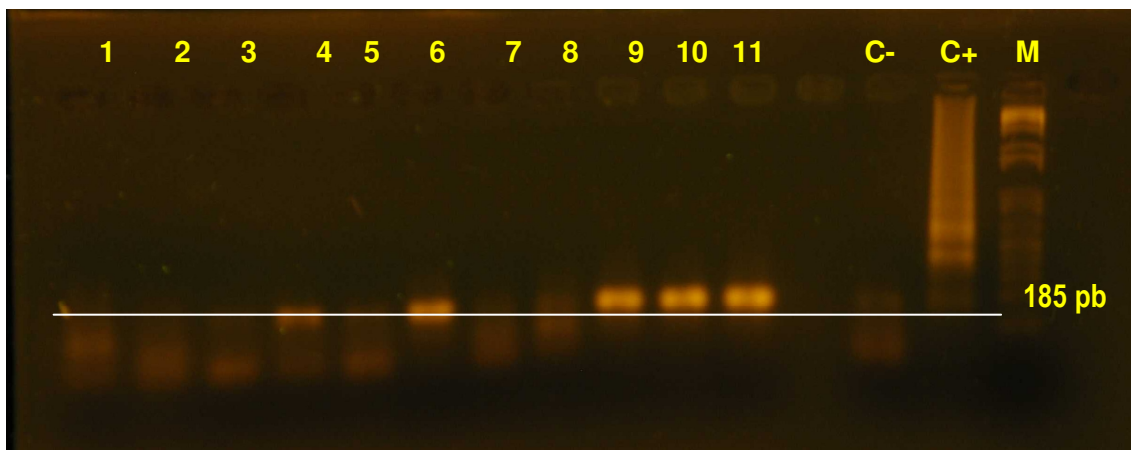


Fig.2. Amplificação de DNA proviral por Nested-PCR de sêmen caprino soropositivo submetido à lavagem com solução Krebs-Ringer-Fosfato. O produto da PCR foi corado com brometo de etídio e submetido a eletroforese em gel de agarose 1% em TBE. M: marcador molecular. Bandas 1-11: coletas de 1 à 11. C+: controle positivo (células infectadas com cepa CAEV-Cork). C-: controle negativo (água destilada).

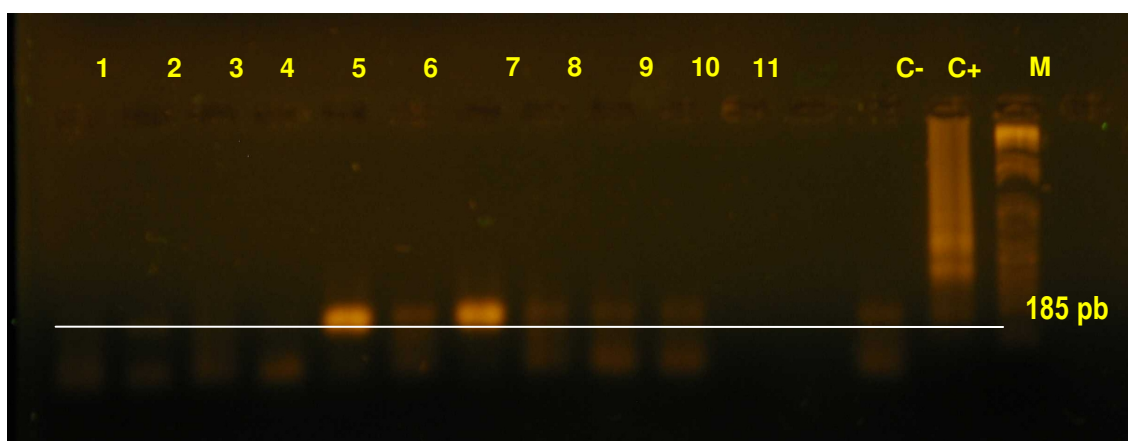


Fig.3. Amplificação de DNA proviral por Nested-PCR de sêmen caprino soropositivo submetido à lavagem com tripsina a 0,025%. O produto da PCR foi corado com brometo de etídio e submetido a eletroforese em gel de agarose 1% em TBE. M: marcador molecular. Bandas 1-11: coletas de 1 à 11. C+: controle positivo (células infectadas com cepa CAEV-Cork). C-: controle negativo (água destilada).

7 CONCLUSÕES

- Animais soropositivos para CAEV podem apresentar resultados positivos para o sêmen utilizando a técnica de Nested-PCR após procedimentos de lavagem com solução de Krebs-Ringer-Fosfato isoladamente ou adicionado a tripsina a 0,025%;
- Os tratamentos de lavagem utilizando a solução de Krebs-Ringer-Fosfato isoladamente ou adicionado a tripsina a 0,025% influenciaram a detecção do CAEV no sêmen pela técnica de Nested-PCR;
- A Solução de Krebs-Ringer-Fosfato pode elevar a sensibilidade da técnica de Nested-PCR em detectar o DNA-Proviral do CAEV no sêmen de animais soropositivos para o IDGA;
- A tripsina pode ser incorporada aos protocolos de lavagem de sêmen infectado na tentativa de minimizar a carga viral;

8 PERSPECTIVAS

- Utilização da SKRP no protocolo de Nested-PCR para detecção de DNA - Proviral no sêmen de animais soropositivos;
- Testar diferentes concentrações de tripsina no protocolo de eliminação de vírus;
- Testar métodos de desinfecção associados a tripsina.

AGRADECIMENTOS

A EMBRAPA juntamente ao Centro Nacional de Pesquisas com Caprinos (CNPQ), ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias e ao Núcleo de Genômica e Bio-informática da UECE pelo apoio técnico e laboratorial e à FUNCAP pelo incentivo concedido em forma de bolsa.

9 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AFSHAR, A., EAGLESOME, M.D. Viruses associated with bovine semen. The Veterinary Bulletin ., v.60, p.689-697, 1990.

AL-ANI, F. K.; VESTWEBER, J. G. E. Caprine arthritis-encephalitis síndrome (CAE): A review. Veterinary Research Communications, Amsterdam, v.8, p.243-253, 1984.

ALBERTS, B.; BRAY, D.; LEWIS, J.; RAFF, M.; ROBERTS, K.; WATSON, J.D. Molecular biology of the cell. 3,ed. New York: Garland Publishing Inc., 1994. lv.

ALEXANDER, N.J. Sexual transmission of human immunodeficiency virus: virus entry into the male and female genital tract. Fertility and Sterility, v.54, p.1-18, 1990.

ALI AL, AHMAD M.Z.; FIENI, F.; PELLERIN, J.L.; GUIGUEN, F.; CHEREL, Y.; CHATAGNON, G.; BOUZAR, A.B.; CHEBLOUNE, Y. Detection of viral genomes of c'aprine arthritis-encephalitis virus (CAEV) in semen and in genital tract tissues of male goat Theriogenology 69 (2008) 473–480.

ALI AL AHMAD, M.Z.; FIENI, F.; MARTIGNAT, L., et al. Proviral DNA of caprine arthritis encephalitis virus (CAEV) is detected in cumulus oophorus cells but not in oocytes from naturally infected goats. Theriogenology, v. 64, n. 7, p.1656-1666, 2005.

ALKAN, F., TAN, M.T.A A comparative study on the diagnosis of Maedi-Visna infection in serum and colostrum samples using agar gel immunodiffusion (AGID) technique. Dtsch Tierarztl wochenschr, v. 105, p.276-278, 1998.

ALMEIDA, A. M. R.; LIMA, J. A. A. Princípios e técnicas de diagnose em fitovirologia. Brasília/Fortaleza: Publicação SBF, 2001.

ALMEIDA, N. C.; TEIXEIRA, M. F. S.; FERREIRA, R. C. S.; CALLADO, A. K. C.; FROTA, M. N. L.; MELO, A. C. M.; APRÍGIO, C. J. L. Detecção de ovinos soropositivos

para Maedi-Visna destinados ao abate na região metropolitana de Fortaleza. Veterinária Notícias. v.9. n.1. p. 59-63. 2003.

ANDRIOLI, A. Vírus da Artrite Encefalite Caprina: PCR e isolamento viral em amostras de sêmen, fluido uterino e embriões. Belo Horizonte: UFMG, 2001. Tese (Doutorado em Ciências Veterinárias)- Escola de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais, 68p., 2001.

ANDRIOLI, A., GOUVEIA, A.M.G., MARTINS, A.S., PINHEIRO, R.R, SANTOS, D.O.. Fatores de risco na transmissão do lentivírus caprino pelo sêmen. Pesq. agropec. bras., v.41, n.8, p.1313-1319, 2006.

ANDRIOLI, A.; GOUVEIA, A. M. G.; PINHEIRO, R. R.; ROCHA, M. A.; MARTINS, A.; SANTOS, D. O. Detecção do DNA pro-viral do lentivírus caprino em sêmen de bodes naturalmente infectados. Revista Brasileira de Reprodução Animal, V. 32, p. 101-106, 1999.

ANDRIOLI, A.; GOUVEIA, A.M.G.; PINHEIRO, R.R. Seleção de sêmen de reprodutores portadores do vírus da artrite encefalite caprina através da técnica de reação em cadeia da polimerase. Sobral, Comunicado Técnico. EMBRAPA-CNPc, n.50, 23 p, 2003..

ANDREWES CH. Viruses of vertebrates. London: Bailliere, Tindal and Cox; 1964.

ARAUJO, S.A.C., DANTAS, T.V.M., SILVA, J.B.A, RIBEIRO, A.L., RICARTE, A.R.F., TEIXEIRA, M.F.S Identificação do maedi-visna vírus em pulmão de ovinos infectados naturalmente. Arq. inst. Biol. São Paulo, v.71, n.4, p. 431-436, out/dez., 2004.

ARAGÃO, M. A. C.; PINHEIRO, R. R. ; ANDRIOLI, A. ; ALVES, F. S. F. ; FONSECA, A. A. ; TEIXEIRA, M. F. S. . MAEDI-VISNA VÍRUS: PRODUÇÃO DE ANTÍGENO, ANÁLISE PROTÉICA E ANTIGÊNICA. Arquivos do Instituto Biológico, v. 75, p. 423-429, 2008.

ASSIS, A.P.M.V.; GOUVEIA, A.M.G. Evidência sorológica de lentivírus (Maedi Visna/CAE) em rebanhos nos Estados de MG, RJ, BA e CE. In: ENCONTRO DE PESQUISA DA ESCOLA VETERINÁRIA DA UFMG, 1994, Belo Horizonte. Anais... Belo Horizonte, p. 46, 1994.

BANDEIRA, D. A.; CASTRO, R. S.; AZEVEDO, E. O.; MELO, L.S.S; MELO, C.B. Seroprevalence of caprine arthritis-encephalitis vírus in goats in the Cariri region, Paraíba State, Brazil. In press The Veterinary Journal, 2008.

BARLOUGH, J.; EAST, N.; ROWE, J.D.; HOOSEAR, K.V.;DEROCK, E.; BIGORNIA, L.; RIMSTAD, E. Double-nested polymerase chain reaction for detection of caprine arthritis encephalitis chain reaction for detection of caprine arthritis encephalitis virus proviral DNA in blood, milk, and tissues of infectedgoats. Journal of Virological Methods, v.50, p.101-113, 1994.

BIELANSKI A, EASTMAN P, HARE WCD. Transitory acidification of semen as a potential method for the inactivation of some pathogenic microorganisms. Effect on fertilization and development of ova in superovulated heifers. Theriogenology;36:33–40. 1991.

BIELANSKI, A. Effect of trypsin in semen on in vivo fertilization and early embryonic development in superovulated heifers. Vet Res Commun;13:251–5, 1989.

BIELANSKI, A.; DUBUC, C.; HARE, W.C.D. Failure to remove bovine diarrhea virus (BVDV) from bull semen by swim-up and other separatory sperm techniques associated with in vitro fertilization. Reproduction in Domestic Animals, v.27, p.303-306, 1992.

BRINKHOF, J.M.A., HOUWERS, D.J., van MAANEN, C. Development of a sample pooling strategy for the serodiagnosis of small ruminant lentiviral infections using the ELITEST-MVV ELISA. *Small Rumin. Res.* 70 (2–3), 194–199. 2007.

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

CALDAS, A. P.F., LEAL, E.S., SILVA, E. F. A., RAVAZZOLO, A.P. Detecção do provírus da imunodeficiência felina em gatos domésticos pela técnica de Reação em Cadeia da Polimerase. *Pesquisa Veterinária Brasileira*, v. 20, n. 1, p.20-25, 2000.

CALLADO, A. K. C., CASTRO, R. S. de and TEIXEIRA, M. F. S.. Lentiviruses of small ruminants (CAEV and Maedi-Visna): a review and perspectives. *Pesq. Vet. Bras.* v.21, n.3, p.87-97, 2001.

CAREY, N.; ROY, D. J., DALZIEL, R. G. Use of recombinant gp 135 to study epitopespecific antibody responses to Maedi-Visna virus. *Journal of Virological Methods*, v. 43, p. 221-323, 1993.

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

CASTRO, R. S. Lentivírus de pequenos ruminantes: ensaios imunoenzimáticos, Perfil sorológico e inferências filogenéticas. Belo Horizonte. MG: UFMG – Escola de Veterinária, 1998. 132p. Tese (Doutorado)

CASTRO, R.S.; NASCIMENTO, S.A.; ABREU, S.R.O. Evidência sorológica de infecção pelo vírus da artrite-encefalite caprina em caprinos leiteiros do Estado de Pernambuco. Arq. Bras. Med. Vet. Zoot. V.46, n. 5, p. 571-572, 1994

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

CONCHA – BERMEJILLO, A. Maedi-visna e ovine progressive pneumonia. Veterinary Clinic North American: Food Animale Practice. v. 13, n. 1, p. 13-33, 1997.

CONCHA – BERMEJILLO, A., BRODIE, S. J., MAGNUS – CORRAL, S., BOWEN, R. A., DOMARTINI, J. C., Pathologic and serological responses of isogeneic twin lambs to phenotypically distinct lentiviruses. Journal Acquired immune deficient syndrome Human Retrovirol. v. 8, p. 116-123, 1995.

CORK, L. C. E.; NARAYAN, O. The pathogenesis of viral leukoencephalomyelitisarthritis of goats. 1. Persistent viral infection with progressive patologic changes. Lab. Invest., v.42, p.596-602, 1980.

CORK, L.C.; HADLOW, W.J.; CRAWFORD, T.B. et al., Infectious leucoencephalomyelitis of young goats. J. Infect. Dis., v. 129, n. 2, p. 134-141, 1974

CRAWFORD, T.; ADAMS, D.; CHEEVERS, W. Chronic arthritis in goats caused by a retrovirus. Science. v.207, p.997-999. 1980.

CUTLIP, R. C., LAIRD, G. A. Isolation and characterization of a virus associated with progressive pneumonia (Maedi) of sheep. American Journal Veterinary Research, v. 37, p. 1377-1382, 1976.

DANTAS, T.V.M., Desenvolvimento e padronização de ELISA indireto para diagnóstico de Maedi-Visna vírus em ovinos. 2004, 79p. Dissertação (mestardo em ciências veterinárias)-Universidade Estadual do Ceará. Fortaleza, 2004.

DANTAS, T. V. M.; ARAÚJO, S. A. C.; PINHEIRO, R. R.; ARAGÃO, M. A. C.; SILVA, J. B. A.; RICARTE, A. R. F.; RIBEIRO, A. L.; TEIXEIRA, M. F. S. Ciência Animal Brasileira, v. 9, n. 1, p. 181-187, jan./mar. 2008.

DAWSON, M. The caprine arthritis encephalitis syndrome. Vet. Annu. 29, 98–102. 1989.

DeMARTINI, J. C.; HALSEY, W.; BOSHOF, C.; DENNIS, Y.; HOWELL, M. D. Comparison of a Maedi- Visna virus CA-TM fusion protein ELISA with other assays for detecting sheep infected with North American ovine lentivírus strains. Veterinary Immunology and Immunopathology, v. 71, p. 29-40,1999.

EAST, N.E.; ROWE, J.D.; DAHLBERG, J.E.; THEILEN G.H.; PEDERSON N.C. Modes of transmission of caprine arthritis-encephalitis virus infection.Small Ruminant Research. vol. 10, april, pag. 251-262, 1993

FEITOSA, A.L.V.L. Análise filogenética de lentivirus de pequenos ruminantes isolados do Ceará. 2007. 98p. Dissertação (Mestrado em ciências veterinárias) – Faculdade de Veterinária, Universidade Estadual do Ceará, Fortaleza, 2007.

FENNER F, BACHMANN PA, GIBS EPJ, MURPHY FA, STRUDDERT MJ, WHITE DO. Veterinary virology: structure and composition of viruses. New York: Academic Press; 1987. p. 3–19.

FIENI, F., ROWE, J., VAN HOOSEAR, K, et al. Presence of caprine arthritis encephalitis virus (CAEV) infected cells in flushing media following oviductal-stage embryo collection. Theriogenology, v. 57, p. 931-940, 2002.

FIENI, F., ROWE, J., VAN HOOSEAR, K., BURUCOA, C., OPPENHEIM, S., ANDERSON, G., MURRAY, J., BONDURANT, R. Presence of caprine arthritis–encephalitis virus (CAEV) proviral DNA in genital tract tissues of superovulated dairy goat does. *Theriogenology* v.59, p.1515–1523, 2003.

FRANKE, C. R. Controle sanitário da artrite-encefalite caprina. Salvador: EDUFBA, 1998. 70p.

GARRIDO N, MESEGUER M, BELLVER J, REMOHI J, SIMON C, PELLICER A. Report of the results of a 2 year programme of spermwash and ICSI treatment for human immunodeficiency virus and hepatitis C virus serodiscordant couples. *Hum Reprod* 2004;19:2581–6.

GRADIL, C.; EAGLESOME, M.D.; STEWART, B.; GARCIA, M.M.; QUIMBY, F. Bactericidal effects of ozone at nonspermicidal concentrations. *Can J Vet Res* 1995;59:183–6.

GUERIN C, HARLAY T, GUERIN B, THIBIER M. Distribution of BHV- 1 in fractions of semen from a naturally infected bull. *Theriogenology*;40:997–1002. 1993.

HAASE, A. T. The pathogenesis of lentivirus infections. *Nature*, v.322, p.130-136, 1986.

HAFEZ, E.S.E.; HAFEZ, B. Reprodução animal. 7.ed. São Paulo: Manóle, 2004. 509p

HANABUSA H, KUJI N, KATO S, TAGAMI H, KANEKO S, TANAKA H,. An evaluation of semen processing methods for eliminating HIV-1. *AIDS*;14:1611–6. 2000.

HARE, W.C.D. Enfermedades transmissibles por el semen y las tecnicas de transferencia de embriones. France: Office International des Epizooties, pag. 83. 1985.

HOLLY, L.; JORDAN, J.O.; HOWARD, G.; BUCCI, J. G.; BUTTERWORTH, J. L.; ENGLISH, R.; SUZAN, N.E.; KENNEDY-STOSKOPF; TOMPKINS, M. B.; TOMPKINS, W. A. Horizontal transmission of feline immunodeficiency virus with semen from seropositive cats. *Journal of Reproductive Immunology*. Vol. 41, pag. 341-357, 1998.

JORDAN, H.L.; HOWARD, J.; TOMPKINS, W.A.; KENNEDYSTOSKOPF, S. Detection of feline immunodeficiency virus in semen from seropositive domestic cats (*Felis catus*). *Journal of Virology*, v.69, p.7328-7333, 1995.

KARLSTROM PO, HJELM E, LUNDKVIST O. Comparison of the ability of two sperm preparation techniques to remove microbes. *Hum Reprod*; 6:386–9. 1991.

KATO S, HANABUSA H, KANEKO S, TAKAKUWA K, SUZUKI M, KUJI N,. Complete removal of HIV-1 RNA and proviral DNA from semen by the swim-up method: assisted reproduction technique using spermatozoa free from HIV-1. *AIDS* 2006;20: 967–73.

KNOWLES, D. P. Laboratory diagnostic test for Retrovirus infections of small ruminants. *Veterinary Clinic North American: Food Animal. Practice*, v. 13, p. 1-11, 1997.

LAMARA, A.; FIENI, F.; MSELLI-LAKHAL, L.; CHATAGNON, G.; BRUYAS, J. F.; TAINTURIER, D.; BATTUT, I.; FORNAZERO, C.; CHEBLOUNE, Y. Early embryonic cells from in vivo-produced goat embryos transmit the caprine arthritis-encephalitis virus (CAEV). *Theriogenology*, v. 58. p. 1153-1163, 2002.

LARA, M.C.C.S.H.; BIRGEL-JUNIOR, E.H.; GREGORY, L.; BIRGEL, E.H.. Aspectos clínicos da artrite encefalite dos caprinos. *Arquivo Brasileiro de Medicina veterinária e zootecnia*, v. 57, n.6, p. 736-740, 2005.

LARSEN, H. J.; HYLLSETH, B.; KROGSRUD, J. Experimental maedi virus infection in sheep: cellular and humoral immune response during three years following intranasal inoculation. *American Journal Veterinary Research*, v. 43, n. 3, p. 384-389, 1982.

LEROUX, C. CHASTANG, J., GREENLAND, T., MORNEX, J.F. Genomic heterogeneity of small ruminant lentiviruses: existence of heterogeneous populations in sheep and of the same lentiviral genotypes in sheep and goats. *Archive of Virology*, (142), 1125-1137, 1997.

LERUEX-VILLE, M.; DULIOUST, E.; GALIMAND, J.; GUIBERT, J.; JOUANET, P.; ROUZIOUX, C. Virus et sperm: implications pour l'assistance médicale à la procréation (AMP). *Immuno-analyse & Biologies spécialisées*, v.21, p.181-188, 2006.

LOSKUTOFF NM, HUYSER C, SINGH R, WALKER DL, THORNHILL AR, MORRIS L,. Use of a novel washing method combining multiple density gradients and trypsin for removing human immunodeficiency virus-1 and hepatitis C virus from semen. *Fertil Steril* 2005;84:1001–10.

MADRUGA, C.R., ARAÚJO, F.R., SOARES, C.O.. Princípios , padronização e validação de provas sorológicas. In: *Imunodiagnóstico em medicina Veterinária*. Editores :Madruga, C.R., Araújo, F.R., Soares, C.O., EMBRAPA gado de corte (Campo Grande- Mato Grosso do Sul- Brasil), 145-175., 2001.

MELO, A.C.M.; FRANKE, R.F. Soroprevalência da artrite-encefalite caprina (CAE) no rebanho caprino leiteiro da região da grande Fortaleza, Ceará, Brasil. *Ciência Rural*, v.27, n.1, p. 113-117, 1997.

MERMIN, J.H., HOLODNIY, M., KATZENSTEIN, D.A., MERIGAN, T.C. Detection of human immunodeficiency virus DNA and RNA in semen by the polymerase chain reaction. *Journal Infectious Diseases*, v.164, n.4, p.769-72, 1991.

MOOJEN, V. Caracterização de isolados de lentivirus de pequenos ruminantes naturalmente infectados, do Rio Grande do Sul, Brasil. Rio de Janeiro: FIOCRUZ, 1996. 247p. Tese (Doutorado).

MOOJEN, V.; SOARES, H. C.; RAVAZZOLO, A. P.; PIZZOL, M.; GOMES, M. Evidência de infecção pelo lentivírus (Maedi/Visna - Artrite Encefalite Caprina) em caprinos no Rio Grande do Sul, Brasil. Arquivos da Faculdade de Medicina Veterinária da UFRGS. v. 1, p. 77-78, 1986.

MOOJEN, V.; BARTH, O. M.; RAVAZOLLO, A. P. Sheep maedi-visna virus ultrastructural characterization of a brazilian isolate. In: V ENCONTRO DE VIROLOGIA, 1995, Ribeirão Preto. Anais da V virológica, Ribeirão Preto: Sociedade Brasileira de Virologia, , v. 1, p. B14. 1995.

MORFELD KA, WHITE B, MILLS G, KRISHER RMMA, LOSKUTOFF NM. A novel method eliminating porcine reproductive and respiratory syndrome virus from boar semen and its effect on embryo development. *Reprod Fertil Develop*;17:243. 2005.

MORRELL JM, GERAGHTY RM. Effective removal of equine arteritis virus from stallion semen. *Equine Vet J*. 38:224–9, 2006

MOTHA, M.X., RALSTON, J.C. Evaluation of ELISA for detection of antibodies to CAEV in milk. *Vet. Microbiol*. 38 (4), 359–367. 1994.

NARAYAN, O., CLEMENTS, J.E. Biology and pathogenesis of lentiviruses. *J. Gen. Virol*. v.70, p.1617–1639, 1989.

NASH, J.W.; HANSON, L.A.; COATS, K.C. Bovine immunodeficiency virus in stud bull semen. *American Journal of Veterinary Research*, v.56, p.760-763, 1995.

NICHOLSON CM, ABRAMSSON L, HOLM SE, BJURULF E. Bacterial contamination and sperm recovery after semen preparation by density gradient centrifugation using silane-coated silica particles at different g forces. Hum Reprod 2000;15:662–6.

OFFICE INTERNATIONAL DES EPIZOOTIES - OIE. Manual of standards for diagnostic tests and vaccines. World Organization for Animal Health. p. 369-373, 1996.

PÁLSSON, P.A. Maedi and visna in sheep. Front. Biol. 44, 17–43, 1976

PAULA, N.R.O. Parâmetros Clínicos, Hematológicos, Sorológicos e Reprodutivos em Reprodutores Natural e Artificialmente Infectados com CAEV. Tese de Doutorado. Fortaleza, Ceará. 2008.

PETERSON, K.;BRINKHOF J.;HOUWERS, D.; COLENBRANDEN, B.; GADELA, B. Presence of pro-lentiviral DNA in male sexual organs and ejaculates of small ruminants. Theriogenology, (69), pag. 433-442, 2008.

PICKETT BW, BERNDTSON WE, SULLIVAN JJ. Influence of seminal additives and packaging systems on fertility of frozen bovine spermatozoa. J Anim Sci 1978;47(Suppl. 2):12–47.

PINHEIRO, R. R. Vírus de Artrite Encefalite Caprino: Desenvolvimento padronização de ensaios imunoenzimáticos (ELISA e Dot-Blot) e estudo epidemiológico no Estado do Ceará. Belo Horizonte: UFMG, 2001. 115p. Tese (Doutorado)- Escola de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais.

PINHEIRO, R. R.; GOUVEIA, A. M. G.; ALVES, F. S. F. Prevalência de infecção pelo vírus da artrite encefalite caprina no estado do Ceará, Brasil. Cienc. Rural, v. 31, n. 3, 2001.

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

POLITCH JA, XU C, TUCKER L, ANDERSON DJ. Separation of human immunodeficiency virus type 1 from motile sperm by the double tube gradient method versus other methods. *Fertil Steril*;81:440–7. 2004.

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

QUAYLE, A.J.; XU, C.; MAYER, K.H.; ANDERSON, D.J. T lymphocytes and macrophages, but not motile spermatozoa, are a significant source of human immunodeficiency virus in semen. *Journal of Infectious Diseases*, v.176, p.960-968, 1997.

RAVAZZOLO, A. P. ; REISCHAK, Dilmara ; PETERHANS, Ernst ; Zanoni, R. . Phylogenetic analysis of small ruminant lentiviruses from Southern Brazil. *Virus Research*, v. 79, p. 117-123, 2001.

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

REISCHAK, D. Lentivirus de pequenos ruminantes imunofluorescência utilizando isolados brasileiros para diagnosticar sorológico de infecção em ovinos e caprinos. Porto Alegre, 2000. 132p. Dissertação de Mestrado- Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

REYBURN, H. T., ROY, D. J., BLACKLAWS, B. A. SARGAN, D. R., McCONNELL, I. Expression of Maedi-visna virus major core protein p. 25: development of a sensitive p. 25 antigen detection assay. *Journal of Virological Methods*, v. 70, p. 1617-1639, 1992.

RICARTE, A.R.F. Caracterização Morfológica e Ultra-Estrutural de Folículos Pré-Antrais de Cabras Naturalmente Infectadas com o Vírus da Artrite Encefalite Caprina. Dissertação, 2005. Fortaleza: UECE, 2005. 70p. Dissertação (Mestrado)- Faculdade de Veterinária, Universidade Estadual do Ceará.

RIET-CORRÊA, F. Doenças de Ruminantes e Equinos. v.1. São Paulo: Varela, 2001.

RIMSTAD, E., EAST, N. E., TORTEN, M., HIGGINS, J., DEROCK, E., PEDERSEN, N. C. Delayed seroconversion following naturally acquired caprine arthritis-encephalitis virus infection in goats. American Journal of Veterinary Research, v.54, p.1858-1862, 1993.

RUTKOSKI, J.K., WERENICZ, R., REISCHAK, D., WENDELSTEIN, A.C., MOOJEN, V., RAVAZZOLO, A.P. Detecção da infecção pelo vírus da artrite-encefalite caprina: imunodifusão em ágar e reação em cadeia da polimerase com "primers" degenerados Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia, v.53, n.6, 2001.

SALTARELLI, M., QUERAT, G., KONINGS, D. A. M., VIGNE, R., CLEMENTS, J. E. Nucleotide sequence and transcription analysis of molecular clones of CAEV which generate infectious virus. Virology, v.179, p. 347-364, 1990.

SANTURDE, G.; DA SILVA, N. VILLARES, R. Rapid end high sensitivity test for direct detection of bovine herpesvirus-1 genome in clinical samples. Veterinary Microbiology, v. 49, n. 1-2, p. 81-92, 1996.

SEMPRINI AE, LEVI-SETTI P, BOZZO M, RAVIZZA M, TAGLIORETTI A, SULPIZIO P,. Insemination of HIV-negative women with processed semen of HIV-positive partners. Lancet 1992;340: 1317-9.

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

SILVA N, SOLANA A, CASTRO JM. Evaluation of the effects of different trypsin treatments on semen quality after BHV-1 inactivation, and a comparison of the results before and after freezing, assessed by a computer image analyzer. Anim Reprod Sci;54:227–35. 1999.

SILVA, J.B.A., NETO, C.F., MARIA ISABELA CARLOS DANTAS, BARRETO JÚNIOR, R.A., SOUZA, C.H., DIAS, R.V.C., TEIXEIRA, M.F.S. Artrite Encefalite Caprina em reprodutores da micro-região de Angicos no estado do Rio Grande do Norte. Revista Ciência Animal, v. 15, n. 1, p. 53-56, 2005.

SILVA-PEREIRA, I. Amplificação de DNA por PCR. In: AZEVEDO, M. O., FELIPE, M. S. S., BRÍGIDO, M. M., MARANHÃO, A. Q., DE-SOUZA, M. T. Técnicas básicas em Biologia molecular. Brasília: Editora Universidade de Brasília, p.99-110, 2003.

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

STRINGFELLOW, D. A. Recomendações para o manuseio sanitário de embriões obtidos in vivo. In: STRINGFELLOW, D.A., SEIDEL, S.M. (Eds.). Manual da Sociedade Internacional de Transferência de Embriões. 3.ed. Jaboticabal: SBTE, p. 83-96,1998.

THIBIER, M.; GUÉRIN, B. Hygienic aspects of storage and use of semen for artificial insemination. Animal Reproduction Science, v.62, p.233-251, 2000.

TORTORA, G.J, FUNKE, B.R., CASE, C.L. Microbiologia, 5ed., editora ArtMed, Porto Alegre, 2000, 827p.

TRAVASSOS, C., BENOIT, C., VALAS, S., DA SILVA, A., PERRIN, G. Detection of caprine arthritis encephalitis virus in sperm of experimentally infected bucks. *Vet. Res.* 29, 579–584, 1998.

TRAVASSOS, C. E.; BENOÎT, C.; VALAS, S.; da SILVA, A. G.; PERRIN, G. Caprine arthritis-encephalitis virus in semen of naturally infected bucks. *Small Ruminant Research*, v.32, n.2, p.101-106, 1999.

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

WALSH, P.S.; METZGER, D.A.; HIGUCHI, R. Chelex 100 as a medium for simple extraction of DNA for PCR-based typing from forensic material. *Biotechniques*, v.10, p.506-513, 1991.

ZANONI, R.G., VOGT, H.R., POHL, B., BÖTTCHER, J., BOMMELI, W., PETERHANS, E.. An ELISA based on whole virus for the detection of antibodies to small-ruminant lentiviruses. *J. Vet. Med. B* 41, 662–669. 1994.

ZINK, M. C., JOHNSON, L. K. Pathology of lentivirus infections of sheep and goats. *Virus Research*, v. 32, p139-154, 1994.

F381d

Ferraz, Richard Elaino de Oliveira

Detecção do vírus da Artrite Encefalite Caprina em sêmen tratado de reprodutores soropositivos/ Richard Elaino de Oliveira Ferraz._Fortaleza, 2009.

68p. ; Il.

Orientadora: Profa Dra. Maria Fátima da Silva Teixeira

Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias)- Universidade Estadual do Ceará, Faculdade de Veterinária.

1 Transmissão. 2.Sêmen. 3.Tripsina. 4. CAEV. I. Universidade Estadual do Ceará, Faculdade de Veterinária.

CDD:636.39