



UNIVERSIDADE ESTADUAL DO CEARÁ
FACULDADE DE VETERINÁRIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS
DOUTORADO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS

RENATO MESQUITA PEIXOTO

**AVALIAÇÃO *IN VITRO* DA ATIVIDADE ANTIVIRAL DE
FITOCOMPOSTO AO LENTIVÍRUS CAPRINO NO SÊMEN E
ANÁLISE DA COINFECÇÃO ENTRE *MYCOPLASMA AGALACTIAE* E
O VÍRUS DA ARTRITE ENCEFALITE CAPRINA (CAEV) NO CEARÁ**

FORTALEZA - CE

2018

RENATO MESQUITA PEIXOTO

AVALIAÇÃO *IN VITRO* DA ATIVIDADE ANTIVIRAL DE
FITOCOMPOSTO AO LENTIVÍRUS CAPRINO NO SÊMEN E ANÁLISE
DA COINFEÇÃO ENTRE *MYCOPLASMA AGALACTIAE* E O VÍRUS DA
ARTRITE ENCEFALITE CAPRINA (CAEV) NO CEARÁ

Tese 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 Doutor 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.

Coorientadora: Dra. Alice Andrioli Pinheiro.

FORTALEZA - CE

2018

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação

Universidade Estadual do Ceará

Sistema de Bibliotecas

Peixoto, Renato Mesquita.

Avaliação in vitro da atividade antiviral de fitocomposto ao lentivírus caprino no sêmen e análise da coinfeção entre Mycoplasma agalactiae e o vírus da artrite encefalite caprina (CAEV) no Ceará [recurso eletrônico] / Renato Mesquita Peixoto. - 2018.

1 CD-ROM: il.; 4 ¼ pol.

CD-ROM contendo o arquivo no formato PDF do trabalho acadêmico com 128 folhas, acondicionado em caixa de DVD Slim (19 x 14 cm x 7 mm).

Tese (doutorado) - Universidade Estadual do Ceará, Faculdade de Veterinária, Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, Fortaleza, 2018.
Área de concentração: Reprodução e Sanidade Animal.
Orientação: Prof.^a Dra. Maria Fátima da Silva Teixeira.

Coorientação: Prof.^a Dra. Alice Andrioli Pinheiro.

1. Caprinocultura. 2. Inativação Viral. 3. Infecções Secundárias. 4. Lentivírus de Pequenos Ruminantes. 5. Produtos Naturais. I. Título.

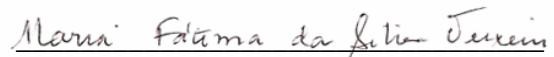
RENATO MESQUITA PEIXOTO


AVALIAÇÃO *IN VITRO* DA ATIVIDADE ANTIVIRAL DE
FITOCOMPOSTO AO LENTIVÍRUS CAPRINO NO SÊMEN E ANÁLISE
DA COINFECÇÃO ENTRE *MYCOPLASMA AGALACTIAE* E O VÍRUS DA
ARTRITE ENCEFALITE CAPRINA (CAEV) NO CEARÁ

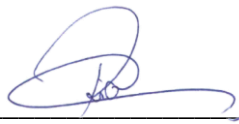
Tese apresentada ao Programa de Pós- Graduação em
Ciências Veterinárias da Faculdade de Veterinária da
Universidade Estadual do Ceará, como requisito parcial
para a obtenção do grau de Doutor em Ciências
Veterinárias.


Aprovada em: 11/07/2018.

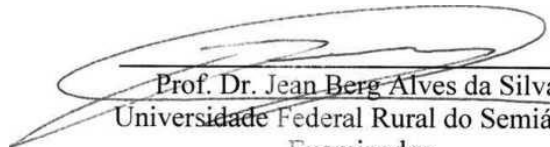
BANCA EXAMINADORA:


Prof.^a Dra. Maria Fátima da Silva Teixeira
Universidade Estadual do Ceará
Orientadora


Dra. Alice Andrioli Pinheiro
Embrapa Caprinos e Ovinos
Coorientadora


Prof. Dr. Raymundo Rizaldo Pinheiro
Embrapa Caprinos e Ovinos
Examinador


Dr. Francisco Selmo Fernandes Alves
Embrapa Caprinos e Ovinos
Examinador


Prof. Dr. Jean Berg Alves da Silva
Universidade Federal Rural do Semiárido
Examinador

FORTALEZA - CE
2018

A meus pais, Antonia Pinto de Mesquita (Toinha) e Raimundo Nonato Peixoto (Rui), por todo amor e carinho que me proporcionam, e por todo apoio ao longo dessa jornada, a qual não foi fácil, mas a ajuda deles me fortaleceu, devendo assim compartilhar essa conquista com eles, pois são minha base, minha fortaleza.

Dedico.

AGRADECIMENTOS

À Deus, por iluminar meus caminhos, me direcionando no rumo certo, e abençoando todos os meus passos.

À Universidade Estadual do Ceará (UECE) e ao seu Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias (PPGCV) pela oportunidade de realizar o Doutorado em Ciências Veterinárias.

A todos os membros do Laboratório de Virologia (LABOVIR) do PPGCV/UECE que me receberam com enorme carinho.

Ao Laboratório de Química de Produtos Naturais (LPQN) do PPGCV/UECE, em especial a Dra Selene Maia de Moraes por disponibilizar o laboratório, e ao meu amigo Adailson Sousa pela ajuda no preparo e processamento dos extratos vegetais.

À Embrapa Caprinos e Ovinos por todo suporte técnico e estrutural, tanto de laboratório quanto de campo, que se fazia necessário para a viabilidade em desenvolver essa pesquisa.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela concessão da bolsa de doutorado via edital Nº 15/2014 CAPES/EMBRAPA, a qual foi de grande valia nesses quatro anos de pesquisa.

À Fundação Cearense de Apoio ao Desenvolvimento Científico e Tecnológico (FUNCAP) e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pelo aporte financeiro que proporcionou a execução desse trabalho.

Aos meus pais, Toinha e Rui, os quais estão presentes em todas as etapas da minha vida, me proporcionando um amor incondicional e puro. E, aos meus familiares que direto ou indiretamente contribuíram ao longo dessa caminhada, e que acreditaram no meu potencial.

À minha orientadora Dra. Maria Fátima da Silva Teixeira por ter me aceitado como seu orientando, e por toda ajuda e confiabilidade depositado a mim ao longo desse doutorado; bem como pela amizade construída, pois ela é um ser humano ímpar, de um caráter exemplar, disposta sempre a ajudar.

À minha coorientadora Dra. Alice Andrioli por toda disponibilidade, confiança e atenção, uma parceria já de longas datas, e de enorme sucesso, pois sempre é uma satisfação trabalhar ao seu lado, em virtude de ser uma profissional exemplar que contribuiu significativamente na minha formação pessoal e profissional.

Ao Dr Rizaldo Pinheiro pelas palavras de incentivo, por confiar no meu potencial, pelo apoio dado ao longo da minha formação acadêmica, e pelos momentos de irreverência, de repasse de conhecimento, todos repletos de muita importância.

Aos amigos da Embrapa Meio Norte em Teresina/PI, principalmente a Dra Izabella Hassum e ao senhor Ozires Sousa, pela ajuda e colaboração dada a esse trabalho.

Aos meus amigos do dia a dia na Embrapa Caprinos e Ovinos, principalmente a Ana Lídia, Dalva Azevedo, Juscilânia Furtado (Laninha), Kelma Costa, Edgar Marques, Jéssica Santos, Maximiana Mesquita e Vanderlan Sousa, os quais contribuíram com essa pesquisa e propiciaram alegria nessa jornada, especialmente nos intervalos de trabalho com nossas “conversas científicas”, e nas nossas confraternizações, momentos esses que lembrarei sempre com muito carinho e saudades.

Aos funcionários e laboratoristas da Embrapa Caprinos e Ovinos não apenas pelo auxílio ao longo do desenvolvimento dessa pesquisa, mas também pela amizade criada e cultivada diariamente, em especial, ao Nóbrega, João Ricardo, Adriano, Osmarilda, Jamile, Orlando, Alex e Seu Lôro.

Aos bolsistas de iniciação científica que aturam ativamente no decorrer dessa pesquisa, e que são amigos que irei levar para vida toda: Davi Farias, Kelry Lopes, Adriano Ferreira, e Bárbara Karen.

A minha namorada, amiga, e companheira Larissa Oliveira por todo incentivo, confiança, e compreensão nos meus momentos de ausência, pois nos melhores e piores momentos ela se manteve ao meu lado e me ajudou a vencer os obstáculos, sem dúvida essa conquista merece ser dividida com ela; e claro, com sua mãe Lúcia Oliveira, mulher guerreira que sempre depositou credibilidade em mim.

Ao Dr. Diones Santos (*in memoriam*), um grande homem, exemplo de profissional e amigo que tive na Embrapa Caprinos e Ovinos, e que teve grande contribuição nessa pesquisa.

Ao meu padrinho Francisco Lucas Pinto (*in memoriam*) e ao senhor Cicero Gonçalves de Oliveira (*in memoriam*) pessoas importantes na minha vida e que sempre se mostravam dispostos a ajudar em momentos de dificuldades.

Ao grupo bolsista Capes no facebook por todas as vivências compartilhadas e risos proporcionados.

MUITO OBRIGADO A TODOS!

*O ser humano não é simplesmente o que ele produz,
é o que vive, o que sente, o que compartilha, pois a
dimensão do viver é maior que a restrição do lattes.*

Renato M. Peixoto

RESUMO

O lentivírus caprino apresenta-se disseminado no Brasil, propiciando a ocorrência de infecções secundárias, as quais são comuns em animais com enfermidade viral. Ademais, infecções por *Mycoplasma agalactiae* (*M. agalactiae*) são diagnosticadas em muitos estados nordestinos, os quais também se encontra presente o vírus da artrite encefalite caprina (CAEV), onde a inexistência de vacina ou tratamento eficaz propicia a eliminação de muitos reprodutores de alta qualidade genética dos rebanhos. Nesse contexto, há a necessidade de buscar métodos de evitar a disseminação do vírus pela via reprodutiva, e conseqüentemente evitar o estabelecimento de infecções simultâneas. Assim, objetivou-se determinar a ocorrência de coinfeção pelo lentivírus caprino e *Mycoplasma agalactiae* nos rebanhos leiteiros do Ceará, bem como avaliar *in vitro* a atividade antiviral de extratos etanólicos de *Azadirachta indica* A. Juss. (nim) contra esse lentivírus presente no sêmen caprino. Esse trabalho foi dividido em três etapas. Na 1ª etapa investigou-se a existência de anticorpos anti-*Mycoplasma agalactiae* em rebanhos leiteiros no estado do Ceará e a sua possível correlação com a artrite encefalite caprina (CAE). Utilizaram-se 417 fêmeas e 69 reprodutores caprinos (486 animais) de raças com aptidão leiteira, puros ou mestiços, de sistema intensivo ou semi-intensivo, advindos de quatro mesorregiões do estado do Ceará. Anticorpos contra o CAEV foram detectados pela microtécnica de imunodifusão em gel de ágar (IDGA) e de *Western Blot* (WB). Já os anticorpos anti-*Mycoplasma agalactiae* optou-se pelo kit comercial de imunoenensaio enzimático da IDEXX Laboratories™. A soroprevalência de *M. agalactiae* em rebanhos de caprinos leiteiros no Ceará foi de 0,62% (3/486). Não evidenciou correlação entre os resultados obtidos no ELISA para *M. agalactiae* e CAEV por IDGA ou por WB ($p < 0,05$). Na 2ª etapa, buscou-se determinar a concentração ideal de dimetilsulfóxido (DMSO) a ser usado na dissolução dos extratos etanólicos. *Pool* de sêmen de cinco caprinos foi diluído em meio essencial mínimo (MEM) enriquecido com glicose a 0,01M, acrescido de concentrações de DMSO (0; 1,5; 1,75; 2,0; 2,25 e 2,5%). Os tratamentos foram refrigerados a 7°C e avaliados até quatro horas após adição de DMSO. Mensurou-se motilidade individual progressiva (MIP), vigor espermático (V), porcentagem de espermatozoides reativos ao teste hiposmótico (HO) e morfológicamente normais (NOR). MIP, vigor e NOR permaneceram dentro dos padrões normais para caprinos em todos os tratamentos. Com isso não foi evidenciado interferência do DMSO nos parâmetros analisados, quando adicionado a uma concentração máxima de 2,5% ao diluidor MEM, sem interferir na qualidade do sêmen caprino refrigerado. Por fim na 3ª etapa, avaliou-se o efeito dos extratos etanólicos de *Azadirachta indica* ao sêmen caprino, e seu potencial de inativar o CAEV no mesmo. Para tanto, *pool* de sêmen de quatro reprodutores caprinos foi diluído em MEM enriquecido com glicose a 0,01M e das frações testes (extrato bruto, acetato de etila e etanol) previamente dissolvidas em DMSO em duas concentrações (75µg/mL e 150µg/mL) e seus parâmetros espermáticos (MIP, V, NOR) avaliados a cada duas horas pós-adição dos extratos até um período máximo de quatro horas. Em seguida, um novo *pool* de sêmen foi infectado com cepa CAEV Cork e tratado com as respectivas frações testes (extrato bruto, acetato de etila e etanol) por 30, 60 e 90 minutos, em duas concentrações (75µg/mL e 150µg/mL) para então ser cocultivado com células de membrana nictitante ovina (MNO) durante 63 dias, com realização de Nested PCR do DNA pró-viral do sobrenadante coletado a cada sete dias e da respectiva passagem celular, e RT-nPCR do sobrenadante coletado na semana seguinte pós-passage. Todos os parâmetros espermáticos permaneceram dentro da normalidade para espécie caprina em todos os tratamentos, e sem apresentar diferença estatística ($p > 0,05$) entre os mesmos. O extrato *Azadirachta indica* em Acetato de Etila e Etanol na concentração de 150µg/mL teve ação antiviral contra o lentivírus, no entanto, novos ensaios devem ser

realizados para poder validá-lo. Como conclusão geral, essa pesquisa demonstrou que não foi verificada a existência de correlação positiva na incidência de infecção pelo CAEV e pelo *M. agalactiae* no presente estudo no estado do Ceará, e que em virtude da disseminação da CAE pelo estado que os extratos etanólicos de *Azadirachta indica* dependendo da concentração e fração, há potencial de inibir o lentivírus caprino no sêmen, podendo ser uma ferramenta válida no controle do vírus pela via reprodutiva.

Palavras-chave: Caprinocultura. Inativação Viral. Infecções Secundárias. Lentivírus de Pequenos Ruminantes. Produtos Naturais.

ABSTRACT

The caprine lentivirus is disseminated throughout Brazil causing the occurrence of secondary infections, which are common in animals with viral disease. In addition, infections by *Mycoplasma agalactiae* (*M. agalactiae*) are frequently diagnosed in several states of the Northeastern region of Brazil, in which the caprine arthritis encephalitis virus (CAEV) is also found very often. In these locations, the lack of vaccine or effective treatment forces the elimination of many breeders that have elevated genetic value from the flocks. In this context, there is a necessity of seeking methods to avoid virus transmission through reproduction and consequently prevent simultaneous infections. Hence, this study aimed to determine the occurrence of coinfection by the caprine lentivirus and *Mycoplasma agalactiae* in dairy flocks of Ceará. In addition, the antiviral activity of ethanol extracts of *Azadirachta indica* A. Juss. (nim) against this lentivirus was evaluated in the caprine semen. This study was divided in three steps. First, the presence of anti-*Mycoplasma agalactiae* antibodies was assessed in dairy flocks in Ceará state and the possible correlation between these cases and the caprine arthritis encephalitis (CAE). A total of 417 female and 69 male caprine breeders (486 animals) with milk production aptitude were used in this study. These animals were pure or mix breed and reared in intensive or semi-intensive systems distributed in four mesoregions of Ceará state. CAEV antibodies were detected with micro technique of agar gel immunodiffusion (AGID) and Western Blot (WB). The presence of anti-*Mycoplasma agalactiae* antibodies was assessed with an enzymatic commercial kit of IDEXX Laboratories™. Seroprevalence of *M. agalactiae* in dairy caprine flocks in Ceará was 0.62% (3/486). There was no correlation between the results obtained from ELISA to *M. agalactiae* and CAEV using AGID or WB ($p < 0.05$). In the second part of the study, the ideal concentration of dimethyl sulfoxide (DMSO) to be used in the dissolution of the ethanol extracts. Pooled samples of the semen obtained from five goats were diluted in minimal essential medium (MEM) enriched with glucose at 0.01M added different DMSO concentrations (0; 1.5; 1.75; 2.0; 2.25 and 2.5%). Treatments were refrigerated at 7°C and evaluated up until four hours after the addition of DMSO. Individual progressive motility (IPM), spermatic vigor (V), percentage of spermatozoids reactive to hyposmotic test (HO) and normal morphology (NOR) were evaluated. IPM, V and NOR values were within normal levels expected for the caprine species in all treatments. Hence, there was no effect of DMSO used to perform MEM dilution in the analyzed parameters of caprine refrigerated semen even in the maximum concentration of 2.5%. In the final part of the study, the effects of ethanol extracts of *Azadirachta indica* in the caprine semen and the potential to inactivate the CAEV were evaluated. Pooled semen samples of four goats were diluted in MEM enriched with glucose at 0.01M and fractions to be tested (brute extract, ethyl acetate and ethanol) previously dissolved in DMSO in two concentrations (75µg/mL and 150µg/mL). Sperm quality parameters (IPM, V and NOR) were evaluated every two hours after the addition of extracts until the maximum period of four hours. Then, a new pool of semen was infected with CAEV Cork strain and treated with the respective fraction tests (brute extract, ethyl acetate and ethanol) for 30, 60 and 90 minutes in two concentrations (75µg/mL and 150µg/mL). Then, samples were co-cultured with ovine nictitating membrane cells (NMC) for 63 days, during which nested-PCR was performed to identify pro viral DNA in supernatant collected every seven days and in the respective cellular passage, and RT-nPCR in the supernatant collected a week after the passage. All sperm parameters remained within normal standards for the caprine species in all treatments and with no statistic difference between them ($p > 0.05$). The ethyl acetate and ethanol extracts of *Azadirachta indica* in the concentration of 150µg/mL presented antiviral effect against the lentivirus. However, new

studies must be performed to validate these results. As a general conclusion, this study demonstrated that there is no positive correlation between the incidence of CAEV and *M. agalactiae* in Ceará state. In addition, considering the dissemination of CAE in this state, the ethanol extracts of *Azadirachta indica*, depending on the fraction and concentration, may present a potential inhibition effect against the caprine lentivirus in semen, which may be a valid tool for controlling the virus in reproduction.

Keywords: Goat production. Viral Inactivation. Secondary Infections. Small Ruminant Lentiviruses. Natural Products.

LISTA DE FIGURAS

REVISÃO DE LITERATURA

Figura 1 - Transmissão e patogênese de *Mycoplasma agalactiae*. 22

CAPÍTULO II

Figura 1 - Soroprevalência do vírus da artrite encefalite caprina (CAEV) por Imunodifusão em Gel de Ágar (IDGA) e Western Blot, e do *Mycoplasma agalactiae* por Imunoensaio Enzimático (ELISA) indireto, nas propriedades com rebanho de caprinos leiteiros. 62

Figura 2 - Soroprevalência do vírus da artrite encefalite caprina (CAEV) por Imunodifusão em Gel de Ágar (IDGA) e Western Blot e do *Mycoplasma agalactiae* por Imunoensaio Enzimático (ELISA) indireto em rebanhos de caprinos leiteiros..... 63

Figura 3 - Associação dos resultados do diagnóstico sorológico entre Imunodifusão em Gel de Ágar (IDGA) com Western Blot (WB) para o vírus da artrite encefalite caprina (CAEV), e de ambos com o Imunoensaio Enzimático (ELISA) indireto para *Mycoplasma agalactiae*. ... 63

CAPÍTULO III

Figura 1 - Espermatozoide bicaudal na concentração de 2,25% de dimetilsulfóxido (DMSO) acrescido ao diluente Tris Gema. 81

CAPÍTULO IV

Figura 1 - Desenho esquemático da metodologia utilizada no teste antiviral..... 98

Figura 2 - Cocultivo de sêmen caprino em células de membrana nictitante ovina (MNO) infectado com lentivírus caprino e tratado com distintas frações de extrato etanólico de folhas de *Azadirachta indica* A. Juss. (nim). 104

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO I

Tabela 1. Plantas medicinais de distintas famílias botânicas com atividade antiviral testada. 39

CAPÍTULO II

Tabela 1. Soroprevalência de anticorpos contra o vírus da artrite encefalite caprina (CAEV) e *Mycoplasma agalactiae* em caprinos leiteiros no estado do Ceará..... 61

CAPÍTULO III

Tabela 1. Características espermáticas do pool de sêmen de cinco reprodutores caprinos, refrigerado e diluído em meio essencial mínimo (MEM) ou Tris Gema a 2,5%, acrescido de concentrações crescentes de dimetilsulfóxido (DMSO). 79

Tabela 2. Distribuição percentual de alterações na morfologia espermática de sêmen caprino refrigerado diluído em meio essencial mínimo (MEM) e Tris Gema a 2,5% acrescido de concentrações crescentes de dimetilsulfóxido (DMSO). 80

Tabela 3. Coeficientes de correlação de Pearson das características seminais de sêmen caprino refrigerado e diluído em meio essencial mínimo (MEM) enriquecido com glicose a 0,01M. 82

Tabela 4. Coeficientes de correlação de Pearson das características seminais de sêmen caprino refrigerado e diluído em Tris Gemas a 2,5%. 82

CAPÍTULO IV

Tabela 1. Parâmetros espermáticos do pool de sêmen de cinco reprodutores caprinos, refrigerados e diluídos em meio essencial mínimo (MEM) com adição ou não de distintas frações de extrato etanólico de folhas de *Azadirachta indica* A. Juss. (nim) nas concentrações de 75µg/mL e 150µg/mL. 99

Tabela 2. Distribuição percentual de alterações na morfologia espermática de sêmen caprino refrigerado diluído em meio essencial mínimo (MEM) acrescido ou não de distintas frações de extrato etanólico de folhas de *Azadirachta indica* A. Juss. (nim) nas concentrações de 75µg/mL e 150µg/mL 100

Tabela 3. Resultado do Nested PCR (nPCR) do DNA pró-viral extraído do sobrenadante coletado a cada sete dias do cocultivo de sêmen caprino tratado com distintas frações de extrato etanólico de folhas de *Azadirachta indica* A. Juss. (nim) nas concentrações de 75µg/mL e 150µg/mL 101

Tabela 4. Resultado do Nested PCR e RT-nPCR do DNA pró-viral e RNA viral extraído do sobrenadante das coletas pós-passagem coletado do cocultivo de sêmen caprino tratado com

distintas frações de extrato etanólico de folhas de *Azadirachta indica* A. Juss. (nim) nas concentrações de 75µg/mL e 150µg/mL..... 102

Tabela 5. Nível de efeito citopático das frações de *Azadirachta indica* A. Juss. (nim) na concentração de 150µg/mL que demonstraram inibição do lentivírus caprino no sêmen em cocultivo com células de membrana nictitante ovina (MNO)..... 103

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

A	Anfotericina B
AC	Agalaxia Contagiosa
AGID	Agar Gel Immunodiffusion
CAE	Artrite Encefalite Caprina
CAEV	Vírus da Artrite Encefalite Caprina
CAPES	Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior
CBRA	Colégio Brasileiro de Reprodução Animal
cDNA	Ácido Desoxirribonucleio Complementar
DA	Defeito de Acrossomo
DC	Defeito de Cabeça
DF	Defeito de Flagelo
DMSO	Dimetilsulfóxido
DPI	Defeito de Peça Intermediária
CPE	Efeito Citopático
ECP	Cipionato de Estradiol
ELISA	Imunoensao Enzimático
EMBRAPA	Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária
<i>env</i>	Gene que codifica as proteínas do envelope viral
g/MI	Gramas por mililitro
<i>gag</i>	Gene que codifica as proteínas internas do vírus
gp	Glicoproteína
h	Horas
H1N1	Vírus Influenza
HIV	Vírus da Imunodeficiência Humana
HO	Formas Reativas ao Teste Hiposmótico
HUVA	Herbário da Universidade Estadual Vale do Acaraú
IDGA	Imunodifusão em Gel de Agarose
INTA	Instituto Superior de Teologia Aplicada
IPM	Individual Progressive Motility
LABOVIR	Laboratório de Virologia
LTRs	Long Terminal Repeats

LVPR	Lentivírus de Pequenos Ruminantes
<i>M. agalactiae</i>	<i>Mycoplasma agalactiae</i>
MEM	Meio Essencial Mínimo
MIP	Motilidade Individual Progressiva
MNO	Membrana Nictitante Ovina
NC	Norte Cearense
NO	Normais
NoC	Noroeste Cearense
NOR	Espermatozoides Morfologicamente Normais
OIE	Organização Mundial de Saúde Animal
P/E	Penicilina e Estreptomicina
nPCR	Nested Reação em Cadeia da Polimerase
pH	Potencial Hidrogeniônico
<i>pol</i>	Gene que codifica as enzimas virais
PPGCV	Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias
<i>rev</i>	Gene de regulação viral
RMF	Região Metropolitana de Fortaleza
RNA	Ácido Ribonucleico
rpm	Rotações por Minuto
RT	Reverse Transcriptase
SC	Sertões Cearense
SFB	Soro Fetal Bovino
TCID	Dose Média Infectante em Cultura de Tecido
TR	Transcriptase Reversa
Tris	Tris-hidroximetil-aminometano
UECE	Universidade Estadual do Ceará
UFERSA	Universidade Federal Rural do Semiárido
UFRPE	Universidade Federal Rural de Pernambuco
UVA	Universidade Estadual Vale do Acaraú
V	Vigor Espermático
<i>vif</i>	Gene de regulação viral
<i>vpr-like</i>	Gene de regulação viral
WB	Western Blot

LISTA DE SÍMBOLOS

%	Percentual
°C	Graus Centígrados
µg	Micrograma
µg/mL	Micrograma por mililitro
µL	Microlitro
células/mL	Células por mililitro
cm	Centímetros
cm ²	Centímetros Quadrado
CO ²	Dióxido de Carbono
g	Gramas
G	Força Gravitacional
g/MI	Gramas por mililitro
m	Metro
M	Molar
mL	Mililitro
mOsmol/L	Milésima parte de número de partículas osmoticamente ativas por Litro
nm	Nanômetro

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	20
2. REVISÃO DE LITERATURA	21
2.1 Infecções Secundárias.....	21
2.2 Lentivírus Caprino	23
2.3 Infecção e Transmissão Viral	24
2.4 Antirretrovirais Advindos de Produtos Naturais	27
2.5 <i>Azadirachta indica</i> A. Juss. (nim)	28
3. JUSTIFICATIVA	30
4. HIPÓTESE CIENTÍFICA	31
5. OBJETIVOS.....	32
5.1 Objetivo Geral.....	32
5.2. Objetivos Específicos.....	32
6. CAPÍTULO I.....	33
7. CAPÍTULO II	55
8. CAPÍTULO III.....	72
9. CAPÍTULO IV	91
10. CONCLUSÕES.....	110
11. PERSPECTIVAS	111
12. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	112
APÊNDICES	124
APÊNDICE A – Comitê de Ética I	124
APÊNDICE B – Comitê de Ética II	125
APÊNDICE C – Comprovante de Aceite do Artigo de Revisão	126
APÊNDICE D – Comprovante de publicação do Artigo Técnico I.....	127
APÊNDICE E – Comprovante de Publicação do Artigo Técnico II.....	128

1. INTRODUÇÃO

A produção de pequenos ruminantes tem apresentado um crescimento satisfatório ao longo dos anos, em virtude do aperfeiçoamento e otimização de etapas que compõem o sistema produtivo da ovinocaprino cultura. A partir dessas transformações a criação de caprinos e ovinos dentro do contexto nacional foi impulsionada, possibilitando que a atividade deixasse de ser considerada unicamente de subsistência para se tornar um ramo promissor do setor agropecuário brasileiro (LIMA; BARBOSA FILHO, 2013).

Entretanto, melhores índices produtivos e reprodutivos são limitados por doenças infectocontagiosas que acarretam debilidade na saúde do animal, conseqüentemente prejuízo econômico ao produtor. Dentre essas enfermidades, a Agalaxia Contagiosa (AC) e a Artrite Encefalite Caprina (CAE) tem sido responsáveis por grandes perdas econômicas na criação de pequenos ruminantes, pois são enfermidades que apesar de serem causadas por agentes etiológicos distintos apresentam sintomas semelhantes, de tal modo que há necessidade de um diagnóstico diferencial (MINGUIJÓN et al., 2015).

No caso da AC, causada pelo *Mycoplasma agalactiae*, embora seja emergente na maioria das regiões brasileiras, na região Nordeste ela assume caráter endêmico em alguns de seus estados (SANTOS et al., 2015). Já a CAE, doença de origem viral, cujo vírus pertence ao gênero *Lentivirus*, família *Retroviridae*, é comumente relatada não só no Brasil, mas em vários países, pois é uma enfermidade de patogenia complexa, e soroconversão tardia, e que não apresenta vacina ou tratamento (MUSSI et al., 2015). Além disso, a infecção viral atinge diversos sistemas, inclusive o reprodutivo (SILVA et al., 2013), uma vez que a transmissão pode ocorrer via sêmen advindo de um reprodutor portador da enfermidade (SOUZA et al., 2013), o qual por não existir meios que possibilite o seu uso ou de seu material genético acaba sendo eliminado do plantel como medida preventiva a fim de evitar a propagação da doença no rebanho (RICARTE et al., 2008).

Nesse contexto, tem crescido a busca por novas fontes e métodos a serem empregadas contra o lentivírus caprino, e produtos à base de plantas dissolvidos em dimetilsulfóxido (DMSO) apresentam-se como uma alternativa passível de investigação por antirretrovirais, devendo previamente realizar a seleção e processamento da planta, testes de toxicidade e determinação do princípio ativo até se chegar a uma substância de alta eficácia (KAZIYAMA et al., 2012).

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Infecções Secundárias

A presença do retrovírus no organismo hospedeiro favorece o estabelecimento de doenças oportunistas, as quais na sua grande maioria são de alto impacto econômico no setor pecuário nacional, vindo os animais a apresentarem infecções secundárias em decorrência de uma menor atividade do sistema imunológico acarretado pela contaminação viral (LEITE et al., 2013). Durante essa infecção observa-se que as células mediadoras da resposta imune predispõe uma maior susceptibilidade dos animais a se contaminarem com outros microorganismos, como também pode acelerar a progressão da enfermidade, já que algumas espécies de bactérias, principalmente as do gênero *Mycoplasma* tem potencial de agirem como cofator para a evolução de uma doença viral, por intermédio do favorecimento do ciclo de replicação (JIAN-RU et al., 2012).

A falta de uma parede celular é a principal característica das mais de 160 espécies de micoplasmas pertencentes à classe *Mollicutes*, as quais acarretam infecções de caráter permanente e doenças prejudiciais em humanos e animais (BARANOWSKI et al., 2014; KUMAR et al., 2014). Esses organismos replicam-se de modo autônomo, parasitando o ambiente extracelular das mucosas dos animais (YATOO et al., 2018).

Em pequenos ruminantes dentre a gama de espécies de micoplasmas existentes o *Mycoplasma agalactiae* se destaca por ser o agente causador da Agalaxia Contagiosa (AC) uma doença crônica determinante de perdas econômicas e produtivas, e considerada endêmica em muitos países (GONZALO, 2017). No Brasil já foi registrado a ocorrência desse agente nos estados de São Paulo (AZEVEDO et al., 2015), e Rio de Janeiro (SANTOS et al., 2014). Entretanto, os principais relatos ocorrem na região Nordeste, aonde o mesmo vem se disseminando, em função da comercialização de animais com fins de melhorar geneticamente os rebanhos, havendo relatos na Paraíba e Rio Grande do Norte (AZEVEDO et al., 2006), Pernambuco (ALVES et al., 2013; SANTOS et al., 2018) e Sergipe (SANTOS et al., 2015), sendo detectada principalmente em caprinos, possivelmente pelo maior direcionamento dessa espécie para produção de leite (SILVA et al., 2014).

Dentre as vias de infecção por *Mycoplasma agalactiae* (Figura 1), a oral é comumente considerada como sendo a principal, vindo posteriormente à via mamária e respiratória (GOMES, 2016). Todavia, o contato entre animais infectados por essa bactéria, com ou sem sintomatologia, e a ingestão de água e alimentos contaminados com fluidos corporais contendo a bactéria, propicia a sua rápida disseminação nos rebanhos leiteiros uma vez que a mesma já foi isolada em secreções nasais, fezes e feto (KUMAR et al., 2014).

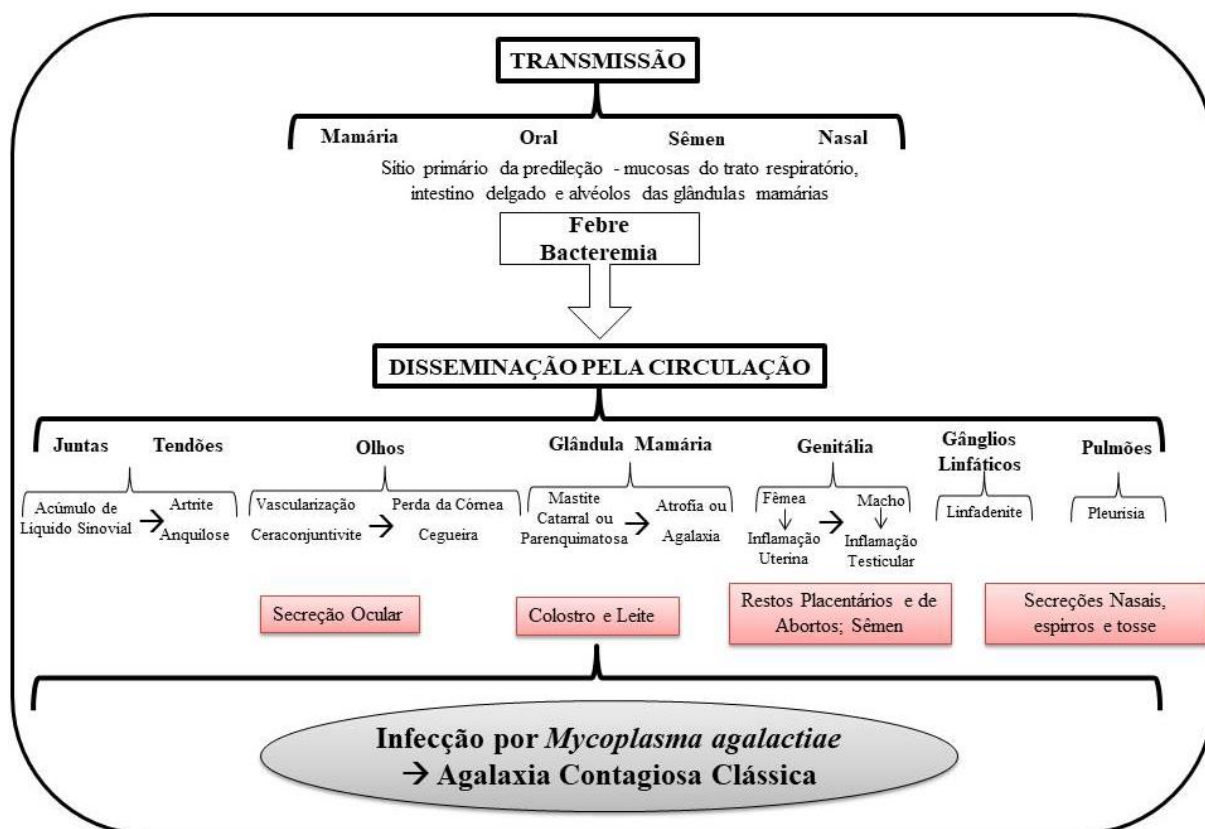


Figura 1 - Transmissão e patogênese de *Mycoplasma agalactiae*.

Fonte: Adaptado de Kumar et al., 2014

Entre os sintomas característicos de infecção por *Mycoplasma agalactiae* estão mastite, artrite, ceratoconjuntivite, pneumonia e redução abrupta da produção de leite (KUMAR et al. 2014), quadro esse similar aos que são observados em animais contaminados com lentivírus caprino, os quais tendem a apresentar quando não assintomáticos, havendo necessidade de um diagnóstico diferencial a ser relacionado com os sinais clínicos. Além disso, a presença de lesões articulares tendem a predispor o desenvolvimento de micoplasmose (GREGORY et al., 2006), favorecida pela queda no sistema imune do animal quando houver ação conjunta viral.

Dessa forma, diante de uma situação de coinfeção o sistema imunológico e seus mecanismos exercem uma relação direta na evolução patogênica das doenças infecciosas, de tal modo que quando um agente viral acarreta mudanças imunológicas interferem na incidência, resposta imune e expressões clínicas de enfermidades oportunistas (SOUZA et al., 2009). No entanto, há uma interação complexa entre lentivírus e micoplasma, pois ao atuarem sobre o sistema imunológico de seu hospedeiro eles se afetam mutuamente, tornando a função dos macrófagos reduzida, bem como a produção de anticorpos, e propicia desequilíbrio de citocinas em virtude de modificações ao longo do processo de produção destas (NORONHA FILHO et al., 2006).

Nesse contexto, como artrite encefalite caprina e agalaxia contagiosa estão entre as principais enfermidades que afetam os rebanhos leiteiros (ALBUQUERQUE et al., 2014), as chances destas atuarem concomitantemente e ocasionar prejuízos econômicos devem ser consideradas, a fim de elaborar programas sanitários eficazes, pois surtos dessas doenças vem aumentando ao longo do Brasil, e em especial na região Nordeste.

2.2 Lentivírus Caprino

O lentivírus caprino juntamente com o vírus Maedi-Visna engloba o grupo denominado de lentivírus de pequenos ruminantes (LVPR), os quais são retrovírus não oncogênicos, responsáveis por acarretar perdas produtivas e reprodutivas, e consequentemente econômicas (AZEVEDO et al., 2018). Aos LVPR são atribuídos cinco diferentes grupos genéticos classificados de A a E, sendo os mais comuns os grupos A e B, variados em inúmeros subtipos (REINA et al., 2010; RACHID et al., 2013), e anteriormente considerados patógenos específicos, porém já se sabe que há ocorrência de transmissão interespecie (RAMÍREZ et al., 2013; SOUZA et al., 2015a).

Dessa forma, as características citopáticas, bem como o local dos receptores que irão interagir com determinadas proteínas virais (favorecendo a entrada do agente infeccioso), e a patogenicidade de cada estirpe viral tendem a sofrer alterações devido à alta diversidade genética presente nos LVPR (RACHID et al., 2013).

Estruturalmente os lentivírus apresentam uma forma esférica, medindo de 80 a 100nm envelopado por uma bicamada de lipídeos, a qual surge da membrana celular da célula hospedeira (ROSA et al., 2016). No envelope está contido glicoproteínas de superfície e transmembranar, sendo as principais a gp135 e gp38 respectivamente, que juntamente com a p28, presente no capsídeo determinam a produção de anticorpos pelo organismo do animal infectado (QUINN et al., 2005).

O genoma do lentivírus caprino é representado por duas fitas similares e lineares de ácido ribonucleico (RNA), de cadeia simples e sem complementariedade (SILVA; LIMA, 2007). Há ainda em sua composição genes estruturais (*gag*, *pol* e *env*) e acessórios (*vif*, *vpr-like* e *rev*), todos esses com funções distintas que variam desde a codificação de proteínas (*gag*) e glicoproteínas (*env*), até a codificação das denominadas enzimas virais (protease, transcriptase reversa e protease) pelo gene *pol* (VILLET et al., 2003; STONOS et al., 2014; MINGUIJÓN et al., 2015).

Dentre os inúmeros vírus existentes, os retrovírus se destacam por seu potencial de inserir genoma viral no organismo hospedeiro, sendo essa etapa essencial para o processo de replicação viral que ocorre em células do sistema imunológico (VAN DER KUYL, 2012).

Nesse processo replicativo os genes *vpr-like* e *vif* são os que atuam diretamente por codificar proteínas não estruturais, porém o *vif* irá determinar a eficácia da replicação e do potencial patogênico viral (VILLET et al., 2003; STONOS et al., 2014). Adicionalmente, o funcionamento correto das chamadas “long terminal repeats” (LTRs), regiões terminais não codificantes, são primordiais para o avanço do ciclo viral, pois durante o processo de transcrição reversa essas regiões acabam sendo formadas, e por intermédio delas os retrovírus inserem sequências virais no genoma da célula hospedeira (PERRONE et al., 2017). Esse tipo de vírus ainda faz uso de mutações que em geral ocorre com frequência como uma alternativa para fugir do sistema imunológico (RAMÍREZ et al., 2013). As maiorias dessas mutações giram em torno de alterações de aminoácidos ocorrentes na replicação viral, e como a transcriptase reversa não consegue efetuar as devidas correções, gera uma alta diversidade genética, fato que dificulta a terapia antirretroviral (VALLUEV-ELLISTON; KOCHETKOV, 2017).

2.3 Infecção e Transmissão Viral

Os retrovírus necessitam dos mecanismos de uma célula hospedeira para poderem se replicar e gerarem partículas infecciosas. No entanto, por se tratar de um RNA vírus há a necessidade de ser reversamente transcrito em DNA, ocorrendo via transcriptase reversa, pois essa enzima realiza a conversão genética de RNA viral de fita simples em sua cópia de DNA de fita dupla, conhecido como DNA pró-viral (PIEKNA-PRZYBYLSKA; BAMBARA, 2013). Além dessa função a transcriptase reversa desempenha atividades catalíticas, podendo completar a síntese de DNA ou degradar híbridos de RNA/DNA em RNA (VALLUEV-ELLISTON; KOCHETKOV, 2017).

As interações com alto padrão de complexidade entre proteínas caracterizam as etapas iniciais no processo de infecção, pois a glicoproteína de superfície (gp135) se liga ao seu receptor proteico situado na célula hospedeira (SEITZ, 2016), havendo um tropismo celular pelas células do sistema monocítico-fagocitário (SOUZA et al., 2015c), as quais estão sujeitas a expressarem produtos virais e efeitos citopáticos (MANEL et al., 2005), sendo os macrófagos preferencialmente infectados, o que possibilita sua disseminação pelo organismo animal (BLACKLAWS, 2012).

Logo que ocorre a incorporação das membranas virais e celulares o capsídeo viral é movido para o citoplasma, onde por meio de reações envolvendo mudanças de potencial hidrogeniônico (pH) há a liberação do seu conteúdo causando a ativação da transcriptase reversa, e posterior transcrição do genoma viral, finalizando com a integração do DNA pró-viral na célula hospedeira por ação da enzima integrase, e com isso ocorre o estabelecimento da infecção (SEITZ, 2016). A ocorrência de uma infecção resistente se dá por vários mecanismos que evolutivamente os lentivírus foram desenvolvendo, como por exemplo, à presença de provírus junto ao genoma dos monócitos, o potencial do vírus de infectar macrófagos sem causar sua lise, e redução do processo replicativo em função da produção de interferon (CALLADO et al., 2001).

No entanto, mesmo havendo a replicação viral essa pode ocorrer de forma restrita, propiciando que o vírus permaneça latente nos monócitos dos hospedeiros sem ser detectado pelo sistema imune (PAULA et al., 2008). E, conseqüentemente mesmo havendo a contaminação do animal nem sempre irá expressar uma sintomatologia característica da doença, podendo se comportar assintomaticamente por longo tempo, e vindo expressar a forma clínica da enfermidade, em geral, quando oriundo de rebanhos com alta soropositividade (BEZERRA et al., 2014).

No caso de reprodutores quando esses se apresentam infectados pelo lentivírus caprino, e assintomáticos, o mesmo torna um propagador e disseminador desse patógeno dentro do rebanho, principalmente quando são doadores de sêmen para as centrais de inseminação artificial (ANDRIOLI et al., 2003), e pelo hábito de compartilhamento de reprodutores entre propriedades. Adicionalmente, a inexistência de técnicas que possibilitem a utilização do sêmen de um reprodutor acometido por algum agente vírico acaba por resultar na perda de material genético, em virtude da eliminação do animal do plantel como medida preventiva para evitar a transmissão da enfermidade (RICARTE et al., 2008).

No entanto, há relatos que comprovam que o animal portador do vírus pode manter a sua fertilidade e libido no mesmo nível de animais não infectados da mesma raça e idade (ANDRIOLI et al., 2002). Mas, a carga viral no sêmen influencia a transmissão do vírus (FIDELI et al., 2001) e sabe-se que alguns fatores promovem o aumento desta no sêmen, como a inflamação do trato reprodutor (ANDRIOLI et al., 2006) e o estresse (PAULA et al., 2009).

A transmissão do lentivírus caprino pode ocorrer por diversas vias, como pela ingestão de colostro ou leite contaminado, uma vez que o mesmo está presente na sua forma livre ou associada ao genoma da célula hospedeira, e via respiratória, onde o contato de animais sadios

com os portadores do vírus favorece a disseminação do mesmo no rebanho (GUILHERME et al., 2017).

No que diz respeito à transmissão vertical diversos trabalhos já comprovaram a existência do vírus em sua forma livre em ovócitos e no fluido uterino de animais infectados (ANDRIOLI, 2001; BLACKLAWS et al., 2004; CAVALCANTE et al., 2013, HASEGAWA et al., 2017), porém a transmissão em si ainda não foi comprovada. Além disso, há relatos da infecção *in vitro* de células da granulosa dos folículos dos ovários, fato esse potencialmente perigoso em procedimentos *in vitro* de fertilização e transferência de embriões (LAMARA et al., 2001; LAMARA et al., 2002) e da presença de ácido desoxirribonucleico (DNA) pró-viral do CAEV no útero e nas trompas uterinas de fêmeas inseminadas com sêmen contaminado (ALI AL AHMAD et al., 2012). A transmissão de forma indireta pode ocorrer através de fômites contaminados, e compartilhados em atividades de manejo, favorecendo assim a disseminação da doença dentro de um plantel (BLACKLAWS et al., 2004).

Todas essas vias são favorecidas pela ocorrência do vírus em diversos fluidos corporais como sangue (PINHEIRO et al., 2010), sêmen (GREGORY et al., 2011), fluido uterino (CAVALCANTE et al., 2013), soro fetal (LÓPEZ et al., 2012), saliva (SOUZA et al., 2015b), e leite (LIMA et al. 2017), bem como no ambiente, água e ar (VILLORIA et al., 2013), fato que evidencia a patogenicidade desse microorganismo, e sua dispersão pelo organismo animal e instalações.

As superfícies mucosas intestinais e respiratórias, em geral, são a via de entrada para a ocorrência de uma infecção natural de LVPRs (BLACKLAWS, 2012). Entretanto, já foi relatado o potencial da via reprodutiva na disseminação da enfermidade dentro de um rebanho, tendo em vista que além do sêmen, já se detectou a presença de DNA pró-viral do lentivírus caprino nas glândulas acessórias e em tecidos genitais de animais, tanto aqueles infectados experimentalmente quanto naturalmente (TRAVASSOS et al., 1999; ANDRIOLI et al., 1999; ALI AL AHMAD et al., 2008; PETERSON et al., 2008). Ademais, há relatos ainda da transmissão via inseminação artificial ou natural usando sêmen contaminado (ALI AL AHMAD et al., 2012; SOUZA et al., 2013; TURCHETTI et al., 2013), vindo a representar um risco considerável na propagação do vírus da artrite encefalite caprina (CORTEZ-ROMERO et al., 2013).

O controle da infecção viral é difícil tendo em vista a falta de uma vacina eficiente e a abrangência desta enfermidade em rebanhos de excelente qualidade zootécnica e de alto valor genético e econômico (GREGORY et al., 2011). Como também não há um tratamento eficaz, a sociedade científica vem cada vez mais direcionando os estudos para meios alternativos, que

possibilitem principalmente a utilização de sêmen de reprodutores de alta genética e valor zootécnico, e que possam atuar em distintas etapas do processo infeccioso viral.

2.4 Antirretrovirais Advindos de Produtos Naturais

A capacidade curativa das plantas é bastante antiga, ao ponto de coincidir com o surgimento da civilização humana no mundo. A percepção de princípios ativos nas essências dessas foi denotada já pelas primeiras civilizações, devido ter se mostrado eficazes no que diz respeito ao seu poder curativo no combate às doenças (BADKE et al., 2011).

A utilização destas, com fim terapêutico, têm crescido de forma substancial ao redor do mundo, concentrando principalmente no combate às doenças crônicas, no formato de terapia antirretroviral (HSIAO et al., 2003; LEE, ANDRADE, FLEXNER, 2006).

Na literatura já existem diversos trabalhos que detectaram a ação antiviral de extratos vegetais contra doenças víricas em humanos e animais (ARAÚJO, 2008; KIM, NARAYANAN, OKCHANG, 2010; NOLKEMPER et al., 2010; KAPEWANGOLO et al., 2013; FENG et al., 2017). Entretanto, poucas espécies têm sido estudadas, e seus efeitos químicos e farmacológicos potencialmente úteis no combate às doenças infecciosas acabam por ficar no desconhecimento. Mas com a descoberta de compostos antivirais na atualidade e dependendo para qual tipo de infecção, poderá até mesmo ser equivalente a época do desenvolvimento dos antibióticos, e iniciar uma nova era na medicina humana e veterinária (SIMONI, 2003).

Assim, os produtos naturais desempenham importante função contra doenças infecciosas, uma vez que são considerados como grandes agentes anti-infecciosos com capacidade de durante a biossíntese viral interferir em um ou mais etapas, além de serem capazes de inativar extracelularmente o vírus (DEMAIN, 2009; TAFURI, 2011). As diversas habilidades de replicação viral em culturas celulares, tais como efeito citopático (CPE) ou formação de placas de lise, em geral são os métodos tradicionalmente úteis na avaliação *in vitro* da atividade antiviral de algum produto natural. A detecção de DNA, RNA e polipeptídeos virais por técnicas moleculares também é uma forma eficaz de monitoramento do processo replicativo (COS et al., 2006).

Nos animais o emprego de plantas medicinais, bem como de seus extratos pode ser utilizado em uma vasta lista de enfermidades, como por exemplo, as respiratórias, entéricas, as causadas por endo e ectoparasitas e ainda as ocasionadas pelos diversos patógenos (SIMONI, 2009). Dentre aquelas de origem viral, nos casos dos pequenos ruminantes, uma possibilidade são as retroviroses, na qual se inclui a artrite encefalite caprina, cuja ausência de

vacina e tratamento eficaz incentiva às pesquisas em formas alternativas, como os antivirais, para o controle da doença.

A busca por princípios ativos em extratos de plantas com potencial ação antiviral não deve ser realizada aleatoriamente, sendo um processo difícil e bastante oneroso. É interessante que esta, seja embasada no uso medicinal e pesquisas prévias, levando-se em questão a planta escolhida (SIMONI, 2009).

Assim, com base nesses critérios tem se observado a utilização de plantas da família *Meliaceae*, tais como *Azadirachta indica* A. Juss. (nim) em diversos estudos, demonstrando inúmeras aplicações, como por exemplo, atividade antiviral, tanto na medicina humana quanto na veterinária (FACCIN-GALBARDI et al., 2012; BHARITKAR et al., 2013; JAFARI et al., 2013; KUMAR; NAVARATNAM, 2013). Salientando que extratos de fitocompostos de *Azadirachta indica* A. Juss. (nim) quando testados em culturas de células fibroblásticas de caprinos tiveram ação antiviral comprovada contra o CAEV (ARAÚJO, 2008), sendo portanto alternativas a serem testadas para a inativação do lentivírus caprino em meios e diluidores de sêmen, pois de forma preventiva e agregação de valor, viabilizaria a comercialização segura do material genético.

2.5 *Azadirachta indica* A. Juss. (nim)

O Nim (*Azadirachta indica* A. Juss.) pertence à família *Meliaceae*, é uma árvore nativa de Burna, atual Myanmar, e de regiões áridas do subcontinente indiano, empregada há milhares de anos com as mais variadas finalidades (FORIM, 2006). Nos dias atuais, além de ser encontrada em países asiáticos e africanos, é encontrado na Austrália, América Central, regiões tropicais da América do Norte e na América do Sul (KETKAR; KETKAR, 1997). Em 1986, foram introduzidas as primeiras espécies dessa árvore no Brasil, na cidade de Londrina, com fins de estudo de planta inseticida (MARTINEZ, 2002).

Climas tropicais e subtropicais são ambientes preferenciais para o crescimento do Nim (VERKERK; WRIGHT, 1993). Essa árvore apresenta um porte variável, de 15 a 20m de altura, com tronco contendo de 30 a 80cm de diâmetro, podendo ser semi reto a reto, de coloração marrom-avermelhada. A copa geralmente tem um diâmetro que varia de 8 a 12m, apesar de alguns exemplares dessa árvore chegar até 15m. As folhas são imparipenadas com folíolos alternados, são sempre verdes caindo apenas em situação de extrema seca. O sistema radicular do Nim é uma raiz pivotante com penetração profunda no solo. As flores são bissexuadas, pequenas de coloração branca, com brotamento em feixes axiais que normalmente atraem muitas abelhas por ter aroma semelhante a mel. Os frutos ocorrem 3 a 5

anos pós plantio, se caracterizando por serem lisos, elipsoides e glabros, os quais maduros assumem coloração amarela, com as sementes envolta por uma polpa doce, com casca e um ou mais caroços (MARTINEZ, 2002; MOSSINI; KEMMELMEIER, 2005).

Quanto à composição química do Nim ela apresenta mais de 135 compostos isolados, que em geral são pertencentes à classe dos triterpenos, com maior concentração dos limonoides, vindo a azadiractina ser o composto mais pesquisado e potente (BRASIL, 2010). A maioria das substâncias bioativas dessa árvore é encontrada em toda a planta, porém aquelas com concentrações primariamente evidenciadas nas sementes e folhas apresentam-se mais concentrados e com melhor acessibilidade, sendo perfeitamente passível de ser extraído em água e solventes orgânicos (hidrocarbonetos, álcoois, cetonas ou éteres) (LEE et al., 1988; MARTINEZ, 2002).

No processo de extração, utilizando-se de solventes orgânicos, consegue-se a produção de compostos com grande atividade biológica, que posteriormente por meio de métodos de separação, torna-se possível realizar o isolamento e identificação dos compostos (MOSSINI; KEMMELMEIER, 2005).

A aplicação do Nim é bastante diversificada podendo exercer efeito de suplemento nutricional (ANANDAN, 1996), atividade praguicida (MARTINEZ, 2002), propriedades anti-helmíntica em ratos e cordeiros (GITHITORI et al., 2003; HORDEGEN et al., 2003) e ainda atividades antifúngicas, antimicrobianas e antivirais (MOSSINI; KEMMELMEIER, 2005; GIRISH; SHANKARA, 2008; FACCIN-GALBARDI et al., 2012).

3. JUSTIFICATIVA

O lentivírus caprino apresenta-se disseminado em muitos estados brasileiros, fato que propicia a ocorrência de infecções secundárias, as quais comumente são evidenciadas em animais acometidos por alguma enfermidade viral. Com base nisso, observa-se que infecções por *Mycoplasma agalactiae* vem sendo diagnosticado em muitos estados nordestinos, ocasionando perdas econômicas e queda de produtividade nos rebanhos leiteiros, porém no estado do Ceará a situação dos nossos rebanhos frente a esse agente é desconhecida. Nesse contexto, determinar a ocorrência ou não desse agente nas diversas regiões cearenses passa a ser fundamental, não apenas para se estabelecer práticas sanitárias adequadas, mas também observar se o *Mycoplasma agalactiae* está atuando em conjunto com o lentivírus caprino, uma vez que esse último vem acometendo grande parte dos rebanhos leiteiros do estado do Ceará, podendo assim favorecer o estabelecimento da bactéria causadora da Agalaxia Contagiosa.

Adicionalmente por não haver uma vacina ou tratamento eficaz, muitos reprodutores de alta qualidade genética, porém portadores do lentivírus caprino acabam sendo eliminados dos rebanhos. Dessa forma, há a necessidade de buscar métodos que possa evitar a disseminação do vírus pela via reprodutiva, e conseqüentemente garantir a qualidade sanitária do sêmen.

Assim, extratos etanólicos de plantas medicinais com atividade antiviral, de baixa toxicidade, acrescidos aos meios de processamento de sêmen, podem ser de grande valor para se conseguir essa premissa. No caso do sêmen caprino, o antiviral poderá ser adicionado ao meio de lavagem, comumente utilizado para o seu congelamento, ou no próprio diluidor do sêmen, utilizado para inseminação artificial, tanto com sêmen fresco quanto no sêmen congelado. Com isso, o uso do antiviral no sêmen seria uma forma de prevenção da transmissão do lentivírus caprino, como procedimento adotado em centrais de processamento de sêmen, por ser uma alternativa segura para o aproveitamento do animal de grande valor genético, porém portador do CAEV. O antiviral poderá ser desta forma, utilizado como forma preventiva e com valor agregado na garantia sanitária deste produto para comercialização nacional ou até mesmo internacional, evitando dessa forma o estabelecimento de infecções secundárias.

4. HIPÓTESE CIENTÍFICA

O controle da artrite encefalite caprina nos rebanhos leiteiros do estado do Ceará pode ser realizado com extratos etanólicos de folhas de *Azadirachta indica* A. Juss. (nim) pelo tratamento do sêmen dos reprodutores mesmo em rebanhos coinfectados com *Mycoplasma agalactiae*.

5. OBJETIVOS

5.1 Objetivo Geral

- ❖ Determinar a ocorrência de coinfeção pelo lentivírus caprino e *Mycoplasma agalactiae* nos rebanhos leiteiros do Ceará, bem como avaliar *in vitro* a atividade antiviral de extratos etanólicos de *Azadirachta indica* A. Juss. (nim) contra esse lentivírus presente no sêmen caprino.

5.2. Objetivos Específicos

- ❖ Detectar a presença de anticorpos anti-lentivírus caprino e anti-*Mycoplasma agalactiae* nos rebanhos leiteiros do estado do Ceará;
- ❖ Determinar se há relação entre a artrite encefalite caprina e agalaxia contagiosa em rebanhos leiteiros cearenses;
- ❖ Determinar a concentração não tóxica ao espermatozoide caprino do solvente (dimetilsulfóxido - DMSO) utilizado na dissolução dos extratos etanólicos de *Azadirachta indica* A. Juss. (nim);
- ❖ Determinar a toxicidade do fitocomposto *Azadirachta indica* A. Juss. (nim) aos espermatozoides caprinos, e sem interferência na sua fertilidade;
- ❖ Inativar o lentivírus caprino no sêmen (testes *in vitro*) tratado com fitocompostos de *Azadirachta indica* A. Juss. (nim), através de cocultivo em membrana nictitante ovina (MNO);
- ❖ Elaborar protocolos de processamento de sêmen utilizando fitocompostos.

6. CAPITULO I

Perspectivas do uso de fitoterápicos no tratamento do sêmen caprino infectado pelo vírus da artrite encefalite caprina

Prospective of herbal remedies in the treatment of caprine semen infected by Caprine Arthritis Encephalitis virus

Renato Mesquita **Peixoto**, Maria Fátima da Silva **Teixeira**, Alice **Andrioli**, Raymundo Rizaldo **Pinheiro**, Antonio Adailson de Sousa **Silva**, Tereza D'Ávila Freitas **Aguar**, Dalva Alana Aragão de **Azevedo**, Ana Lúcia Madeira de **Sousa**

Periódico: **Revista Científica Medicina Veterinária** (ISSN: 1809-4678)

(Aceito para Publicação em Junho de 2018)

Qualis: B3 na Medicina Veterinária

**Perspectivas do uso de fitoterápicos no tratamento do sêmen caprino infectado pelo
vírus da Artrite Encefalite Caprina**

*[Prospectives of herbal remedies in the treatment of caprine semen infected by Caprine
Arthritis Encephalitis virus]*

Renato Mesquita **Peixoto**^{1*}, Maria Fátima da Silva **Teixeira**¹, Alice **Andrioli**², Raymundo
Rizaldo **Pinheiro**², Antonio Adailson de Sousa **Silva**³, Tereza D'Ávila Freitas **Aguiar**¹, Dalva
Alana Aragão de **Azevedo**¹, Ana Lúcia Madeira de **Sousa**¹

¹ Laboratório de Virologia, Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias,
Universidade Estadual do Ceará, Fortaleza, CE, Brasil

² Embrapa Caprinos e Ovinos, Sobral, CE, Brasil

³ Departamento de Fisiologia e Farmacologia da Universidade Federal do Ceará, Fortaleza,
CE, Brasil

* Autor para correspondência/Corresponding author: renatomiraima@gmail.com

Resumo

A transmissão da artrite encefalite caprina pelo sêmen inviabiliza o uso de reprodutores soropositivos de alto valor genético. Como o vírus da artrite encefalite caprina (CAEV), é encontrado no sêmen na forma de RNA viral (vírus livre) ou DNA pró-viral dentro das células não espermáticas, possibilita que pesquisas com plantas com potencial antiviral sejam algo promissor para viabilizar o sêmen de reprodutores caprinos de grande valor zootécnico infectados. Diante disso, com essa revisão objetivou-se elucidar o potencial de fitocompostos, com comprovada ação antiviral, que poderiam vir a ser alvo de estudo para inativar o lentivírus caprino no sêmen. Inúmeras plantas de muitas famílias botânicas já foram estudadas para validação de efeito antiviral contra diversos vírus que acometem animais e humanos. Folhas, raízes, flores, e sementes demonstraram ao longo do tempo em sua constituição

fitoquímica substâncias antivirais promissoras. De acordo com o tipo de planta, não apenas algumas partes dela, mas regiões inteiras da mesma são alvos das pesquisas por fitocompostos a ser usado como alternativa no combate as doenças virais. A base dos estudos nessa vertente são os metabólitos secundários, pois nas pesquisas têm apresentado compostos bioativos antivirais de alto potencial atuando nas diferentes fases do ciclo de desenvolvimento viral. Dessa forma, a biodiversidade da flora brasileira aliada à tendência de formar fitocompostos poderiam contribuir no avanço das pesquisas, a fim de encontrar uma alternativa de base natural, potencialmente eficaz, para eliminar os riscos de transmissão do CAEV pelo sêmen.

Palavras-chave: antiviral; caprinos; extrato de plantas; produtos naturais; retrovirose

Abstract

The transmission of Caprine Arthritis Encephalitis in semen limits the use of seropositive bucks that have high genetic value. The Caprine Arthritis Encephalitis virus (CAEV) may be found in the form of RNA virus (free virus) or pro-viral DNA within non-spermatogenic cells in semen. Thus, researches involving plants with potential antiviral activity are promising for developing techniques that allow the use of semen from high-quality production goats that are infected by this virus. Therefore, this review aimed to elucidate the potential of phytochemicals that have known antiviral activity and could be used in studies to assess inactivation of the caprine lentivirus in semen. Several plants from many botanical families have been tested for validation of antiviral effect against viruses that infect animals and humans. Leaves, roots, flowers and seeds have demonstrated promising antiviral substances in their phytochemical composition. According to the type of plant, entire regions of specimens are used for researching phytochemicals that can serve as alternatives in the treatment of viral diseases. Most of the studies involving this subject focus on secondary metabolites and several have identified high potential compounds with bioactive antiviral activity in different stages of viral development cycle. Hence, the biodiversity of Brazilian flora, which have a

tendency for phytochemical formation, provide adequate material for researches aimed at finding a natural alternative to eliminate the risk of CAEV transmission through semen.

Keywords: antiviral; caprine; plant extract; natural products; retrovirus

Introdução

As infecções virais estão entre as principais causas de enfermidades que acometem humanos e animais, sendo que muitas ainda permanecem com a inexistência de tratamento, ou ocasionadas por vírus que desenvolveram certa resistência aos medicamentos antivirais tradicionais (Bagla et al., 2012). Dentre essas enfermidades está a artrite encefalite caprina (CAE), a qual é ocasionada por um vírus de ácido ribonucleico (RNA) pertencente ao gênero *Lentivirus*, família *Retroviridae* (Minguijón et al., 2015; ICTV, 2017) que se caracteriza por ampla variabilidade genética, e com capacidade de ser transmitido pelo uso de sêmen contaminado, tanto via inseminação artificial quanto no acasalamento (Souza et al., 2013; Turchetti et al., 2013).

A transmissão do vírus da artrite encefalite caprina (CAEV) via sêmen, inviabiliza o uso de reprodutores soropositivos de alto valor genético, trazendo restrições ao uso de biotecnologias reprodutivas (Cortez-Romero et al., 2013). Adicionalmente, a presença deste em fluidos e secreções, na forma de RNA viral (vírus livre) ou ácido desoxirribonucleico (DNA) pró-viral, dentro das células não espermáticas existentes no sêmen, preconizam a utilização de técnicas de lavagem como *swim-up* e centrifugação em gradiente de Percoll, visando separar os espermatozoides do plasma seminal de animais infectados. Entretanto, essas técnicas não eliminam o vírus e realizam apenas a redução da carga viral do patógeno (Peterson et al., 2008; Ávila et al., 2015).

Dessa forma, por não existir ainda um tratamento eficaz no combate ao lentivírus caprino, e nenhuma vacina disponível no mercado (Tu et al., 2017), se faz necessário a busca

por métodos alternativos potencialmente capazes de serem usados no combate a esse vírus. Dentro dessa premissa, produtos a base de plantas com inúmeras atividades biológicas apresentam-se promissores para o desenvolvimento de compostos antivirais (Rebensburg et al., 2016) capazes de inativar o vírus no sêmen, viabilizando o melhor uso de reprodutores de alto valor genético, porém portadores do CAEV. Portanto, o objetivo da presente revisão é elucidar o potencial de fitocompostos, com comprovada ação antiviral, que poderiam vir a ser alvo de estudo para inativar o lentivírus caprino no sêmen.

Presença do lentivírus caprino no sêmen e sítios de ação antirretroviral

O sistema monocítico-fagocitário preferencialmente é o local onde ocorre a infecção pelo lentivírus caprino, acarretando uma infecção estável, sem lise celular, e cujo estado de maturação das células determina a expressão do genoma viral (Tu et al., 2017). Além disso, o processo replicativo, conduzido pela transcriptase reversa, caracteriza-se por altas taxas de mutação que acarreta uma ampla diversidade genética (L'Homme et al., 2015).

No ejaculado, os leucócitos são as principais células portadoras do vírus na forma de DNA pró-viral, com a infecção sendo originada da presença dos vírus nos testículos, epidídimo, e glândulas acessórias (Al Ahmad et al., 2008; Lamara et al., 2013; Souza et al., 2014), porém a presença dele na sua forma livre também já foi relatada (Peterson et al., 2008). No que diz respeito ao espermatozoide, Ricarte et al. (2010) avaliando a ocorrência de lentivírus caprino em espermatozoides, pelo teste de imunohistoquímica, obtiveram positividade para a proteína p28 do CAEV, mas na microscopia eletrônica o vírus foi observado somente na peça intermediária.

Alguns estudos ainda demonstraram que a presença do vírus no sêmen é intermitente e que sua presença tende a ser maior quando ocorre algum processo inflamatório na região genital do animal (Travassos et al., 1999; Cortez-Romero et al., 2013). Mas mesmo assim, a

presença desse patógeno no sêmen não interfere nos parâmetros seminais que são condizentes com os desejáveis para a espécie caprina (Paula et al., 2009; CBRA, 2014).

Entretanto, como forma de evitar a transmissão do vírus, em geral, o recomendado é a retirada do reprodutor do plantel, restringindo a sua utilização como doador de esperma, e dessa forma, implicando perdas econômicas, como também de material genético. Diante disso, o desenvolvimento de produtos com potencial antiviral além de inativar o vírus no ejaculado, poderia permitir a volta à atividade reprodutiva desses animais.

A maioria dos retrovírus e, entre eles o lentivírus caprino, estão incluídos em um grupo de grande heterogeneidade e de alta capacidade de mutação, resultando em elevada variabilidade genética (Minguijón et al., 2015). Desse modo, tratamentos que visem o combate à enfermidade de origem retroviral devem ser embasados no emprego de substâncias que apresentem potencial de impedir a síntese de RNA (Dan e Castellar, 2015). A replicação dos retrovírus na célula hospedeira depende necessariamente da transcriptase reversa, integrase e protease (Kenyon e Lever, 2011), porém a transcriptase reversa e a integrase são os principais alvos na busca por antivirais, por serem enzimas fundamentais ao longo do processo replicativo retroviral (Gu et al., 2016). Mas inibidores de protease também podem ser levados em consideração nas pesquisas por antivirais advindos de produtos naturais, pois como ela transforma proteínas estruturais em enzimas virais a partir da clivagem de poliproteínas, uma vez que esse processo é inibido, conseqüentemente essas poliproteínas não serão clivadas determinando a formação apenas de vírions não infecciosos (Silva et al., 2016).

Assim, os sítios de ação de um antirretroviral são voltados a todo o processo de replicação do vírus, pois como os mesmos necessariamente precisam estar infectando uma célula hospedeira para poder se desenvolver métodos que possibilite inibir a fixação e entrada deste no organismo, funcionaria como uma medida de prevenção que viria a limitar a

disseminação do vírus pelo organismo (Yeh e Coen, 2011). Desse modo, os fitoterápicos com potencial efeito antiviral devem apresentar a capacidade de atuar nas diversas etapas por meio do qual o vírus exerce sua replicação, e preferencialmente inibir a transcriptase reversa e atingir a produção de ácidos nucleicos, bem como de proteínas sintetizadas pelo próprio vírus e não as do hospedeiro (Ministério da Saúde, 2008).

Produtos naturais com potencial antiviral

A utilização de plantas medicinais com indício de atividade antiviral tem sido estudada ao longo do tempo, tendo como base distintas plantas das mais variadas famílias botânicas (Tabela 1). A ampla maioria dessas pesquisas tem como intuito validar os princípios ativos dessas plantas e aperfeiçoar o seu uso prático no combate as retrovirose, principalmente direcionadas contra os lentivírus de primatas, incluindo principalmente o ser humano (Zhang et al., 2017). Diante disso, a busca por substâncias antivirais, tem visto nos produtos a base de plantas uma rica fonte por meio do qual é possível conseguir fitocompostos com ação potencial contra as mais diversas enfermidades de origem viral. E, ao longo do tempo, evidencia-se que inúmeras plantas das mais variadas famílias botânicas, vem demonstrando uma interação com as etapas que compõem o ciclo viral (Lin et al., 2014).

Tabela 1. Plantas medicinais de distintas famílias botânicas com atividade antiviral testada.

Planta	Família Botânica	Parte da Planta Utilizada	Tipo de Extrato	Principal composto fitoquímico	Vírus	µg/mL	Sítio de Ação	Referência
<i>Sesbania grandiflora</i>	Fabaceae	Flores	Etanólico	Flavonoides	Herpes simples 1 e 2	20 a 45	Replicação do vírus e atividade imunomoduladora	Arthanari et al. (2012)
<i>Podocarpus henkelii</i>	Podocarpaceae	Folhas	Etanólico	Biflavones, terpenoides e dilactonas	Cinomose Canina e Doença da Pele Grumosa Vírus da	3,0	Replicação do vírus	Bagla et al. (2012)
<i>Avicennia marina</i>	Acanthaceae	Folhas	Etanólico	Flavonoides, fenol e taninos	Imunodeficiência Humana (HIV)	372 a 489	Transcriptase Reversa e DNA polimerase	Beula et al. (2012)
<i>Melia azedarach</i>	Meliaceae	Folhas	Etanólico	Flavonoides	Herpes	62,5	Transcrição Viral	Bueno

					Simple	Tipo			et al. (2012)
					1				
<i>Azadirachta indica</i>	Meliaceae	Folhas	Aquoso	Arabinose e galactose	Poliovírus tipo 1	12,1 a 80	Replicação Viral		Faccin-Galhardi et al., 2012
<i>Alpinia katsumadai</i>	Zingiberaceae	Sementes	Etanólico	Flavonoides	Rotavírus bovino e suíno	7 a 33,7	Adsorção viral		Kim et al. (2012)
<i>Plectranthus barbatus</i>	Lamiaceae	Folhas	Etanólico	Diterpenoides	Vírus da Imunodeficiência Humana (HIV)	62	Inibição da protease		Kapewang et al. (2013)
<i>Cinnamomum cassia</i>	Lauraceae	Galhos Secos	Aquoso	-	Vírus Sincicial Respiratório Humano	30	Inibição da ligação viral, internalização e formação de sincício		Yeh et al. (2013)
<i>Glycyrrhiza uralensis</i>	Fabaceae	Fatias de Radicais	Aquoso	ácido glicirizico (triterpenoide)	Enterovírus 71 e coxsackievirus A16	300 a 1000	Bloqueou a produção infecciosa; inibiu a expressão do vírus e de proteína viral		Wang et al. (2013)
<i>Glycyrrhiza uralensis</i>	Fabaceae	Raízes	Etanólico	Cumarinas e Triterpenoides	Vírus da Hepatite C	20 a 80	Replicação Viral		Adianti et al. (2014)
<i>Pelargonium sidoides</i>	Geraniaceae	Raízes	Aquoso	Polifenóis	Vírus da Imunodeficiência Humana (HIV)	1,0 a 8,13	Bloqueio de Receptores		Helfer et al. (2014)
<i>Bauhinia longifolia</i>	Fabaceae	Folhas	Etanólica	Flavonoides	Vírus da Febre Mayaro	25 a 100	Replicação do Vírus		Santos et al. (2014)
<i>Aloe arborescens</i>	Xanthorrhoeaceae	Folhas	Aquoso	-	Vírus da Gripe (H1N1; H3N2)	-	Inibição da neuraminidase (enzima viral)		Glatthaar-Saalmüller et al. (2015)
<i>Berberis holstii</i>	Berberidaceae	Raízes	Aquoso	Alcaloides	Vírus da Imunodeficiência Humana (HIV)	3,64 a 3,85	Inibição da Transcriptase Reversa		Ngwira et al. (2015)
<i>Salvia plebeia</i>	Lamiaceae	Partes Aéreas	Etanólicos	Flavonoides e Fenólicos	Vírus da Gripe (H1N1)	20	Inibição da neuraminidase (enzima viral)		Bang et al. (2016)
<i>Cleistocalyx operculatus</i>	Myrtaceae	Folhas	Etanólico	Flavonoides	Vírus da Gripe (H1N1; H9N2)	-	Inibição da neuraminidase (enzima viral)		Ha et al. (2016)
<i>Cistus incanus</i>	Cistaceae	Toda a planta	Aquoso	Polifenóis	Vírus da Imunodeficiência Humana (HIV)	0,7 a 2,0	Replicação Viral		Rebensburg et al. (2016)
<i>Cyathulae officinalis</i>	Amaranthaceae	Toda a planta	Aquoso	Polissacarídeos	Parvovírus canino	-	Adsorção Viral		Feng et al. (2017)
<i>Peganum harmala</i>	Zygophyllaceae	Sementes	Etanólico	Alcaloides	Vírus da Influenza A	100	Replicação do Vírus		Moradi et al. (2017)
<i>Alnus japonica</i>	Betulaceae	Folhas	Etanólico	Flavonoides	Vírus da Hepatite A	50	Inibição de Receptores Virais		Seo et al. (2017)
<i>Bulbine frutescens</i>	Asphodelaceae	Parte Aérea	Etanólico	Flavonoides	Vírus da Imunodeficiência Humana (HIV)	0,18 a 0,52	Transcriptase reversa, protease e integrase		Shikalepo et al. (2017)
<i>Syzygium jambos</i>	Myrtaceae	-	Etanólico	-	Herpes Vírus Tipo 1	50	Inibição de Enzima Viral (COX-2)		Twilley et al. (2017)
<i>Phyllanthus urinaria</i>	Euphorbiaceae	Toda a planta	Aquoso	Ácido gálico e polifenol	Vírus da Imunodeficiência Humana	0,61 a 0,76	Adsorção viral		Zhang et al. (2017)

Muitas das pesquisas por métodos alternativos antirretroviral iniciaram em virtude da preocupação com a elevação dos índices de infecção pelo vírus da imunodeficiência humana (HIV), vírus esse similar ao lentivírus caprino, que embora não consiga eliminar completamente o vírus apresenta tratamento considerado eficaz. Entretanto, as desvantagens acarretadas ao longo da terapia antirretroviral relacionados ao HIV, principalmente casos de resistência aos atuais medicamentos, levantou a necessidade de desenvolver métodos alternativos e com alto teor de eficácia (Prinsloo et al., 2017). Dessa forma, 144 famílias botânicas já foram testadas e vieram a apresentar efeito antiviral contra o HIV, sendo que a família Asteraceae é a que detém o maior número de espécies testadas, entretanto grande parte dessas pesquisas não conseguiram isolar e determinar com clareza o mecanismo de ação do potencial efeito antiviral (Dan e Castellar, 2015).

Dentro dessa concepção, Zhang et al., (2017) avaliando extrato aquoso de *Phyllanthus urinaria*, uma *Euphorbiaceae*, detectaram a eficácia antiviral do mesmo, o qual interagindo com a transcriptase reversa conseguiu inibir a entrada do HIV nas células. Já Shikalepo et al., (2017) em ensaios *in vitro* evidenciaram que extratos etanólicos da parte de *Bulbine frutescens* pertencente a família *Asphodelaceae* apresentaram atividade inibitória contra a protease do HIV, bem como a transcriptase reversa e a integrase, chegando a atingir de 50 a 87% de inibição viral dependendo da concentração. Além do uso de uma planta específica denota-se ainda que misturas de plantas advindas de famílias botânicas distintas (*Asteraceae*, *Bignoniaceae*, *Fabaceae* e *Myrtaceae*) foram alvo das pesquisas de Mophuting et al., (2017) os quais observaram que os extratos hexânicos originados dessa mistura de ervas demonstrou potencial inibitório contra a transcriptase reversa do HIV e restringiu sua replicação.

Apesar de grande parte das pesquisas serem direcionadas ao HIV, outros vírus também causadores de importantes enfermidades, já tiveram fitocompostos sendo descritos como

potencial inibidor, tais como: poliovírus tipo 1 (Faccin-Galhardi et al., 2012); vírus da enterite de patos (Song et al., 2013); vírus da doença de Newcastle (Song et al., 2015); vírus H1N1 (Bang et al., 2016; Ha et al., 2016); Parvovírus canino (Feng et al., 2017); vírus da hepatite A (Seo et al., 2017) e herpes vírus tipo 1 (Twilley et al., 2017).

Na literatura consultada, observou-se que o efeito antiviral de meliáceas é rotineiramente relatado, como por exemplo, Parida et al. (2002) denotaram que um extrato aquoso produzido de folhas de *Azadirachta indica*, determinou a total inibição da replicação do vírus da dengue, enquanto que Faccin-Galhardi et al. (2012) relataram que percentuais de até 80% de inibição viral do poliovírus tipo 1 foram conseguidos ao usar fitocomposto. Já no caso de *Melia azedarach* (Cinamomo), esta, já apresentou resultados promissores contra o herpes vírus tipo 1 e 2 (Petrera e Coto; 2009; Bueno et al., 2012).

A expressão desse efeito antiviral no caso das meliáceas deve-se consequentemente a sua composição fitoquímica, os quais são representados pelos ácidos graxos, alcaloides, esteroides, limonoides, flavonoides, taninos, saponinas e aminoácidos, pois são os principais grupos químicos encontrados em todas as polaridades de fração de extratos dessas plantas (Kumazawa et al., 2013; Al-Hashemi e Hossain, 2016).

Entretanto, efeito espermicida também já foi descrito advindo de extratos aquosos a base de folhas de *Azadirachta indica* (Khillare e Shrivastav, 2003), e das cinzas da madeira dessa meliácea que além de efeito espermicida gerou espermatozoides anormais, indicando que apesar de ter em sua constituição fitoquímicos potencialmente antivirais, dependendo da concentração determinará perda na qualidade espermática por interferência no processo espermatogênico (Auta e Hassan, 2016). Dessa forma, torna-se essencial uma avaliação criteriosa, pois a citotoxicidade de determinados constituintes presentes em uma droga natural pode acabar impedindo a descoberta de propriedades antivirais de outro componente fitoquímico (Arthanari et al., 2012).

Além de folhas e raízes, as sementes de plantas têm demonstrado em sua constituição fitoquímica substâncias antivirais promissoras, como por exemplo, sementes de *Peganum harmala*, uma *Zygophyllaceae*, que *in vitro* inviabilizou a replicação do vírus da gripe, pela síntese tardia de proteínas virais (Moradi et al., 2017). Diante disso, observa-se que dependendo do tipo de planta, algumas partes desta ou regiões inteiras, são passíveis de serem estudadas e seus princípios bioativos validados, objetivando conhecer substâncias que possam vir a ser utilizadas no combate a doenças virais (Farzaneh e Carvalho, 2015).

Anteriormente, pesquisa com produtos naturais tratava-se de algo intuitivo ou empírico, porém com o tempo os fitocompostos passaram a ser fonte das substâncias onde tem se concentrado o maior número de pesquisas para uso terapêutico em humanos e animais, contra diversas enfermidades infecciosas, sendo que em torno de 30% das drogas que se tem conhecimento ao redor do mundo são sintetizadas de maneira direta ou indireta de plantas (Dantas et al, 2009; Maia et al., 2015).

A partir dessa premissa, é notório que a diversidade biológica da flora brasileira contribui para o direcionamento das pesquisas para o desenvolvimento de fitoterápicos, incluindo aqueles com potencial ação antiviral, os quais podem vir a serem utilizados na terapêutica humana e veterinária, de maneira alternativa ou complementar, na forma de vegetais frescos, extratos vegetais e especialmente fitocompostos (Simoni, 2011).

A base dos estudos nessa temática são os metabólitos secundários (alcaloides, flavonoides e terpenoides) por exercerem papel fundamental na pesquisa por compostos antivirais bioativos, apresentando resultado promissor para a atividade antiviral de flavonoides isolados ou constituintes de extratos vegetais (Nolkemper et al., 2010; Moradi et al., 2017; Shikalepo et al., 2017). Diversas pesquisas já demonstraram a eficácia de compostos flavonoides exercendo atividade antiviral contra os mais diferentes vírus, inclusive retrovírus, como é o caso do CAEV (Dell'Aica et al., 2004; Wang et al., 2013; Zafar et al.,

2013; Adianti et al., 2014; Santos et al., 2014; Zhang et al., 2014), pois certos tipos de flavonoides podem determinar inibição da transcriptase reversa (Ahmad et al., 2015).

Além disso, alguns estudos relataram que fitocompostos com substâncias antioxidantes têm reduzido progressivamente certas retrovíroses, como por exemplo, extratos de *Carprobrotus edulis* (Omoruyi et al., 2012), *Plectranthus barbatus* (Kapewangolo et al., 2013), e *Bulbine frutescens* (Shikalepo et al., 2017).

Dentre as principais vantagens da adoção de fitocompostos na medicina veterinária estão o baixo custo, acessibilidade de matéria prima, e riscos mínimos de efeito colateral, por se tratar de um medicamento natural (Farzaneh e Carvalho, 2015). No entanto, os fitoterápicos, bem como as soluções utilizadas no preparo e dissolução dos mesmos, podem ser tóxicos a célula ou ao organismo como todo, que se almeja tratar ou proteger, sendo assim imprescindível realizar ensaios de citotoxicidade a fim de eliminar eventuais efeitos danosos e indesejáveis. Adicionalmente, observa-se que determinadas limitações que são atribuídas ao uso de fitoterápicos, em geral, referem-se à parte da planta selecionada (por poder influenciar na concentração do princípio ativo), estabilização da solução (soluções de fácil degradação) e mensuração das concentrações do princípio ativo (Oliveira et al., 2009).

A grande maioria dos produtos naturais com efeito antiviral descrito na literatura trata-se de extratos aquosos e etanólicos (Parida et al. 2002; Zafar et al., 2013; Adianti et al., 2014; Santos et al., 2014; Zhang et al., 2014). Na dissolução dessas drogas normalmente se opta pelo dimetilsulfóxido (DMSO) como seu principal solvente por ser altamente solúvel e não causar interferência molecular nos componentes fitoquímicos (Bona et al., 2014). Diante disso, torna-se ainda mais viável a busca por uma alternativa antiviral a base de produtos naturais para tratar o sêmen infectado com o CAEV, uma vez que o DMSO, o principal solvente de extratos vegetais, quando presente no diluidor seminal caprino não determina perda na qualidade espermática (Peixoto et al., 2017).

Entretanto, na avaliação da eficácia desses fitoterápicos são passíveis inúmeros métodos de avaliação, porém a ausência de dados científicos que indique qual seria o melhor a ser adotado, associado à falta de padronização da metodologia de extração, e consequentemente de análises *in vitro*, acabam por limitar maiores avanços no ramo das pesquisas com produtos naturais (Bona et al., 2014).

Considerações Finais

O crescimento das pesquisas efetuando testes com as mais variadas espécies de plantas já comprovaram que é possível encontrar constituintes fitoquímicos com efeito antiviral, inclusive contra o retrovírus, mesmo fazendo uso da extração dos constituintes via processo aquoso ou etanólico, com dissolução em DMSO. Adicionalmente, a classe de metabólitos secundários se concretiza como a fonte de onde pode se conseguir alternativas eficazes no combate às doenças de caráter viral, visando no caso dos retrovírus a atingir principalmente a transcriptase reversa.

Nesse contexto, espera-se que essas plantas possam também se tornar eficazes na inativação do CAEV presente no sêmen de reprodutores caprinos, sem causar danos à célula espermática e nem interferência na fertilidade, possibilitando assim o uso de material genético advindo de reprodutor infectado pelo lentivírus caprino. No entanto, como forma de incentivo é imprescindível que metodologias sejam padronizadas e parcerias interdisciplinares formalizadas com a perspectiva de explorar com racionalidade e sustentabilidade a rica biodiversidade, especialmente, da flora brasileira.

Agradecimentos

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela concessão da bolsa de estudo; a Fundação Cearense de Apoio ao Desenvolvimento Científico

e Tecnológico pelo apoio financeiro; à Embrapa Caprinos e Ovinos pelo apoio e suporte técnico; e à Universidade Estadual do Ceará (UECE) pela disponibilização do Laboratório de Virologia e Laboratório de Química de Produtos Naturais.

Referências

- Adianti, M.; Aoki, C.; Komoto, M.; Deng, L.; Shoji, I.; Wahyuni, T.S.; Lusida, M.I.; Soetjipto; Fuchino, H.; Kawahara, N.; Hotta, H. Antihepatitis C virus compounds obtained from *Glycyrrhiza uralensis* and other *Glycyrrhiza* species. **Microbiology and Immunology**, 58(3): 180–187, 2014.
- Ahmad, A.; Kaleem, M.; Ahmed, Z.; Shafiq, H. Therapeutic potential of flavonoids and their mechanism of action against microbial and viral infections – A review. **Food Research International**, 77: 221-235, 2015.
- Ali Al Ahmad, M.Z.; Fieni, F.; Pellerin, J.L.; Guiguen, F.; Cherel, Y.; Chatagnon, G. Detection of viral genomes of caprine arthritis-encephalitis virus (CAEV) in semen and in genital tract tissues of male goat. **Theriogenology**, 69: 473-480, 2008.
- Al-Hashemi, Z.S.S.; Hossain, M.A. Biological activities of different neem leaf crude extracts used locally in Ayurvedic medicine. **Pacific Science Review A: Natural Science and Engineering**, 18: 128-131, 2016.
- Arthanari, S.K.; Vanitha, J.; Ganesh, M.; Venkateshwaran, K.; Clercq, D. Evaluation of antiviral and cytotoxic activities of methanolic extract of *S. grandiflora* (Fabaceae) flowers. **Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine**, 855-858, 2012.
- Ávila, A.A.; Sider, L.H.; Veras, A.K.A.; Pinheiro, R.R.; Oliveira, M.L.M.; Silva, P.A.F.; Sousa, S.D.; Andrioli, A. Uso da técnica de *swim-up* para a remoção do vírus da artrite encefalite caprina do sêmen de reprodutores infectados. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, 67(1): 94-102, 2015.

- Auta, T.; Hassan, A.T. Reproductive toxicity of aqueous wood-ash extract of *Azadirachta indica* (neem) on male albino mice. **Asian Pacific Journal of Reproduction**, 5(2): 11-115, 2016.
- Bagla, V.P.; McGaw, L.J.; Eloff, J.N. The antiviral activity of six South African plants traditionally used against infections in ethnoveterinary medicine. **Veterinary Microbiology**, 155: 198–206, 2012.
- Bang, S.; Ha, T.K.Q.; Lee, C.; Li, W.; Oh, W.; Shim, S.H. Antiviral activities of compounds from aerial parts of *Salvia plebeian* R. Br. **Journal of Ethnopharmacology**, 192: 398-405, 2016.
- Beula, J.M.; Granadesigan, M.; Rajkumar, P.B.; Ravikumar, S.; Anand, M. Antiviral, antioxidante and toxicological evaluation of mangrove plant from South East coast of India. **Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine**, 352-357, 2012.
- Bona, E.A.M.; Pinto, F.G.S.; Fruet, T.K.; Jorge, T.C.M.; Moura, A.C. Comparação de métodos para avaliação da atividade antimicrobiana e determinação da concentração inibitória mínima (cim) de extratos vegetais aquosos e etanólicos. **Arquivo do Instituto Biológico**, 81(3): 218-225, 2014.
- Bueno, C.A.; Lombardi, M.G.; Sales, M.E.; Alché, L.E. A natural antiviral and immunomodulatory compound with antiangiogenic properties. **Microvascular Research**, 84: 235-241, 2012.
- CBRA – Colégio Brasileiro de Reprodução Animal. **Manual para exame andrológico e avaliação de sêmen animal**. 2ª. ed. Belo Horizonte: CBRA, 2013. 49p.
- Cortez-Romero, C.; Pellerinm J.L.; Ali Al Ahmad, M.Z.; Chebloune, Y.; Gallegos-Sanchez, J.; Lamara, A.; Pépin, M.; Fieni, F. The risk of small ruminant lentivirus (SRLV) transmission with reproductive biotechnologies: State-of-the-art review. **Theriogenology**, 79: 1-9, 2013.

- Dan, G.; Castellar, A. Plantas medicinais com atividade antirretroviral. **Alumni**, 3(6): 1-17, 2015.
- Dantas, S.A.F.; Sena, L.V.T.; Melo, D.J.A.; Duarte, F.T.; Carvalho, A.S. Avaliação de plantas medicinais no combate a mastite bovina. **Holos**, 4: 2009.
- Dell'Aica, I.; Dona, M.; Tonello, F.; Piris, A.; Mock, M.; Montecucco, C.; Garbisa, S. Potent inhibitors of anthrax lethal factor from green tea. **EMBO Reports**, 5(4): 418–422, 2004.
- Faccin-Galhardi, L.C.; Yamamoto, K.A.; Ray, S.; Ray, B.; Linhares, R.E.C.; Nozawa, C. The *in vitro* antiviral property of *Azadirachta indica* polysaccharides for poliovirus. **Journal of Ethnopharmacology**, 142: 86-90, 2012.
- Farzaneh, V.; Carvalho, I.S. A review of the health benefit potentials of herbal plant infusions and their mechanism of actions. **Industrial Crops and Products**, 65: 247-258, 2015.
- Feng, H.; Fan, J.; Yang, S.; Zhao, X.; Yi, X. Antiviral activity of phosphorylated Radix *Cyathulae officinalis* polysaccharide against Canine Parvovirus *in vitro*. **International Journal of Biological Macromolecules**, 99: 511-518, 2017.
- Glatthaar-Saalmüller, B.; Fal, A.M.; Schönknecht, K.; Conrad, F.; Sievers, H.; Saalmüller, A. Antiviral activity of an aqueous extract derived from *Aloe arborescens* Mill. against a broad panel of viruses causing infections of the upper respiratory tract. **Phytomedicine**, 22: 911-920, 2015.
- Gu, S.X.; Xue, P.; Ju, S.L.; Zhu, Y.Y. Advances in rationally designed dual inhibitors of HIV-1 reverse transcriptase and integrase. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, 24: 5007-5016, 2016.
- Ha, T.K.Q.; Dao, T.T.; Nguyen, N.H.; Kim, J.; Kim, E.; Cho, T.O.; Oh, W.K. Antiviral phenolics from the leaves of *Cleistocalyx operculatus*. **Fitoterapia**, 110: 135-141, 2016.
- Helfer, M.; Koppensteiner, H.; Schneider, M.; Rebensburg, S.; Forcisi, S.; Müller, C.; Schmitt-Kopplin, P.; Schindler, M.; Brack-Werner, R. The root extract of the medicinal

- plant *Pelargonium sidoides* is a potent HIV-1 attachment inhibitor. **Plos One**, 9(1): 1-12, 2014.
- ICTV. **International Committee on Taxonomy of Viruses. Virus Taxonomy: 2013.** Disponível em: <<http://ictvonline.org/virusTaxonomy.asp>>. Acesso em: 28 set. 2017.
- Kapewangolo, P.; Tawha, T.; Nawinda, T.; Knott, M.; Hans, R. *Sceletium tortuosum* demonstrates in vitro anti-HIV and free radical scavenging activity. **South African Journal of Botany**, 106: 140-143, 2013.
- Kenyon, J.C.; Lever, A.M. The molecular biology of feline immunodeficiency virus. **Viruses**, 3(11): 2193-2213, 2011.
- Kim, H.; Kwon, H.; Ryu, Y.B.; Chang, J.S.; Cho, K.; Hosmillo, M.D.T.; Rho, M.; Park, S.; Lee, W.S. Antiviral activity of *Alpinia katsumadai* extracts against rotaviruses. **Research in Veterinary Science**, 92: 320-323, 2012.
- Khillare, B.; Shrivastav, T.G. Spermicidal activity of *Azadirachta indica* (neem) leaf extract. **Contraception**, 68: 225-229, 2003.
- Kumazawa, S.; Kubota, S.; Yamamoto, H.; Okamura, N.; Sugiyama, Y.; Kobayashi, H.; Nakanishi, M.; Ohta, T. Antiangiogenic activity of flavonoids from *Melia azedarach*. **Natural Product Communications**, 8(12): 1719-1720, 2013.
- Lamara, A.; Fieni, F.; Chatagnon, G.; Larrat, M.; Dubreil, L.; Chebloune, Y. Caprine arthritis encephalitis virus (CAEV) replicates productively in cultured epididymal cells from goats. **Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases**, 36: 397-404, 2013.
- L'Homme, Y.; Leboeuf, A.; Arsenault, J.; Fras, M. Identification and characterization of an emerging small ruminant lentivirus circulating recombinant form (CRF). **Virology**, 475: 159-171, 2015.
- Lin, L.; Hsu, W.; Lin, C. Antiviral natural products and herbal medicines. **Journal of Traditional and Complementary Medicine**, 4(1): 24-35, 2014.

Maia, T.F.; Donato, A.; Fraga, M.E. Atividade antifúngica de óleos essenciais de plantas. **Revista Brasileira de Produtos Agroindustriais**, 17(1): 105-116, 2015.

Ministério da Saúde. **Formulário terapêutico nacional 2008: Rename 2006**. 1^a ed. Brasília: Ministério da Saúde, 2008. 897p.

Minguijón, E.; Reina, R.; Pérez, M.; Polledo, L.; Villoria, M.; Ramírez, H.; Leginagoikoa, I.; Badiola, J.J.; García-Martín, J.F.; De Andrés, D.; Luján, L.; Amorena, B.; Juste, R.A. Small ruminant lentivirus infections and diseases. **Veterinary Microbiology**, 181(1): 75-89, 2015.

Mophuting, B.C.; Bapela, M.J.; Tshikalange, T.E. *In vitro* antigonococcal, anti-inflammatory and HIV-1 reverse transcriptase activities of the herbal mixture used for the treatment of sexually transmitted diseases. **South African Journal of Botany**, 109: 354-255, 2017.

Moradi, M.; Karimi, A.; Rafieian-Kopaei, M.; Fotouhi, F. *In vitro* antiviral effects of *Peganum harmala* seed extract and its total alkaloids against Influenza virus. **Microbial Pathogenesis**, 110: 42-49, 2017.

Ngwira, K.J.; Maharaj, V.J.; Magani, Q.A. *In vitro* antiplasmodial and HIV-1 neutralization activities of root and leaf extracts from *Berberis holstii*. **Journal of Herbal Medicine**, 5: 30-35, 2015.

Nolkemper S.; Reichling, J.; Sensch, K.H.; Schnitzlu, P. Mechanism of herpes simplex virus type 2 suppression by propolis extracts. **Phytomedicine**, 17: 131-148, 2010.

Oliveira, M.C.S.; Giglioti, R.; Forim, M.R.; Calura, F.H.; Oliveira, H.N.; Chagas, A.C.S.; Brito, L.G. **Uso de extratos de Nim (*Azadirachta indica*) no controle de carrapato *Rhipicephalus (Boophilus) microplus***. São Carlos: Embrapa Pecuária Sudeste, 2009. 12p. Comunicado Técnico, 90.

Omoruyi, B.E.; Bradley, G.; Afolayan, J.A. Antioxidant and phytochemical properties of *Carpobrotus edulis* (L.) bolus leaf used for the management of common infections in

- HIV/AIDS patients in Eastern Cape Province. **BMC Complementary and Alternative Medicine**, 12: 1-9, 2012.
- Parida, M.M.; Upadhyay, C.; Pandya, G.; Jana, A.M. Inhibitory potential of neem (*Azadirachta indica* Juss) leaves Dengue virus type-2 replication. **Journal of Ethnopharmacology**, 79: 273-278, 2002.
- Paula, N.R.O.; Andrioli, A.; Cardoso, J.F.S.; Pinheiro, R.R.; Sousa, F.M.L.; Souza, K.C.; Alves, F.S.F.; Campello, C.C.; Ricarte, A.R.F.; Teixeira, M.F.S. Profile of the Caprine arthritis-encephalitis virus (CAEV) in blood, semen from bucks naturally and experimentally infected in the semi-arid region of Brazil. **Small Ruminant Research**, 85(1): 27-33, 2009.
- Peixoto, R.M.; Andrioli, A.; Santos, D.O.; Pinheiro, R.R.; Araújo, J.F.; Sousa A.L.M.; Silva, D.F.; Damasceno, E.M.; Teixeira, M.F.S. Avaliação da toxicidade de solvente de extratos vegetais com ação antiviral em sêmen caprino refrigerado. **Acta Scientiae Veterinariae**, 45: 1-8, 2017.
- Peterson, K.; Brinkhof, J.; Houwers, D.J.; Colenbrander, B.; Gadella, B.M. Presence of pro-lentiviral DNA in male sexual organs and ejaculates of small ruminants. **Theriogenology**, 69: 433-442, 2008.
- Petrera, E.; Coto, C.E. Therapeutic effect of meliacine, an antiviral derived from *Melia azedarach* L., in mice genital herpetic infection. **Phytotherapy Research**, 23: 1771-1777, 2009.
- Prinsloo, G.; Marokane, C.K.; Street, R.A. Anti-HIV activity of southern African plants: Current developments, phytochemistry and future research. **Journal of Ethnopharmacology**, 210: 133-155, 2017.
- Rebensburg, S.; Helfer, M.; Schneider, M.; Koppensteiner, H.; Eberle, J.; Schindler, M.; Gürtler, L.; Brack-Werner, R. Potent in vitro antiviral activity of *Cistus incanus* extract

- against HIV and Filoviruses targets viral envelope proteins. **Scientific Reports**, 6: 1-15, 2016.
- Ricarte, A.R.F.; Andrioli, A.; Pinheiro, R.R.; Bão, S.N.; Silva, J.S.; Braz, S.V.; Name, K.P.O.; Lima-Verde, I.B.; Brito, I.F.; Dias, R.P.; Aguiar, T.D.; Dantas, T.V.M.; Araújo S.A.C.; Cavalcanti, D.M.L.P.; Paula, N.R.O.; Teixeira, M.F.S. Avaliação imunohistoquímica e ultraestrutural de gametas e embriões caprinos infectados com o CAEV. **Arquivo do Instituto Biológico**, 77(2): 217-223, 2010.
- Santos, A.E.; Kuster, R.M.; Yamamoto, K.A.; Salles, T.S.; Campos, R.; Meneses, M.D.; Soares, M.R.; Ferreira, D. Quercetin and quercetin 3-O-glycosides from *Bauhinia longifolia* (Bong.) Steud. show anti-Mayaro virus activity. **Parasites & Vectors**, 7(1): 130, 2014.
- Seo, D.J.; Lee, M.; Jeon, S.B.; Park, H.; Jeong, S.; Lee, B.; Choi, S. Antiviral activity of herbal extracts against the hepatitis A virus. **Food Control**, 72: 9-13, 2017.
- Simoni, I. Plantas com poder curativo na saúde animal. **Instituto Biológico**, 155, 2011.
- Shikalepo, R.; Mukakalisa, C.; Kandawa-Schulz, M.; Chingwaru, W.; Kapewangolo, P. In vitro anti-HIV and antioxidant potential of *Bulbine frutescens* (Asphodelaceae). **Journal of Herbal Medicine**, 1-6, 2017.
- Silva, F.S.; Silva, D.S.; Vargas, G.D.; Fischer, G.; Lima, M.; Hübner, S.O. Terapia antirretroviral no controle da infecção pelo vírus da imunodeficiência felina: revisão e perspectivas. **Science and Animal Health**, 4(3): 268-282, 2016.
- Song, X.; Yin, Z.; Li, L.; Cheng, A.; Jia, R.; Xu, J.; Wang, Y.; Yao, X.; Lv, C.; Zhao, X. Antiviral activity of sulfated *Chuanminshen violaceum* polysaccharide against duck enteritis virus *in vitro*. **Antiviral Research**, 98: 344-351, 2013.
- Song, X.; Zhang, Y.; Yin, Z.; Zhao, X.; Liang, X.; He, C.; Yin, L.; Lv, C.; Zhao, L.; Ye, G.; Shi, F.; Shu, G.; Jia, R. Antiviral effect of sulfated *Chuanmingshen violaceum*

- polysaccharide in chickens infected with virulent Newcastle disease virus. **Virology**, 476: 316-322, 2015.
- Souza, K.C.; Pinheiro, R.R.; Santos, D.O.; Brito, R.L.L.; Rodrigues, A.S.; Sider, L.H.; Paula, N.R.O.; Ávila, A.A.; Cardoso, J.F.S.; Andrioli A. Transmission of the caprine arthritis-encephalitis vírus through artificial insemination. **Small Ruminant Research**, 109: 193-198, 2013.
- Souza, K.C.; Andrioli, A.; Teixeira, M.F.S. Vírus da artrite encefalite caprina em sêmen: diagnóstico e transmissão. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, 38(2) : 92-97, 2014.
- Travassos, C.E.; Benôit, C.; Valas, S.; Silva, A.G.; Perrin, G. Detection of caprine arthritis-encephalitis vírus in semen of naturally infected bucks. **Small Ruminant Research**, 32: 101-106, 1999.
- Twilley, D.; Langhansová, L.; Palaniswamy, D.; Lall, N. Evaluation of traditionally used medicinal plants for anticancer, antioxidant, anti-inflammatory and anti-viral (HPV-1) activity. **South African Journal of Botany**, 112: 494-500, 2017.
- Turchetti, A.P. ; Paniago, J.J. ; Costa, L.F. ; Cruz, J.C. ; Braz, G.F. ; Gouveia, A.M. ; Paixão, T.A. ; Santos, R.L. ; Heinemann, M.B. Distribution of caprine arthritis encephalitis vírus provirus, RNA, and antigen in the reproductive tract of one naturally and seven experimentally infected bucks. **Theriogenology**, 80: 933-939, 2013.
- Tu, P.A., Shiu, J.S.; Lee, S.H.; Pang, V.F.; Wang, D.C.; Wang, P.H. Development of a recombinase polymerase amplification lateral flow dipstick (RPA-LFD) for the field diagnosis of caprine arthritis-encephalitis virus (CAEV) infection. **Journal of Virological Methods**, 243: 98-104, 2017.

- Wang, H.Q.; Meng, S.; Li, Z.R.; Peng, Z.G.; Han, Y.X.; Guo, S.S.; Cui, X.L.; Li, Y.H.; Jiang, J.D. The antiviral effect of 7-hydroxyisoflavone against Enterovirus 71 *in vitro*. **Journal of Asian Natural Products Research**, 15(4): 382–389, 2013.
- Yeh, R.W.; Coen, D.M. Farmacologia das infecções virais. In: Golan, D.E.; Tashjian, J.R.; A.H.; Armstrong, E.J.; Armstrong, A.W. (ed.). **Principles of pharmacology: The pathophysiologic basis of drug therapy**. 3rd.ed. Philadelphia:Deputy editor, 2011. p.609-630.
- Yeh, C.H.; Chang, J.S.; Wang, K.C.; Shieh, D.E.; Chiang, L.C. Water extract of *Cinnamomum cassia* blume inhibited human respiratory syncytial virus by preventing viral attachment, internalization, and syncytium formation. **Journal of Ethnopharmacology**, 147: 321-326, 2013.
- Zafar, M.S.; Muhammad, F.; Javed, I.; Akhtar, M.; Khaliq, T.; Aslam, B.; Waheed, A.; Yasmin, R.; Zafar, H. Mulberry (*Morus alba*): A brief phytochemical and pharmacological evaluations account. **International Journal of Agriculture e Biology**, 15: 612–620, 2013.
- Zhang, W.; Quiao, H.; Lv, Y.; Wang, J.; Chen, X.; Hou, Y.; Tan, R.; Li, E. Apigenin inhibits enterovirus-71 infection by disrupting viral RNA association with **trans**-acting factors. **Plos One**, 9(10): 1-9, 2014.
- Zhang, X.; Xia, Q.; Yang, G.; Zhu, D.; Shao, Y.; Zhang, J.; Cui, Y.; Wang, R.; Zhang, L. The anti-HIV-1 activity of polyphenols from *Phyllanthus urinaria* and the pharmacokinetics and tissue distribution of its marker compound, gallic acid. **Journal of Traditional Chinese Medical Sciences**, 1-9, 2017.

7. CAPÍTULO II

***Mycoplasma agalactiae* em rebanhos leiteiros no estado do Ceará em associação com o vírus da artrite encefalite caprina**

Mycoplasma agalactiae in dairy goat flocks bred in state of Ceará in association with caprine
arthritis encephalitis virus

Renato Mesquita Peixoto, Alice Andrioli, Raymundo Rizaldo Pinheiro, Francisco Selmo
Fernandes Alves, Vanderlan Warlington Souza dos Santos, Maximiana Mesquita de Sousa,
Dalva Alana Aragão de Azevedo, Edgar Marques Damasceno & Maria Fátima da Silva
Teixeira.

Periódico: **Acta Scientiae Veterinariae** (ISSN: 1679-9216)

(Publicado em fevereiro de 2018)

Qualis: B1 na Medicina Veterinária

Disponível em: <http://www.ufrgs.br/actavet/46/PUB%201533.pdf>

***Mycoplasma agalactiae* em Rebanhos Leiteiros no Estado do Ceará em Associação com o
Vírus da Artrite Encefalite Caprina**

Occurrence of *Mycoplasma agalactiae* in Dairy Goat Flocks Bred in State of Ceará in
Association with Caprine Arthritis Caprine Encephalitis Virus

Renato Mesquita Peixoto¹, Alice Andrioli², Raymundo Rizaldo Pinheiro², Francisco Selmo
Fernandes Alves², Vanderlan Warlington Souza dos Santos³, Maximiana Mesquita de Sousa³,
Dalva Alana Aragão de Azevedo¹, Edgar Marques Damasceno⁴ & Maria Fátima da Silva
Teixeira¹

Artigo baseado em projeto de Tese do primeiro autor em cumprimento parcial dos requisitos para o título de Doutor. ¹Laboratório de Virologia (LABOVIR), Programa de Pós-graduação em Ciências Veterinárias (PPGCV), Universidade Estadual do Ceará (UECE), Fortaleza, CE, Brazil. ²EMBRAPA Caprinos e Ovinos (CNPACO), Sobral, CE. ³Universidade Federal Rural do Semiárido (UFERSA), Mossoró, RN. ⁴Universidade Estadual Vale do Acaraú (UVA), Sobral. CORRESPONDENCE: R.M. Peixoto [renatomiraima@gmail.com - Fax: +55 (85) 3101-9849]. LABOVIR, Faculdade de Veterinária, Universidade Estadual do Ceará (UECE). Av. Dr. Silas Munguba n. 1700, Campus do Itaperi. CEP 60740-000 Fortaleza, CE, Brazil.

ABSTRACT

Background: Contagious agalactia is an infectious disease caused by *Mycoplasma agalactiae* (*M. agalactiae*) that occurs in small ruminants leading to productive and economic losses. Due to the similarity of clinical signs presented in Caprine Arthritis Encephalitis (CAE), which is a viral disease, a differential diagnosis is important. Therefore, this study aimed to investigate the presence of anti-*Mycoplasma agalactiae* antibodies in dairy goat flocks in Ceará State and possible correlation with CAE.

Material, Methods & Results: The research was performed in four mesoregions in Ceará State (Metropolitan Region of Fortaleza- MRF; Northeast Ceará – NeC; North Ceará – NC; Sertões in Ceará – SC), from which 16 productions located in 10 cities with the highest

representativeness for goat milk production within the State or mesoregion were sampled. A total of 417 females and 69 males (486 animals) of breeds with dairy production aptitude, pure or crossbreed, maintained in semi-intensive or intensive systems, were tested. Blood serum was obtained by venipuncture of the jugular vein with vacuum pressure syringe followed by centrifugation at 1,500g for 10min. Antibodies against the caprine arthritis encephalitis virus (CAEV) were detected with micro technique of agarose gel immunodiffusion (AGID) and Western Blot (WB). The anti-*Mycoplasma agalactiae* antibodies were detected with commercial kit of enzymatic immunoassay (IDEXX Laboratories™). Seroprevalence of *M. agalactiae* in dairy goat flocks in Ceará State was 0.62% (3/486). From the total of 16 visited productions, 18.75% (3/16) had seropositive animals for *M. agalactiae* located in MRF, NC and SC mesoregions. CAE was diagnosed in 56.25% (9/16) of productions with AGID and in 81.25% (13/16) with WB. In addition, 5.2% (25/486) of animals were seropositive for CAE with AGID and 16.6% (80/486) with WB. Animals that reacted positive for *M. agalactiae* were all females of pure breed with milk production aptitude in distinct mesoregions submitted to intensive rearing system. None of these animals was positive in neither test (AGID or WB) for CAE. Therefore, no correlation of results obtained in diagnosis of *M. agalactiae* by ELISA and CAEV by AGID or WB ($P < 0.05$) was identified. However, two out of three productions that were positive for *M. agalactiae* presented positive results for CAEV with frequencies of 10% and 20%.

Discussion: Seroprevalence of *M. agalactiae* in Ceará State was low in comparison with other Brazilian states and even other countries. However, the presence of the pathogen in more than one mesoregion indicates that the disease occurs in different locations within the State. Therefore, flocks in Ceará are susceptible to the infection, which may be favored by uncontrolled commerce that occurs with deficient surveillance, associated with the importation of animals to improve flock genetic quality. The presence of the pathogen in

dairy goats may contribute to significant losses in the local production. On the other hand, CAE was diagnosed in nearly all productions proving the dissemination of this lentivirus infection among dairy goat flocks in Ceará State. Although an association between these diseases was not identified, the presence of a retrovirus in the organism may favor co-infection with another micro-organism, promoting the deficiency in the immune system of the host. In conclusion, *M. agalactiae* is present in different mesoregions of the Ceará State and control measures should be adopted in short term to prevent pathogen dissemination and, consequently reduce economic and productive losses in the local dairy goat production. No correlation was identified between the prevalence of infection by CAEV and *M. agalactiae* in this study.

Keywords: Correlation, diagnosis, caprine lentivirus, mycoplasmosis.

Descritores: Correlação, diagnóstico, lentivírus caprino, micoplasmose.

INTRODUÇÃO

A infecção por *Mycoplasma agalactiae* (*M. agalactiae*) afeta pequenos ruminantes [23], causando a Agalaxia Contagiosa (AC), doença raramente diagnosticada, apesar das perdas econômicas acarretadas à pecuária [26]. No Brasil essa micoplasmose já foi relatada no Nordeste [6], primeiramente em 2001 na Paraíba [5], seguido por Pernambuco, Rio Grande do Norte e Sergipe [1,5,26]. No Ceará, relataram *Mycoplasma* sp., pelo isolamento em co-cultivo do líquido sinovial em células de dois caprinos [9].

Os sinais clínicos após infecção por *M. agalactiae* são: mastite com redução na produção de leite, agalaxia, artrite, ceratoconjuntivite e pneumonia [15]. Essa doença pode ser confundida com a artrite encefalite caprina (CAE) cujo agente etiológico desencadeia um

quadro sintomatológico similar a AC, passando a ser fundamental um diagnóstico diferencial [19].

Portanto, o diagnóstico não pode se basear apenas nos sinais clínicos, sendo necessário a realização de testes de diagnóstico. O ensaio de imunoadsorção enzimática (ELISA) indireto, em geral, é o escolhido para o diagnóstico de micoplasmose, por sua eficácia na detecção de anticorpos [6,15]. Já para CAE, a Imunodifusão em Gel de Agarose (IDGA) e ELISA indireto são os exames preconizados pela Organização Mundial de Saúde Animal (OIE) [16, 20]. No entanto, por sua sensibilidade e especificidade ser superior a outros testes sorológicos, o *Western Blot* (WB) tem sido uma alternativa eficaz na detecção de anticorpos contra o lentivírus caprino [18, 24, 28]. Assim, objetivou-se com o presente estudo investigar a existência de anticorpos anti-*Mycoplasma agalactiae* em rebanhos leiteiros no estado do Ceará e a sua possível correlação com a CAE.

MATERIAIS E MÉTODOS

Localização

A pesquisa foi realizada em quatro mesorregiões do estado do Ceará (Região Metropolitana de Fortaleza - RMF; Noroeste Cearense - NoC; Norte Cearense - NC; Sertões Cearense - SC), situadas no nordeste do Brasil. Na RMF foram estudadas sete propriedades em quatro municípios (Aquiraz, Caucaia, Fortaleza e Horizonte), no NoC três propriedades em dois municípios (Santa Quitéria e Sobral), no NC três propriedades em dois municípios (Beberibe e São Gonçalo do Amarante) e nos SC foram três propriedades em dois municípios (Banabuiú e Quixadá), perfazendo um total de 16 propriedades em 10 municípios com maior representatividade na produção de leite caprino para o estado ou para mesorregião. Além disso, as mesorregiões escolhidas representam 71,73% do rebanho caprino do estado do Ceará [14].

Animais

Foram utilizados 417 fêmeas e 69 reprodutores caprinos, totalizando 486 animais, oriundos de rebanhos destinados à produção de leite, sendo todos de raça com aptidão leiteira, puros ou mestiços, e criados em sistema intensivo ou semi-intensivo.

Procedimento Experimental

Os testes de diagnóstico foram aplicados utilizando soro sanguíneo, obtido a partir de coleta de sangue de todos os animais experimentais por meio da punção da veia jugular, por sistema à vácuo, com tubos¹ de 5 mL sem anticoagulante, seguido de centrifugação em centrífuga (Excelsa[®] II 206 BL)² não refrigerada a 1500 G por 10 minutos.

Na detecção de anticorpos contra o vírus da artrite encefalite caprina (CAEV) foi utilizado a microtécnica de imunodifusão em gel de ágar (IDGA) conforme metodologia de Gouveia [13], e a técnica de *Western Blot* (WB) descrita por Rodrigues *et al.* [24]. O antígeno utilizado para a IDGA foi produzido no Laboratório de Virologia da Embrapa Caprinos e Ovinos, a partir de estirpe do CAEV-Cork (CAEV-Co), utilizando o protocolo de Pinheiro *et al.* [22]. No preparo do antígeno utilizado no WB utilizou-se o método de ultracentrifugação em gradiente de sacarose³ [11]. A concentração da proteína total foi determinada pelo método de Bradford [7] e o antígeno mantido a -80°C até a realização dos ensaios laboratoriais.

Para a detecção de anticorpos anti-*Mycoplasma agalactiae* da lipoproteína de membrana p48, foi utilizado o kit comercial⁴ de imunoensaio enzimático, segundo recomendações do fabricante, com diluição dos soros de 1:20 com valor de corte igual ou superior a 60% de percentual de reconhecimento de anticorpos, sendo utilizado espectrofotômetro (Multiskan FC)⁵ para leitura da absorbância das placas.

Análise Estatística

Um banco de dados foi elaborado, mediante tabulação e codificação, com os resultados obtidos submetidos ao teste de Qui-quadrado (χ^2) e exato de Fisher, nos casos onde

os critérios do qui-quadrado não foram atendidos, considerando-se sempre o nível de significância de 5% ($P < 0,05$) analisado pelo programa IBM[®] SPSS[®] Statistics versão 21⁶. Em seguida, aplicou-se uma análise de regressão logística, considerando o modelo:

$$\hat{\pi}_j = \frac{1}{1 + e^{-(\beta_0 + \beta_1 X_{1j} + \dots + \beta_m X_m)}}$$

Em que:

$\hat{\pi}$ = Probabilidade de ter a doença

j = Variação de cada animal

e = Exponencial da função logística

β_0 a β_m = Parâmetros do modelo

X_1 a X_m = Variáveis do estudo consideradas no modelo

RESULTADOS

Na análise dos dados (Tabela 1) pode-se observar que a soroprevalência de *M. agalactiae* em rebanhos de caprinos leiteiros no estado do Ceará foi de 0,62% (3/486).

Tabela 1. Soroprevalência de anticorpos contra o vírus da artrite encefalite caprina (CAEV) e *Mycoplasma agalactiae* em caprinos leiteiros no estado do Ceará.

	Vírus da Artrite Encefalite Caprina				<i>Mycoplasma agalactiae</i>	
	IDGA		Western Blot		ELISA	
	Nº	%	Nº	%	Nº	%
Positivo	25	5,20	80	16,60	3	0,62
Negativo	461	94,80	406	83,40	483	99,38

IDGA = Imunodifusão em Gel de Ágar; ELISA: Imunoensaio Enzimático; Nº = Número de amostras; % = Valor percentual.

Dentre as 16 propriedades que compuseram esse estudo, 18,75% (3/16) tiveram animais soropositivos para *M. agalactiae*, sendo estas oriundas das mesorregiões metropolitana de Fortaleza, norte cearense e sertões cearenses (Figura 1).

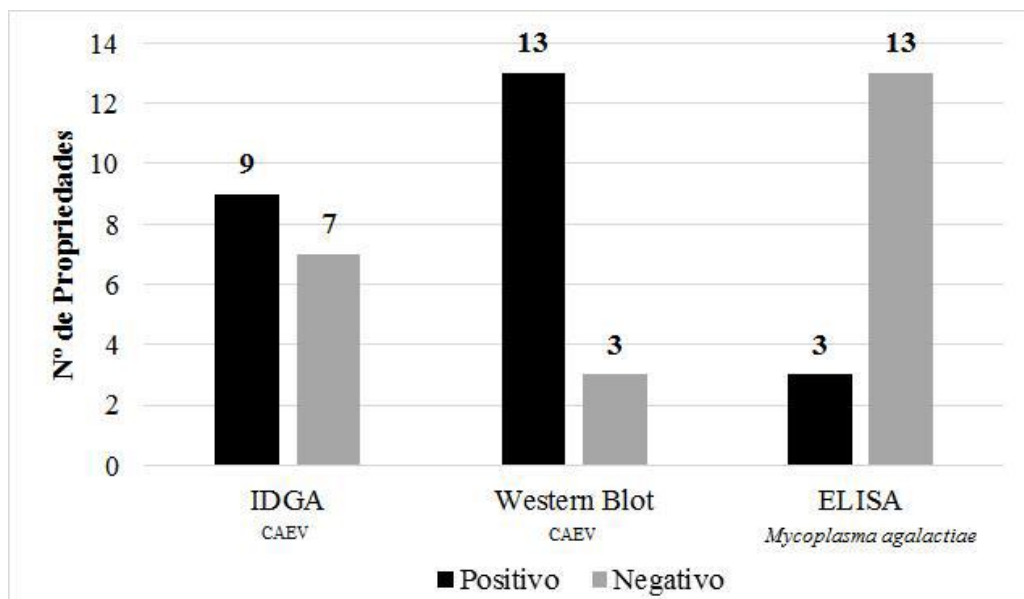


Figura 1. Soroprevalência do vírus da artrite encefalite caprina (CAEV) por Imunodifusão em Gel de Ágar (IDGA) e Western Blot, e do *Mycoplasma agalactiae* por Imunoensaio Enzimático (ELISA) indireto, nas propriedades com rebanho de caprinos leiteiros.

A CAE foi diagnosticada em 56,25% (9/16) das propriedades pela IDGA, e em 81,25% (13/16) pelo WB (Figura 1). Adicionalmente observa-se que a CAE, nesse estudo, apresentou 5,2% (25/486) de animais soropositivos pela IDGA, enquanto pelo *Western Blot*, 16,6% (80/486) das amostras apresentaram anticorpos contra o lentivírus caprino (Tabela 1; Figura 2). Contudo, no presente trabalho todas as amostras positivas no IDGA também foram positivas pelo WB (Figura 3).

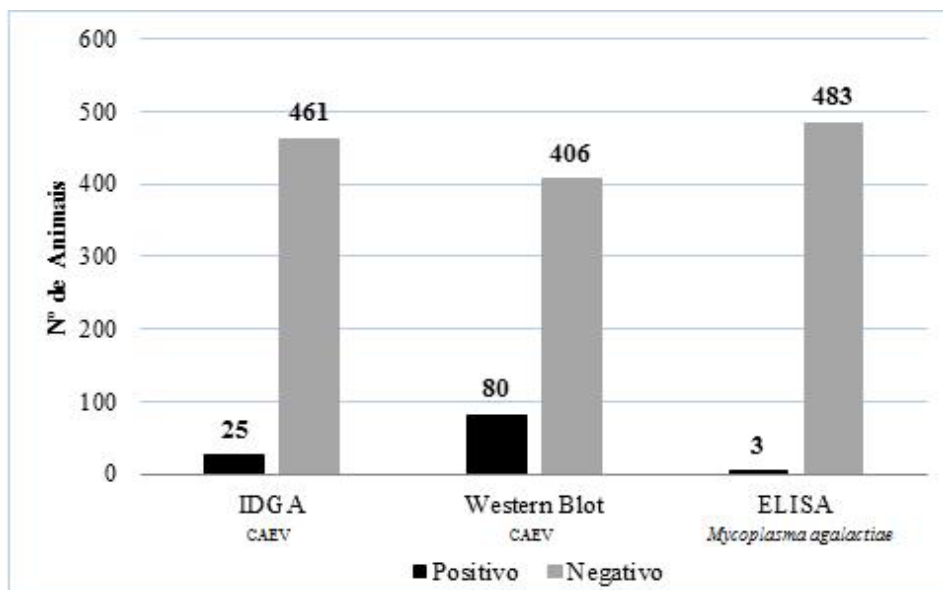


Figura 2. Soroprevalência do vírus da artrite encefalite caprina (CAEV) por Imunodifusão em Gel de Ágar (IDGA) e Western Blot e do *Mycoplasma agalactiae* por Imunoensaio Enzimático (ELISA) indireto em rebanhos de caprinos leiteiros.

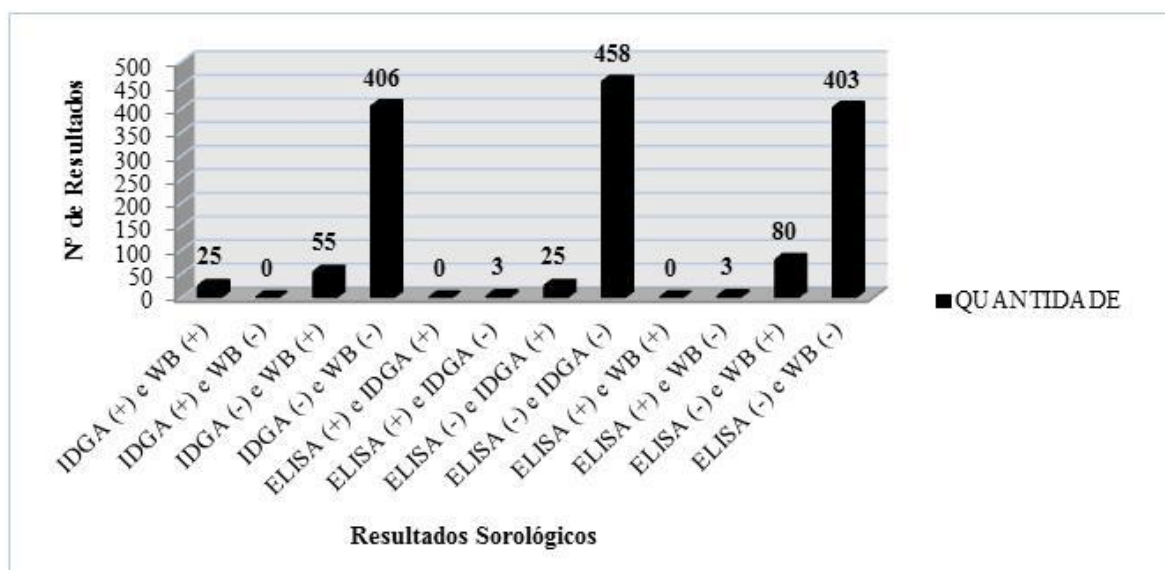


Figura 3. Associação dos resultados do diagnóstico sorológico entre Imunodifusão em Gel de Ágar (IDGA) com Western Blot (WB) para o vírus da artrite encefalite caprina (CAEV), e de ambos com o Imunoensaio Enzimático (ELISA) indireto para *Mycoplasma agalactiae*.

IDGA (+) = Imunodifusão em gel de ágar com amostra com resultado positivo para anticorpos contra o vírus da artrite encefalite caprina; IDGA (-) = Imunodifusão em gel de ágar com amostra com resultado negativo para anticorpos contra o vírus da artrite encefalite caprina; WB (+) = Western Blot com amostra com resultado positivo para anticorpos contra o vírus da artrite encefalite caprina; WB (-) = Western Blot com amostra negativa para anticorpos contra o vírus da artrite encefalite caprina; ELISA (+) = Imunoensaio Enzimático com amostra

positiva para anticorpos anti-*Mycoplasma agalactiae*; ELISA (-) = Imunoensaio Enzimático com amostra negativa para anticorpos anti-*Mycoplasma agalactiae*.

Os animais sororreagentes para *M. agalactiae* no presente estudo, eram de matrizes puras de raça com aptidão leiteira, pertencentes a propriedades e mesorregiões distintas, e submetidas a sistema de criação intensivo. Contudo, essas matrizes não foram soropositivas em nenhum dos testes (IDGA e WB) para Artrite Encefalite Caprina. Dessa forma, não se evidenciou correlação entre os resultados obtidos no teste de ELISA para *M. agalactiae* e o CAEV por IDGA ou por WB ($P < 0,05$), pois nenhum animal apresentou resultado positivo na detecção de anticorpos para ambos os patógenos (Figura 3). Entretanto, em três propriedades com animais sororreagentes para *M. agalactiae*, em duas foi identificado animais com Artrite Encefalite Caprina com percentual de detecção variando de 10 a 20%.

DISCUSSÃO

A soroprevalência encontrada para *M. agalactiae* no estado do Ceará pode ser considerada baixa em comparação aos percentuais relatados em outros estados brasileiros, como na Paraíba (83,28%) [8], Sergipe (10,3%) [26], São Paulo (27,7%) [6], e Rio de Janeiro (85%) [25], como também, em países, como Mali (8,3%) [12], e Espanha (66,7%) [4]. Vale ainda salientar que com esse estudo o estado do Ceará torna-se o quinto do Nordeste a relatar a presença desse agente.

A infecção de *M. agalactiae* nos estados brasileiros pode ser atribuída ao livre comércio com fiscalização deficiente em feiras e exposições agropecuárias, associada à importação de animais de outros estados ou países como forma de melhorar geneticamente a qualidade dos rebanhos [5]. A presença de animais cronicamente infectados e assintomáticos resulta não só na manutenção da infecção dentro do rebanho como também no risco de disseminação para outras propriedades [23]. Como estes rebanhos são de animais

direcionados a produção de leite, a comprovação da presença do agente favorece a possibilidade de ocorrências de perdas consideráveis na produção [27].

Adicionalmente a presença de anticorpos contra o *M. agalactiae* em propriedades situadas em diferentes mesorregiões, indica que apesar da baixa prevalência, a doença encontra-se em pontos distintos do estado do Ceará, sendo cada propriedade fonte de contágio do patógeno. Diante disso, indica um estado de susceptibilidade à infecção por parte dos rebanhos cearenses, sendo necessário medidas que impeçam a sua disseminação, e consequentemente maiores danos e perdas econômicas aos produtores.

Já a CAE por ter sido diagnosticada em quase todas as propriedades, comprova a disseminação dessa lentivirose nos rebanhos cearenses com aptidão leiteira, vindo o valor de soropositividade detectado pela IDGA nesse estudo ser superior aos 4,6% constatado em rebanhos de caprinos leiteiros no Ceará [21], e aos 2,8% relatado no estado do Maranhão ao fazer uso desse mesmo teste sorológico [30]. Além disso, o teste de *Western Blot* reafirmou ainda mais essa situação, uma vez que foram detectados um maior número de amostras sororreagentes, comprovando assim a maior sensibilidade do WB em relação ao IDGA (Figura 2) [3, 24]. Entretanto, o valor evidenciado nesse trabalho de amostras positivas para CAE pelo WB, foi inferior aos 30,6% relatado em outra pesquisa com rebanhos de caprinos cearenses [24], porém superior aos 6,44% registrado no sertão de Pernambuco [2].

Mas fica evidente que a IDGA detecta níveis elevados de anticorpos circulantes no sangue e que por isso propicia resultados falso-negativos, pois níveis mínimos de anticorpos podem não ser detectados. Em contrapartida, o WB, por ser um teste com maior sensibilidade, é capaz de detectar baixos níveis de anticorpos, e riscos mínimos de reações inespecíficas [10, 24].

Nessa perspectiva, constata-se que tanto a Agalaxia Contagiosa quanto a CAE encontram-se presente nos rebanhos cearenses, podendo a ocorrência de rebanhos caprinos

com casos de artrite, ceratoconjuntivite e pneumonia, sugerir a presença de uma ou das duas enfermidades [12].

Assim, embora não tenha sido comprovado a existência de associação entre essas enfermidades, a presença de um retrovírus no organismo pode facilitar a coinfeção por outro microorganismo promovendo a debilitação do sistema imunológico do indivíduo portador. Um exemplo clássico pode ser observado com a elevação nos casos de coinfeção entre pacientes portadores do vírus da imunodeficiência humana (HIV), vírus esse pertencente à mesma família do CAEV, e pelo bacilo da tuberculose, onde a infecção por HIV aumenta em 20 vezes o risco de desenvolver tuberculose ativa [17]. Além disso, há relatos que 32,1% de indivíduos portadores do HIV estavam coinfectados por *Mycoplasma hominis* uma espécie de micoplasma potencialmente patogênico encontrado no trato urogenital [29]. Portanto, a infecção por um retrovírus pode predispor a entrada de outros microorganismos.

CONCLUSÃO

Não houve correlação positiva na incidência de infecção pelo CAEV e pelo *Mycoplasma agalactiae* no presente estudo. Porém o *Mycoplasma agalactiae* está presente em distintas mesorregiões, e medidas sanitárias devem ser adotadas, em um curto prazo, a fim de impedir a disseminação do patógeno, e conseqüentemente, prejuízos produtivos e econômicos, a caprinocultura leiteira cearense.

MANUFACTURERS

¹ BD Vacutainer[®]. São Paulo, SP, Brazil.

² FANEM[®] Ltda. Guarulhos, SP, Brazil.

³ Sigma-Aldrich. St Louis, MO, USA.

⁴ IDEXX Laboratories[™]. Westbrook, ME, USA.

⁵ Thermo Electron. Waltham, MA, USA.

⁶ OSB Software. São Paulo, SP, Brazil.

Funding. The work was financially supported by Funcap [Project number BP2-0107-00240.01.00/15], CNPq/MAPA/SDA [Project number 578438/2008-9], CAPES [Project CAPES/EMBRAPA 15/2014 number 145], and EMBRAPA [Project number 02.13.10.003.00.05].

Ethical approval. This work is part of the PhD thesis of the first author. The research project was approved by the Ethics Committee for the Use of Animals (CEUA) under number 012.12.

Declaration of interest. The authors report no conflicts of interest. The authors alone are responsible for the content and writing of the paper.

REFERENCES

- 1 Alves B.H.L.S., Silva J.G., Mota A.R., Campos A.C., Pinheiro Júnior J.W., Santos S.B. & Mota R.A. 2013.** *Mycoplasma agalactiae* in semen and milk of goat from Pernambuco state, Brazil. *Pesquisa Veterinária Brasileira*. 33(11): 1309-1312.
- 2 Alves J.R.A., Limeira C.H., Lima G.M.S., Pinheiro R.R., Alves F.S.F., Santos V.W.S., Azevedo S.S. & Alves C.J. 2017.** Epidemiological characterization and risk factors associated with lentiviral infection of small ruminants at animal fairs in the semiarid Sertão region of Pernambuco, Brazilian semiarid. *Semina: Ciências Agrárias*. 38 (4): 1875-1886.
- 3 Arruda E.T., Oliveira M.M.M., Nascimento S.A., Campos A.C. & Castro R.S. 2011.** Avaliação de uma microimunodifusão em gel de ágar para diagnóstico de lentivírus de pequenos ruminantes (LVPR) em caprinos. *Ciência Animal Brasileira*. 12 (3): 560-565.
- 4 Amores J., Sánchez., Gómez-Martín A., Corrales J.C., Contreras A. & LA Fe C. 2012.** Surveillance of *Mycoplasma agalactiae* and *Mycoplasma mycoides* subsp.capri in dairy goat herds. *Small Ruminant Research*. 102(1): 89-93.
- 5 Azevedo E.O., Alcântara M.D.B., Nascimento E.R., Tabosa I.M., Barreto M.L., Almeida J.F., Araújo M.D., Rodrigues A.R.O., Riet-Correa F. & Castro R.S. 2006.**

Contagious agalactia by *Mycoplasma agalactiae* in small ruminants in Brazil: first report. *Brazilian Journal of Microbiology*. 37(4): 576-581.

6 Azevedo E.O., Câmara D.R., Silva S.V. & Guerra M.M.P. 2015. Agalaxia contagiosa: Um “novo” problema para caprinos e ovinos no Brasil. *Ciência Veterinária nos Trópicos*. 18(2): 34-38.

7 Bradford M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*. 72: 248-254.

8 Campos A.C., Teles J.A.A., Azevedo E.O., Nascimento E.R., Oliveira M.M.M., Nascimento S.A. & Castro R.S. 2009. ELISA protein G for the diagnosis of contagious agalactia in small ruminants. *Small Ruminant Research*. 84 (1-3): 70-75.

9 Cavalcante A.C.R., Alves F.S.F. & Nascimento E.R. 1999. Ácaros do conduto auditivo de caprinos e infecção por *Mycoplasma*. *Embrapa Caprinos e Ovinos - Outras publicações técnicas (INFOTECA-E)*.

10 Cruz R.B., Putini V.B., Santana G.S., Jorge J.S., Coelho I., Silva D.L., Zacharias F., Tigre, D. & Cerqueira R.B. 2009. Estudo comparativo da sensibilidade e da especificidade de ELISA indireto com o teste de imunodifusão em gel de agarose no diagnóstico sorológico da artrite encefalite caprina (CAE). *Revista Acadêmica: Ciência Animal*. 7(3): 355-364.

11 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. 2008. Desenvolvimento e padronização de um Elisa indireto para diagnóstico de Maedi Visna em ovinos. *Ciência Animal Brasileira*. 9:181-187..

12 Diallo M., Cissé O., Niang M., Doucouré M., Koné M., Schalch L., Nicolet J. & Roth J. 2003. Enquête sérologique de l’agalctie contagieuse à *Mycoplasma agalactiae* chez les petits ruminants au Mali. *Revue d’élevage et de médecine vétérinaire des pays tropicaux*. v. 56(1-2).

13 Gouveia A.M. 1994. Padronização de microtécnica de imunodifusão em gel de agarose para diagnóstico de lentivírus da pneumonia progressiva ovina (OPP), maedi-visna (MVV) e artrite encefalite caprina (CAEV). Sobral, 4p. (Mimeografado).

14 Doc. Eletrônico (internet): IBGE – Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Perfil pecuário. Disponível em: <http://downloads.ibge.gov.br/downloads_estatisticas.htm>. [Acessado em 08/2017.]

15 Kumar A., Rahal A., Chakraborty S., Verma A.K. & Dhama K. 2014. *Mycoplasma agalactiae*, an etiological agent of contagious agalactia in small ruminants: A Review. *Veterinary Medicine International*.

16 Lima C.C.V., Costa J.N., Souza T.S., Martinez P.M., Costa Neto A.O., Azevedo D.A.A. & Pinheiro R.R. 2013. Immunodiagnostic for arthritides encephalitis caprine in flocks of semi-arid region in Bahia state, Brazil. *Revista Brasileira de Medicina Veterinária*. 35: 358-364.

17 Magno E.S., Saraceni V., Souza A.B., Magno R.S., Saraiva M.G.G. & Bühner-Sékula S. 2017. Fatores associados à coinfeção tuberculose e HIV: o que apontam os dados de notificação do Estado do Amazonas, Brasil, 2001-2012. *Cadernos de Saúde Pública*. 33(5).

18 Miguel M.P., Menezes L.B. & Araújo E.G. 2012. Western Blotting: A técnica e aplicações na pesquisa e rotina diagnóstica em medicina veterinária. *Enciclopédia Biosfera*. 8(15):1704.

19 Minguijón E., Reina R., Pérez M., Polledo L., Villoria M., Ramírez H., Leginagoikoa I., Badiola J.J., García-Martín J.F., De Andrés D., Luján L., Amorena B. & Juste R.A. 2015. Small ruminant lentivirus infections and diseases. *Veterinary Microbiology*. 181(1): 75-89.

20 Office International des Epizooties. 2004. Manual of standards diagnostic tests and vaccines. World Organization for Animal Health, Paris: OIE, p.1178, 5.ed.

- 21 Pinheiro R.R., Gouveia A.M.G. & Alves F.S.F. 2001.** Prevalência da infecção pelo vírus da artrite encefalite caprina no estado do Ceará, Brasil. *Ciência Rural*. 31(3): 449-454.
- 22 Pinheiro R.R., Andrioli A., Gouveia A.M.G., Aragão M.A.C. & Martinez P.M. 2010.** Avaliação de antígenos para o diagnóstico de lentivírus em rebanho caprino sob programa de controle. *Arquivo do Instituto Biológico*. 77: 133-137.
- 23 Prats-Van der Ham M., Tatay-Dualde J., De La Fe C., Paterna A., Sánchez A., Corrales J.C., Contreras A. & Gómez-Martín A. 2017.** Detecting asymptomatic rams infected with *Mycoplasma agalactiae* in ovine artificial insemination centers. *Theriogenology*. 89: 324-328.
- 24 Rodrigues A.S., Brito R.L.L., Pinheiro R.R., Dias R.P., Alves S.M., Souza T.S., Souza K.C., Azevedo D.A.A., Andrioli A., Magalhães D.C.T. & Teixeira M.F.S. 2014.** Padronização do Elisa indireto e Western Blot para diagnóstico da artrite-encefalite caprina. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*. 66(2): 417-424.
- 25 Santos L.M.M., Pereira C.M., Mansur F.J., Lopes L.A., Campos A.C., Azevedo E.O., Castro R.S., Barreto M.L., Almeida J.F. & Nascimento E.R. 2014.** *Mycoplasma agalactiae* Outbreak in Goat Herd of Rio de Janeiro State, Brazil. In: *Abstracts of the XX Congress of the International Organization for Mycoplasmaology* (Blumenau, Brazil). Poster session 1. p. 22.
- 26 Santos M.O., Campos A.C., Santos J.P., Santos P.O.M., Caldas E.L.C., Santos A.D.F., Nascimento E.R., Castro R.S. & Azevedo E.O. 2015.** Agalaxia contagiosa em ovinos e caprinos do Estado do Sergipe: dados preliminares. *Scientia Plena*. 11(4).
- 27 Silva N.S., Azevedo E.O., Campos A.C., Cordeiro A.A., Mamede A.G., Silva R.B.S., Castro R.S., Nascimento E.R. & Marinho M.L. 2014.** Infecção congênita em cabritos por *Mycoplasma agalactiae*. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*. 66(2):631-634.

28 Sousa A.L.M. 2013. Avaliação da sensibilidade de testes de Imunodiagnóstico para detecção de anticorpos contra o vírus da Artrite Encefalite Caprina. 21f. Sobral, CE. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Biologia) – Universidade Estadual Vale do Acaraú.

29 Souza G.C., Xavier-Souza E., Timbó M.S., Cunha V. & Travassos A.G. 2017. P3.83 Antimicrobial resistance of *Ureaplasma urealyticum* and *Mycoplasma hominis* researched at a reference centre in Salvador, Bahia. *Journal Sexually Transmitted Infections*. 93(2): 123-124.

30 Teixeira W.C., Santos H.P., Veschi J.L.A., Nascimento S.A., Silva J.C.R, Marvulo M.F.V., Rizzo H. & Castro R.S. 2016. Prevalência da infecção pelo Vírus da Artrite Encefalite Caprina em rebanhos caprinos do estado do Maranhão, Brasil. *Revista Brasileira de Medicina Veterinária*. 38(1): 01-06.

8. CAPÍTULO III

Avaliação da toxicidade de solventes de extratos vegetais com ação antiviral em sêmen caprino refrigerado

Evaluation of solvent toxicity of plant extract with antiviral action in refrigerated goat semen

Renato Mesquita Peixoto, Alice Andrioli, Diones Oliveira Santos, Raymundo Rizaldo
Pinheiro, Juscilânia Furtado Araújo, Ana Lúcia Madeira de Sousa, Davi Farias Silva, Edgar
Marques Damasceno & Maria Fátima da Silva Teixeira.

Periódico: **Acta Scientiae Veterinariae** (ISSN: 1679-9216)

(Publicado em setembro de 2017)

Qualis: B1 na Medicina Veterinária

Disponível em: <http://www.ufrgs.br/actavet/45/PUB%201487.pdf>

**Avaliação da Toxicidade de Solvente de Extratos Vegetais com Ação Antiviral em
Sêmen Caprino Refrigerado**

Evaluation of Solvent Toxicity of Plant Extract with Antiviral Action in Refrigerated Goat
Semen

Renato Mesquita Peixoto¹, Alice Andrioli², Diones Oliveira Santos², Raymundo Rizaldo
Pinheiro², Juscilânia Furtado Araújo¹, Ana Lúcia Madeira de Sousa¹, Davi Farias Silva⁴,
Edgar Marques Damasceno³ & Maria Fátima da Silva Teixeira¹

Artigo baseado em projeto de Tese do primeiro autor em cumprimento parcial dos requisitos para o título de Doutor. ¹Laboratório de Virologia (LABOVIR), Programa de Pós-graduação em Ciências Veterinárias (PPGCV), Universidade Estadual do Ceará (UECE), Fortaleza, CE, Brazil. ²EMBRAPA Caprinos e Ovinos (CNPACO), Sobral, CE. ³Universidade Estadual Vale do Acaraú (UVA), Sobral. ⁴Instituto Superior de Teologia Aplicada (Faculdades INTA), Sobral. CORRESPONDENCE: R.M. Peixoto [renatomiraima@gmail.com - Fax: +55 (85) 3101-9849]. LABOVIR, Faculdade de Veterinária, Universidade Estadual do Ceará (UECE). Av. Dr. Silas Munguba n. 1700, Campus do Itaperi. CEP 60740-000 Fortaleza, CE, Brazil.

ABSTRACT

Background: Caprine Arthritis Encephalitis Virus have been detected in sperm of breeding goats causing economic losses. In order to control the virus, researches aiming to identify natural extracts with potential antiviral effects are performed. However, aqueous or ethanolic extracts must be diluted in dimethyl sulfoxide (DMSO), which is a substance with unknown effects in sperm quality when present in diluting media. Therefore, this study aimed to evaluate sperm viability of refrigerated caprine semen diluted in media containing DMSO. This was performed to provide data that aid in researches involving the use of this component with natural extracts that may inactivate the caprine lentivirus in sperm.

Materials, Methods & Results: The experiment was performed at the Laboratory of Seminal Technology in Embrapa Goats and Sheep in the city of Sobral, Brazil. Sperm viability was assessed in caprine semen refrigerated in two dilution media with crescent concentrations of

DMSO. Sperm samples of five goats seronegative for the caprine lentivirus were pooled and diluted in minimal essential medium (MEM) enriched with glucose at 0.01M added of crescent concentrations of DMSO (0%, 1.5%, 1.75%, 2.0%, 2.25% and 2.5%). The same breeders provided the pool of sperm to test Tris added 2.5% of egg yolk and the same concentrations of DMSO previously mentioned. Treatments were refrigerated at 7°C and evaluated up until four hours after DMSO addition. Individual progressive motility (IPM), sperm vigor (V), percentage of spermatozoa reactive to hypoosmotic test (HO) and morphologically normal (NOR) were evaluated. IPM, vigor and NOR remained within normal standards for the caprine species in all treatments test. Percentage results of spermatozoa reactive to hypoosmotic test was higher in Tris yolk with values ranging between 34.66% to 46.33%. Sperm vigor was positively correlated ($r = 0.85$) with IPM in the MEM diluted pool of sperm. In Tris yolk, vigor and hypoosmotic test correlated moderately ($r = 0.63$, $r = 0.54$, respectively) with IPM. Tris yolk medium added DMSO presented the highest percentage of reactivity to hypoosmotic test in all treatments when compared to MEM added DMSO.

Discussion: The fact that DMSO is easily homogenized in water, ethylic alcohol and most organic solvents favors its use in diluting natural extracts. These components are a possible source of products that inactivate caprine arthritis encephalitis virus in sperm, which is the key to promoting the safe use of genetic material of infected breeders, in addition to commercial use of germplasm. In this study, there was no interference of DMSO in the analyzed parameters when added in a maximum concentration of 2.5% to MEM and Tris yolk, which is in accordance with standard values for goats. In addition, Tris yolk may promote greater protection to the membrane of sperm cells, which was demonstrated by hypoosmotic test. This medium could be ideal to be used in new methodologies that incorporate DMSO. In conclusion, DMSO added to dilution media Tris yolk and MEM did

not interfere with the quality of refrigerated caprine sperm, which maintained viability. These results indicate that this substance did not present harmful effects to the genetic material, promoting the use as solvent of extracts from plant compounds with potential anti-viral effect. The information in this study may aid new research performed in this area.

Keywords: Dimethyl Sulfoxide, MEM, Tris yolk, sperm preservation.

Descritores: Dimetilsulfóxido, MEM, Tris Gema, preservação do sêmen.

INTRODUÇÃO

A possibilidade de contaminação direta do sêmen por microorganismos, como o vírus da artrite encefalite caprina (CAEV), presente no sêmen de caprinos na forma de DNA pró-viral [25] como também de RNA viral [17] inviabiliza o uso do reprodutor, e a comercialização de seu germoplasma.

Assim, muitas pesquisas tem se direcionado para extratos de fitocompostos de produtos naturais com potencial efeito antiviral para retirar ou inativar o CAEV do sêmen, porém estes devem ser previamente dissolvidos em dimetilsulfóxido (DMSO) independente de serem aquosos ou etanólicos [3,6]. A escolha dessa substância como meio para dissolução dessas drogas ocorre pela sua fácil solubilidade em ambientes aquosos e etanólicos, e versatilidade associada com inúmeras propriedades farmacológicas [1]. Além disso, o DMSO possui capacidade de interagir com drogas naturais sem causar alteração na estrutura molecular, propiciando assim que inúmeras substâncias quando associadas a ele sejam carregadas com efeitos potencializados através das membranas, enquanto que a nível celular exerce efeito sinérgico com tais substâncias [10].

Portanto, ao testar drogas cuja incorporação ocorreria no diluidor seminal deveria ser levado em consideração o efeito destas, e no caso do DMSO, a sua ação individual na

qualidade espermática durante o processo de resfriamento, e influência nos parâmetros seminiais. Nessa concepção, por ser algo desconhecido no enfoque utilizado, objetivou-se avaliar a viabilidade espermática de sêmen caprino refrigerado diluído em diferentes meios acrescidos de concentrações crescentes de DMSO para poder utilizá-lo em eventuais pesquisas com extratos naturais que possam inativar o CAEV no sêmen.

MATERIAIS E MÉTODOS

Localização

O experimento foi realizado no Laboratório de Tecnologia de Sêmen da Embrapa Caprinos e Ovinos na cidade de Sobral - CE, nordeste do Brasil, à latitude de 3° 42' sul, longitude de 40° 21'.

Animais

Foram utilizados cinco reprodutores caprinos da raça Anglo-nubiano com idade de 12 a 24 meses, soronegativos para o lentivírus caprino obtidos após três testes consecutivos de Western Blot (WB) e de Nested PCR (nPCR) no sangue, com intervalo de 30 dias.

Procedimento Experimental

Todos os animais foram submetidos a quatro coletas de sêmen, com intervalo de sete dias, por meio de vagina artificial modelo curto na presença de uma fêmea ovariectomizada com estro induzido pela aplicação de 1 mL de benzoato de estradiol¹, 48 h antes da coleta, e imobilizada em tronco de contenção de forma a facilitar a monta e a coleta.

À medida que o sêmen era coletado o mesmo era imediatamente destinado ao Laboratório de Tecnologia de Sêmen para realização do espermograma, quantificando os seguintes parâmetros: volume (mL), concentração espermática ($\times 10^9$ espermatozoide/mL), motilidade individual progressiva (MIP, 0-100%), e vigor (0-5), de acordo com os critérios preconizados pelo Colégio Brasileiro de Reprodução Animal (CBRA) [9]. Após cada coleta

colocou-se o sêmen em banho-maria a 37°C e determinou-se o volume do ejaculado por meio da graduação do tubo coletor de polipropileno². Em seguida, uma gota de sêmen foi colocada juntamente com uma gota de solução salina entre lâmina³ e lamínula⁴ pré-aquecida a 37°C e observada em microscópio óptico⁵ com aumentos de 10 e 40x, verificando a motilidade progressiva retilínea (percentual) e o vigor espermático. Posteriormente, acrescentou-se 50 µL do sêmen em 10 mL de solução fisiológica formolizada a 0,1% tamponada para contagem das células espermáticas, utilizando-se espectrofotômetro (Spectronic 20)⁶, para determinação da concentração espermática por mL e no ejaculado total.

Realizada a avaliação *in vitro* de cada ejaculado, o sêmen dos reprodutores com MIP \geq 80% e vigor \geq 3 foram misturados formando um *pool* e em seguida diluídos em: meio essencial mínimo⁷ contendo glicose⁸ a 0,01M e no diluidor Tris⁸ (Tris-hidroximetilaminometano-H₂NC(CH₂OH)₃, com adição de frutose⁸ a 0,5%, ácido cítrico⁹ a 1,99% e gema de ovo à 2,5%. A diluição do *pool* de sêmen foi feita para obter a concentração de 2×10^9 espermatozoides processáveis/mL em ambos os diluentes.

O *pool* de sêmen foi em seguida resfriado em geladeira (7°C), por duas horas para estabilizar a temperatura do material. Após isso, o pool de sêmen foi dividido em tubos de 15 mL, acrescido de dimetilsulfóxido (DMSO)⁸ para a obtenção das seguintes concentrações: 0, 1,5; 1,75; 2,0; 2,25 e 2,5%. Adicionalmente, foram avaliados os parâmetros de motilidade individual progressiva e vigor espermático do *pool* de sêmen, nas diferentes concentrações de DMSO, com intervalo de duas horas, até um período máximo de quatro horas pós-adição do diluente.

Concomitantemente eram feitas lâminas para observação da morfologia espermática por meio de esfregaços corados com azul de bromofenol⁸, e avaliação de 200 células em microscópio óptico (Leica DM 500)¹⁰ (100x). Foi realizado teste hiposmótico, onde 50 µL de cada amostra era depositada em tubo de 2,5 mL contendo 500 µL de solução hiposmótica com

osmolaridade de 179 mOsmol/L composta de citrato de sódio⁸ e água milli-Q. Após 20 minutos, 30 µL dessa mistura era colocado em lâmina e lamínula contendo 60 µL de glutaraldeído¹¹ e efetuado a contagem dos espermatozoides com membrana plasmática íntegra através da observação em microscópio óptico¹⁰ com contraste de fase de aumentos de 40x, realizando a contagem de 100 células.

Análise Estatística

A consistência dos dados e análise descritiva (médias e desvio padrão) das características avaliadas nas diferentes concentrações de DMSO, em ambos os diluidores, foram comparadas pelo Teste de t de Student a 5% de significância, e submetido à correlação de Pearson.

RESULTADOS

Independentemente do tipo de diluente utilizado, os valores encontrados de motilidade individual progressiva (MIP) e vigor espermático (V) apresentaram-se em conformidade com os preconizados pelo CBRA [9]. Em adição, pode ser observado que não houve interferência do DMSO nos parâmetros de MIP e V (Tabela 1), quando esse foi adicionado a uma concentração máxima de 2,5% ao MEM. Ao efetuar a análise estatística desses dois parâmetros entre os diluidores, o vigor do sêmen que foi diluído em MEM sem acréscimo de DMSO apresentou diferença significativa ($P < 0,05$) com relação ao *pool* diluído em Tris Gema, também sem DMSO (Tabela 1). Quanto ao sêmen diluído em Tris Gema foi encontrada diferença estatística ($P < 0,05$) para a MIP, em diferentes concentrações de DMSO.

Tabela 1. Características espermáticas do pool de sêmen de cinco reprodutores caprinos, refrigerado e diluído em meio essencial mínimo (MEM) ou Tris Gema a 2,5%, acrescido de concentrações crescentes de dimetilsulfóxido (DMSO).

DMSO (%)	MEM				TRIS GEMA			
	MIP (%)	V (0-5)	HO (%)	NOR (%)	MIP (%)	V (0-5)	HO (%)	NOR (%)
0	75,00 ± 10,48Aa	3,83 ± 0,40Aa	20,83 ± 5,63Aa	87,10 ± 1,30Aa	81,66 ± 4,08Aa	3,16 ± 0,40Ba	46,33 ± 6,88Ba	90,00 ± 6,53Aa
1,5	65,00 ± 16,43Aa	3,50 ± 0,54Aa	18,50 ± 11,91Aa	90,65 ± 1,90Aa	66,66 ± 8,16Ab	3,33 ± 0,51Aa	38,50 ± 4,50Bb	86,08 ± 19,49Aa
1,75	73,33 ± 10,32Aa	3,60 ± 0,51Aa	15,50 ± 7,60Aa	87,67 ± 11,80Aa	75,00 ± 10,48Aa	3,33 ± 0,51Aa	35,50 ± 8,75Bb	95,33 ± 2,08Aa
2,0	70,00 ± 8,94Aa	3,60 ± 0,51Aa	19,83 ± 8,42Aa	88,91 ± 3,51Aa	70,00 ± 8,94Ab	3,16 ± 0,40Aa	34,66 ± 11,92Bb	94,41 ± 4,53Ba
2,25	78,33 ± 7,52Aa	3,83 ± 0,40Aa	21,50 ± 6,59Aa	88,75 ± 6,54Aa	73,33 ± 13,66Aa	3,16 ± 0,75Aa	34,66 ± 11,34Bb	94,16 ± 2,58Aa
2,5	68,33 ± 14,71Aa	3,33 ± 0,81Aa	23,83 ± 7,75Aa	91,04 ± 1,83Aa	68,33 ± 14,71Ab	3,00 ± 0,89Aa	40,50 ± 6,02Ba	94,66 ± 2,85Aa

MIP = motilidade individual progressiva; V = vigor espermático; HO = formas reativas ao teste hiposmótico; NOR = espermatozoides morfolologicamente normais. Letras maiúsculas diferentes na mesma linha indicam diferença estatística entre os diluidores ($P < 0,05$) para cada parâmetro; letras minúsculas diferentes na mesma coluna indicam diferença estatística ($P < 0,05$) dentro de cada meio diluidor.

No que diz respeito ao percentual máximo de espermatozoides reativos ao teste hiposmótico (HO), percebe-se que o meio Tris gema acrescido de DMSO apresentou maior percentual de reatividade em todos os tratamentos quando comparado com o MEM incrementado com DMSO. Na avaliação separada por diluente, notou-se que os percentuais detectados de espermatozoides com membrana funcional intacta, em sêmen diluído em MEM, não apresentaram diferença estatística ($P > 0,05$) nas diversas concentrações de DMSO. Observou-se diferença estatística quanto ao HO do sêmen diluído em Tris Gema sem DMSO em relação ao sêmen diluído no mesmo meio, mas com concentrações de 1,5 à 2,25% de DMSO, porém não foi observado quando a concentração foi de 2,5%. Em adição, o maior percentual de reatividade ao teste hiposmótico ($23,83 \pm 7,75$), do sêmen diluído em MEM foi com 2,5% de DMSO, assim foi sugestivo que o DMSO não afeta a membrana espermática.

Quanto ao percentual de espermatozoides morfolologicamente normais (Tabela 1) observou-se que os valores permaneceram dentro dos padrões entre 80 a 90% recomendados

para caprinos [9], em todos os tratamentos, havendo diferença estatística ($P < 0,05$) apenas na concentração de 2,0% de DMSO entre os diluentes seminais, com o Tris Gema vindo a apresentar um maior percentual ($94,41 \pm 4,53$) de células espermáticas normais, em relação ao MEM ($88,91 \pm 3,51$) nesse tratamento.

Evidenciou-se que dentre as alterações encontradas na morfologia espermática em todos os tratamentos, independente do diluidor, o principal defeito foi relacionado a problemas de cabeça (Tabela 2). Nos tratamentos onde o diluidor utilizado foi o meio essencial mínimo (MEM) denota-se que até uma concentração de 1,75% de DMSO o defeito morfológico que teve maior incidência após os de cabeça foram defeitos de peça intermediária (DPI), porém essa situação se modificou à medida que ocorria aumento da concentração de DMSO a esse tipo de diluidor, onde nesse caso os defeitos de flagelo passaram a ter maior ocorrência que os de peça intermediária.

Tabela 2. Distribuição percentual de alterações na morfologia espermática de sêmen caprino refrigerado diluído em meio essencial mínimo (MEM) e Tris Gema a 2,5% acrescido de concentrações crescentes de dimetilsulfóxido (DMSO).

DMSO (%)	Diluyente	Morfologia espermática (%)				
		NO	DA	DC	DPI	DF
0	MEM	$87,10 \pm 1,30$	$0,20 \pm 0,00$	$7,60 \pm 1,70$	$2,80 \pm 0,00$	$1,90 \pm 0,50$
	TRIS	$90,00 \pm 6,53$	$0,00 \pm 0,00$	$6,90 \pm 5,80$	$1,20 \pm 0,10$	$1,90 \pm 0,60$
1,5	MEM	$90,65 \pm 1,90$	$0,40 \pm 0,60$	$3,39 \pm 0,20$	$3,25 \pm 2,20$	$2,34 \pm 0,80$
	TRIS	$86,08 \pm 19,49$	$0,09 \pm 0,10$	$10,67 \pm 11,30$	$1,25 \pm 0,40$	$1,75 \pm 0,50$
1,75	MEM	$87,67 \pm 11,80$	$0,00 \pm 0,00$	$9,31 \pm 11,30$	$1,84 \pm 0,50$	$1,19 \pm 0,30$
	TRIS	$95,33 \pm 2,08$	$0,00 \pm 0,00$	$2,42 \pm 0,10$	$0,92 \pm 0,10$	$1,34 \pm 0,40$
2,0	MEM	$88,91 \pm 3,51$	$0,09 \pm 0,10$	$5,75 \pm 6,50$	$2,09 \pm 1,30$	$3,17 \pm 1,10$
	TRIS	$94,41 \pm 4,53$	$0,00 \pm 0,00$	$2,83 \pm 1,60$	$0,59 \pm 0,60$	$2,17 \pm 0,60$
2,25	MEM	$88,75 \pm 6,54$	$0,00 \pm 0,00$	$6,00 \pm 4,60$	$2,00 \pm 0,50$	$3,42 \pm 0,70$
	TRIS	$94,16 \pm 2,58$	$0,00 \pm 0,00$	$2,83 \pm 0,20$	$0,67 \pm 0,00$	$2,33 \pm 0,50$
2,5	MEM	$91,04 \pm 1,83$	$0,0 \pm 0,00$	$4,58 \pm 1,52$	$1,71 \pm 0,76$	$2,52 \pm 0,90$
	TRIS	$94,66 \pm 2,85$	$0,0 \pm 0,00$	$3,16 \pm 0,94$	$0,75 \pm 0,82$	$1,50 \pm 0,29$

NO: normais; DA: defeito de acrossomo; DC: defeito de cabeça; DPI: defeito de peça intermediária; DF: defeito de flagelo.

Já no diluidor Tris Gema foi observado que em todas as concentrações de DMSO, o segundo maior percentual de defeito morfológico era relacionado a defeitos de flagelo, indicando que concentrações maiores de DMSO a esse diluidor determinaria maiores incidências desse tipo de alteração espermática, a qual é prejudicial à fertilidade da célula. Exatamente nesse diluente, denotou-se que durante as avaliações de patologia espermática encontrou-se um defeito raro que é a presença de um espermatozoide bicaudal (Figura 1) na concentração de 2,25% de DMSO acrescido ao diluente Tris Gema.



Figura 1. Espermatozoide bicaudal na concentração de 2,25% de dimetilsulfóxido (DMSO) acrescido ao diluente Tris Gema.

Analisando as correlações das características espermáticas avaliadas no *pool* de sêmen diluído em MEM (Tabela 3) verifica-se que apenas o vigor (V) apresentou diferença estatística ($P < 0,05$) e correlação positiva alta ($r = 0,85$) com a motilidade individual progressiva (MIP).

Tabela 3. Coeficientes de correlação de Pearson das características seminais de sêmen caprino refrigerado e diluído em meio essencial mínimo (MEM) enriquecido com glicose a 0,01M.

	MIP	V	HO	NOR
MIP	-			
VIGOR	0,85*	-		
HO	0,30ns	0,19ns	-	
NOR	0,042ns	-0,036ns	0,218ns	-

MIP = motilidade individual progressiva; V = vigor espermático; HO = formas reativas ao teste hiposmótico; NOR = espermatozoides morfolologicamente normais. * = ($P < 0,05$); ns = não significativo ($P > 0,05$).

Observa que com o *pool* de sêmen diluído em Tris Gema, o vigor, juntamente com o percentual de formas reativas ao teste hiposmótico (HO) apresentaram correlação favorável e moderada ($r = 0,63$; $r = 54$, respectivamente) com a MIP (Tabela 4).

Tabela 4. Coeficientes de correlação de Pearson das características seminais de sêmen caprino refrigerado e diluído em Tris Gemas a 2,5%.

	MIP	V	HO	NOR
MIP	-			
VIGOR	0,63*	-		
HO	0,54*	0,29 ns	-	
NOR	0,085ns	-0,304ns	-0,232ns	-

MIP = motilidade individual progressiva; V = vigor espermático; HO = formas reativas ao teste hiposmótico; NOR = espermatozoides morfolologicamente normais. * = ($P < 0,05$); ns = não significativo ($P > 0,05$).

DISCUSSÃO

A eficácia do dimetilsulfóxido (DMSO) como crioprotetor interno e/ou anti-inflamatório já está bem elucidada [12], agora o presente estudo constatou a viabilidade do sêmen quando essa substância for incluída ao diluente seminal para o processo de refrigeração, apresentando parâmetros seminais normais para espécie e similares a outros autores [25,27] que também avaliaram sêmen caprino refrigerado, porém sem DMSO. Desse modo, observa-se que o DMSO, independente da concentração testada nos diluentes MEM e Tris Gema não ocasionou efeito danoso sobre os espermatozoides.

Quanto ao percentual máximo de espermatozoides reativos ao teste hiposmótico (HO), independente do diluente (MEM ou Tris Gema) os dados obtidos foram inferiores aos relatados em outras pesquisas [5,16,19]. Mas deve-se ressaltar, que nesses trabalhos a solução hiposmótica era composta de citrato de sódio com frutose apresentando osmolaridades de 150mOsm/L e 412mOsm/Kg, valores esses diferentes da osmolaridade da solução de citrato de sódio (179mOsmol/L), não enriquecida com frutose, deste trabalho.

Altos índices de temperatura ambiente e umidade relativa do ar podem ter contribuído para a ocorrência desses baixos valores de reatividade ao teste, através de possíveis alterações da qualidade seminal por meio de modificações no processo de maturação no epidídimo que resultaria em problemas na membrana espermática dos espermatozoides [11,21], e com isso comprometendo a resposta dos mesmos ao teste hiposmótico.

Em adição, tratamentos em que o diluente é o Tris Gema há uma maior taxa de preservação da membrana da célula espermática, a qual permanece com sua membrana normal do ponto de vista funcional, mesmo na presença de DMSO no diluente. Situação semelhante foi também relatada por outros autores [13,26], os quais mencionam que diluidores a base de gema de ovo determinam uma maior preservação da membrana plasmática, pois tem em sua composição frações lipoproteicas de baixa densidade que ajudam a preservar a integridade da membrana celular do espermatozoide, determinando taxas maiores de reatividade ao teste hiposmótico. Fato esse não proporcionado pelo MEM, justificando assim a ocorrência de diferença estatística ($P < 0,05$) entre esses dois diluidores em todos os tratamentos. Na literatura, diversos trabalhos relataram a qualidade e eficiência do Tris Gema como diluente seminal [15,25,27,28], pois o mesmo além de atuar como uma substância tampão acarreta uma desaceleração do metabolismo da frutose pelo espermatozoide, de modo a contribuir para preservação energética da célula espermática [7]. Partindo dessa premissa, presume-se que possivelmente esse diluente seja o ideal a ser

adotado em metodologias que busquem a inativação do CAEV no sêmen através de extratos naturais dissolvidos em DMSO, tornando uma ferramenta auxiliar no combate a artrite encefalite caprina.

Mas vale ressaltar que os resultados apresentados nesse estudo corroboram com os de outros autores [24] no que diz respeito ao uso do MEM como diluente seminal apresentando potencial de manutenção do sêmen caprino dentro dos padrões normais para a espécie, podendo vir a ser adotado como diluidor seminal.

Na análise das alterações encontradas na morfologia espermática houve uma grande detecção de problemas de cabeça (Tabela 2). Normalmente a ocorrência dessas alterações é atribuída a elementos tóxicos, advindos do próprio metabolismo espermático, como por exemplo, constituintes de espermatozoides imóveis ou anormais que apresentam capacidade de reação com o oxigênio e causam a degeneração, não podendo nesse caso, associar a incidência dessas alterações ao DMSO, uma vez que os índices de células espermáticas com morfologia normal permaneceram em conformidade para a espécie.

Nesse estudo também foi evidenciado a presença de um defeito raro, que é a presença de um espermatozoide bicaudal (Figura 1), pois, em geral, os principais defeitos morfológicos de sêmen caprino descritos na literatura são relacionados a problemas de peça intermediária [2] e /ou de cabeça de espermatozoides [14], sendo esse último defeito o que mais foi observado nesse atual estudo.

Deve-se salientar que o efeito deletério, ocasionado por altas temperaturas, as quais são peculiares do nordeste brasileiro, prejudicam a qualidade seminal, resultando muitas vezes em aumento na temperatura testicular do animal e por consequência acarretando em degenerações específicas, ao ponto de propiciar irregularidades na morfologia espermática em etapas importantes do processo de espermatogênese [11], o que possivelmente contribuiu para determinar esse maior percentual de defeitos de cabeça relatado nesse trabalho.

Alguns autores [2] mencionaram que inúmeros fatores (protocolo, diluente, coloração) influenciaram na análise patológica, inclusive a variação de cada reprodutor (o qual foi eliminado com a avaliação do *pool* e não de cada ejaculado), com isso há uma enorme relevância na avaliação da patologia espermática, pois conforme a distribuição de espermatozoides normais poderia determinar a fertilidade, tanto *in vitro* quanto *in vivo*, dependendo da constituição da célula espermática. Com isso, partidas de sêmen que venham a apresentar problemas de cauda dupla implicaria em baixa qualidade espermática.

A motilidade espermática está diretamente relacionado com o poder dos espermatozoides de alcançarem o ambiente uterino e o local de fertilização [22], sendo de enorme importância que haja a ocorrência de correlação entre motilidade e vigor espermático, algo que foi evidenciado nesse estudo tanto nos tratamentos onde o DMSO foi incluso em MEM (Tabela 3) quanto nos que tinha o Tris Gema como diluidor seminal (Tabela 4), corroborando assim com outros dados presentes na literatura que relatam correlação de moderada a alta entre MIP e V em sêmen caprino [4,18], correlação essa já relatada também em outras espécies de interesse zootécnico, como por exemplo, bovinos [20] e frangos [8].

Assim, vale salientar, que na busca constante por novas alternativas que venham a ser eficazes na retirada ou inativação do vírus da CAE no sêmen, observa-se que o DMSO é passível de ser incluso no diluente seminal, uma vez que os dados desse estudo demonstram que a viabilidade seminal permanece estável. Portanto, extratos naturais aquosos e/ou etanólicos com potencial antiviral, que normalmente possuam o DMSO como seu principal diluente, em virtude de sua capacidade de se misturar a água, álcool etílico e grande parte de solventes orgânicos [10] torna-se uma ferramenta a ser validada em novos estudos que visem à inativação do vírus da CAE presente no sêmen de reprodutores.

CONCLUSÃO

O DMSO adicionado aos diluentes seminais, MEM e Tris Gema, não interferiu na qualidade do sêmen caprino refrigerado, o qual manteve sua viabilidade, indicando que essa substância não apresentou efeitos danosos a esse material genético, possibilitando o seu uso como solvente de extratos de fitocompostos com potencial efeito antiviral. Adicionalmente, espera-se que as informações do presente estudo sirvam de subsídio para novas pesquisas dentro dessa vertente.

MANUFACTURERS

¹Biofarm Química e Farmacêutica Ltda. Jaboticabal, SP, Brazil.

²Techno Plastic Products AG. Trasadingen, Switzerland.

³Perfecta Indústrias e Comércio de Lâminas de Vidro Ltda. São Paulo, SP, Brazil.

⁴Glasstécnica Importação e Comércio de Vidros Ltda. São Paulo, SP, Brazil.

⁵Laborlux 12 ME – Leitz - Estugarda, Germany.

⁶Bausch & Lomb. Rochester, NY, USA.

⁷Gibco by Life Technologies, CO, USA.

⁸Sigma-Aldrich - St Louis, MO, USA.

⁹Dinâmica Repres e Serviços Ltda – Balneário Camboriú, SC, Brazil.

¹⁰Leica Camera AG - Wetzlar, Germany.

¹¹Rioquímica S/A – São José do Rio Preto, SP, Brazil.

Funding. The work was financially supported by Funcap [Project number BP2-0107-00240.01.00/15] and EMBRAPA [Project number 02.13.10.003.00.05].

Ethical approval. This work is part of the PhD thesis of the first author. The research project was approved by the Ethics Committee for the Use of Animals (CEUA) under number 013/2014.

Declaration of interest. The authors report no conflicts of interest. The authors alone are responsible for the content and writing of the paper.

REFERENCES

1 Alves G.E.C. 1998. Dimetilsulfóxido (DMSO). *Saude Equina*. 1(6): 6-10.

- 2 Aragão C.P.M., Maia S.P., Cavalcante J.M.M., Campello C.C., Salgueiro C.C.M. & Nunes J.F. 2013.** Efeitos da criopreservação sobre a morfologia e morfometria de espermatozoides de caprinos diluídos em meio a base da água de coco em pó (ACP-101c). *Ciencia Animal*. 23(2): 16-28.
- 3 Ayres M.C.C., Brandão M.S., Vieira-Junior G.M., Menor J.C.A.S., Silva H.B., Soares M.J.S. & Chaves M.H. 2008.** Atividade antibacteriana de plantas úteis e constituintes químicos da raiz de *Copernicia prunifera*. *Revista Brasileira de Farmacognosia*. 18(1):90-97.
- 4 Bezerra F.Q.G. 2011.** Avaliação de parâmetros fisiológicos e andrológicos de caprinos jovens da raça Boer. *Revista de Medicina Veterinária*. 1(1): 99-100.
- 5 Bispo C.A.S., Pugliesi G., Palhão M.P., Coelho P.G.B., Ker P.G., Rodrigues M.T. & Carvalho G.R. 2011.** Características *in vitro* e fertilidade do sêmen caprino armazenado a 5°C e por 24 horas utilizando duas concentrações de gema de ovo no diluente. *Ciência Animal Brasileira*. 12: 653-660.
- 6 Bona E.A.M., Pinto F.G.S., Fruet T.K., Jorge T.C.M. & Moura A.C. 2014.** Comparação de métodos para avaliação da atividade microbiana e determinação da concentração inibitória mínima (cim) de extratos vegetais aquosos e etanólicos. *Arquivo do Instituto Biológico*. 81(3): 218-225.
- 7 Castelo T.S., Frota T.R. & Silva A.R. 2008.** Considerações sobre a criopreservação do sêmen de caprinos. *Acta Veterinária Brasilica*. 2: 67-75.
- 8 Celeghini E.C.C., Albuquerque R., Arruda R.P. & Lima C.G. 2000.** Correlações entre as características seminais, parâmetros testiculares (peso e histologia) e peso corporal em galos. *Revista Brasileira de Ciência Avícola*. 1: 56.
- 9 Colégio Brasileiro de Reprodução Animal. 2013.** *Manual para exame andrológico e avaliação de sêmen animal*. 2.ed. Belo Horizonte: CBRA. 91p.

- 10 Ferrari M.V., Weiss R.R., Folador A., Ribeiro F.L. & Collodel S.T.S. 1999.** Características seminais de ovinos (*Ovis aries*) submetidos a tratamentos com dimetilsulfóxido (DMSO). *Archives of Veterinary Science*. 4(1): 117-120.
- 11 Huang S.Y., Kuo Y.H., Lee Y.P., Tsou H.L., Lin E.C. & Lee W.C. 2000.** Association of heat shock protein 70 with semen quality in boars. *Animal Reproduction Science*. 23: 231-240.
- 12 Manjunath P. & shivaprakash B.V. 2013.** Pharmacology and clinical use of dimethyl sulfoxide (DMSO): A Review. *International Journal of Molecular Veterinary Research*. 3: 23-33.
- 13 Melo M.I.V., Henry M. & Beker A.R.C.L. 2005.** Teste hiposmótico para avaliação da viabilidade do sêmen equino resfriado com diferentes diluidores. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*. 57: 757-763.
- 14 Oliveira R.V., Nunes J.F., Salgueiro C.C.M., Cavalcante J.M.M, Moura A.A.A. & Araújo A.A. 2009.** Avaliação morfológica de espermatozoides caprinos diluídos e congelados em meio à base de água de coco em pó (ACP-101) ou Tris, corados com eosina-negrosina e azul de bromofenol. *Ciencia Animal Brasileira*. 10(3): 862-869.
- 15 Oliveira R.V., Nunes J.F., Salgueiro C.C.M., Cavalcante J.M.M., Brasil O.O. & Moura A.A.A.N. 2011.** Avaliação de espermatozoides caprinos congelados em meio à base de água de coco em pó (ACP-101®) ou Tris. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*. 6: 1295-1302.
- 16 Oliveira I.R.S., Alves H.M., Castelo T.S., Bezerra F.S.B., Bezerra A.C.D.S. & Silva A.R. 2013.** Correlações entre o teste hiposmótico e a avaliação clássica do sêmen de caprinos. *Ciência Animal Brasileira*. 14: 216-221.

- 17 Peterson K., Brinkhof J., Houwers D.J., Colenbrander B. & Gadella B.M. 2008.** Presence of pro-lentiviral DNA in male sexual organs and ejaculates of small ruminants. *Theriogenology*. 69: 433-442.
- 18 Santos A.D.F., Torres C.A.A., Fonseca J.F., Borges A.M., Guimarães J.D., Costa E.P. e Rovay H. 2006.** Uso de testes complementares para avaliação do congelamento do sêmen de bodes submetidos ao manejo de fotoperíodo artificial. *Revista Brasileira de Zootecnia*. 35(5): 1934-1942.
- 19 Silva A.K.B. 2010.** Utilização do teste hiposmótico na avaliação do sêmen refrigerado de pequenos ruminantes. 44f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) – Pós-Graduação em Medicina Veterinária, Universidade Federal de Campina Grande.
- 20 Silveira T.S., Siqueira J.B., Guimarães S.E.F., Paula T.A.R., Miranda Neto T. & Guimarães J.D. 2010.** Maturação sexual e parâmetros reprodutivos em touros da raça Nelore criados em sistema extensivo. *Revista Brasileira de Zootecnia*. 39(3): 503-511.
- 21 Silva M.R. & Souza B.B. 2016.** Estresse térmico e sua influência na fisiologia hormonal de pequenos ruminantes. *Journal of Animal Behaviour and Biometeorology*. 4(2): 50-54.
- 22 Siqueira, J.B.; Guimarães, J.D.; Costa, E.P., Henry M., Torres C.A.A., Silva M.V.G.B. & Silveira T.S. 2007.** Relação da taxa de gestação com sêmen bovino congelado e testes de avaliação espermática *in vitro*. *Revista Brasileira de Zootecnia*. 36(2): 387-395.
- 23 Siqueira A.P., Silva Filho J.M., Fonseca J.F., Bruschi J.H., Palhares M.S., Borges A.M., Bruschi M.C.M., Peixoto M.P. & Rossi R. 2009.** Taxa de concepção de cabras inseminadas com sêmen caprino resfriado a 5°C, por 12 ou 24 horas, em meio diluidor à base de gema de ovo. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*. 61: 66-71.
- 24 Souza K.C., Pinheiro R.R., Santos D.O. & Andrioli A. 2011.** Viabilidade do meio essencial mínimo como diluidor de sêmen caprino em infecção experimental com vírus da

artrite encefalite caprina (CAEV). In: *Resumos da XII Reunión Latinoamericana de Reproducción Animal* (Montevideo, Uruguai). Poster Salud Animal N12. CD-ROM. p.17.

25 Souza K.C., Andrioli A. & Teixeira M.F.S. 2014. Vírus da artrite encefalite caprina em sêmen: diagnóstico e transmissão. *Revista Brasileira de Reprodução Animal*. 38(2): 92-97.

26 Toniolli R., Barros T.B., Toniolli L.C., Guimarães D.B., Freitas E.N. & Nunes T.G.OP. 2016. Diferentes concentrações de gema de ovo em pó adicionada ao diluente ACP-103[®] na conservação do sêmen de suíno. *Ciência Animal Brasileira*. 17(2): 243-251.

27 Viana A.K.S., Chalhoub M., Ribeiro Filho A.L, Almeida A.K., Portela A.P.M., Bittencourt R.F., Alves S.G.G., Bittencourt T.C.C. & Quintela A.T. 2006. Avaliação *in vitro* do sêmen caprino resfriado, com ou sem centrifugação do plasma seminal e diluído em leite-desnatado-glicose e tris-gema de ovo. *Ciência Animal Brasileira*. 7: 67-76.

28 Souza W.L., Moraes E.A., Costa J.M.S., Sousa P.H.F., Lopes Junior E.S., Oliveira R.P. & Toniolli R. 2016. Efeito de diferentes concentrações de melatonina em espermatozoides de carneiros sobre estresse oxidativo após criopreservação. *Pesquisa Veterinária Brasileira*. 36(7): 657-664.

9. CAPÍTULO IV

Avaliação *in vitro* da atividade antiviral e citotóxica de extratos de *Azadirachta indica* A. Juss. (nim) sobre o lentivírus caprino no sêmen

In vitro evaluation of antiviral and cytotoxic effects of *Azadirachta indica* A. Juss. (nim) extracts against the caprine lentivirus in semen

Renato Mesquita Peixoto, Antonio Adailson de Sousa Silva, Alice Andrioli, Raymundo Rizaldo Pinheiro, Ana Lídia Madeira de Sousa, Juscilânia Furtado Araújo, Dalva Alana Aragão de Azevedo, Kelma Costa de Souza, Selene Maria Maia de Moraes, Maria Fátima da Silva Teixeira

Periódico: **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia** (ISSN: 1678-4162)

Qualis: A2 na Medicina Veterinária

(Não submetido por ter sido dado entrada no processo de patente, estando a aguardar parecer)

PROCESSO DE PATENTE

SIGED Embrapa: 21148.301549/2017-71

SNE Embrapa: 21165.000110/2017-15

Análise de Patenteabilidade Ref. APA-E-H-17B0330

PROCESSO DE PATENTE

SIGED Embrapa: 21148.301549/2017-71

SNE Embrapa: 21165.000110/2017-15

Análise de Patenteabilidade Ref. APA-E-H-17B0330

PROCESSO DE PATENTE

SIGED Embrapa: 21148.301549/2017-71

SNE Embrapa: 21165.000110/2017-15

Análise de Patenteabilidade Ref. APA-E-H-17B0330

PROCESSO DE PATENTE

SIGED Embrapa: 21148.301549/2017-71

SNE Embrapa: 21165.000110/2017-15

Análise de Patenteabilidade Ref. APA-E-H-17B0330

PROCESSO DE PATENTE

SIGED Embrapa: 21148.301549/2017-71

SNE Embrapa: 21165.000110/2017-15

Análise de Patenteabilidade Ref. APA-E-H-17B0330

PROCESSO DE PATENTE

SIGED Embrapa: 21148.301549/2017-71

SNE Embrapa: 21165.000110/2017-15

Análise de Patenteabilidade Ref. APA-E-H-17B0330

PROCESSO DE PATENTE

SIGED Embrapa: 21148.301549/2017-71

SNE Embrapa: 21165.000110/2017-15

Análise de Patenteabilidade Ref. APA-E-H-17B0330

PROCESSO DE PATENTE

SIGED Embrapa: 21148.301549/2017-71

SNE Embrapa: 21165.000110/2017-15

Análise de Patenteabilidade Ref. APA-E-H-17B0330

PROCESSO DE PATENTE

SIGED Embrapa: 21148.301549/2017-71

SNE Embrapa: 21165.000110/2017-15

Análise de Patenteabilidade Ref. APA-E-H-17B0330

PROCESSO DE PATENTE

SIGED Embrapa: 21148.301549/2017-71

SNE Embrapa: 21165.000110/2017-15

Análise de Patenteabilidade Ref. APA-E-H-17B0330

PROCESSO DE PATENTE

SIGED Embrapa: 21148.301549/2017-71

SNE Embrapa: 21165.000110/2017-15

Análise de Patenteabilidade Ref. APA-E-H-17B0330

PROCESSO DE PATENTE

SIGED Embrapa: 21148.301549/2017-71

SNE Embrapa: 21165.000110/2017-15

Análise de Patenteabilidade Ref. APA-E-H-17B0330

PROCESSO DE PATENTE

SIGED Embrapa: 21148.301549/2017-71

SNE Embrapa: 21165.000110/2017-15

Análise de Patenteabilidade Ref. APA-E-H-17B0330

PROCESSO DE PATENTE

SIGED Embrapa: 21148.301549/2017-71

SNE Embrapa: 21165.000110/2017-15

Análise de Patenteabilidade Ref. APA-E-H-17B0330

PROCESSO DE PATENTE

SIGED Embrapa: 21148.301549/2017-71

SNE Embrapa: 21165.000110/2017-15

Análise de Patenteabilidade Ref. APA-E-H-17B0330

PROCESSO DE PATENTE

SIGED Embrapa: 21148.301549/2017-71

SNE Embrapa: 21165.000110/2017-15

Análise de Patenteabilidade Ref. APA-E-H-17B0330

PROCESSO DE PATENTE

SIGED Embrapa: 21148.301549/2017-71

SNE Embrapa: 21165.000110/2017-15

Análise de Patenteabilidade Ref. APA-E-H-17B0330

PROCESSO DE PATENTE

SIGED Embrapa: 21148.301549/2017-71

SNE Embrapa: 21165.000110/2017-15

Análise de Patenteabilidade Ref. APA-E-H-17B0330

PROCESSO DE PATENTE

SIGED Embrapa: 21148.301549/2017-71

SNE Embrapa: 21165.000110/2017-15

Análise de Patenteabilidade Ref. APA-E-H-17B0330

10. CONCLUSÕES

Há baixa prevalência de *Mycoplasma agalactiae* nos rebanhos leiteiros das mesorregiões (norte, noroeste, sertões cearenses e região metropolitana de Fortaleza) do estado do Ceará, e não há casos de coinfeção com o lentivírus caprino.

Adicionalmente o dimetilsulfóxido (DMSO) pode ser utilizado como solvente de extratos vegetais e incluso no diluente seminal sem acarretar danos à qualidade do sêmen. Além disso, verificou-se que *Azadirachta indica* A. Juss. (nim) em acetato de etila e etanol em altas concentrações apresentaram efeito inibitório contra o lentivírus caprino, porém novas pesquisas são válidas para poder determinar com maior clareza.

11. PERSPECTIVAS

- Novas avaliações sobre a associação do lentivírus caprino com bactérias do tipo *Mycoplasma agalactiae*, ou mesmo com outros microorganismos passa a ser interessante a fim de verificar a influência das infecções secundárias no comprometimento da saúde animal, e conseqüentemente os prejuízos acarretados na produção, reprodução e no bem-estar animal;
- *Azadirachta indica* A. Juss. (nim) em acetato de etila e etanol futuramente podem vir a ser utilizados no tratamento do sêmen caprino, no intuito de garantir o padrão sanitário do mesmo, porém mais testes *in vitro* são necessários para validar a melhor concentração, bem como o tempo de tratamento e a melhor técnica de extração do fitocomposto;
- Estudos adicionais até mesmo com outras espécies e famílias botânicas são necessários, pois a diversidade da flora brasileira induz que o ramo dos fitocompostos seja algo promissor na busca por substâncias inibidoras de lentivirose;
- Adicionalmente, pesquisas com outras frações de *Azadirachta indica* A. Juss. (nim) e até mesmo em concentrações maiores, e advindas de outras partes da planta é válida a fim de observar o comportamento do vírus frente a super dosagens, mas desde que não afete a qualidade espermática, para posteriormente dar seguimento na realização de testes *in vivo*;
- Por fim, análises bioquímicas e de isolamento dos constituintes das frações com potencial antiviral é uma etapa que deve ser realizada para verificar qual a substância que realmente apresenta ação eficaz de inativação viral, e em qual etapa do processo infeccioso há inibição.

12. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALBUQUERQUE, I.R.R.; GOIS, G.C.; CAMPOS, F.S. Perfil sanitário de cabras lactantes da região de Senhor do Bonfim, Bahia. **Acta Veterinaria Brasilica**, v.8, n.2, p.144-149, 2014.

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

ALI AL AHMAD, M.Z.; CHEBLOUNE, Y.; CHATAGNON, G.; PELLERIN, J.L.; FIENI, F. Is caprine arthritis encephalitis virus (CAEV) transmitted vertically to early embryo development stages (morulae or blastocyst) via *in vitro* infected frozen semen? **Theriogenology**, v.77, p.1673-1678, 2012.

ALVES, B.H.L.S.; SILVA, J.G.; MOTA, A.R.; CAMPOS, A.C.; PINHEIRO JÚNIOR, J.W.; SANTOS, S.B; MOTA, R.A. *Mycoplasma agalactiae* in semen and milk of goat from Pernambuco state, Brazil. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v.33, n.11, p.1309-1312, 2013.

ANANDAN, S.; SASTRY, V.R.B.; MUSALIA, L.M.; AGRAWAL, D.K. Growth rate and nutrient efficiency of growing goats fed urea ammoniated neem (*Azadirachta indica*) seed kernel meal as protein supplement. **Small Ruminant Research**, v.22, p.205-212, 1996.

ANDRIOLI, A.; GOUVEIA, A.M.G.; PINHEIRO, R.R.; ROCHA, M.A.; MARTINS, A.S.; SANTOS, D.O. Detecção do DNA próviral do lentivírus caprino em sêmen de bodes naturalmente infectados. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v.23, p.420-421, 1999.

ANDRIOLI, A. **Vírus da artrite encefalite caprina: PCR e isolamento em amostras de sêmen, fluido uterino e embriões**. 2001. 68 f. Tese (Doutorado em Ciência Animal) – Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte.

ANDRIOLI, A.; GOUVEIA, A.M.G.; ANDRADE, J.S.; PINHEIRO, R.R.; YORINORI, E.H.; SILVA, M.X. Diagnostic of the caprine arthritis encephalitis virus in uterine fluid and embryos of goats by virus isolation in cell culture and PCR Nested. **Theriogenology**, v.57, p. 567-567, 2002.

ANDRIOLI, A.; GOUVEIA, A.M.G.; PINHEIRO, R.R. **Seleção do sêmen de reprodutores portadores do vírus da Artrite Encefalite Caprina através da Técnica de Reação em Cadeia da Polimerase**. Sobral: EMBRAPA Caprinos e Ovinos, 2003. 7p. (EMBRAPA Caprinos e Ovinos. Documentos, 50).

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. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.41, n.8, p.1313-1319, 2006.

ARAÚJO, S.A.C. **Avaliação *in vitro* da atividade antiviral de produtos sintéticos e naturais contra lentivírus de pequenos ruminantes**. 2008. 149f. Tese (Doutorado em Ciências Veterinárias) – Universidade Estadual do Ceará, Fortaleza.

AZEVEDO, E.O.; ALCÂNTARA, M.D.B.; NASCIMENTO, E.R.; TABOSA I.M., BARRETO M.L., ALMEIDA J.F., ARAÚJO M.D., RODRIGUES A.R.O., RIET-CORREA F. & CASTRO R.S. Contagious agalactia by *Mycoplasma agalactiae* in small ruminants in Brazil: first report. **Brazilian Journal of Microbiology**, v.37, n.4, p. 576-581, 2006.

AZEVEDO, E.O.; CÂMARA, D.R.; SILVA, S.V.; GUERRA, M.M.P. Agalaxia contagiosa: Um “novo” problema para caprinos e ovinos no Brasil. **Ciência Veterinária nos Trópicos**, v.18, n.2, p.34-38, 2015.

AZEVEDO, D.A.A.; SANTOS, V.W.S.; SOUSA, A.L.M.; PEIXOTO, R.M.; PINHEIRO, R.R.; ANDRIOLI, A.; TEIXEIRA, M.F.S. Small ruminant lentiviruses: economic and productive losses, consequences of the disease. **Arquivos do Instituto Biológico**, v.84, p.1-10, 2017.

BADKE, M.R.; BUDÓ, M.L.D.; SILVA, F.M.; RESSEL, L.B. Plantas medicinais: O saber sustentado na prática do cotidiano popular. **Escola Anna Nery**, v.15, n.1, p. 132-139, 2011.

BARANOWSKI, E.; BERGONIER, D.; SAGNÉ, E.; HYGONENQ, M.; RONSIN, P.; BERTHELOT, X.; CITTI, C. Experimental infections with *Mycoplasma agalactiae* identify key factors involved in host-colonization. **Plos One**, v.9, n.4, p.1-12, 2014.

BHARITKAR, Y.P.; BATHINI, S.; OJHA, D.; GHOSH, S.; MUKHERJEE, H.; KUOTSU, K.; CHATTOPADHYAY, D.; MONDAL, N.B. Antibacterial and antiviral evaluation of

sulfonoquinovosyldiacylglyceride: a glycolipid isolated from *Azadirachta indica* leaves. **Letters in Applied Microbiology**, v.58, p.184-189, 2013.

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

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

BRASIL, R. B. **Estudo fitoquímico e Atividade Fungicida do Extrato Metanólico das Folhas de *Azadirachta indica* (A. Jusseu)**. 2010. 90f. Dissertação (Mestrado em Química) - Universidade Federal do Pará, Pará.

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

CAVALCANTE, F.R.A.; ANDRIOLI, A.; PINHEIRO, R.R.; SOUZA, K.C.; VERAS, A.K.A.; LOPES, T.A.; SOUSA, S.D.; SILVA, P.A.F. Detecção do vírus da artrite encefalite caprina por *nested* PCR e *nested* RT-PCR em ovócitos e fluido uterino. **Arquivos do Instituto Biológico**, v.80, n.4, p.381-386, 2013.

COS, P.; VLIETINCK, A.J.; BERGHE, D.V.; MAES, L. Anti-infective potential of natural products: How to develop a stronger *in vitro* 'proof-of-concept'. **Journal of Ethnopharmacology**, v.106, p.290-302, 2006.

DEMAIN, A.L. Antibiotics: Natural products essential to human health. **Medicinal Research Reviews**, v.29, n.6, p.821-842, 2009.

FACCIN-GALHARDI, L.C.; YAMAMOTO, K.A.; RAY, S.; RAY, B.; LINHARES, R.E.C.; NOZAWA, C. The *in vitro* antiviral property of *Azadirachta indica* polysaccharides for poliovirus. **Journal of Ethnopharmacology**, v.142, p.86-90, 2012.

FENG, H.; FAN, J.; YANG, S.; ZHAO, X.; YI, X. Antiviral activity of phosphorylated Radix *Cyathulae officinalis* polysaccharide against Canine Parvovirus *in vitro*. **International Journal of Biological Macromolecules**, 99: 511-518, 2017.

FIDELI, U.S.; ALLEN, S.A.; MUSONDA, R.; TRASK, S.; HAHN, B.H.; WEISS, H.; MULENGA, J.; KASOLO, F.; VERMUND, S.H.; ALDROVANDI, G.M. Virologic and immunologic determinants of heterosexual transmission of Human Immunodeficiency Virus Type 1 in Africa, **AIDS. Research Human Retroviruses**, v.17, p. 901-910, 2001.

FORIM, M.R. **Estudo Fitoquímico do Enxerto de *Azadirachta indica* sobre a *Melia azadirach*: Quantificação de substâncias Inseticidas**. 2006. 325f. Tese (Doutorado em Química) - Universidade Federal de São Carlos, São Carlos.

GIRISH, K.; SHANKARA, B.S. Neem – A green treasure. **Eletronic Journal of Biology**, v.4, n.3, p.102-111, 2008.

GITHIORI, J.B.; HOGLUND, J.; WALLER, P.J.; LEYDEN BAKER, R. Evaluation of anthelmintic properties of extracts from some plants used as livestock dewormers by pastoralist and smallholder farmers in Kenya against Heligmosomoides polygyrus infections in mice. **Veterinary Parasitology**, v.118, p.215-226, 2003.

GOMES, T.L.S. **Micoplasmose (*Mycoplasma agalactiae*) e artrite encefalite caprina em cabras leiteiras no Cariri paraibano**. 2016. 57f. Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias) – Universidade Federal de Campina Grande – Patos.

GONZALO, C. Milk hygiene in small ruminants: a review. **Spanish Journal of Agricultural Research**, v.15, n.4, 2017.

GREGORY, L.; SILVA, L.C.L.C.; ANGELINI, M.; LARA, M.C.C.S.H.; FRANCHINI, M.L.; RIZZO, E.H.; CARDOSO, M.V.; BENESI, F.J.; CASTRO, R.S. Avaliação clínica de caprinos acometidos por artrite – Diferencial entre artrite viral (CAE) e bacteriana (*Mycoplasma* spp.) em dois casos atendidos no hospital veterinário da FMVZ – USP. **Arquivos do Instituto Biológico**, v.73, n.2, p.247-249, 2006.

GREGORY, L.; LARA, M.C.C.S.H.; HASEGAWA, M.Y.; CASTRO, R.S.; RODRIGUES, J.N.M.; ARAÚJO, J.; KELLER, L.W.; SILVA, L.K.F.; DURIGON, E.L. Detecção do vírus

da artrite encefalite caprina no sêmen através das técnicas de PCR e Nested-PCR. **Arquivos do Instituto Biológico**, v.78, n.4, p.599-603, 2011.

GUILHERME, R.F.; AZEVEDO, S.S.; HIGINO, S.S.S.; ALVES, F.S.F.; SANTIAGO, L.B.; LIMA, A.M.C.; PINHEIRO, R.R.; ALVES, C.J. Caracterização epidemiológica e fatores de risco associados à infecção por lentivírus de pequenos ruminantes na região do semiárido paraibano, Nordeste do Brasil. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v.37, n.4, p.544-548, 2017.

HASEGAWA, M.Y.; LARA, M.C.C.S.H.; MONTEFORTE, E.; LOBOS, C.V.; GAETA, N.C.; HAYASHI, M.; SHIRAYAMA, L.; CASTRO, R.S.; GREGORY, L. An experimental study on the vertical transmission of caprine arthritis-encephalitis virus from naturally infected females to their offspring. **Small Ruminant Research**, v.149, p.23-27, 2017.

HSIAO, A.F.; WONG, M.D.; KANOUSE, D.E.; COLLINS, R.L.; LIU, H.; ANDERSEN, R.M.; GIFFORD, A.L.; MCCUTCHAN, A.; BOZZETTE, S.A.; SHAPIRO, M.F.; WENGER, N.S.; HCSUS, CONSORTIUM. Complementary and alternative medicine use and substitution for conventional therapy by HIV-infected patients. **Journal of Acquired Immune Deficiency Syndromes**, v.33, n.2, p. 157-165, 2003.

JAFARI, S.; SAEIDNIA, S.; HAJIMEHDIPOOR, H.; ARDEKANI, M.R.S.; ALI FARAMAZI, M.; HADJIAKHOONDI, A.; KHANAVI, M. Cytotoxic evaluation of *Melia azedarach* in comparison with, *Azadirachta indica* and its phytochemical investigation. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v.21, p.2-1, 2013.

JIAN-RU, W.; BEI, W.; HAO, C.; JIN-SHUI, X.; XI-PING, H.; Mycoplasmas in the urine of HIV-1 infected men. **Epidemiology and Infection**, v.140, p.1141-1146, 2012.

KAPEWANGOLO, P.; TAWHA, T.; NAWINDA, T.; KNOTT, M.; HANS, R. *Sceletium tortuosum* demonstrates *in vitro* anti-HIV and free radical scavenging activity. **South African Journal of Botany**, 106: 140-143, 2013.

KAZIYAMA, V.M.; FERNANDES, M.J.B.; SIMONI, I.C. Atividade antiviral de extratos de plantas medicinais disponíveis comercialmente frente aos herpesvírus suíno e bovino. **Revista Brasileira de Plantas Medicinais**, v.14, n.3, p.522-528, 2012.

KETKAR, C.M.; KETKAR, M.S. Botany. In: NARWAL, S.S.; TAURO, P.; BISLA, S.S.(Ed.). **Neem in Sustainable Agriculture**. Pawan Kumar Scientific Publishers. Jodhpur: 1997.

KIM, Y.; NARAYANAN, S.; OKCHANG, K. Inhibition of influenza vírus replication by plant-derived isoquercetin. **Antiviral Research**, v.88, p.227-235, 2010.

KUMAR, V.S.; NAVARATNAM, V. Neem (*Azadirachta indica*): Prehistory to contemporary medicinal uses to humankind. **Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine**, v.3, n.7, p.505-514, 2013.

KUMAR, A.; RAHAL, A.; CHAKRABORTY, S.; VERMA, A.K.; DHAMA, K. Mycoplasma agalactiae, na etiological agent of contagious agalactia in small ruminants: a review. **Veterinary Medicine International**, p.1-13, 2014.

LAMARA, A.; FIENI, F.; MSELLI-LAKHAL, L.; TAINURIER, D.; CHEBLOUNE, Y. Efficient replication of caprine arthritis-encephalitis vírus in goat granulosa cells. **Virus Research**, v. 79, p. 165-172, 2001.

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

LEE, S.M.; OLSEN, J.I.; SCHWEIZER, M.P.; KLOCKE, J.A. **Phytochemistry**, v.27, p.2773-2775, 1988.

LEE, L.S.; ANDRADE, A.S.; FLEXNER, C. Interactions between natural health products and antiretroviral drugs: pharmacokinetic and pharmacodynamic effects. **Clinical Infectious**, v.43, n.8, p.1052-1059, 2006.

LEITE, R.C.; REIS, J.K.P.; OLIVEIRA, A.P.; NASCIMENTO, P.M.P.; OLIVEIRA, F.G.; NAVES, J.H.F.F.; RODRIGUES, A.P.S.; GASPARINI, M.P.; ALVES, F.; OLIVEIRA, C.H.S.; RAJÃO, D.S.; GALINARI, G.C.F. Retrovíroses dos animais domésticos. **Veterinária e Zootecnia**, v.20, p.73-92, 2013.

LIMA, L.R.; BARBOSA FILHO, J.A.D. Impacto do manejo pré-abate no bem-estar de caprinos e ovinos. **Journal of Animal Behaviour and Biometeorology**, v.1, n.2, p.52-60, 2013.

LIMA, C.C.V.; AYRES, M.C.C.; PINHEIRO, R.R.; COSTA, J.N.; ANDRIOLI, A.; SOUZA, T.S.; AZEVEDO, D.A.A.; SANTOS, V.W.S.; ARAÚJO, J.F.; SOUSA, A.L.M.; PEIXOTO, R.M.; DAMASCENO, E.M.; COSTA NETO, A.O. Caprine lentivirus in sheep milk and semen. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.69, n.2, p.391-397, 2017.

LÓPEZ, G.A.; RODRÍGUEZ, H.A.M.; PÉREZ, J.T. Detección de anticuerpos contra lentivirus de pequeños rumiantes em fetos ovinos y caprinos. **Veterinária México**, v.43, n.1, 2012.

MANEL, N.; BATTINI, J.L.; TAYLOR, N.; SITBON, M. HTLV-1 tropism and envelope receptor. **Oncogene**, v.24, p.6016-6025, 2005.

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

MARTINEZ, S.S. **O nim: *Azadirachta indica* – natureza, usos múltiplos e produção**. Londrina: Instituto Agronômico do Paraná, 2002. 142 p.

MOSSINI, S.A.G.; KEMMELMEIER, C. A árvore Nim (*Azadirachta indica* A. Juss): Múltiplos usos. **Acta Farmacêutica Bonaerense**, v.24, n.1, p.139-148, 2005.

MUSSI, J.M.S.; GOUVEIA, A.M.G.; CORTEZ, A.; LAGE, A.P.; GUIMARÃES, A.S.; HEINEMANN, M.B. Use of serological diagnostic techniques in the control and eradication of caprine arthritis encephalitis: an update. **Brazilian Journal Veterinary Research Animal Science**, v.52, n.4, p.283-297, 2015.

NOLKEMPER, S.; REICHLING, J.; SENSCH, K.H.; SCHNITZLU, P. Mechanism of herpes simplex virus type 2 suppression by propolis extracts. **Phytomedicine**, v.17, p.131-148, 2010.

NORONHA FILHO, A.J.; MAEDA, T.Y.; FERRAZ, D.M. Tuberculose e AIDS. **Revista do Hospital Universitário Pedro Ernesto**, p.1-13, 2006.

PAULA, N.R.O.; ANDRIOLI, A.; CARDOSO, J.F.S.; SANTOS, D.O.; ELOY, A.M.X. **Reprodução no Macho Caprino: Análise Básica e Aplicada**. Sobral: Embrapa Caprinos e Ovinos, 2008. 30p. Documentos, 79.

PAULA, N.R.O.; ANDRIOLI, A.; CARDOSO, J.F.S.; PINHEIRO, R.R.; SOUSA, F.M.L.; SOUZA, K.C.; ALVES, F.S.F.; CAMPELLO, C.C.; RICARTE, A.R.F.; TEIXEIRA, M.F.S. Profile of the Caprine arthritis-encephalitis virus (CAEV) in blood, semen from bucks naturally and experimentally infected in the semi-arid region of Brazil. **Small Ruminant Research**, p.1-10, 2009.

PERRONE, R.; LAVEZZO, E.; PALÚ, G.; RICHTER, S.N. Conserved presence of G-quadruplex forming sequences in the long terminal repeat promoter of lentiviruses. **Nature**, v.7, 2018.

PETERSON, K.; BRINKHOF, J.; HOUWERS, D.J.; COLENBRANDER, B.; GADELLA, B.M. Presence of pro-lentiviral DNA in male sexual organs and ejaculates of small ruminants. **Theriogenology**, v.69, p.433-442, 2008.

PIEKNA-PRZYBYLSKA; BAMBARA. Proviral DNA Synthesis in HIV: Background in Human Immunodeficiency Virus Reverse Transcriptase. A Bench-to-Bedside Success, Springer, p. 23-53, 2013.

PINHEIRO, R.R.; ANDRIOLI, A.; GOUVEIA, A.M.G.; ARAGÃO, M.A.C.; MARTINEZ, P.M. 2010. Avaliação de antígenos para o diagnóstico de lentivírus em rebanho caprino sob programa de controle. **Arquivos do Instituto Biológico**, v.77, n.1, p.133- 137, 2010.

QUINN, P. J.; MARKEY, B. K.; CARTER, M. E.; DONNELLY, W. J.; LEONARD, F. C. **Retroviridae. Grupo dos Lentivírus de Pequenos Ruminantes**. In: Microbiologia veterinária e doenças infecciosas. Porto Alegre: Artmed, 2005, p. 346-357.

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

RAMÍREZ, H.; REINA, R.; AMORENA, B.; ANDRÉS, D.; MARTÍNEZ, H.A. Small ruminant lentiviruses: Genetic variability, tropism and diagnosis. **Viruses**, v.5, p.1175-1207, 2013.

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

RICARTE, A.R.F.; ARAÚJO, S.A.C.; DANTAS, T.V.M.; COSTA, E.C.; SILVA, J.B.A.; TEIXEIRA, M.F.S. Possibilidades de aplicação de biotecnologias reprodutivas em animais de produção acometidos por agentes víricos. **Revista Brasileira Reprodução Animal**, v.32, n.1, p.3-8, 2008.

ROSA, M.C.; SILVA, N.M.O.; HORA, V.P. Patogênese do HIV – características do vírus e transmissão materno-infantil. **Revista Brasileira de Análises Clínicas**, v.48, n.4, p.301-306, 2016.

SANTOS, L.M.M.; PEREIRA, C.M.; MANSUR, F.J.; LOPES, L.A.; CAMPOS, A.C.; AZEVEDO, E.O.; CASTRO, R.S.; BARRETO, M.L.; ALMEIDA, J.F.; NASCIMENTO, E.R. *Mycoplasma agalactiae* Outbreak in Goat Herd of Rio de Janeiro State, Brazil. In: Abstracts of the XX Congress of the International Organization for Mycoplasmology (Blumenau, Brazil). Poster session 1. p. 22.

SANTOS, M.O.; CAMPOS, A.C.; SANTOS, J.P.; SANTOS, P.O.M.; CALDAS, E.L.C.; SANTOS, A.D.F.; NASCIMENTO, E.R.; CASTRO, R.S.; AZEVEDO, E.O. Agalaxia contagiosa em ovinos e caprinos do Estado do Sergipe: dados preliminares. **Scientia Plena**, v.11, n.4, p.1-5, 2015.

SANTOS, S.B.; MELO, R.P.B.; SILVA, L.T.R.; OLIVEIRA, J.M.B.; ABAD, A.C.A.; PINHEIRO JÚNIOR, J.W.; MOTA, R.A. Epidemiology of *Mycoplasma agalactiae* and *Mycoplasma mycoides* cluster in flocks of northeastern Brazil. **Ciência Rural**, v.48, n.4, p.1-8, 2018.

SEITZ, R. Human Immunodeficiency Virus (HIV). **Transfusion Medicine and Hemotherapy**, v.43, p.203-222, 2016.

SILVA, J.B.A.; LIMA, P.M. Lentivírus de pequenos ruminantes: caracterização etiológica, infectividade, controle, prevenção e diagnóstico. **Acta Veterinaria Brasilica**, v.1, n.4, p.111-117, 2007.

SILVA, M.L.C.R.; CASTRO, R.S.; MAIA, R.C.; NASCIMENTO, S.A.; GOMES, A.L.V.; AZEVEDO, S.S. Lentivírus em caprinos leiteiros do semiárido paraibano: prevalência de anticorpos, fatores de risco e detecção molecular. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v.33, n.4, p.453-458, 2013.

SILVA, N.S.; AZEVEDO, E.O.; CAMPOS, A.C.; CORDEIRO, A.A.; MAMEDE, A.G.; SILVA, R.B.S.; CASTRO, R.S.; NASCIMENTO, E.R.; MARINHO, M.L. Infecção congênita em cabritos por *Mycoplasma agalactiae*. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.66, n.2, p.631-634, 2014.

SIMONI, I.C. Tratamentos Antivirais. **Instituto Biológico**, v.65, p.41-44, 2003.

SIMONI, I.C. **Plantas medicinais com atividade antiviral. 2009**. Disponível em: <http://www.infobibos.com/Artigos/2009_4/antivirais/index.htm>. Acesso em: 11/03/2018.

SOUZA, A.; PORTO, A.; SANTOS, S.B.; BASTOS, M.L.; CARVALHO, E.M. Influência do HTLV-I na incidência, resposta imune e manifestações clínicas de outras doenças infecciosas. **Gazeta Médica da Bahia**, v.79, n.1, p.61-67, 2009.

SOUZA, K.C.; PINHEIRO, R.R.; SANTOS, D.O.; BRITO, R.L.L.; RODRIGUES, A.S.; SIDER, L.H.; PAULA, N.R.O.; AVILA, A.A.; CARDOSO, J.F.S.; ANDRIOLI, A. Transmission of the caprine arthritis-encephalitis vírus through artificial insemination. **Small Ruminant Research**, v.109, p.193-198, 2013.

SOUZA, T.S.; PINHEIRO, R.R.; COSTA, J.N.; LIMA, C.C.V.; ANDRIOLI, A.; AZEVEDO, D.A.A.; SANTOS, V.W.S.; ARAÚJO, J.F.; SOUSA, A.L.M.; PINHEIRO, D.N.S.; FS; FERNANDES, F.M.C. COSTA NETO, A.O. Interspecific transmission of small ruminant lentiviruses from goats to sheep. **Brazilian Journal of Microbiology**, v.46, n.3, p.867-874, 2015a.

SOUZA, K.C.; ANDRIOLI, A.; SIDER, L.H.; PINHEIRO, R.R.; BEZERRA JUNIOR, R.Q.; PEIXOTO, R.M.; TEIXEIRA, M.F.S. Detecção de sequências do DNA proviral do vírus da artrite encefalite caprina em saliva. **Acta Scientiae Veterinariae**, v.43, p. 1-6, 2015b.

SOUZA, K.C.; ANDRIOLI, A.; TEIXEIRA, M.F.S. Vírus da artrite encefalite caprina em sêmen: diagnóstico e transmissão. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v.38, n.2, p.92-97, 2015.

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

TAFURI, N.F. **Atividade antiviral de extratos vegetais e flavonoides contra o *Bovine herpesvirus 1 (BoHV1)***. 2011. 70f. Dissertação (Pós-Graduação em Bioquímica Agrícola) – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa.

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

TURCHETTI, A.P.; PANIAGO, J.J.; COSTA, L.F.; CRUZ, J.C.; BRAZ, G.F.; GOUVEIA, A.M.; PAIXÃO, T.A.; SANTOS, R.L.; HEINEMANN, M.B. Distribution of caprine arthritis encephalitis vírus provirus, RNA, and antigen in the reproductive tract of one naturally and seven experimentally infected bucks. **Theriogenology**, v. 80, p. 933-939, 2013.

VALLUEV-ELLISTON; KOCHETKOV. Novel HIV-1 Non-nucleoside Reverse Transcriptase Inhibitors: A Combinatorial Approach. **Biochemistry**, v.82, n.13, p.1716-1743, 2017.

VAN DER KUYL, A.C. HIV infection and HERV expression: a review. **Retrovirology**, v.9, n.6, p.1-10, 2012.

VERKERK, R.H.J.; WRIGHT, D.J. **Journal of Pest Science**, v.37, p.83-91, 1993.

VILLET, S.; BOUZAR, B.A.; MORIN, T.; VERDIER, G.; LEGRAS, C.; CHEBLOUNE, Y. Maedi-visna virus and caprine arthritis encephalitis virus genomes encode vpr-like but no tat protein. **Journal of Virology**, v.77, n.17, p.9632-9638, 2003.

VILLORIA, M.; LEGINAGOIKOA, I.; LUJÁN, L.; PÉREZ, M.; SALAZAR, E.; BERRIATUA, E.; JUSTE, R.A.; MINGUIJÓN, E. Detection of small ruminant lentivirus in environmental samples of air and water. **Small Ruminant Research**, v.110, n.2- 3, p.155-160, 2013.

YATOO, M.I.; PARRAY, O.R.; MIR, M.S.; QURESHI, S.; KASHOO, Z.A.; NADEEM, M.; FAZILI, M.U.R.; TUFANI, N.A.; KANWAR, M.S.; CHAKRABORTY, S.; DHAMA, K.; RANA, R. Mycoplasmosis in small ruminants in India: a review. **Journal of Experimental Biology and Agricultural Sciences**, v.6, n.2, 2018.

APÊNDICES

APÊNDICE A – Comitê de Ética I



UNIVERSIDADE ESTADUAL
VALE DO ACARAÚ
Comitê de Ética no Uso de Animais



GOVERNO DO
ESTADO DO CEARÁ
Secretaria de Ciência, Tecnologia
e Educação Superior

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

Certificamos que o Protocolo nº 012.12, sob título "Estudo Zoossanitário da Caprinocultura e da Ovinocultura Tropical: Epidemiologia, Riscos e Impacto econômico das enfermidades" sob a responsabilidade de, Francisco Selmo Fernandes Alves, está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotados pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal - CONCEA (Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008), **TENDO SIDO CONSIDERADO APROVADO PELA** Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Estadual Vale do Acaraú (CEUA/UVA) em reunião realizada em 19 de setembro de 2012.

Sobral, 20 de setembro de 2012.

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

APÊNDICE B – Comitê de Ética II



Caprinos e Ovinos

**Comissão de ética no Uso de Animais –
CEUA / CNPC**

CERTIFICADO DE CREDENCIAMENTO E AUTORIZAÇÃO PARA REALIZAÇÃO DE PROTOCOLO

A Comissão de Ética no Uso de Animais da Embrapa Caprinos e Ovinos – CEUA-CNPC – em reunião realizada no dia 24 de fevereiro de 2015 e com base na legislação nacional vigente (Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008; Resolução Normativa CONCEA nº 12/2013), deliberou por autorizar a realização do projeto “Avaliação da inativação viral do CAEV por fitocompostos adicionados ao meio de processamento do sêmen de caprinos visando restringir a transmissão viral pela inseminação artificial”, **protocolo nº 013/2014**, sob a responsabilidade da Dra. Alice Andrioli Pinheiro, desde que respeitada a descrição da metodologia apresentada à CEUA-CNPC.

Qualquer alteração no projeto, intencional ou acidental, que repercuta negativamente na saúde e/ou bem estar dos animais em experimentação, deverá ser comunicada imediatamente à CEUA-CNPC. Informamos que, conforme disposto na legislação vigente, os membros da CEUA deverão ter livre acesso ao local de execução dos experimentos.

Este Certificado é válido até 01/02/2017, podendo ser renovado mediante a análise do pedido que deverá, necessariamente, ser acompanhado pelo relatório, de acordo com o formulário fornecido pela CEUA-CNPC, referente ao período anterior.

Concluído o projeto, cópia digital e impressa do relatório de atividades deverá ser encaminhada à CEUA/CNPC para arquivamento.

Sobral, CE, 25 de fevereiro de 2015.

Dr. Diego Barcelos Galvani
Coordenador da CEUA-CNPC

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

APÊNDICE C – Comprovante de Aceite do Artigo de Revisão

Re: Submissão - Artigo de Revisão (114-2017) Entrada

Medicina Veterinária (UFRPE)
para mim

17 de Jun (Há 9 dias)

Revista Científica
Medicina Veterinária (UFRPE)
Nº Manuscrito: 114-2017

Título: Perspectivas do uso de fitoterápicos no tratamento do sêmen caprino infectado pelo vírus da Artrite Encefalite Caprina

Tipo: Artigo de Revisão

Prezado Sr. Renato Mesquita Peixoto
UECE

Boa noite.

Ao cumprimentar V. Sa., agradecemos a submissão do manuscrito número 114-2017 intitulado "Perspectivas do uso de fitoterápicos no tratamento do sêmen caprino infectado pelo vírus da Artrite Encefalite Caprina" para publicação na revista científica Medicina Veterinária (UFRPE).

De acordo com a análise dos revisores da revista, o manuscrito tem grande potencial para ser publicado, pois representa uma contribuição original e científica relevante. Contudo, o artigo científico deverá ser reformulado para que ele possa ser publicado, pois existem considerações dos revisores.

Considerações dos Revisores e do Editor-Gerente

Verificar as considerações dos revisores e corrigir o manuscrito nesta versão em anexo do arquivo: RMV_114_2017_R1_17jun18.
Conferir atentamente se todos os autores citados no texto estão listados nas referências.
As referências do artigo deverão ser corrigidas de acordo com as Diretrizes para Autores (em anexo).

No envio do manuscrito corrigido, no corpo do e-mail deve ser informado se o autor para correspondência aceitou todas as sugestões dos revisores. Caso tenha existido uma discordância e a alteração não tenha sido realizada, ela deve ser discriminada com a informação do número da linha e a justificativa da não alteração. Por favor, destaque em amarelo esta parte do texto que não foi alterada de acordo com as sugestões dos revisores.

Após a sua revisão, o manuscrito deverá ser submetido para o e-mail: revmedvet@ufrpe.br.

Cordialmente,

Prof. Jean Carlos Ramos Silva
Editor-Gerente
Medicina Veterinária (UFRPE)
Departamento de Medicina Veterinária
UFRPE

De: "Revista de Medicina Veterinária da UFRPE" <revmedvet@ufrpe.br>
Para: "Renato Peixoto" <renatomrma@gmail.com>
Enviadas: Segunda-feira, 4 de dezembro de 2017 6:42:25
Assunto: Re: Submissão - Artigo de Revisão

APÊNDICE D – Comprovante de publicação do Artigo Técnico I



Acta Scientiarum Veterinariae, 2018, 46: 1533.

RESEARCH ARTICLE

ISSN 1679-0216

Pub. 1533

Mycoplasma agalactiae* em rebanhos leiteiros no estado do Ceará em associação com o vírus da artrite encefalite caprina

Mycoplasma agalactiae In Dairy Goat Flocks Bred In Ceará State of Ceará in Association with Caprine Arthritis Encephalitis Virus

Renato Mesquita Peixoto¹, Alice Andrioli², Raymundo Rizaldo Pinheiro², Francisco Selmo Fernandes Alves², Vanderlan Warlington Souza dos Santos², Maximiana Mesquita de Sousa³, Dalva Alana Aragão de Azevedo¹, Edgar Marques Damasceno⁴ & Maria Fátima da Silva Teixeira¹

ABSTRACT

Background: Contagious agalactia is an infectious disease caused by *Mycoplasma agalactiae* (*M. agalactiae*) that occurs in small ruminants leading to productive and economic losses. Due to the similarity of clinical signs presented in Caprine Arthritis Encephalitis (CAE), which is a viral disease, a differential diagnosis is important. Therefore, this study aimed to investigate the presence of anti-*Mycoplasma agalactiae* antibodies in dairy goat flocks in Ceará State and possible correlation with CAE.

Materials, Methods & Results: The research was performed in four mesoregions in Ceará State (Metropolitan Region of Fortaleza-MRF; Northeast Ceará - NeC; North Ceará - NC; Sertões in Ceará - SC), from which 16 productions located in 10 cities with the highest representativeness for goat milk production within the State or mesoregion were sampled. A total of 417 females and 69 males (486 animals) of breeds with dairy production aptitude, pure or crossbreed, maintained in semi-intensive or intensive systems, were tested. Blood serum was obtained by venipuncture of the jugular vein with vacuum pressure syringe followed by centrifugation at 1,500 g for 10min. Antibodies against the caprine arthritis encephalitis virus (CAEV) were detected with micro technique of agarose gel immunodiffusion (AGID) and Western Blot (WB). The anti-*Mycoplasma agalactiae* antibodies were detected with commercial kit of enzymatic immunoassay (IDEXX LaboratoriesTM). Seroprevalence of *M. agalactiae* in dairy goat flocks in Ceará State was 0.62% (3/486). From the total of 16 visited productions, 18.75% (3/16) had seropositive animals for *M. agalactiae* located in MRF, NC and SC mesoregions. CAE was diagnosed in 56.25% (9/16) of productions with AGID and in 81.25% (13/16) with WB. In addition, 5.2% (25/486) of animals were seropositive for CAE with AGID and 16.6% (80/486) with WB. Animals that reacted positive for *M. agalactiae* were all females of pure breed with milk production aptitude in distinct mesoregions submitted to intensive rearing system. None of these animals was positive in neither test (AGID or WB) for CAE. Therefore, no correlation of results obtained in diagnosis of *M. agalactiae* by ELISA and CAEV by AGID or WB ($P < 0.05$) was identified. However, two out of three productions that were positive for *M. agalactiae* presented positive results for CAEV with frequencies of 10% and 20%.

Discussion: Seroprevalence of *M. agalactiae* in Ceará State was low in comparison with other Brazilian states and even other countries. However, the presence of the pathogen in more than one mesoregion indicates that the disease occurs in different locations within the State. Therefore, flocks in Ceará are susceptible to the infection, which may be favored by uncontrolled commerce that occurs with deficient surveillance, associated with the importation of animals to improve flock genetic quality. The presence of the pathogen in dairy goats may contribute to significant losses in the local production. On the other hand, CAE was diagnosed in nearly all productions proving the dissemination of this lentivirus infection among dairy goat flocks in Ceará State. Although an association between these diseases was not identified, the presence of a retrovirus in the organism may favor co-infection with another micro-organism, promoting the deficiency in the immune system of the host. In conclusion, *M. agalactiae* is present in different mesoregions of the Ceará State and control measures should be adopted in short term to prevent pathogen dissemination and, consequently reduce economic and productive losses in the local dairy goat production. No correlation was identified between the prevalence of infection by CAEV and *M. agalactiae* in this study.

Keywords: correlation, diagnosis, caprine lentivirus, mycoplasmosis.

Descritores: correlação, diagnóstico, lentivírus caprino, micoplasmose.

Received: 18 October 2017

Accepted: 10 February 2018

Published: 27 February 2018

*Article based on a Dissertation submitted by the senior author in partial fulfillment of requirements for the Doctor's Degree. ¹Laboratório de Virologia (LABOVIR), Programa de Pós-graduação em Ciências Veterinárias (PPGCV), Universidade Estadual do Ceará (UECE), Fortaleza, CE, Brazil. ²EMBRAPA Caprinos e Ovinos (CNPACO), Sobral, CE. ³Universidade Federal Rural do Semiárido (UFERSA), Mossoró, RN, Brazil. ⁴Universidade Estadual Vale do Acaraú (UVA), Sobral. CORRESPONDENCE: R.M. Peixoto [renatomiraima@gmail.com - Fax: +55 (85) 3101-9849]. LABOVIR, Faculdade de Veterinária, Universidade Estadual do Ceará (UECE), Av. Dr. Síllas Manguba n. 1700, Campus do Itaperi. CEP 60740-000 Fortaleza, CE, Brazil.

APÊNDICE E – Comprovante de Publicação do Artigo Técnico II



Acta Scientiarum Veterinariae, 2017, 45: 1487.

RESEARCH ARTICLE
Pub. 1487

ISSN 1678-9236

Avaliação da toxicidade de solvente de extratos vegetais com ação antiviral em sêmen caprino refrigerado*

Evaluation of Solvent Toxicity of Plant Extract with Antiviral Action in Refrigerated Goat Semen

Renato Mesquita Peixoto¹, Alice Andrioli², Diones Oliveira Santos², Raymundo Rízaldo Pinheiro²,
Juscilândia Furtado Araújo¹, Ana Lídia Madeira de Sousa¹, Davi Faria Silva⁴,
Edgar Marques Damasceno⁵ & Maria Fátima da Silva Teixeira¹

ABSTRACT

Background: Caprine Arthritis Encephalitis Virus have been detected in sperm of breeding goats causing economic losses. In order to control the virus, researches aiming to identify natural extracts with potential antiviral effects are performed. However, aqueous or ethanolic extracts must be diluted in dimethyl sulfoxide (DMSO), which is a substance with unknown effects in sperm quality when present in diluting media. Therefore, this study aimed to evaluate sperm viability of refrigerated caprine semen diluted in media containing DMSO. This was performed to provide data that aid in researches involving the use of this component with natural extracts that may inactivate the caprine lentivirus in sperm.

Materials, Methods & Results: The experiment was performed at the Laboratory of Seminal Technology in Embrapa Goats and Sheep in the city of Sobral, Brazil. Sperm viability was assessed in caprine semen refrigerated in two dilution media with crescent concentrations of DMSO. Sperm samples of five goats seronegative for the caprine lentivirus were pooled and diluted in minimal essential medium (MEM) enriched with glucose at 0.01 M added of crescent concentrations of DMSO (0%, 1.5%, 1.75%, 2.0%, 2.25% and 2.5%). The same breeders provided the pool of sperm to test Tris added 2.5% of egg yolk and the same concentrations of DMSO previously mentioned. Treatments were refrigerated at 7°C and evaluated up until four h after DMSO addition. Individual progressive motility (MIP), sperm vigor (V), percentage of spermatozoa reactive to hypoosmotic test (HO) and morphologically normal (NOR) were evaluated. IPM, vigor and NOR remained within normal standards for the caprine species in all treatments test. Percentage results of spermatozoa reactive to hypoosmotic was higher in Tris yolk with values ranging between 34.66% to 46.33%. Sperm vigor was positively correlated ($r = 0.85$) with IPM in the MEM diluted pool of sperm. In Tris yolk, vigor and hypoosmotic test correlated moderately ($r = 0.63$, $r = 0.54$, respectively) with IPM. Tris yolk medium added DMSO presented the highest percentage of reactivity to hypoosmotic test in all treatments when compared to MEM added DMSO.

Discussion: The fact that DMSO is easily homogenized in water, ethylic alcohol and most organic solvents favors its use in diluting natural extracts. These components are a possible source of products that inactivate caprine arthritis encephalitis virus in sperm, which is the key to promoting the safe use of genetic material of infected breeders, in addition to commercial use of germplasm. In this study, there was no interference of DMSO in the analyzed parameters when added in a maximum concentration of 2.5% to MEM and Tris yolk, which is in accordance with standard values for goats. In addition, Tris yolk may promote greater protection to the membrane of sperm cells, which was demonstrated by hypoosmotic test. This medium could be ideal to be used in new methodologies that incorporate DMSO. In conclusion, DMSO added to dilution media Tris yolk and MEM did not interfere with the quality of refrigerated caprine sperm, which maintained viability. These results indicate that this substance did not present harmful effects to the genetic material, promoting the use as solvent of extracts from plant compounds with potential anti-viral effect. The information in this study may aid new research performed in this area.

Keywords: Dimethyl sulfoxide, MEM, Tris yolk, sperm preservation.

Descritores: dimetilsulfóxido, MEM, Tris Gema, preservação do sêmen.

Received: 1 May 2017

Accepted: 4 September 2017

Published: 18 September 2017

*Article based on a Dissertation submitted by the senior author in partial fulfillment of requirements for the Doctor's Degree at the Programa de Pós-graduação em Ciências Veterinárias (PPGCV), Universidade Estadual do Ceará (UECE), Fortaleza, CE, Brazil. ¹Laboratório de Virologia (LABOVIR), PPGCV, UECE, Fortaleza. ²EMBRAPA Caprinos e Ovinos (CNPACO), Sobral, CE. ³Universidade Estadual Vale do Acaraú (UNA), Sobral. ⁴Instituto Superior de Teologia Aplicada (Faculdade INTA), Sobral. CORRESPONDENCE: R.M. Peixoto [renatoemiraima@gmail.com - Fax: +55 (85) 3101-9849], LABOVIR, Faculdade de Veterinária, Universidade Estadual do Ceará (UECE), Av. Dr. Sílas Munguba n. 1700, Campus do Itaperi, CEP 60740-000 Fortaleza, CE, Brazil.