

ARACELY RAFAELLE FERNANDES RICARTE

AVALIAÇÃO DA SUSCEPTIBILIDADE DE GAMETAS E EMBRIÕES  
CAPRINOS AO VÍRUS DA ARTRITE ENCEFALITE CAPRINA

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 título 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

FORTALEZA-CE

2009

ARACELY RAFAELLE FERNANDES RICARTE

AVALIAÇÃO DA SUSCEPTIBILIDADE DE GAMETAS E EMBRIÕES  
CAPRINOS AO VÍRUS DA ARTRITE ENCEFALITE CAPRINA

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 título de Doutor em Ciências Veterinárias.

Aprovada em: 26 / 01 / 2009

**Banca Examinadora**

---

Dra. Maria Fátima da Silva Teixeira  
**Orientadora – UECE**

---

Dra. Alice Andrioli Pinheiro  
**Co-orientadora-EMBRAPA**

---

Dr. Raymundo Rizaldo Pinheiro  
**Examinador-EMBRAPA**

---

Dr. Jean Berg Alves da Silva  
**Examinador-UFERSA**

---

Dra. Valeska Shelda Pessoa de Melo  
**Examinadora-UECE**

R487a

Ricarte, Aracely Rafaelle Fernandes

Avaliação da susceptibilidade de gametas e embriões caprinos ao vírus da artrite encefalite caprina/Aracely Rafaelle Fernandes Ricarte.\_Fortaleza, 2009.

112p. ; Il.

Orientadora: Profa Dra. Maria Fátima da Silva Teixeira

Tese (Doutorado em Ciências Veterinárias)-  
Universidade Estadual do Ceará, Faculdade de Veterinária.

1 Biotécnica. 2.CAEV. 3. Espermatozóides. 4. Folículos. 5. Embriões. I. Universidade Estadual do Ceará, Faculdade de Veterinária.

“O que vale na vida não é o ponto de partida e sim a caminhada,  
caminhando e semeando, no fim terás o que colher.”  
(Cora Coralina)

**DEDICATÓRIA**

Ao meu esposo Marcos Júnior e ao meu filho, que há pouco tempo começou a fazer parte de mim e já se transformou na coisa mais importante da minha vida.

Dedico.

## **AGRADECIMENTOS INSTITUCIONAIS**

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal do Ensino Superior – CAPES pelo apoio financeiro concedido na forma de bolsa de estudo, que viabilizou a realização deste trabalho.

À Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária – Centro Nacional de Pesquisa em Caprinos (EMBRAPA-CNPC) pelo apoio financeiro e técnico imprescindível para a execução desta pesquisa.

Ao Laboratório de Virologia da Universidade Estadual do Ceará pelo acolhimento e apoio técnico para realização do trabalho.

Ao Laboratório de Microscopia Eletrônica da Universidade de Brasília por permitir parte da realização dos experimentos da tese.

Ao laboratório de Histologia e Embriologia da Universidade Federal Rural do Semi-árido (UFERSA) pelo apoio técnico.

## AGRADECIMENTOS PESSOAIS

Agradeço a Deus, por me ter me dado força e coragem para encarar todas as dificuldades na vida pessoal e profissional, para que eu conseguisse vencer mais esta etapa e por ter me proporcionado o convívio com pessoas maravilhosas, amigos verdadeiros que levarei para o resto da vida.

Ao meu esposo Marcos Júnior, por todo carinho, amor, força e compreensão, pelos momentos em que soube me dar apoio sem exigir nada em troca, por outros em que conseguiu me abrir os olhos e mostrar o que realmente valia a pena, e agora por me proporcionar a alegria de ser mãe, agradeço.

Agradeço aos meus pais (Francimar F. Ricarte e Plácido R. da Silva) por todo incentivo, apoio e dedicação e a minha irmã (Cláudia Danielle F. Ricarte) pelo apoio e preocupação. É gratificante saber que tenho vocês sempre do meu lado me dando força e comemorando minhas conquistas.

Agradeço aos meus segundos pais (Maria do Socorro P. Almeida e Marcos P. Almeida) e toda sua família, por me abrigar, cuidar de mim e meu esposo com tanto carinho, e ainda pelo apoio e incentivo.

Muito obrigada à todos os tios, tias, primos e avós que sempre me incentivaram, rezaram e torceram por mim.

Meus sinceros agradecimentos à Dr<sup>a</sup>. Maria Fátima da Silva Teixeira, por ter me concedido a oportunidade de fazer parte da família LABOVIR, como também, pelo seu exemplo de profissional e de pessoa, os quais me proporcionaram um extraordinário crescimento pessoal.

Aos amigos integrantes do LABOVIR, em especial a Tânia Valeska Medeiros Dantas, aquela que cuida de todos com muito carinho e atenção, a você o meu muito obrigada por todos cuidados e ajuda. A Suzana A. C. Araújo, pelos conselhos, amizade e exemplo de dedicação ao trabalho. E ainda a Edmara, Valeska, Neilson, Ariana, Esmale, Dávila, Cíntia e Richard pela amizade e convivência agradável.

Meus sinceros agradecimentos a Dr<sup>a</sup> Alice Andrioli Pinheiro (EMBRAPA - Caprinos), pela amizade, confiança, orientação e por ter disponibilizado o seu laboratório, seus animais e sua equipe para a realização deste trabalho. Sem isto, a elaboração desta tese ficaria extremamente difícil.

Ao Dr. Raymundo Rizaldo Pinheiro (EMBRAPA-CNPC) pelos conselhos, orientação e confiança a mim dispensados durante toda a realização do experimento.

A todos os técnicos e estagiários da EMBRAPA-CNPC, em especial a Nóbrega, Osmarilda, João Ricardo, S. Pedro, S. Chiquinho, Ismênia, Kelma, Fabiane e Ronaldo pelos ensinamentos, auxílio e atenção.

À Dr<sup>a</sup>. Sônia Nair Bão, muito obrigada por todos os ensinamentos, pela gentileza de ter cedido o seu laboratório e sua equipe (Juliana, Shélida e Khesller) na Universidade de Brasília para realização da microscopia eletrônica e pelas valiosas sugestões durante os experimentos.

Ao Dr. Jean Berg Alves da Silva, amigo, conselheiro e orientador nas horas vagas, aquele que me auxiliou desde a elaboração do projeto da tese até a sua execução final. Também ao Dr. Luiz Augusto Cordeiro, por toda compreensão e auxílio imprescindíveis para a finalização deste trabalho. E ainda ao Dr. Alexandre Rodrigues da Silva, por todo apoio e por ter aceitado participar da banca.

Aos amigos Leandro Silva e Roberta Lomonte que me adotaram, cuidaram de mim e juntamente com Ismênia me deram força, carinho e atenção (coisa de família), coisas que jamais vou esquecer, serei grata a vocês para o resto da vida.

Às amigas Márcia Viviane A. Saraiva e Sthênia S. A. Amora por todo carinho, atenção e cuidados.

Às amigas Luciana Andrade e Daniele Oliveira que me socorreram no início do experimento com suas experiências, me cedendo conhecimentos e material para a pesquisa.

A todos os professores do Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias (PPGCV) da UECE, que contribuíram para o meu crescimento profissional com os seus ensinamentos e dedicação. E as secretárias do PPGCV, Adriana e Cristina pela prestabilidade.

A todos que não foram aqui mencionados, mas que contribuíram direta ou indiretamente para a realização deste trabalho, meus sinceros agradecimentos.

## RESUMO

Um dos métodos de prevenção da artrite encefalite caprina (CAE) é a separação e sacrifício de animais soropositivos, levando assim a perdas de animais com alto valor genético. Neste contexto, o uso de biotécnicas reprodutivas surge como uma alternativa para o resgate e utilização do material genético desses animais. Por este motivo é que se faz necessário a realização de pesquisas para se avaliar a susceptibilidade dos gametas e embriões e ainda os parâmetros reprodutivos de fêmeas caprinas acometidas com o CAEV. Sendo assim, os objetivos da presente pesquisa foi o de realizar análise molecular e ultra-estrutural de espermatozoides caprinos de animais infectados naturalmente e experimentalmente e ainda em espermatozoides infectados *in vitro*; caracterizar a ocorrência de degeneração, e ainda presença do vírus da artrite encefalite caprina e susceptibilidade dos folículos ovarianos, espermatozoides e embriões caprinos ao mesmo; e por último avaliar a recuperação de embriões na produção *in vivo* de embriões de fêmeas caprinas naturalmente infectadas com o CAEV submetidas a um protocolo de superovulação, inseminação artificial e coleta de embriões. Para isto, o experimento foi dividido em três etapas, na primeira delas, submeteu-se quatro fêmeas soropositivas para o CAEV e duas fêmeas negativas (grupo controle) a um protocolo de superovulação. Observou-se no grupo de fêmeas positivas para o CAEV um número maior de estruturas recuperadas (oócitos e embriões) do que no grupo controle. Na segunda etapa, foi pesquisada a presença do CAEV em espermatozoides de machos naturalmente e experimentalmente infectados, através das técnicas de reação em cadeia da polimerase (PCR) e microscopia eletrônica de transmissão. Posteriormente, foi testada a susceptibilidade de espermatozoides caprinos ao vírus, realizando-se para isto a técnica de *swim up* e a infecção *in vitro* dos mesmos, em três tempos distintos (30, 60 e 120 minutos), em seguida foram submetidos ao teste de PCR e microscopia eletrônica de transmissão. De todas as amostras testadas, apenas uma antes do *swim up* foi positiva na PCR. Em amostra oriunda de animal que havia sido infectado experimentalmente, foi visualizada uma partícula viral do CAEV na região da peça intermediária no interior de vacúolos. Foi observada a presença de vacúolos também na porção da peça intermediária, porém, sem partícula viral no seu interior em amostra oriunda de animal infectado naturalmente. Na última etapa do experimento, foram analisados espermatozoides e folículos ovarianos através das técnicas de imunohistoquímica e microscopia eletrônica de transmissão, antes e após infecção *in vitro* com o CAEV e ainda embriões caprinos produzidos *in vivo* oriundos de cabras negativas e positivas para o CAEV, os quais foram submetidos à análise ultra-estrutural. Na

imunohistoquímica das amostras seminais, observou-se imunomarcção positiva em amostras de animais infectados naturalmente, artificialmente e em amostras infectadas *in vitro*. Nas amostras de tecido ovariano observou-se a imunomarcção na região do estroma. Na análise ultra-estrutural, observou-se espermatozóide com alterações degenerativas e folículos e embriões íntegros. Por todos estes achados observados pode-se concluir que: A infecção pelo CAEV não influencia na recuperação de embriões de fêmeas caprinas infectadas naturalmente; Espermatozóides caprinos podem ser infectados pelo CAEV; E os folículos ovarianos não são susceptíveis ao mesmo.

**Palavras-chave:** biotécnicas; CAEV; espermatozóides; folículos; embriões.

## ABSTRACT

One method of prevention of caprine arthritis encephalitis (CAE) is the separation and sacrifice of seropositive animals, thus leading to losses of animals with high genetic value. In this context, the use of reproductive biotechnology emerges as an alternative to the purchase and use of genetic material of animals. For this reason it is necessary that the conduct of research to evaluate the susceptibility of gametes and embryos and the reproductive parameters of female goats affected with CAEV. Thus, the objectives of this research was to perform molecular analysis and ultrastructural spermatozoa of goats from naturally and experimentally infected animals and also in spermatozoa infected in vitro, to characterize the occurrence of degeneration, and presence of the virus caprine arthritis encephalitis and susceptibility of ovarian follicles, spermatozoa and embryos at the same goats, and finally evaluate the recovery of embryos in vivo production of embryos of female goats naturally infected with CAEV undergo a protocol of superovulation, artificial insemination and collection of embryos. For this, the experiment was divided into three stages, the first of them, put up four females seropositive for CAEV negative and two females (control group) to a protocol of superovulation. It was observed in the group of females positive for CAEV a greater number of structures recovered (oocytes and embryos) than in the control group. In the second step, was investigated the presence of CAEV in spermatozoa of males naturally and experimentally infected, through the techniques of polymerase chain reaction (PCR) and transmission electron microscopy. It was subsequently tested the susceptibility of goat spermatozoa to the virus, making up for that swim up the technique of in vitro and infection of them in three different times (30, 60 and 120 minutes), then were tested with the PCR and transmission electron microscopy. In all samples tested, only one before the swim up was positive in PCR. In samples derived from animals that had been experimentally infected, was viewed a viral particle of CAEV in the region of midpiece inside vacuoles. Was observed also the presence of vacuoles in the portion of the midpiece, but no viral particles in its interior in a sample derived from naturally infected animal. In the last step of the experiment, we analyzed spermatozoa and ovarian follicles through the techniques of immunohistochemistry and transmission electron microscopy, before and after in vitro infection with CAEV and goat embryos produced in vivo from positive and negative goats to CAEV, the which were submitted to ultrastructural analysis. In immunohistochemistry of seminal samples, positive immunolabeling was observed in samples from animals infected naturally and artificially

infected samples in vitro. Samples of ovarian tissue was observed in immunolabeling in the stroma. In ultrastructural analysis, we observed degenerative changes in sperm and embryos and whole follicles. For all these findings can be observed that: The CAEV infection does not influence the recovery of embryos from females naturally infected goats, spermatozoa goats can be infected by CAEV, and the ovarian follicles are not susceptible.

Keywords: biotechnology; CAEV; spermatozoa; follicles; embryos.

## LISTA DE FIGURAS

### REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

- Fig. 1- Desenho esquemático mostrando os folículos em suas diversas fases de desenvolvimento. 21
- Fig. 2- Representação esquemática das partes integrantes de um espermatozóide. 25

### CAPÍTULO 2

- Fig. 1 – Oócito não fecundado recuperado por lavagem do corno uterino de fêmea positiva para o CAEV. 60

### CAPÍTULO 3

- Fig. 1 - Cytopathic effect (multinucleated giant cells - arrows) in MSC used as positive control of virus-CAEV Cork (Magnificant 400x). 69
- Fig. 2 - Electronic micrograph of spermatozoa come from animals artificially infected with the CAEV presenting at the middle piece vesicles and some of them in a viral particle within it (arrow). 70
- Fig. 3 - Electronic micrograph of spermatozoa come from animals naturally infected with the CAEV presenting at the middle piece several vesicles (arrows). 71

### CAPÍTULO 4

- Fig. 1 – Espermatozóides caprinos submetidos a imunohistoquímica demonstrando marcação positiva (seta). (Aumento 400X). 84
- Fig. 2 - Tecido ovariano submetido a imunohistoquímica demonstrando marcação positiva em fibroblasto do estroma (seta). (Aumento 100X). 84
- Fig. 3 – Micrografia eletrônica de um folículo ovariano normal oriundo de cabra infectada naturalmente com o CAEV. 85
- Fig. 4 – Micrografia eletrônica de embrião oriundo de fêmea negativa e macho positivo para o CAEV. 86

## LISTA DE QUADROS

### REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

**Quadro** - Patógenos virais detectados no trato reprodutivo de animais domésticos indicando risco de transmissão venérea e/ou vertical.

35

**LISTA DE TABELAS****CAPÍTULO 2**

Tabela 1– Média de embriões e oócitos coletados por fêmea após terem sido submetidas ao protocolo de superovulação.

59

**CAPÍTULO 3**

Table 1- Number of samples tested by the seminal test of polymerase chain reaction (PCR-nested) before the swim up (ASU) and after the swim up (DSU) in groups of animals infected with natural and artificial

71

**CAPÍTULO 4**

Tabela 1 - Amostras seminais testadas pela imunohistoquímica antes do swim up (ASU) e depois (DSU) nos diferentes grupos

83

**LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS**

Ac	:Anticorpos
AGID	:Agarose imuno difusion
ASU	:Antes do swim up
aSU	:After swim up
°C	:Graus Celsius
BIV	:Vírus da imunodeficiência bovina
BP	:Pares de base
BSU	:Before swim up
BVDV	:Vírus da diarreia viral bovina
BHV	:Herpes vírus bovino
CG	:Células da granulosa
CAE	:Artrite Encefalite Caprina
CAEV	:Vírus da Artrite Encefalite Caprina
CO <sub>2</sub>	:Gás carbônico
DAB	:Diaminobenzidina
DNA	:Ácido desoxirribonucléico
DSU	:Depois do swim up
EAV	:Vírus da arterite eqüina
ECP	:Efeito citopático
EDTA	:Etilodiaminotetracético
ELISA	:Enzyme-Linked Immunosorbent Assay
Fig.	:Figura
FIV	:Fecundação in vitro
FOPA	:Folículos pré-antrais

FSH	:Hormônio Folículo Estimulante
g	:gramas
GnRH	:Hormônio Liberador de Gonadotrofinas
h	:Hora
HIV	:Vírus da Imunodeficiência Humana
IDGA	:Imunodifusão em Gel de Agarose
IA	:Inseminação artificial
IETS	:Sociedade Internacional de Transferência de Embriões
IgG	:Imunoglobulina G
IM	:Intramuscular
LH	:Hormônio Luteinizante
LTR	:Repetições Terminais Longas
LVPR	:Lentivirus de Pequenos Ruminantes
MOIFOPA	:Manipulação de oócitos inclusos em folículos ovarianos pré-antrais
M	:Molar
MEM	:Meio essencial mínimo
Mg	:Miligrama
Min.	:Minutos
mL	:Mililitro
Mm	:Milímetro
mM	:Milimolar
MSC	:Membrana Sinovial Caprina
MVV	:Vírus Maedi-Visna
N	:número de amostras
Nm	:Nanômetro
Nu	:Núcleo do oócito

O	:Oócito
OIE	:Office International des Epizooties
PBS	:Phosphate Buffered Saline
PCR	:Reação em Cadeia da Polimerase
PCV	:Circovírus porcino
PGF 2 $\alpha$	:Prostaglandina F 2 $\alpha$
pH	:Potencial hidrogeniônico
PIV	:Produção <i>in vitro</i> de embriões
P<0.05	:Probabilidade menor do que 5%
RNA	:Ácido ribonucléico
SRD	:Sem raça definida
RT	Transcriptase reversa
TE	:Transferência de Embriões
TBE	:Tris Borato EDTA
$\mu$	:Micro
VIF	:Vírus da imunodeficiência felina
ZP	:Zona pelúcida
$\mu$ g	:Microgramas
$\mu$ L	:Microlitro
$\mu$ m	:Micrômetro
%	:Porcentagem

## SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	19
2 REVISÃO DE LITERATURA	21
2.1 Folículos Ovarianos	21
2.2 Fisiologia reprodutiva da fêmea caprina	22
2.3 Sêmen	24
2.4 Fisiologia reprodutiva do macho caprino	26
2.5 Artrite Encefalite Caprina (CAE)	27
2.5.1 Agente Etiológico	27
2.5.2 Epidemiologia	28
2.5.3 Patogênese	29
2.5.4 Diagnóstico	30
2.5.5 Controle	31
2.6 Formas de Contaminação do Sêmen	31
2.7 Formas de contaminação do Embrião	32
2.8 Influência do CAEV no trato reprodutivo de caprinos	33
2.9 Influência de outros vírus no trato reprodutivo de animais domésticos	34
2.9.1 Vírus Maedi Visna (MVV)	36
2.9.2 Vírus da Imunodeficiência Felina (VIF)	36
2.9.3 Vírus da Imunodeficiência Bovina (BIV)	37
2.9.4 Vírus da Diarréia Viral Bovina (BVDV)	37
2.9.5 Herpes Vírus Bovino (BHV)	38
2.9.6 Vírus da Arterite Equina (EAV)	39
2.9.7 Circovírus Porcino (PCV)	40
3 JUSTIFICATIVA	41
4 HIPÓTESE CIENTÍFICA	42

5 OBJETIVOS	43
5.1 Geral	43
5.2 Específicos	43
6 CAPÍTULO 1	
- Possibilidades de Aplicação de Biotecnologias Reprodutivas em Animais de Produção Acometidos com Agentes Víricos	44
7 CAPÍTULO 2	
- Recuperação embrionária em fêmeas infectadas com o CAEV submetidas a protocolo de superovulação no semi-árido Cearense	54
8 CAPÍTULO 3	
- Molecular analysis and ultrastructural spermatozoa of goats infected in vitro and in animals infected naturally and experimentally with the CAEV	61
9 CAPÍTULO 4	
- Avaliação imunohistoquímica e ultra-estrutural de gametas e embriões caprinos infectados com o CAEV	73
10 CONCLUSÕES	87
11 PERSPECTIVAS	88
12 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	89
13 ANEXOS	106

## 1 INTRODUÇÃO

A criação de caprinos no Brasil tem crescido bastante nos últimos anos como um ramo econômico rentável. Dentre vários aspectos, a exploração de caprinos no nordeste brasileiro destaca-se também pelo seu efetivo, pois, de aproximadamente 9,5 milhões de animais, 91,4% são explorados nessa região (IBGE, 2007). Este rebanho é composto, em sua maioria, por animais sem raça definida (SRD), os quais são caracterizados por uma elevada adaptabilidade às condições ambientais (OLIVEIRA; LIMA, 1994).

Este vem sendo melhorado geneticamente ao longo dos anos com a introdução de animais exóticos de alto valor zootécnico, porém as importações destes animais sem adequada supervisão levou a introdução de novas doenças aos rebanhos nativos (ASSIS; GOUVEIA, 1994), podendo algumas dessas patologias interferir de forma direta ou indireta no aspecto reprodutivo dos caprinos.

Dentre os agentes virais causadores de enfermidades nesta espécie, temos o vírus da artrite encefalite caprina (CAEV), um vírus do gênero *Lentivirus*, da família Retroviridae (HAASE, 1986), subfamília Lentivirinae que pode provocar nos caprinos artrite crônica progressiva, mastite, pneumonia em animais adultos e leucoencefalomielite em animais jovens (CORK et al., 1974). Podendo levar a perdas econômicas por causar morte de animais jovens, diminuição da produção láctea e perda de peso dos adultos devido às dificuldades de locomoção. E a perdas indiretas importantes como a desvalorização dos rebanhos, reposição precoce de animais, despesas com medidas de controle e barreiras comerciais para produtos (matrizes, reprodutores e sêmen) (FRANKE, 1998; PINHEIRO et al., 2001).

Um dos métodos de prevenção da artrite encefalite caprina (CAE) é a separação e sacrifício de animais soropositivos (OIE, 1996), levando assim a perdas de animais com alto valor genético. Neste contexto, o uso de biotécnicas reprodutivas surge como uma alternativa para o resgate e utilização do material genético desses animais. Dentre as técnicas promissoras para esta finalidade, podemos destacar a inseminação artificial e a fecundação *in vitro* (FIV), no entanto, pouco se sabe do risco da transmissão de agentes patogênicos pelo sêmen, e oócitos podendo estes ser fonte de entrada de doenças, com repercussões graves na produção e na comercialização de rebanhos (ANDRIOLI et al., 2003).

O Vírus da Imunodeficiência Humana (HIV), exemplar do gênero *Lentivirus*, já foi identificado em espermatozoides e embrião de humanos (BACCETTI et al., 1998). Em caprinos, já foi detectada a presença do DNA pró-viral do CAEV no sêmen (ANDRIOLI et al., 1999; TRAVASSOS et al., 1999; ALI AL AHMAD et al., 2008a), e em células do *cumulus*

*oophorus* (ALI AL AHMAD et al., 2005), mas ainda não se sabe exatamente em qual componente seminal este pode estar presente ou se pode estar no oócito e se o material genético desses animais pode ser utilizado com segurança nas biotécnicas de inseminação artificial e fecundação *in vitro*.

## 2 REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1 Folículos Ovarianos

Para poder entender os riscos de transmissão de patógenos pelo oócito é necessário conhecer o folículo ovariano o qual constitui a unidade estrutural e funcional do ovário, contendo o oócito, cercado por células da granulosa, uma membrana basal e células da teca associadas e organizadas sobre a membrana basal (CORTVRINDT; SMITZ, 2001; WU et al., 2001). O folículo ovariano sustenta o crescimento e maturação do oócito (CORTVRINDT; SMITZ, 2001) e de acordo com o grau de evolução pode se dividir em: pré-antrais ou não cavitários e antrais ou cavitários (FIGUEIREDO et al., 2001).

Os folículos pré-antrais representam cerca de 90% da população folicular ovariana (SAUMANDE, 1991) e estão subdivididos de acordo com o seu estágio de desenvolvimento (Fig. 1). Os folículos primordiais apresentam o oócito envolto por uma única camada de células da granulosa de formato pavimentoso ou células da granulosa pavimentosas e cuboidais. O folículo primário, que caracteriza o início da fase de crescimento, apresenta uma única camada de células da granulosa de formato cúbico circundando o oócito. Já o folículo secundário, apresenta uma zona pelúcida evidente, e possui mais de uma camada de células da granulosa de formato cúbico circundando o oócito (HULSHOF et al., 1994). Quando há o acúmulo do líquido folicular, na denominada cavidade antral, o folículo é denominado terciário, que posteriormente, evolui para o folículo pré-ovulatório ou de De Graaf (GEORGE et al., 1998).

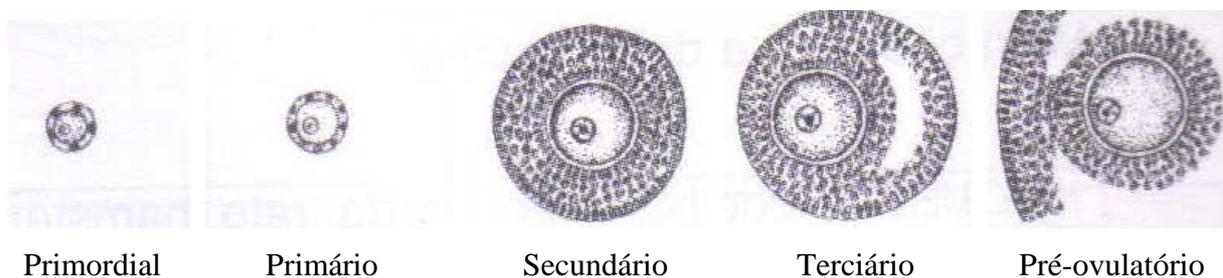


Fig. 1- Desenho esquemático mostrando os folículos ovarianos em suas diversas fases de desenvolvimento (Fonte: Adaptado de HAFEZ; HAFEZ, 2004).

O desenvolvimento folicular normal para que o oócito seja capaz de sofrer fertilização e desenvolvimento embrionário depende de uma sucessão complexa de interações hormonais dentro do folículo. Estas interações criam um ambiente gonadotrófico inconstante durante o desenvolvimento do oócito. Em qualquer fase durante este desenvolvimento, o folículo normalmente pode continuar o seu desenvolvimento ou, mais freqüentemente, sofrer o processo de atresia (WU et al., 2001).

A atresia é um processo fisiológico, de duração desconhecida, que pode ocorrer por via degenerativa e/ou apoptótica em mamíferos, como também em outras espécies (JOHNSON, 2003). Aproximadamente 99,9% dos folículos presentes no ovário tornam-se atrésicos durante seu crescimento e maturação (CARROL et al., 1990). Os folículos pré-antrais sofrem comumente uma atresia conhecida como do tipo A, onde as alterações degenerativas ocorrem primariamente no oócito. Já os folículos antrais sofrem mais freqüentemente, a atresia do tipo B, sendo nesta as primeiras alterações ocorridas nas células da granulosa (FIGUEIREDO et al., 2001). Se o folículo antral não for exposto a um ambiente gonadotrófico apropriado na fase terminal, a atresia se iniciará quase que imediatamente. Os folículos que regridem são invadidos por células inflamatórias, e a área previamente ocupada por eles acaba sendo preenchida por tecido conjuntivo, e o folículo é então substituído por uma cicatriz ovariana, conhecida como corpo atrésico (CUNNINGHAM, 1993). Independente da fase na qual ocorre, e apesar de ser um fenômeno natural, a atresia reduz de maneira significativa o número de oócitos potencialmente ovuláveis, diminuindo, conseqüentemente, a produção de oócitos viáveis durante a vida reprodutiva de um animal (FIGUEIREDO et al., 2001).

## **2.2 Fisiologia reprodutiva da fêmea caprina**

Dentre os aspectos da reprodução da fêmea caprina, a puberdade, a estacionalidade sexual, bem como as características do ciclo estral são pontos importantes a serem considerados no entendimento do processo reprodutivo.

Para que se inicie a atividade cíclica reprodutiva é necessário que a fêmea caprina passe por um processo denominado de puberdade, termo este utilizado para definir o início da vida reprodutiva. Do ponto de vista prático, uma fêmea atinge a puberdade quando é capaz de liberar gametas e de manifestar uma seqüência completa de comportamento sexual, ou seja, capaz de apresentar o primeiro estro clínico seguido de ovulação (HAFEZ; HAFEZ, 2004).

Nas fêmeas caprinas, a idade da puberdade é altamente variável e depende, dentre outros fatores, da herança genética dos animais (GONZALEZ-STAGNARO, 1984). Esta fase reprodutiva pode variar de 119 dias de idade até 776 (MOLOKWU; IGONO, 1982; KHAN et al., 1981). Em raças caprinas locais do Nordeste do Brasil (Canindé, Marota, Moxotó e Repartida), a puberdade pode ocorrer por volta dos 360 dias de idade (SIMPLÍCIO et al., 1990).

A cabra apresenta um ciclo reprodutivo do tipo estral, ou seja, períodos limitados de receptividade sexual, onde o início do estro representa o início do ciclo estral. A duração do ciclo estral na cabra é, em média, de 21 dias, podendo variar de 17 a 25 dias. O estro é o período do ciclo estral no qual a fêmea aceita a monta pelo macho e, na espécie caprina, tem duração média de 30 horas (CHEMINEAU et al., 1992). A ovulação na fêmea caprina, em geral, ocorre no terço final do estro (CAMP et al., 1983), mas tem sido descrita a ocorrência de ovulação após o término desse período (RIERA, 1982).

A fêmea caprina é classificada como poliéstrica estacional, ou seja, possui um potencial de apresentar vários estros em estações determinadas. Esta estacionalidade é influenciada por determinados fatores, tais como o fotoperíodo, a nutrição e efeitos sociais. Os sinais fotoperiódicos são traduzidos em efeitos no sistema reprodutivo através de alterações no padrão de secreção de melatonina, a qual é secretada pela glândula pineal, resultando em alterações na liberação pulsátil de GnRH pelo hipotálamo (MORI; OKAMURA, 1986).

A disponibilidade de nutrientes é um regulador fundamental da função reprodutiva da cabra, pois uma severa desnutrição é capaz de cessar toda a atividade reprodutiva em detrimento de outros fatores (RONDINA, 1998). Em raças caprinas fotorefratárias, a súbita disponibilidade de boa nutrição pode induzir estro e ovulação. Em fêmeas cíclicas, o melhoramento da nutrição aumenta a taxa de ovulação e a incidência de nascimentos múltiplos sem afetar a incidência de estros ou o comprimento do ciclo estral (HENNIAWATI; FLETCHER, 1986).

Os principais fenômenos responsáveis pelo desencadeamento da atividade reprodutiva são: os efeitos macho e fêmea, além da interação fêmea-fêmea (WALKDEN-BROWN; RESTALL, 1996). A indução da atividade reprodutiva cíclica e fértil em fêmeas acíclicas, decorrente da súbita introdução dos machos (efeito macho), foi documentada em caprinos por vários autores (RESTALL, 1992; WALKDEN-BROWN et al., 1993). A estimulação direta da atividade reprodutiva, fêmea-fêmea, tem sido estudada amplamente na espécie caprina (WALKDEN-BROWN; RESTALL, 1996), apresentando uma elevada importância, onde

cabras em estro são capazes de induzir estro em outras, estacionalmente, anovulatórias (WALKDEN-BROWN et al., 1993; RESTALL et al., 1995).

## 2.2 Sêmen

No macho é preciso entender a composição do sêmen e seu comportamento reprodutivo para se avaliar a relevância da contaminação seminal.

O sêmen é o produto da ejaculação de um reprodutor, sendo composto por espermatozóides, células responsáveis pela fecundação dos óvulos das fêmeas, as quais são produzidas nos testículos, e por uma fração líquida denominada plasma seminal, produzida pelas glândulas acessórias (CORTELL, 1981) e pelos epidídimos do sistema genital masculino. Tendo a sua composição variando segundo as espécies (EVANS; MAXWELL, 1990).

Os espermatozóides são formados a partir do desenvolvimento de células germinativas presentes no interior dos túbulos seminíferos (HAFEZ, HAFEZ, 2004). A estrutura do espermatozóide é formada por cabeça, colo, peça intermediária e flagelo, sendo este último subdividido em peça principal e peça terminal (Fig. 2) (BARTH; OKO, 1989).

A cabeça do espermatozóide é formada principalmente pelo núcleo. Entre a membrana plasmática e a porção anterior do núcleo existe o acrossoma, uma estrutura de dupla camada de membranas que contém enzimas (hialuronidase e acrosina) responsáveis pela destruição do *cumulus oophorus* e da zona pelúcida do oócito durante a fecundação (BEARDEN; FUQUAY, 1997).

O colo é a região que liga a cabeça à peça intermediária, que como o flagelo, tem em sua constituição, dois microtúbulos centrais circundados por nove microtúbulos duplos, que é a constituição específica dos flagelos. Circundando esta estrutura, existem outras nove formações: as fibrilas densas externas. Revestindo a peça intermediária, existe uma bainha mitocondrial e uma bainha fibrosa, enquanto que o flagelo é revestido apenas pela bainha fibrosa (MIES FILHO, 1987). A movimentação da cauda se dá pelo deslizamento entre os microtúbulos, cuja energia para tal é proveniente de uma bainha de mitocôndrias que recobre a peça intermediária (BARTH; OKO, 1989).

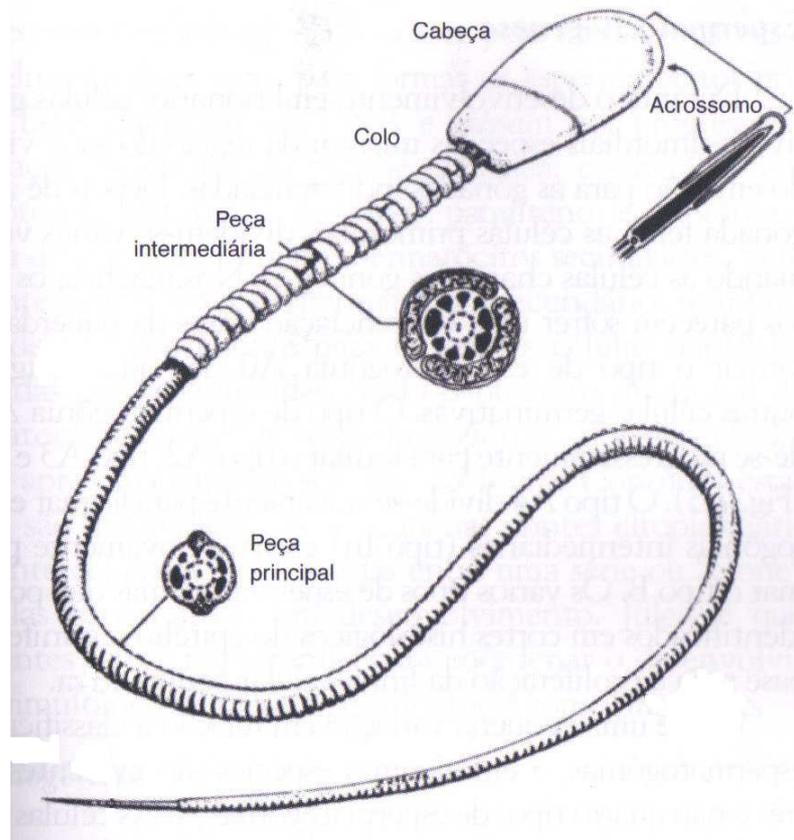


Fig. 2- Representação esquemática das partes integrantes de um espermatozóiado. (Fonte: Adaptado de HAFEZ; HAFEZ, 2004)

O plasma seminal é a porção fluida do sêmen, incorporada durante a ejaculação e formada por uma mistura de líquidos secretados pelas glândulas sexuais acessórias (vesiculares, bulbouretrais e próstata), pelos epidídimos e pelos ductos deferentes (EVANS; MAXWELL, 1990).

O plasma seminal atua como veículo para os espermatozóiados serem transportados do trato genital do macho, ativa a sua motilidade e proporciona um meio rico em nutrientes e tamponado, necessário para manter a sobrevivência dos espermatozóiados após sua deposição no trato genital feminino (EVANS; MAXWELL, 1990). Normalmente, apresenta pressão osmótica semelhante ao sangue e possui pH neutro (UPRETI et al., 1995).

O plasma seminal contém uma variedade de constituintes bioquímicos, alguns dos quais são relativamente específicos dentro do mecanismo de regulação da função do espermatozóiado, entretanto as exatas funções destes componentes seminais no controle da motilidade espermática, ainda não estão bem elucidadas (STREZEZEK et al., 1992). O

contato com o fluido seminal desencadeia eventos preparatórios nos espermatozóides para a fertilização (MÜLLER et al., 1997), pois os constituintes do plasma seminal são conhecidos por modular uma variedade de funções espermáticas (CALVETE et al., 1994).

## **2.2 Fisiologia reprodutiva do macho caprino**

Dentre os aspectos da fisiologia reprodutiva do macho, o aparecimento da puberdade e os fatores que influenciam a produção espermática são os principais enfoques para um melhor entendimento da atividade sexual nesta espécie.

Sendo os testículos os principais órgãos do aparelho genital masculino, estes têm duas funções essenciais: a espermatogênese e a produção hormonal (THIBAUT; LEVASSEUR, 1992). Sendo a puberdade no bode associada a um marcante aumento na secreção de testosterona, na espermatogênese e no comportamento sexual. De 30 a 40 dias após o nascimento, o crescimento dos testículos e dos epidídimos do caprino jovem se processa em um ritmo acelerado até a idade de 140 a 150 dias (NUNES, 2001). Embora o cabrito já seja capaz de fecundar a partir do momento que começa a espermatogênese, só deve ser usado como reprodutor a partir dos 8 ou 9 meses (RIBEIRO, 1997).

Além dos testículos, o aparelho reprodutor dos machos caprinos é constituído pelo epidídimo, glândulas acessórias e o pênis, sendo estes importantes no transporte, armazenamento, produção de plasma seminal e cópula respectivamente (HAFEZ; HAFEZ, 2004).

Os machos caprinos também possuem uma característica peculiar de elevada importância para o acasalamento, que é a presença das glândulas odoríferas. Estas glândulas são também denominadas como glândulas de Schietzel, localizadas atrás do ponto de inserção dos chifres, e que produzem um odor característico, o odor hircino, que aumenta na estação de monta, estimula o comportamento sexual da fêmea (NUNES, 2001).

Dentre os fatores que influenciam a produção espermática nesta espécie, sabe-se que em rebanhos de reprodução estacional, o volume do ejaculado é máximo na estação sexual e diminui durante a primavera/verão, alcançando o mínimo na estação não-sexual. Tais fatores refletem as variações estacionais na produção e liberação do plasma seminal pelas glândulas acessórias as quais estão ativadas quando os níveis de testosterona estão altos na estação sexual e quiescentes quando os níveis de testosterona estão baixos durante a estação não-sexual. Por outro lado, bodes de rebanhos tropicais, quando alimentados adequadamente, não apresentam variações estacionais quanto à espermatogênese ou ao comportamento sexual (CHEMINEAU et al., 1991).

De acordo com Nunes (2001), vários estudos comprovaram que altas temperaturas afetam a qualidade seminal, esse efeito deletério ocorre principalmente como resultado de um aumento na temperatura testicular que provoca degenerações específicas com o surgimento de alterações espermáticas em momentos críticos e precisos do ciclo espermato gênico.

A escassez de alimentos também pode influenciar diretamente na libido do animal, provocar perda de peso crônica e conseqüentemente diminuição no peso testicular e da concentração de espermatozoides por ejaculado (NUNES, 2001).

Outro fator de extrema importância que pode limitar o desempenho reprodutivo dos machos e fêmeas são as enfermidades que podem interferir de forma direta ou indireta no aspecto reprodutivo dos caprinos, dentre os agentes virais causadores de enfermidades nesta espécie, temos o vírus da artrite encefalite (CAEV). Sendo assim, torna-se necessária uma abordagem mais detalhada para se compreender a importância dos prejuízos econômicos que podem decorrer da infecção de um rebanho por este vírus.

## **2.5. Artrite Encefalite Caprina (CAE)**

### **2.5.1 Agente Etiológico**

O CAEV é um vírus pertencente à família Retroviridae (HAASE, 1986), subfamília Lentivirinae que compartilha características genéticas, morfológicas e patológicas com outros lentivírus, incluindo o vírus maedi-visna (MVV). Frequentemente CAEV e MVV são denominados de lentivírus de pequenos ruminantes (LVPR), por possuírem características patogênicas, epidemiológicas e organização genômica semelhantes (BANKS et al., 1983).

O vírus da CAE é envelopado, de formato esférico e tem como material genético uma fita simples de RNA. Ele é resistente à radiação ultravioleta e sensível a solventes lipídicos, formaldeído, ribonuclease, e pH abaixo de 4,2, tendo sua infectividade destruída a 56°C quando submetido a um tempo mínimo de uma hora (HIRSH; ZEE, 2003).

A estrutura do envelope viral é composta por uma dupla camada de lipídeos, onde se encontram inseridas diversas glicoproteínas codificadas pelo vírus. Por ter esta natureza lipídica, o vírus tem estrutura heterogênea, podendo ser denominado assim de pleomórfico. O capsídeo viral é composto de uma ou mais proteínas, as quais se encontram repetidas inúmeras vezes, arrançadas de tal forma a constituir um envoltório protetor ao redor do material genético. O capsídeo, juntamente com o envelope, possui duas funções básicas: proteger o material genético no ambiente extracelular e introduzir o material genético nas células do hospedeiro. (KREUTZ, 2001).

A primeira fase da infecção viral é a ligação da partícula viral com moléculas da superfície celular. As proteínas virais que promovem essa interação ligam-se, de forma específica a determinados componentes celulares, denominados receptores, encontrados em apenas alguns tipos de células, o que determina, o tropismo celular do vírus. Logo após esta ligação, a partícula viral penetra na célula, sendo a fusão da partícula viral com a célula hospedeira, necessária para permitir a liberação do material genético viral dentro do citoplasma ou núcleo, onde irá iniciar o processo de replicação viral e expressão dos genes virais (KREUTZ, 2001).

Dentro da célula, o genoma de RNA retroviral origina por transcrição reversa, o DNA resultante (provírus), que apresenta duas regiões terminais não-codificantes, as repetições terminais longas ou “LTRs”. Entre estas duas regiões extremas estão os genes *gag*, *env* e *pol* codificantes de proteínas estruturais, além dos genes acessórios *tat*, *vif* e *rev*, codificantes de proteínas reguladoras. O gene *gag* codifica um precursor que é subsequenteemente clivado em três proteínas principais: matriz, capsídeo e nucleocapsídeo. O gene *pol* codifica as proteínas de atividade enzimática: transcriptase reversa, protease, integrase. O gene *env* codifica as glicoproteínas de superfície e transmembranária do envelope (HIRSH; ZEE, 2003).

Após a replicação do material genético do vírus, ocorre a montagem da partícula viral e a liberação do vírus da célula infectada por brotamento, ou após a destruição celular (KREUTZ, 2001).

### **2.5.2 Epidemiologia**

No início da década de 80, importações de caprinos de raças leiteiras exóticas, procedentes de distintos países da Europa (França, Suíça, Alemanha, Holanda, Inglaterra) e da América do Norte (Estados Unidos e Canadá) foram feitas com o objetivo de introduzir material genético para melhorar a produção de leite das raças nativas brasileiras. Nessas importações, realizadas sem a adequada supervisão, foi também introduzido o CAEV (ASSIS; GOUVEIA, 1994).

O CAEV tem sido identificado em diversos países, com prevalências mais elevadas naqueles em que a caprinocultura é mais tecnificada (OIE, 1996), causando perdas econômicas decorrentes da diminuição da vida produtiva e da produção leiteira. No Brasil, a CAE foi inicialmente identificada sorologicamente por Moojen *et al.* (1986) em cabras no Rio Grande do Sul. No mesmo estado, registraram pela primeira vez o isolamento (HOTZEL *et al.*, 1993) do CAEV no Brasil e posteriormente evidências sorológicas do vírus foram relatados em diferentes estados do país (CALLADO *et al.*, 2001).

No Ceará, o primeiro registro dessa infecção ocorreu em animais de raças leiteiras no município de Sobral (PINHEIRO et al., 1989). Em levantamento realizado em rebanhos leiteiros na região metropolitana de Fortaleza (CE), verificou-se soroprevalência de 40,7% de animais positivos para LVPR (MELO; FRANKE, 1997). Um dos principais entraves para o controle da CAE tem sido a pouca informação por parte dos produtores, o que tem limitado a implantação e avaliação de medidas profiláticas nas propriedades (PINHEIRO et al., 2001).

### 2.5.3 Patogênese

O reservatório e a fonte de infecção deste lentivírus são os animais infectados, de ambos os sexos, de várias raças e idades. Esta doença se caracteriza por causar artrite crônica progressiva, mastite, e mais raramente pneumonia em animais adultos e leucoencefalomielite em animais jovens (CORK et al., 1974). A forma mais importante da doença é a artrítica, que geralmente é observada em animais com mais de oito meses de idade (CRAWFORD; ADAMS, 1981). Por outro lado a forma de maior significado econômico é a mamária, devido ao comprometimento da produção leiteira e predisposição a infecções secundárias da glândula mamária (SMITH et al., 1988).

Como o vírus é excretado no leite, a transmissão pode ocorrer por via digestiva, pela ingestão de colostro e leite contaminados de fêmeas enfermas, bem como por fezes, saliva, secreções respiratória e urogenital (HIRSH; ZEE, 2003). Entretanto, acredita-se que outras rotas de infecção vertical estejam envolvidas na transmissão do CAEV (EAST et al, 1993), uma vez que já foi descrita a soroconversão de cabrito recém-nascido alimentado com colostro artificial, indicando a possibilidade de infecção intra-uterina (ADAMS et al., 1983).

Após a introdução do vírus no organismo dos animais, este irá infectar as células do sistema monocítico-fagocitário, produzindo a infecção persistente do hospedeiro (NARAYAN, 1990; CALLADO et al., 2001). Estas células são os tipos celulares predominantemente infectados *in vivo*. Porém, já foi detectado a presença do DNA pró-viral em células do *cumulus oophorus* de folículos terciários (ALI AL AHMAD et al., 2005) e um aumento na taxa de degeneração de folículos ovarianos pré-antrais de animais infectados naturalmente (RICARTE, 2005).

Este lentivírus é capaz de desenvolver mecanismos que podem não estimular a resposta imune humoral intensa, pelo fato das células infectadas não estarem produzindo antígenos virais (HIRSH; ZEE, 2003). A infecção, geralmente persistente e assintomática, pode causar afecção multissistêmica, de evolução geralmente crônica, com agravamento

progressivo das lesões levando a perda de peso e debilidade até a morte (CALLADO et al., 2001).

Esta infecção e/ou soropositividade não estão obrigatoriamente relacionadas com a presença de sinais clínicos, uma vez que apenas 35% dos animais infectados apresentam sintomatologia da CAE (WILKERSON et al., 1995).

#### **2.5.4 Diagnóstico**

Pelas características da doença e por não existirem sinais clínicos patognomônicos, torna-se necessário o auxílio de testes laboratoriais que permitam seu diagnóstico (ABREU et al., 1998).

O diagnóstico laboratorial pode ser realizado por meio da detecção de anticorpos (Ac) no soro, isolamento viral ou detecção do DNA proviral pela reação em cadeia da polimerase (PCR) e ainda por imunomarcção através de técnicas como a imunohistoquímica, que permite a detecção imunológica de antígenos virais presentes no tecido e em cultivos celulares (ALMEIDA, 2003). Os principais testes sorológicos empregados para detecção da infecção pelo lentivírus caprino são a imunodifusão em gel de agarose (IDGA), Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA) e “Imuno Western Blot” (RUTKOSKI et al., 2001).

Dentre estes, o teste laboratorial para diagnóstico de infecção pelo CAEV mais difundido e recomendado pelo OIE (Escritório Internacional de Epizootias) é o de IDGA. Ele é executado como um teste de triagem na rotina de rebanhos, devido ao custo relativamente baixo, à sua alta especificidade, além da praticidade de execução e leitura (HARKISS; WATT, 1990).

A imunohistoquímica, técnica essencialmente qualitativa cujo objetivo fundamental é o encontro e localização topográfica de antígenos nos tecidos (BRASILEIRO FILHO et al., 2000), é de grande valia para detecção de células infectadas em tecido de órgãos específicos do organismo animal (ARAÚJO, 2004), auxiliando assim, o estudo da patogenia de vírus como o CAEV (GUEDES et al., 2001).

A microscopia eletrônica de transmissão também pode ser utilizada para o diagnóstico, uma vez que possibilita a observação de vírions em espaço intracitoplasmático. Outra vantagem desta técnica é a possibilidade de detectar sinais de degeneração provocados pelo vírus, como presença de vacuolização do citoplasma e aumento do tamanho das mitocôndrias e núcleo, sendo esta técnica muito eficiente para diagnosticar lentivírus (LEE et al., 1996).

O teste da Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) é utilizado no diagnóstico de alguns lentivírus, com o intuito de se detectar o DNA pró-viral dos mesmos. Permitindo a identificação por amplificação de parte do ácido nucléico viral específico de células e tecidos de um animal infectado (PINHEIRO, 2001). É ainda um teste caro, porém possui alta sensibilidade e especificidade o que dá uma maior segurança para o diagnóstico do CAEV (RIET-CORREA, 2001).

### **2.5.5 Controle**

Os programas de controle ou erradicação da infecção por CAEV têm sido adotados em vários países, geralmente de adesão voluntária, baseados no teste periódico dos animais. A separação ou eliminação dos positivos, associado ao uso de certas práticas de manejo para prevenção da disseminação do agente (OIE, 1996), como separar crias imediatamente após o nascimento, evitar o contato com secreções e isolamento dos adultos, administrar colostro termizado de mães não infectadas ou de fêmeas bovinas, ou ainda, alimentar as crias com substitutos do leite (GOUVEIA et al., 1996), contribuem para redução da incidência do CAEV.

Vale ressaltar que as práticas de manejo adotadas atualmente nos programas de controle podem dificultar futuras intervenções da CAE, pois a separação e eliminação dos animais soropositivos, pode contribuir para a seleção de animais que respondem a infecção com baixos títulos ou que soroconvertem tardiamente, e ainda de amostras virais pouco indutoras de resposta humoral (CALLADO et al., 2001).

Na tentativa de criar novos métodos de controle e evitar perdas de animais soropositivos para o CAEV de alto valor genético, várias biotécnicas vêm sendo testadas e utilizadas na reprodução animal. Dentre estas podemos citar a inseminação artificial e transferência de embriões. Porém, pouco se sabe do risco da transmissão de agentes patogênicos pelo sêmen, podendo este ser uma fonte de entrada de doenças. Sendo assim, faz-se necessário um levantamento dos riscos de transmissão de patógenos através do sêmen e do embrião.

## **2.6. Formas de Contaminação do Sêmen**

Na inseminação artificial (IA), o potencial de disseminação de enfermidades é relevante, pois o número de fêmeas que podem receber sêmen contaminado é

expressivamente maior, caso não sejam rigorosamente seguidas as normas técnicas e sanitária para o processamento do sêmen (ANDRIOLI et al., 2003).

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

E ainda fatores como lesões, inflamações e infecções no órgão reprodutor podem desencadear maior fluxo de células sangüíneas para o sêmen, juntamente com os patógenos, e ainda outros fatores como o estágio da doença, o estado imunológico ou nutricional e a associação com outras enfermidades (CONCHA-BERMEJILLO et al., 1996; PINHEIRO, 2001).

## **2.7. Formas de Contaminação do Embrião**

Para que ocorra a transmissão de um patógeno através do embrião é necessário que ele esteja presente dentro do oócito, em associação ou mesmo aderido à zona pelúcida (ZP), ou que esteja presente nos fluidos no qual os embriões são recolhidos, manipulados, criopreservados ou transferidos (SINGH, 1987; WRATHALL, 1995).

Outro fator importante na transmissão de agentes por embrião é a patogenia da doença, especialmente quanto à predileção do patógeno ao trato genital. Agentes carreados pelo sangue podem, também, ganhar acesso ao trato genital, aumentando o risco no caso de qualquer hemorragia uterina o que ocorre, inevitavelmente, durante a colheita de embriões. No caso de outros agentes de doenças que têm predileção por pele ou vísceras, a probabilidade de contaminação do embrião é remota, todavia, tais agentes, ocasionalmente, produzem infecções generalizadas, e mesmo as localizadas podem causar contaminação dos meios, das soluções e do equipamento (ANDRIOLI et al., 2003).

## 2.8. Influência do CAEV no trato reprodutivo de caprinos

Anteriormente se acreditava ser o alvo da infecção *in vivo* do CAEV, apenas as células do sistema monocítico-fagocitário. Sendo as principais formas de infecção do rebanho, a ingestão pelo recém-nascido de colostro e leite contaminados de fêmeas enfermas, bem como por fezes, saliva, secreções respiratória e urogenital (NARAYAN, 1990). Entretanto, acreditava-se que a rota de infecção vertical esteja envolvidas na transmissão do CAEV (EAST et al., 1993), uma vez que já foi descrita a soroconversão de cabrito recém-nascido alimentado com colostro artificial, indicando a possibilidade de infecção intra-uterina (ADAMS et al., 1983).

Tentando-se elucidar o risco de transmissão do CAEV pelo trato reprodutivo, Travassos et al. (1999) testaram, através da técnica de PCR *nested*, a presença do DNA pró-viral no sêmen de machos caprinos naturalmente infectados com o CAEV e verificaram positividade em oito de 15 amostras examinadas, ressaltando o risco de transmissão da enfermidade pelo sêmen. Em outro experimento, Andrioli-Pinheiro (2001), observou que a injúria testicular e a lavagem do sêmen são fatores que influenciam a presença do CAEV no mesmo, onde em 50% e 53,6% das amostras de animais submetidos à injúria testicular e a não lavagem do sêmen, respectivamente, foram positivas para o PCR *nested*, enquanto que este número foi de 21,4% e 17,9% para o grupo dos animais não submetidos à injúria e submetidos a lavagem, respectivamente.

Mais recentemente Ali Al Ahmad et al. (2008a) observaram a presença do lentivírus caprino em amostras de células sangüíneas, células não espermáticas presentes no ejaculado e no plasma seminal de animais infectados com o CAEV, o que não foi observado em amostras contendo apenas espermatozóides. Esses achados sugerem a presença do CAEV no sêmen de forma transitória e associada à presença das células de defesa e não aos espermatozóides, necessitando ainda o estudo da susceptibilidade desses gametas a este vírus para se poder utilizá-los com segurança em biotecnologias reprodutivas.

Em estudos realizados com células do trato reprodutivo de fêmeas, Lamara et al. (2001; 2002) testaram a possibilidade de replicação do CAEV *in vitro* em células da granulosa, e em células epiteliais de oviduto, respectivamente, as quais proporcionaram uma replicação eficiente deste vírus. Posteriormente, Fieni et al. (2003) verificaram a presença deste vírus em meios de lavagem de cabras infectadas usadas como doadoras de embriões. Já Ali Al Ahmad et al. (2005), verificaram a presença do DNA pró-viral do CAEV em células da granulosa, mas não no oócito de folículos antrais de cabras infectadas naturalmente, estes mesmos autores utilizando técnicas moleculares como a PCR *nested* e a RT-PCR verificaram

que células embrionárias são susceptíveis e permissivas ao CAEV (ALI AL AHMAD et al., 2006). Porém, foi verificado recentemente que embriões livre do CAEV, após terem sido transferidos para mães infectadas e separados ao nascimento das mesmas, não soro converteram, indicando que a biotecnologia de transferência de embriões pode ser utilizada com segurança nestes animais (ALI AL AHMAD et al., 2008b).

Apesar de muitos trabalhos já terem sido desenvolvidos tentando-se avaliar a presença e/ou susceptibilidade de células do trato reprodutivo de fêmeas e machos ao CAEV, ainda falta a elucidação dos prováveis receptores destes vírus, uma vez que se sabendo quais são esses receptores, tornaria mais fácil a avaliação da susceptibilidade de qualquer célula a este tipo de vírus, o que poderia levar a nova forma de manejo do material genético destes animais, descartando as células susceptíveis e utilizando somente aquelas que não apresentassem risco de contaminação, uma vez que o descarte de um animal de elevado valor zootécnico poderia acarretar um atraso para o melhoramento genético e perdas econômicas drásticas para um rebanho.

## **2.9 Influência de outros vírus no trato reprodutivo de animais domésticos**

Vários trabalhos vêm sendo desenvolvidos com intuito de se elucidar novas rotas de infecção dos vírus e dentre os agentes virais já detectados após infecção *in vivo* ou *in vitro* em células do trato reprodutivo de animais domésticos têm-se o CAEV (TRAVASSOS et al., 1999; ANDRIOLI-PINHEIRO, 2001; LAMARA et al., 2001; 2002; FIENI et al., 2003; ALI AL AHMAD et al., 2005; 2006), o Vírus Maedi Visna (CONCHA-BERMEJILLO, 1996; ROMERO et al., 2004), o Vírus da Imunodeficiência Felina (O'NEIL et al., 1995; 1996; JORDAN et al., 1996; 1998; ), Vírus da Imunodeficiência Bovina (GRADIL et al., 1999), Vírus da Diarréia Viral Bovina (BROWNLIE, 1990; BAKER, 1995), Herpes Vírus Bovino do tipo 1 (GUERIN et al., 1989; 1990; VANROOSE et al., 1997; GROM et al., 2006), Vírus da Arterite Equina (MITTELHOLZER et al., 2006; RAZ et al., 2006) e o Circovírus Porcino do tipo 2 (BOGDAN et al., 2001; PENSAERT et al., 2004), como pode se observar no Quadro (abaixo). Estes vírus podem estar presentes no trato reprodutivo sem causar nenhum dano aparente ou provocando alterações como a degeneração de gametas, podendo dificultar a fecundação, provocar abortos e causar inflamações no trato reprodutivo (RICARTE, 2005; PENSAERT et al., 2004).

**Quadro** - Patógenos virais detectados no trato reprodutivo de animais domésticos indicando risco de transmissão venérea e/ou vertical.

<b>Patógeno</b>	<b>Espécie</b>	<b>Localização</b>	<b>Referências</b>
LVPR ( <i>Lentivírus de Pequenos Ruminantes</i> – CAEV e MVV)	Caprina e Ovina	Sêmen, ovário, oviduto e células embrionárias	Concha-Bermejilo, 1996; Travassos et al., 1999; Andrioli-Pinheiro, 2001; Lamara et al., 2001; 2002; Fieni et al., 2003; Romero et al., 2004 Ali Al Ahmad et al., 2005; 2006
VIF ( <i>Vírus da Imunodeficiência Felina</i> )	Felina	Vagina, útero e sêmen	O’Neil et al., 1995; 1996; Jordan et al., 1996; 1998
BIV ( <i>Vírus da Imunodeficiência Bovina</i> )	Bovina	Sêmen	Gradil et al., 1999
BVDV ( <i>Vírus da Diarréia Viral Bovina</i> )	Bovina	Feto, secreções e sêmen	Brownlie, 1990; Baker, 1995
BHV ( <i>Herpes Vírus Bovino</i> )	Bovina	Ovário, oviduto, útero, embriões e sêmen	Guerin et al., 1989 ; 1990; Vanroose et al., 1997; Grom et al., 2006
EAV ( <i>Vírus da Arterite Eqüina</i> )	Eqüina	Sêmen	Mittelholzer et al., 2006; RAZ et al., 2006
PCV ( <i>Circovírus Porcino</i> )	Suíno	Útero e feto	Bogdan et al., 2001; Pensaert et al., 2004

### 2.9.1 Vírus Maedi Visna (MVV)

Lentivírus de pequenos ruminantes é a denominação dada ao vírus da artrite encefalite caprina (CAEV) e ao vírus Maedi Visna (MVV), por possuírem características patogênicas, epidemiológicas e organização genômica semelhantes (BANKS et al., 1983).

Assim como o CAEV, já se indicou a possibilidade de transmissão deste vírus pela via uterina, uma vez que já foi realizado o isolamento do MVV de cordeiros obtidos por cesariana (CUTLIP et al., 1981).

Esta via de transmissão foi confirmada com a detecção do DNA pró-viral do MVV em leucócitos de cordeiros, antes da ingestão de colostro (BRODIE et al., 1994), porém segundo os autores, esses animais podem ter se contaminado na ocasião do parto com células presentes no sangue das mães enfermas. O mesmo também, já foi detectado no sêmen de ovinos experimentalmente infectados com o MVV e *Brucella ovis* (CONCHA-BERMEJILLO, 1996). E mais recentemente, Romero et al. (2004) verificaram a presença do MVV em células da granulosa e oócito pela técnica de PCR *double-nested* em ovelhas naturalmente infectadas, tendo o teste demonstrado a presença do vírus apenas nas células da granulosa.

### 2.9.2 Vírus da Imunodeficiência Felina (FIV)

Este é um vírus RNA, pertencente à família Retroviridae, gênero *Lentivirus*, que acomete entre 1 e 20% dos felinos domésticos do mundo, levando o animal a um quadro imunológico de hipergamaglobulinemia e linfopenia dentre outros (WILLETT et al., 1997).

O FIV já foi isolado do sangue (YAMAMOTO et al., 1988), da saliva (MATTEUCCI et al., 1993), fluido cérebro-espinhal (YAMAMOTO et al., 1988), leite (SELLON et al., 1994; O'NEIL et al., 1995) e lavados vaginais (O'NEIL et al., 1995, 1996). Experimentalmente, o FIV demonstrou ser capaz de apresentar transmissão horizontal por via parenteral, oral, ou exposição retal (ENGLISH et al., 1993; MOENCH et al., 1993; SELLON et al., 1994). Já tendo sido citada também a transmissão pelo útero (O'NEIL et al., 1995, 1996).

Em 1996, Jordan et al. verificaram a soroconversão de fêmeas as quais haviam sido inseminadas com o sêmen de machos positivos para o FIV. Em 1998, Jordan et al. conseguiram verificar, de forma experimental, a transmissão horizontal deste vírus através do sêmen, a partir de então, este vírus é utilizado devido as suas similaridades morfológicas e bioquímicas como modelo experimental, no estudo da possível transmissão venérea do Vírus

da Imunodeficiência Humana (HIV), bem como para realização de pesquisas no campo de diagnóstico molecular, tentando aperfeiçoar e tornar mais preciso o diagnóstico para o lentivirus humano (JORDAN et al., 2002).

Todos os trabalhos realizados com o FIV tiveram grande importância para demonstrar que até o momento não é viável utilizar o material genético dos animais acometidos por este vírus em biotecnologias reprodutivas, uma vez que isso representa um grande risco de contaminação, principalmente dos animais destinados à reprodução, mas vale a pena ressaltar a importância das pesquisas realizadas até então, pois estas elucidaram a transmissão venérea da doença, e serviu como modelo para pesquisas com o HIV, fato este que deve ser seguido para outras enfermidades víricas que acometem rebanhos de animais de produção com frequência, para se averiguar a viabilidade econômica de se criar novos métodos de controle e novas tecnologias para o aproveitamento do material genético dos mesmos.

### **2.9.3 Vírus da Imunodeficiência Bovina (BIV)**

Baseado nas características imunológicas, bioquímicas e genéticas, o BIV é classificado como um lentivirus pertencente à família Retroviridae (Garvey et al., 1990; Gonda et al., 1994). Como outros lentivirus, na infecção *in vivo* este tem tropismo por células do sistema monocítico-fagocitário (CARPENTER et al., 1992). Já tendo sido relatada a provável transmissão deste pelo sêmen, uma vez que o fluido seminal é rico em células como linfócitos, monócitos e macrófagos, alvos da infecção (WOLFF, 1995).

Em experimento realizado por Gradil et al. (1999), touros com idade de 18 a 24 meses de idade foram inoculados por via intravenosa com uma suspensão contendo BIV-FL112 (SUAREZ et al., 1993). Após 14 semanas foram coletadas amostras de sangue e sêmen dos animais infectados experimentalmente, as quais foram submetidas ao teste de PCR *nested*. Todas as amostras sanguíneas e seminais foram positivas ao teste, demonstrando assim o risco de transmissão pelo sêmen. Estes achados servem de alerta para os profissionais da área de mercado de germoplasma, os quais deveriam buscar novas tecnologias para a rotina dos seus laboratórios a fim de diagnosticar e prevenir o risco de transmissão de patógenos pelo sêmen.

### **2.9.4 Vírus da Diarréia Viral Bovina (BVDV)**

O vírus da Diarréia Viral Bovina é um dos principais patógenos de bovinos e causa perdas econômicas significativas para a pecuária bovina em todo o mundo (BAKER, 1995). O

BVDV pertence à família Flaviviridae, gênero *Pestivirus*, (HORZINEK, 1991). O BVDV tem distribuição mundial e a prevalência de anticorpos chega a atingir 70 a 80% dos animais e até 80% dos rebanhos na América do Norte e em alguns países europeus. Os pestivírus são vírus pequenos (40-60nm), envelopados e contêm uma molécula de RNA linear, fita simples, polaridade positiva, de aproximadamente 12,5kb como genoma (COLLETT et al., 1989; HORZINEK, 1991).

Embora identificado originalmente de casos de doença gastroentérica, o BVDV é um vírus freqüentemente associado com fenômenos reprodutivos (BAKER, 1995). As conseqüências clínico-patológicas e epidemiológicas da infecção de fêmeas bovinas prenhes são marcantes. Em muitos rebanhos onde a infecção é endêmica, falhas reprodutivas representam os sinais mais evidentes e por vezes, os únicos da presença da infecção. A infecção antes ou após a cobertura ou inseminação artificial pode resultar em perdas reprodutivas como infertilidade temporária, retorno ao cio, mortalidade embrionária ou fetal, abortos, mumificação, má formações fetais, bem como o nascimento de bezerros fracos e inviáveis (BROWNLIE, 1990; BAKER, 1995).

Este vírus já foi detectado em tecidos de fetos abortados, leucócitos de animais acometidos, sêmen de touros pertencentes a centrais de inseminação artificial e em células do encéfalo. A infecção fetal entre os dias 40 e 120 de gestação freqüentemente resulta na produção de bezerros imunotolerantes, persistentemente infectados com o vírus. Estes bezerros geralmente são soronegativos, podem ser clinicamente normais, e excretam o vírus continuamente em grandes quantidades em secreções e excreções (BROWNLIE, 1990; BAKER, 1995). Por isso, são considerados o ponto-chave da epidemiologia da infecção e a sua identificação e descarte constituem-se em etapas essenciais para o controle e/ou erradicação do BVDV dos rebanhos (DUBOVI, 1992).

De especial interesse são os estudos que detectaram anticorpos anti-BVDB em outras espécies, como em suínos (ROEHE et al., 1998), caprinos (CASTRO et al., 1996) e bubalinos (PITUCO et al., 1997). Embora o papel de outras espécies de animais domésticos e silvestres na epidemiologia do BVDV ainda não seja conhecido, algumas espécies silvestres têm merecido especial atenção em programas de combate à infecção.

### **2.9.5 Herpes Vírus Bovino (BHV)**

O BHV do tipo 1 é um agente etiológico que demonstra diferentes síndromes clínicas como rinotraqueíte, vulvovaginite pustular e balanopostite (GIBBS e RWEYEMAMU, 1997).

Pode ser transmitido de forma direta por contato com animais infectados ou através de aerossóis (AFSHAR e EAGLESOME, 1990). Tendo sido observado um aumento crescente nas pesquisas para se verificar a possível transmissão deste vírus através do trato reprodutivo.

Em estudo experimental, doadoras foram inoculadas com o BHV-1, e posteriormente esse vírus foi encontrado em associação com oócitos, ovários, fluido folicular, células da granulosa, corpo lúteo, e fluido ovidutal (GUERIN et al., 1990). No mesmo experimento, observou-se que o desenvolvimento de oócitos fertilizados de ovários infectados com o vírus foi consideravelmente reduzido quando comparado com oócitos fertilizados oriundos de ovários de vacas negativas utilizadas como grupo controle.

Guerin et al. (1989) utilizando a técnica *in vitro-in vitro*, examinaram o efeito da introdução do BHV-1 em sistema de maturação para fecundação *in vitro* de oócitos. O vírus foi detectado em oócito e meios de lavagem. Observou-se que o mesmo altera o potencial de fertilização dos espermatozoides, pois pode causar a degeneração de organelas internas do oócito. Levando os autores a concluir que a contaminação *in vitro* dos oócitos pelo BHV-1 resulta em absorção do vírus pela zona pelúcida o que acarreta uma interferência em mecanismos intracelulares dificultando a fusão dos gametas.

Vanroose et al. (1997) demonstraram que a susceptibilidade de embriões livres de zona pelúcida ao BHV-1 depende do seu estágio de desenvolvimento. Os oócitos e zigotos foram refratários à infecção, demonstrando uma maior susceptibilidade em estágios mais avançados de desenvolvimento como em estágio de 4 a 8 células.

Recentemente, Grom et al. (2006) detectaram molecularmente o BHV-1 em sêmen inoculado artificialmente e em sêmen de touros com infecção latente os quais estavam, sendo tratados com dexametasona, o que indica uma possível transmissão deste vírus pela inseminação artificial, porém para averiguar a veracidade desta afirmação ainda são necessários estudos observando a possível soroconversão das fêmeas inseminadas e o nascimento das crias oriundas de inseminações artificiais com material de touro contaminado.

### **2.9.6 Vírus da Arterite Equina (EAV)**

Este vírus é um protótipo da família Arteriviridae e ordem Nidovirales (CAVANAGH, 1997), sendo associado a infecções contagiosas dos eqüinos, podendo os mesmos serem infectados por contato com aerossóis, sendo essa a via mais comum, como também pela via venérea. Pode provocar uma infecção subclínica em animais adultos imunocompetentes e abortos em fêmeas prenhes (TIMONEY & MCCOLLUM, 2000).

Poucos trabalhos foram desenvolvidos tentando-se elucidar a presença deste vírus nos órgãos reprodutivos, mas recentemente, Raz et al. (2006) verificando os efeitos de sêmen de animais positivos para o EAV na fertilidade de fêmeas, observaram a soroconversão de fêmeas, quadros de endometrites, descargas nasais e urticárias após a inseminação com o sêmen de machos infectados.

Corroborando com estes achados, Mittelholzer et al. (2006) conseguiram isolar o EAV em cultivo de células a partir de amostras seminais, achados que confirmam a presença do vírus no sêmen dos animais infectados e o risco de transmissão do mesmo pela rota venérea.

### **2.9.7 Circovírus Porcino (PCV)**

Semelhante a outros vírus de suínos como o da peste suína clássica, vírus da síndrome respiratória e reprodutiva suína, enterovírus porcino e o vírus da doença de Aujeszky, o Circovírus Porcino tipo 2 está associado com falhas reprodutivas, recentemente foi adicionado à lista de vírus com transmissão transplacentária, tendo sido isolado de tecido uterino de porcas acometidas. Este vírus pode provocar a morte e expulsão do feto ou a sua mumificação no útero materno, de onde também já se conseguiu o isolamento viral (BOGDAN et al., 2001).

O PCV não foi detectado no sêmen de machos acometidos, mas em infecções experimentais de porcas observou-se que este provoca uma viremia nos animais e demonstrou replicação em tecidos fetais, provocando abortos ou mumificação. Demonstrando assim que os animais sexualmente maduros são a parcela mais acometida pelo vírus (PENSAERT et al., 2004).

Nesse caso em especial, a rota da infecção não é a venérea, mas a vertical, o que poderia ser solucionado com um manejo intensivo das instalações das porcas, com isolamento dessas, limpeza intensiva das baias e cuidados nutricionais para se evitar qualquer estresse e, conseqüentemente, o acometimento dos animais por qualquer enfermidade infecciosa, pois uma vez que o circovírus porcino infecte uma porca gestante estará em risco o feto e a mãe, comprometendo assim todo o processo reprodutivo da criação.

Vale ressaltar, que por não terem cura, a principal forma de controle de algumas enfermidades víricas de animais domésticos é o sacrifício dos animais acometidos, levando assim a graves perdas econômicas e de material genético.

### 3 JUSTIFICATIVA

Como a rota de infecção vertical do CAEV ainda não está totalmente elucidada e a principal forma de controle do CAEV é a separação e sacrifício dos animais positivos, isto pode levar à perdas de animais de alto valor genético. Na tentativa de reduzir estas perdas, o uso de biotécnicas reprodutivas como a inseminação artificial e fecundação *in vitro* de embriões, surgem como alternativas para o resgate e utilização do material genético desses animais. Sendo que para a utilização dos gametas, de fêmeas e machos infectados com o CAEV, faz-se necessário averiguar a presença do vírus e a susceptibilidade dos espermatozóides e oócitos infectados naturalmente e *in vitro* com o CAEV, para se verificar a segurança da utilização dessas técnicas em animais soropositivos para o CAEV.

#### **4 HIPÓTESE CIENTÍFICA**

O vírus da Artrite Encefalite Caprina é capaz de infectar espermatozóides, folículos ovarianos e embriões caprinos.

## 5 OBJETIVOS

### 5.1 Objetivo Geral

Avaliar os gametas e embriões caprinos quanto à presença e susceptibilidade ao vírus da Artrite Encefalite Caprina.

### 5.2 Objetivos Específicos

- Pesquisar a presença do CAEV e possíveis sinais de degeneração provocados por este em espermatozóides, folículos ovarianos, oócitos e embriões oriundos de caprinos infectados;
- Pesquisar a susceptibilidade *in vitro* dos espermatozóides, folículos ovarianos e oócitos ao vírus da artrite encefalite caprina;
- Pesquisar a recuperação embrionária na produção *in vivo* de embriões em fêmeas caprinas naturalmente infectadas com CAEV;
- Testar e padronizar a técnica de *swim up* na espécie caprina para separação de espermatozóides dos demais tipos celulares presentes no sêmen.

## 6. CAPÍTULO 1

### **Possibilidades de Aplicação de Biotecnologias Reprodutivas em Animais de Produção Acometidos com Agentes Víricos**

Possibility of Application of Reproductive Biotechnologies in Animals of Production with  
infection with Viral Agents

Periódico: Revista Brasileira de Reprodução Animal (Publicado em janeiro de 2008)

**Possibilidades de aplicação de biotecnologias reprodutivas em animais de produção  
acometidos por agentes víricos**

*Possibility of application of reproductive biotechnologies in production animals infected with  
viral agents*

**Aracely Rafaelle Fernandes Ricarte<sup>1,3</sup>, Suzana Aparecida Costa de Araújo<sup>1</sup>, Tânia  
Valeska Medeiros Dantas<sup>1</sup>, Edmara Chaves Costa<sup>1</sup>, Jean Berg Alves da Silva<sup>2</sup>, Maria  
Fátima da Silva Teixeira<sup>1</sup>**

<sup>1</sup>Laboratório de Virologia, Faculdade de Veterinária, Universidade Estadual do Ceará,  
Fortaleza, CE, Brasil. Avenida Paranjana, nº1700, Campus do Itaperi, Fortaleza-CE, CEP:  
60.740-903

<sup>2</sup> Faculdade de Veterinária, Universidade Federal Rural do Semi-árido, Mossoró, RN, Brasil

<sup>3</sup>Correspondência: aracelyrfr@yahoo.com.br

**Resumo**

As biotécnicas reprodutivas são empregadas com o intuito de potencializar o aproveitamento do material genético dos animais com melhores desempenhos. No entanto, quando um reprodutor é acometido por algum agente vírico, é automaticamente descartado da reprodução, o que representa grande perda de material genético. É necessário, antes do uso de qualquer biotécnica, que seja confirmada a ausência de patógenos, utilizando-se algumas técnicas moleculares no auxílio do diagnóstico sanitário dos gametas, evitando, assim, a veiculação de patógenos por meio dessas técnicas. Objetivou-se neste trabalho fazer um levantamento bibliográfico e apontar perspectivas de utilização dos gametas de animais acometidos por agentes víricos, empregando diferentes biotecnologias reprodutivas.

**Palavras-chave:** biotecnologias, reprodução, agentes víricos.

**Abstract**

*Reproductive biotechnologies have been used with the intention of exploiting genetic material of more productive animals. However, when a viral agent infects a sire, the animal is automatically discarded from the process, which represents great loss of genetic material. It has been seen that these biotechnologies may be used, when gametes are proved to be free of*

*viral agents using molecular techniques to make the diagnose, preventing, by this way, propagation of infectious agents. The objective of this study was to do a bibliographic survey and to show how germplasm of animals infected by viral agents could not be discarded using different reproductive biotechnologies.*

**Keywords:** *biotechnologies, reproduction, viral agents.*

## **Introdução**

Ao longo de centenas de anos, o homem tem procurado potencializar o aproveitamento do material genético dos seus melhores animais domésticos, no intuito de obter descendentes com características semelhantes ou melhores do que as dos seus genitores (Hafez e Hafez, 2004). Dentre as biotecnologias utilizadas com maior frequência na produção animal, destacam-se a inseminação artificial, a transferência de embriões e a fecundação *in vitro*. Além dessas, existem técnicas que apresentam boas perspectivas para aplicação em larga escala no futuro, como a manipulação de oócitos inclusos em folículos ovarianos pré-antrais (MOIFOPA), a transgênese e a clonagem (Figueiredo et al., 2001).

Porém, para que o animal expresse melhor seu desempenho produtivo e reprodutivo, é necessário que ele tenha um bom manejo e que esteja livre de enfermidades, uma vez que o acometimento de um reprodutor por agentes infecciosos pode impedir sua utilização para fins reprodutivos, além de levá-lo à morte, acarretando sérios prejuízos econômicos e perda de material genético de qualidade (Andrioli et al., 2003). Com o objetivo de reduzir essas conseqüências, as biotecnologias reprodutivas vêm surgindo como uma alternativa para o resgate e a utilização do material genético desses animais.

Dentre as biotécnicas, a transferência de embriões vem sendo utilizada com segurança em animais acometidos por algumas enfermidades infecto-contagiosas. Após vários estudos, a Sociedade Internacional de Transferência de Embriões (IETS) sugeriu a utilização de algumas técnicas padronizadas na manipulação dos embriões, as quais poderiam reduzir o risco de transmissão de enfermidades, demonstrando ser esta técnica, na atualidade, a que apresenta um menor risco de transmissão de patógenos quando aplicada com material genético de animais enfermos (Guerin et al., 1997). Desse novo potencial biotecnológico, surge a necessidade de se realizarem pesquisas aprofundadas com as demais biotécnicas no intuito de se averiguar a possibilidade de utilização dessas técnicas com segurança nesses animais. Sendo assim, o objetivo do presente estudo foi fazer um levantamento bibliográfico sobre o risco de transmissão de patógenos pela reprodução e avaliar a possibilidade de multiplicação

de material genético dos animais de elevado valor zootécnico, acometidos por enfermidades infecto-contagiosas, utilizando diferentes biotecnologias reprodutivas.

### **Utilização de material genético de animais com infecções víricas em biotecnologias reprodutivas**

Os vírus são capazes de infectar, tanto o homem, como os animais. Para que consigam infectar um determinado tipo celular é necessário que a célula possua receptores para o mesmo, o que determina a patogenia do vírus (Kreutz, 2001).

Atualmente, com o advento da biologia molecular, tem se descoberto de uma forma mais precisa a patogenia de vários microrganismos. Alguns vírus que anteriormente imaginava-se infectar apenas um tipo celular têm demonstrado predileção também por células do trato reprodutivo. Devido ao tamanho dos vírus e à sua forma de infecção, esses são de difícil controle, diagnóstico e tratamento. Por esses aspectos, é que a principal forma de controle de várias enfermidades víricas é a separação e sacrifício dos animais acometidos nos rebanhos, o que pode levar a um atraso no melhoramento genético e graves perdas econômicas.

Neste sentido, a utilização de gametas de animais acometidos por agentes víricos nas diferentes biotecnologias reprodutivas, surge como uma alternativa para se evitar a perda de material genético de animais de alto valor zootécnico. Cada biotécnica tem seus entraves, mas vale ressaltar aqui algumas possibilidades para estar se aplicando as mesmas com segurança em animais enfermos.

#### **2.1.1. Inseminação Artificial (IA)**

A inseminação artificial consiste em, após a obtenção do sêmen, deposita-lo no trato genital da fêmea a ser inseminada (Silva, 1999). Esta técnica pode ser utilizada como um meio alternativo quando da impossibilidade de realização de monta natural, devido a problemas anatômicos e comportamentais, ou ainda, quando da utilização do sêmen congelado (Feldman & Nelson, 1996). Essa biotécnica apresenta ainda como vantagens a possibilidade de utilização por tempo indefinido e disseminação mais rápida do material genético de machos, bem como a redução de custos e de estresse com transporte de animais (Silva et al., 2001).

Levando-se em consideração que a transmissão de patógenos pelo sêmen é bastante relevante, uma vez que na IA várias fêmeas são inseminadas com um único ejaculado, principalmente quanto à possibilidade de introdução de novas cepas de microrganismos mais

virulentas em um rebanho inteiro (Andrioli et al., 2003). Desta forma a utilização de sêmen requer um cuidado redobrado, visto que, este pode ser contaminado de várias formas.

O sêmen pode ser infectado por microrganismos procedentes dos testículos, epidídimo, glândulas anexas, da uretra ou do prepúcio, ou os patógenos podem ganhar acesso ao sistema reprodutor, pelo sangue e líquidos tissulares extravasados para este sistema, nas bacteremias ou viremias, ou no caso de qualquer inflamação ou infecção nestes órgãos. Além disso, o sêmen pode contaminar-se no meio externo, por agentes presentes no ambiente, na pele do reprodutor, nos materiais utilizados (caso não sejam adequadamente esterilizados) na coleta e manipulação do sêmen, e no caso da congelação do mesmo em *pellets* pode ocorrer no nitrogênio líquido a partir de outras amostras de *pellets* contaminados (Hare, 1985; Thibier & Guérin, 2000).

Fatores como lesões, inflamações e infecções no órgão reprodutor podem desencadear maior fluxo de células sangüíneas para o sêmen, juntamente com os patógenos, assim como o estágio da doença, o estado imunológico ou nutricional e a associação com outras enfermidades (Concha-Bermejillo et al., 1996; Pinheiro, 2001).

Atualmente, o comércio de sêmen é mais procurado do que em relação ao de animais, em virtude do desenvolvimento das técnicas de criopreservação desses materiais associado a vantagens como praticidade, economia e aspectos sanitários do comércio de germoplasma. Porém, as pesquisas sobre o risco de disseminação de enfermidades via sêmen não foram totalmente elucidadas para as diferentes enfermidades, sendo essa uma necessidade atual, para um melhor controle no avanço das enfermidades víricas principalmente aquelas de caráter crônico, onde o aparecimento de sintomas é tardio (Andrioli et al., 2003).

Pelo fato de ter se observado que alguns vírus como os lentivírus de pequenos ruminantes (LVPR), apresentam-se no sêmen de forma intermitente, ou seja, apenas alguns ejaculados apresentam o patógeno (Concha-Bermejillo et al., 1996; Andrioli-Pinheiro, 2001), uma alternativa para se estar utilizando o material genético destes animais seria o de testar alíquotas de sêmen através de técnicas moleculares mais sensíveis como a PCR e utilizar apenas as amostras seminais negativas para o patógeno. Sendo esta conduta recomendada até mesmo para aqueles reprodutores tidos como saudáveis, uma vez que este pode estar com alguma virose de caráter crônico e ainda não ter soroconvertido e conseqüentemente demonstrado sinais clínicos (Andrioli et al., 2003).

### 2.1.2. Transferência de Embriões (TE)

A transferência de embriões é uma biotécnica que permite recolher embriões de uma fêmea doadora e transferi-los para fêmeas receptoras com a finalidade de completarem o período de gestação. Sua importância básica para a produção animal, consiste na possibilidade de uma fêmea produzir um número de descendentes muito superior ao que seria possível obter fisiologicamente durante sua vida reprodutiva. Para o melhoramento zootécnico, ela é um importante instrumento porque acelera e confere maior precisão no processo de seleção animal (Reichenbach et al., 2001).

Um pouco diferente do que ocorre com o sêmen, para que ocorra a transmissão de um patógeno através do embrião é necessário que ele esteja presente dentro do oócito, em associação ou mesmo aderido à zona pelúcida (ZP), ou que esteja presente nos fluidos no quais os embriões são recolhidos, manipulados, criopreservados ou transferidos (Singh, 1987; Wrathall, 1995).

Outro fator importante na transmissão de agentes pelo embrião, é a patogenia da doença, especialmente quanto à predileção do patógeno ao trato genital. Agentes carreados pelo sangue podem, também, ganhar acesso ao trato genital, aumentando o risco no caso de qualquer hemorragia uterina o que ocorre, inevitavelmente, durante a colheita de embriões. No caso de outros agentes de doenças que têm predileção por pele ou vísceras, a probabilidade de contaminação do embrião é remota, todavia, tais agentes, ocasionalmente, produzem infecções generalizadas, e mesmo as localizadas podem causar contaminação dos meios, das soluções e do equipamento (Andrioli et al., 2003).

A TE torna possível a obtenção de um grande número de crias em um curto intervalo de tempo e tem sido considerada a técnica mais segura para o trânsito internacional de material genético (Castro et al., 1992; Philpott, 1993). Isto se deve à utilização das normas sanitárias da Sociedade Internacional de Transferência de embriões (IETS) as quais têm o intuito de minimizar os riscos de transmissão de patógenos, dentre estas normas está a não utilização de embriões com zona pelúcida rompida, pois esta se caracteriza como uma barreira natural contra a entrada de patógenos no embrião, outra técnica adotada é a lavagem dos embriões, a qual visa retirar por lavagem qualquer patógeno que possa estar aderido à zona pelúcida, podendo se utilizar para isto meios de lavagem que contenham enzimas que facilitem essa remoção como a tripsina (Pinheiro, 2001).

Desta forma, a TE pode suprir a necessidade de rápida reposição dos animais puros infectados, com obtenção de crias sadias e manutenção da qualidade genética do plantel,

possibilitando a importação de material genético com segurança, mesmo se utilizando fêmeas contaminadas, obtendo resultados satisfatórios no âmbito econômico, sanitário, reprodutivo e do melhoramento genético (Andrioli et al., 2003).

### **2.1.3. Produção *in vitro* de embriões (PIV)**

Essa é uma biotécnica utilizada, alternativamente, para acelerar a produção de animais geneticamente superiores e impedir, pelo resgate *in vivo* de folículos e cultivo *in vitro*, o descarte precoce de fêmeas geneticamente privilegiadas portadoras de alterações adquiridas que impedem que a reprodução ocorra de forma natural ou até mesmo pela transferência de embriões. A PIV consiste nas etapas de colheita, maturação, fecundação de oócitos e cultivo de zigotos (Gonçalves et al., 2001).

Para esta biotecnologia, são levados em consideração os mesmos riscos de contaminação dos espermatozoides e embriões citados anteriormente. Valendo ressaltar que o espermatozoide pode na ocasião da fecundação carrear para dentro do oócito o patógeno consigo, o que irá comprometer todo o esforço para produzir embriões em larga escala.

Atualmente, no desenvolvimento das biotécnicas existe um controle bem maior de infecções bacterianas, tanto dos próprios gametas quanto dos meios e soluções utilizadas na manipulação dos mesmos, uma vez que diversos estudos foram realizados obtendo sucesso, testando se a utilização de antibióticos nos meios de coleta, maturação, fecundação e cultivo, o que levou os profissionais a utilizarem este recurso corriqueiramente para prevenir essas contaminações.

Pensando nisto, Givens et al. (2006), testaram a utilização de um composto antiviral o 2-(4-[2-imidazolil] fenil)-5-(4-metoxifenil) furano (DB606) contra o BVDV, na produção *in vitro* de embriões bovinos, onde observou-se que a utilização do antiviral não interferiu no sistema de cultivo dos embriões, tendo sido obtida boas taxas de prenhez, nascimento e viabilidade de neonatos.

Este experimento demonstra a possibilidade de utilização de agentes antivirais como medida preventiva contra contaminações por vírus em meios de maturação, fecundação e de cultivo de oócitos, espermatozoides e embriões manipulados *in vitro*. Semelhante ao que já ocorre com a utilização de antimicrobianos contra bactérias e fungos nas biotecnologias reprodutivas, os antivirais podem ser também utilizados preventivamente em todas as manipulações necessitando para isto a realização de pesquisas para elucidar a ação efetiva dos antivirais e avaliação dos efeitos citotóxicos dos mesmos para as células reprodutivas, o que

pode possibilitar também no futuro a utilização de material genético de animais com enfermidades infecciosas.

#### **2.1.4. Manipulação de oócitos inclusos em folículos ovarianos pré-antrais (MOIFOPA)**

A MOIFOPA é uma biotécnica que consiste no isolamento ou resgate de folículos pré-antrais (FOPAS) a partir de ovários, seguido das etapas de conservação e/ou cultivo folicular, visando o crescimento, maturação e fecundação *in vitro* dos oócitos previamente inclusos em FOPAS. As vantagens do emprego atual e futuro desta biotécnica vão desde o aumento da eficiência reprodutiva de animais de alto valor zootécnico, passando pela utilização de ovários de animais portadores de patologias graves de ovidutos e/ou útero, até a recuperação de rebanhos eliminados por problemas sanitários (Figueiredo et al., 2001).

Recentemente em cabras portadoras do vírus da artrite encefalite caprina, Silva (2006) observou pela técnica de PCR *nested* a presença deste vírus nos folículos pré-antrais das mesmas, porém, ainda não se sabe a localização exata deste vírus no folículo, se no oócito, ou nas células da granulosa, as quais já demonstraram ser permissivas a este vírus *in vitro* (Lamara et al., 2001).

Para se evitar a contaminação de folículos pré-antrais em cultivo, o ideal seria realizar um teste diagnóstico molecular a nível de ovário e ainda assim, mesmo com o resultado negativo para algum patógeno, seria mais seguro realizar o cultivo dos folículos isoladamente, para um único folículo contaminado não venha a comprometer os demais.

#### **2.1.5. Criopreservação**

Com intuito de formar bancos de germoplasma animal foi que a técnica de criopreservação de gametas foi desenvolvida. Esta tem sido protocolada e utilizada para a preservação de material genético como sêmen (Storey et al., 1998), embriões (Otoi et al., 1998) e oócitos oriundos de folículos antrais (Bosch et al., 2004; Mochida et al., 2003) e pré-antrais (Amorim et al., 2003; Rodrigues et al., 2004) de alguns animais domésticos.

O objetivo da preservação consiste em garantir que as células permaneçam com uma baixa taxa metabólica durante um determinado período de estocagem, do qual possam ser resgatadas a fim de continuar o seu desenvolvimento normal. Entretanto para que isso seja possível mesmo após longos períodos de preservação, alguns fatores essenciais para a sobrevivência das células devem ser levados em consideração, tais como: temperatura, tempo de preservação, tipo e concentração do crioprotetor dentre outros (Santos et al., 2004).

Já foi descrito a possibilidade de contaminação de amostras seminais criopreservadas em *pellets* através do nitrogênio líquido a partir de outras amostras de *pellets* contaminados inseridos no mesmo, o que também poderia acontecer com embriões ou oócitos (Hare, 1985; Thibier & Guérin, 2000). A conservação de material genético também pode ser feita através de fragmentos de ovário, sendo esta uma opção estratégica para conservar as funções gametogênicas e esteroidogênicas, porém estes fragmentos são utilizados posteriormente para transplante, seja para o mesmo animal ou não (Santos et al., 2004), podendo este fragmento conter patógenos que venham a contaminar outras amostras através do nitrogênio líquido e também as receptoras do fragmento transplantado.

Para que isto não venha a ocorrer, seria ideal que cada amostra antes de ser criopreservada fosse testada através de técnicas bastante sensíveis como a PCR, sendo as amostras positivas descartadas e somente as negativas preservadas para poder posteriormente serem utilizadas com segurança (Silva, 2006).

#### **2.1.6. Transgênese**

O objetivo da biotécnica de transgênese é produzir animais que possuam uma incorporação estável de fragmento de DNA exógeno em sua linhagem germinativa. Existindo na atualidade para isto várias formas de se obter um animal transgênico, podendo se utilizar para isto técnicas como a microinjeção de genes em pronúcleos de oócitos fecundados, transferência de DNA mediada por espermatozóides durante a fecundação *in vitro*, transferência nuclear com células somáticas, biobalística, dentre outras (Wheeler et al., 2001).

Talvez a transgênese seja a única biotecnologia da reprodução em que a presença de um vírus possa ser em alguns casos fundamental. Isto porque um dos métodos de transferência de genes é utilizando-se retrovírus.

Os retrovírus são vírus pertencentes a família Retroviridae, são RNA vírus os quais possuem a enzima transcriptase reversa, necessária para sua replicação, a qual consegue promover uma síntese de uma cópia de DNA de fita dupla a partir do seu RNA, por ação de outra enzima denominada integrase o DNA transcrito é integrado de forma estável ao genoma da célula hospedeira, comportando-se então como um gene celular residente, podendo permanecer desta forma por longos períodos ou prosseguir a sua replicação com posterior tradução de proteínas, montagem da partícula viral e saída desta da célula por brotamento (Peçanha et al., 2002).

Por esta capacidade de tradução e integração ao genoma celular é que os retrovírus são utilizados como um sistema natural de transferência para introduzir DNA em vários tipos de células de mamíferos. Tanto retrovírus naturais, quanto aqueles produzidos por engenharia genética, podem ser utilizados para infectar células de embriões mamíferos. A principal vantagem da transferência de genes, mediada por retrovírus é a facilidade técnica de expor vírus a embriões em vários estádios de desenvolvimento. No entanto, o tamanho da seqüência de DNA transferida é limitado e o gene inserido não é sempre expresso na segunda geração (Varmus, 1998).

O controle sanitário nesta biotecnologia é imprescindível, apesar de se utilizar agentes infecciosos, pois o risco de contaminação é descartado quando se utiliza retrovírus inespecíficos para a espécie utilizada, sendo o vírus inofensivo para os animais transgênicos.

Estudos realizados com o intuito de se averiguar a sanidade e possibilidade de utilização do material genético de animais acometidos de enfermidades víricas é importante, para se evitar perdas de material genético de alta qualidade, pois o descarte de um animal de elevado valor zootécnico, poderia acarretar um atraso para o melhoramento genético e perdas econômicas drásticas para um rebanho. Porém, deve se ter cuidados para que através das biotecnologias não se venha a veicular patógenos, para isto, a biologia molecular vem cada vez mais auxiliando no diagnóstico e controle de enfermidades víricas nos rebanhos.

## **7. CAPÍTULO 2**

### **Recuperação embrionária em fêmeas infectadas com o CAEV submetidas a protocolo de superovulação no semi-árido Cearense**

Embryonic recovery in females infected with CAEV submitted to the protocol of superovulation in the semi-árido Cearense

Periódico: Ciência Animal Brasileira (Submetido em setembro de 2008)

## **Recuperação embrionária em fêmeas infectadas com o CAEV submetidas a protocolo de superovulação no semi-árido Cearense**

**Aracely Rafaelle Fernandes Ricarte<sup>1</sup>, Alice Andrioli<sup>2</sup>, Diônes Oliveira Santos<sup>2</sup>, Ismênia França de Brito<sup>2</sup>, Fabiane Maria Lima Sousa<sup>2</sup>, Maria Fátima da Silva Teixeira<sup>1</sup>**

1. Laboratório de Virologia, Programa de Pós-graduação em Ciências Veterinárias, (PPGCV) Universidade Estadual do Ceará, (UECE), Av. Paranjana, 1700, Itapery, CEP 60740-000, Fortaleza, CE, e-mail: labovirfavetuece@yahoo.com.br;

2. EMBRAPA-CNPC, Sobral, CE, Brasil.

### **Resumo**

Um dos métodos de controle da artrite encefalite caprina (CAE) é a separação e sacrifício de animais soropositivos, levando assim a perdas de animais com alto valor genético. Neste contexto, o uso de biotécnicas reprodutivas surge como uma alternativa para o resgate e utilização do material genético desses animais. Por este motivo é que se faz necessário a realização de pesquisas para se avaliar os parâmetros reprodutivos de fêmeas caprinas acometidas com o CAEV. Sendo assim, o objetivo do presente trabalho foi o de avaliar a recuperação embrionária na produção *in vivo* de embriões de fêmeas caprinas naturalmente infectadas com o CAEV submetidas a um protocolo de superovulação, inseminação artificial e coleta de embriões. Para isto, submeteu-se 4 fêmeas soropositivas para o CAEV e 2 fêmeas negativas (grupo controle) a um protocolo de superovulação. Observou-se no grupo de fêmeas positivas para o CAEV um número maior de estruturas recuperadas (oócitos e embriões) do que no grupo controle, podendo se concluir que a infecção por este vírus não influencia na recuperação embrionária.

**Palavras-chave: CAEV, embriões, oócitos, cabras.**

### **Summary**

One method of prevention of caprine arthritis-encephalitis (CAE) is the separation and sacrifice of animals seropositive, thus leading to losses of animals with high genetic value. In this context, the use of reproductive technology emerges as an alternative to the purchase and use of the genetic material of animals. For this reason is that it is necessary to complete surveys to assess the reproductive parameters of goats involved with the CAEV. Therefore, the aim of this study was to assess the recovery in the production of embryos *in vivo* of goats naturally infected with the CAEV subject to a superovulation treatment. For this, referred to 4

goats seropositive for the CAEV and 2 goats negative (control group) receiving superovulation treatment, artificial insemination and embryo collection. It was observed in the group of goats positive for the CAEV a larger number of structures recovered (oocytes and embryos) than in the control group, which may be concluded that the infection by this virus does not affect the embryonic recovery.

**Key words: CAEV, embryos, oocytes, goats.**

## **Introdução**

Dentre os aspectos da reprodução da fêmea caprina, a puberdade, a estacionalidade sexual, bem como as características do ciclo estral são pontos importantes a serem considerados no entendimento do processo reprodutivo.

Um regulador fundamental da função reprodutiva da cabra é a disponibilidade de nutrientes e a sanidade do animal, pois uma severa desnutrição é capaz de cessar toda a atividade reprodutiva (Rondina, 1998) e o acometimento de reprodutores por alguma enfermidade pode colocar a perder toda a produtividade do animal. Dentre os agentes causadores de enfermidades nos caprinos temos o vírus da artrite encefalite caprina, um vírus do gênero *Lentivirus*, da família Retroviridae (Haase, 1986), subfamília Lentivirinae que pode provocar nos caprinos artrite crônica progressiva, mastite, pneumonia em animais adultos e leucoencefalomielite em animais jovens (Cork et al., 1974). Podendo levar a perdas econômicas por causar morte de animais jovens, diminuição da produção láctea e perda de peso dos adultos devido às dificuldades de locomoção. A CAE também acarreta perdas indiretas importantes, como a desvalorização dos rebanhos, a reposição precoce de animais, despesas com medidas de controle e barreiras comerciais para produtos (matrizes, reprodutores e sêmen) (Franke, 1998; Pinheiro et al., 2001).

Um dos métodos de controle da artrite encefalite caprina (CAE) é a separação e sacrifício de animais soropositivos (OIE, 1996), levando assim a perdas de animais com alto valor genético. Neste contexto, o uso de biotécnicas reprodutivas surge como uma alternativa para o resgate e utilização do material genético desses animais. Pensando nisto, foi que Ricarte (2005) avaliou a taxa de degeneração de folículos pré-antrais de cabras naturalmente infectadas com o CAEV, e observou um pequeno acréscimo desta taxa, mas não o suficiente para comprometer a atividade reprodutiva destes animais (Ricarte, 2005). Poucos trabalhos foram desenvolvidos com intuito de avaliar a taxa de recuperação de embriões e os sintomas de manifestação de estro em fêmeas caprinas positivas para o CAEV. Por este motivo é que se

faz necessário a realização de pesquisas para se avaliar os parâmetros reprodutivos de fêmeas caprinas acometidas com o CAEV.

Sendo assim, o objetivo do presente trabalho foi o de avaliar a recuperação embrionária e sinais de manifestação de estro, na produção *in vivo* de embriões de fêmeas caprinas naturalmente infectadas com o CAEV submetidas a um protocolo de superovulação.

## **Material e Métodos**

O experimento foi desenvolvido na EMBRAPA Caprinos (Sobral-CE) durante os meses de outubro e novembro de 2007, onde a precipitação pluviométrica anual foi de 821,6 mm, com uma temperatura média de 30°C, com 3°42' de latitude Sul, 40°21' de longitude Oeste e a uma altitude de 69 metros (IBGE, 2007).

Foram utilizadas seis fêmeas caprinas da raça anglo-nubiana com escore corporal médio igual a dois, sendo quatro positivas para o CAEV pelo teste de IDGA e duas negativas, estas últimas constituíram o grupo controle. Todas as fêmeas foram submetidas ao protocolo de superovulação e durante a execução do protocolo, foram realizadas inspeções das características físicas e comportamentais dos animais cinco dias por semana, iniciando a partir da colocação das esponjas intravaginais. Neste período foi analisada a vulva quanto ao aumento de volume e hiperemia, se havia a presença de muco e as suas características e quantidade. As fêmeas também foram observadas por um período diário de 1h onde observou-se se estas apresentavam inquietação, agitação de cauda, ou comportamento de montar ou deixar-se montar por outras fêmeas. Após a retirada das esponjas as frequências de observação dos animais foi a cada 8 horas com duração de 1 hora em presença de um rufião.

Os animais foram alimentados com feno de leucena, concentrado composto por farelo de milho, soja e sal mineral e recebiam água *ad libitum*.

Para o protocolo de superovulação as esponjas intravaginais impregnadas com Medroxiprogeterona foram inseridas no dia 0, no dia 9 foi feita uma aplicação única de PGF 2 $\alpha$  (Ciosin ®) e iniciou-se a aplicação de FSH (Foltropin®) por quatro dias consecutivos, sendo 2 aplicações diárias com intervalo de 12 horas. No dia 11 foram retiradas as esponjas, as fêmeas foram inseminadas três vezes com sêmen fresco e resfriado tendo um tempo médio de intervalo entre as inseminações de 6 horas; nos tempos de 72, 96 e 120 horas foi aplicado Banamine® (IM) e 84 horas após o início do estro foi aplicado LH (Lutalise®).

As coletas de embrião foram realizadas por laparotomia e lavagem dos cornos uterinos do 5° ao 6° dia após a última inseminação artificial, segundo metodologia descrita por Andrioli-Pinheiro (1993).

## **Resultados e Discussão**

Na observação dos aspectos físicos, observou-se a partir do 10° dia do protocolo, o aparecimento de hipertrofia vulvar, concomitantemente observou-se também o aparecimento de hiperemia da mesma, estes achados foram observados até 30 horas após a retirada das esponjas. Estas observações foram semelhantes às de Salles et al. (1998), que observaram em cabras da raça Saanen o aparecimento de hipertrofia e hiperemia vulvar, alguns dos principais sinais de estro, aos 35 horas após a retirada das esponjas.

Com relação à presença de muco vulvar, observou-se muco com aspecto cristalino em quantidade menor no início do estro. Às 24 horas após a retirada das esponjas, o muco observado adquiriu um aspecto cremoso e claro, no terço final do estro este demonstrou-se viscoso e esbranquiçado. Nunes et al. (1997), descrevem que as características do muco presente na vulva da fêmea caprina muda o seu aspecto ao longo do período estral, podendo variar de cristalino no início a viscoso no final do mesmo.

O comportamento das fêmeas também variaram com proximidade do estro e durante o mesmo. Os sinais comportamentais observados foram inquietação, balançar de cauda incessante, balidos freqüentes, buscar o macho, montar e deixar-se montar por outras fêmeas e pelo macho. Esses sinais não foram observados na ocasião da colocação das esponjas intravaginais, mas começaram a ser apresentados 24 horas após a retirada das mesmas, tendo durado um tempo de 30 horas. De acordo com Granados et al. (2006), fêmeas caprinas podem apresentar os sinais característicos de estro por um tempo aproximado de 30 horas, o comportamento pode ser reconhecido observando as fêmeas em grupo ou isoladas com a presença de outro macho, metodologia que foi empregada neste experimento.

Com relação às estruturas recuperadas com a lavagem uterina, nas fêmeas positivas observou-se uma média de embriões recuperados por fêmea menor do que de oócitos não fecundados. Estes valores foram diferentes dos encontrados por Andrioli et al. (2002) que foi de 11,7 (embriões/fêmea) e superiores aos encontrados nas fêmeas do grupo controle, como pode ser observado na Tabela 1.

Tabela 1 – Média de embriões e oócitos coletados por fêmea após terem sido submetidas ao protocolo de superovulação

Animais	Embriões/Fêmea	Oócitos/Fêmea
Fêmeas Positivas	1,75	6,75
Fêmeas Negativas	0,5	4,0
TOTAL	1,80	10,75

Esta discrepância entre os valores de estruturas recuperadas nos grupos das fêmeas positivas e negativas, pode ter se dado pelo fato das fêmeas do grupo negativo serem mais jovens do que as do grupo positivo. Segundo Baril et al. (1993), pode ocorrer uma importante variabilidade na resposta ovulatória em fêmeas jovens ou que nunca tenham recebido um tratamento hormonal.

Em ambos os grupos observou-se um número maior de oócitos recuperados, do que de embriões, diferente dos achados de Andrioli et al. (2002) que recuperaram cerca de 63,25% de embriões e 36,75% de oócitos não fecundados, porém os achados foram compatíveis com os de Freitas et al. (1999), que conseguiram recuperar em animais da raça Saanen 9 oócitos não fecundados e apenas 1 embrião, estando este em estágio de mórula. Este baixo número de embriões recuperados pode ter ocorrido pelo retardo do pico pré-ovulatório de LH, que segundo Freitas et al. (1997), é um achado comum nesta espécie e poderá tornar a fecundação de todos os oócitos presentes ineficientes. Não tendo sido o CAEV o fator envolvido para a recuperação de um baixo número de estruturas.

### Conclusões

Diante dos resultados obtidos pode-se concluir que a infecção pelo vírus da artrite encefalite caprina não influenciou na recuperação de embriões de fêmeas caprinas infectadas naturalmente com o CAEV, porém, são necessários trabalhos mais esclarecedores quanto à possibilidade de veiculação deste vírus pelos embriões.

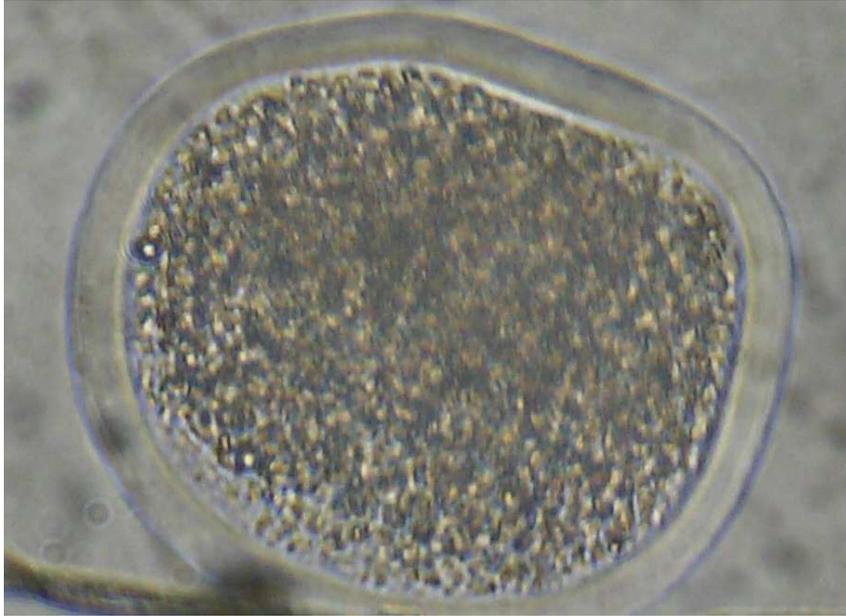


Figura 1 – Oócito não fecundado recuperado por lavagem do corno uterino de fêmea positiva para o CAEV.

### **Agradecimentos**

À EMBRAPA-CNPC, pelo apoio financeiro, técnico e científico para realização deste experimento. À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Ensino Superior (CAPES), pelo apoio financeiro, em forma de bolsa cedida à doutoranda Aracely R. F. Ricarte durante o experimento.

## 8. CAPÍTULO 3

### **Presence of CAEV in goat spermatozoa: molecular analysis and ultrastructural**

Presença do CAEV em espermatozóides caprinos: uma análise molecular e ultra-estrutural

Periódico: Pesquisa Veterinária Brasileira (Submetido em dezembro de 2008)

## Presence of CAEV in goat spermatozoa: molecular analysis and ultrastructural

Aracely Rafaelle F. Ricarte<sup>1</sup>, Alice Andrioli<sup>2</sup>, Raymundo R. Pinheiro<sup>2</sup>, Sônia N. Bão<sup>3</sup>, Juliana S. Silva<sup>3</sup>, Shélida V. Braz<sup>3</sup>, Ismênia F. Brito<sup>2</sup>, Kelma C. Souza<sup>2</sup>, Ronaldo P. Dias<sup>2</sup>, Tânia Valeska M. Dantas<sup>1</sup>, Suzana Aparecida C. Araújo<sup>1</sup>, Ney Rômulo O. Paula<sup>1</sup>, Jean Berg A. Silva<sup>4</sup>, Maria Fátima da S. Teixeira<sup>1\*</sup>

### ABSTRACT

Trying to find goat spermatozoa as the presence and susceptibility to the virus caprine arthritis encephalitis (CAEV), this study aimed to perform molecular analysis and ultrastructural of spermatozoa from goats experimentally infected animals and naturally and even in infected spermatozoa in vitro. For this, the experiment was divided into two phases, the first of them was investigated in the presence of CAEV spermatozoa from males naturally and experimentally infected, that were used for the polymerase chain reaction (PCR) and transmission electron microscopy. The second stage was tested the spermatozoa of goats susceptibility to the virus, and where it's technique to swim up and at the same infection in vitro in three different times (30, 60 and 120 minutes) and then were subjected to the test the PCR and transmission electron microscopy. Of the 45 samples tested just before a swim up gave positive PCR. In a sample derived from animals that had been experimentally infected, was viewed a viral particle of CAEV in the region of middle piece inside the vesicles. There was no presence of vesicles also in the portion of middle piece, but no viral particles within them in sample derived from naturally infected animal. According to the findings observed, it was concluded that spermatozoa goats can be infected by CAEV and thus may serve as carriers of this virus.

Index terms: Reproduction, CAEV, spermatozoa, biotechnology.

<sup>1</sup>Laboratório de Virologia, Faculdade de Veterinária, Universidade Estadual do Ceará, Fortaleza, CE, Brasil. Avenida Paranjana, nº1700, Campus do Itaperi, Fortaleza-CE, CEP: 60.740-903. Fone/Fax: (85) 3101-9849. \*Autor para correspondência: labovirfavetuece@yahoo.com.br

<sup>2</sup> Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (EMBRAPA) – Centro Nacional de Pesquisa em Caprinos (CNPC), Sobral, CE, Brasil.

<sup>3</sup> Laboratório de Microscopia Eletrônica, Universidade de Brasília, Brasília, DF, Brasil.

<sup>4</sup> Departamento de Ciências Animais, Universidade Federal Rural do Semi-árido, Mossoró, RN, Brasil.

## **RESUMO [Presença do CAEV em espermatozóides caprinos: uma análise molecular e ultra-estrutural]**

Tentando-se averiguar espermatozóides caprinos quanto a presença e susceptibilidade ao vírus da artrite encefalite caprina (CAEV), este trabalho teve como objetivo realizar análise molecular e ultra-estrutural de espermatozóides caprinos de animais infectados naturalmente e experimentalmente e ainda em espermatozóides infectados *in vitro*. Para isto, o experimento foi dividido em duas etapas, na primeira delas foi pesquisada a presença do CAEV em espermatozóides de machos naturalmente e experimentalmente infectados, para isto foram utilizadas a reação em cadeia da polimerase (PCR) e microscopia eletrônica de transmissão. Na segunda etapa foi testada a susceptibilidade de espermatozóides caprinos ao vírus, realizando-se para isto a técnica de *swim up* e posteriormente a infecção *in vitro* dos mesmos, em três tempos distintos (30, 60 e 120 minutos) em seguida foram submetidos ao teste de PCR e microscopia eletrônica de transmissão. Das 45 amostras testadas apenas uma antes do swim up deu positiva na PCR. Em amostra oriunda de animal que havia sido infectado experimentalmente, foi visualizada uma partícula viral do CAEV na região da peça intermediária no interior de vesículas. Foi observada a presença de vesículas também na porção da peça intermediária, porém, sem partícula viral no seu interior em amostra oriunda de animal infectado naturalmente. De acordo com os achados observados, pode-se concluir que espermatozóides caprinos podem ser infectados pelo CAEV e, portanto, podem servir como veiculadores deste vírus.

Termos de indexação: Reprodução, CAEV, espermatozóides, biotécnicas.

## **INTRODUCTION**

Among the causative agents of viral diseases in goats, the caprine arthritis encephalitis virus (CAEV) belonging to the *Lentivirus* genus, can cause chronic progressive arthritis, mastitis, pneumonia in adult animals and leucoencefalomyelitis in young animals (Cork et al. 1974). This can lead to economic losses by causing the death of young animals, decreased milk production and weight loss in adults because of difficulties in walking. The indirect losses include herd devaluation, early animal replacement, expenditure on control measures and trade barriers to products (matrices, breeding and semen) (Pinheiro et al. 2001).

One method of preventing caprine arthritis encephalitis (CAE) is the separation and sacrifice of seropositive animals (OIE 1996), thus leading to losses of animals with high genetic value. In this context, the use of reproductive biotechnology has emerged as an alternative for the rescue and use of the genetic material of these animals. Among the

promising techniques for this purpose, we can highlight artificial insemination and in vitro fertilization (IVF), but little is known of the risk of pathogen transmission by spermatozoa, which can be a source of disease entry, with serious repercussions in livestock production and marketing (Andrioli et al. 2003).

HIV, also of the Lentivirus genus, was first identified in spermatozoa and embryos (Baccetti et al. 1998). The presence of proviral DNA of CAEV has been detected in the semen (Andrioli et al. 1999, Travassos et al. 1999, Ali Al Ahmad et al. 2008a), but it is still do not known exactly which component in this semen may be present and whether the breeding material of these animals can be used safely in biotechnology for artificial insemination and in vitro fertilization.

Thus the objective of this study was to conduct molecular and ultrastructural sperm analysis in the presence of CAEV in animals naturally and experimentally infected and further in spermatozoa in vitro.

## **MATERIALS AND METHODS**

### **Experimental design**

The experiment was divided into two phases, the first of them the presence of CAEV spermatozoa was investigated from males naturally and experimentally infected, that were used for the polymerase chain reaction (PCR) and transmission electron microscopy.

The second stage tested the susceptibility of spermatozoa to goat CAEV, and where it's infection in vitro in three different times (30, 60 and 120 minutes) and to verify whether there was an infection the spermatozoa they were also subjected to PCR and transmission electron microscopy.

### **Semen samples**

We used spermatozoa from 12 male goats, four males naturally infected with CAEV, four experimentally infected and four tested negatively for immunity by agarose gel (AGID) and Polymerase chain reaction (PCR). Six samples were taken from each animal, the group of infected animals and a collection of animals in the negative group, the samples were divided into before and after the swim up. Semen was collected using the artificial vagina method, where a female in estrus was used to stimulate the male. Soon after collection, the tube containing the spermatozoa was closed to protect the ejaculate from dust, sunlight and agitation and taken to the laboratory where it was processed.

### **Technique for *Swim up***

This technique was used to separate the spermatozoa alive from the other semen components (Goncalves et al. 2001). For this, a small sample of semen (200 - 500 $\mu$ L) was placed on the bottom of a centrifuge tube and then on top of the semen, the culture medium Gamete  $\text{\textcircled{R}}$  (Vitrolife). These tubes were inclined to form an angle of 45 degrees from ambient to 5% CO<sub>2</sub> and temperature of 39°C. In a second step, the supernatant rich in spermatozoa was drawn, a small rate was observed under the microscope to make sure that there were only spermatozoa, that was later transferred to another tube to be centrifuged, then the supernatant was discarded and spermatozoa pellets were resuspended in PBS and stored in a freezer at -20°C for subsequent use in the polymerase chain reaction.

### **Polymerase Chain Reaction (PCR) - Nested**

Before the extraction of DNA from samples of semen and spermatozoa pure separated by swim up, they were filtered individually, in Sephacryl S-4003 column, according Santurde et al. (1996). For extraction of DNA samples were added to Chelex  $\text{\textcircled{R}}$  solution and incubated with Proteinase K. For the DNA amplification two pairs of primers were used derived from sequences of gag regions of the sample standard-CAEV Cork (Saltarelli et al., 1990), with primers 1 (5'CAAGCAGCAGGAGGGAGAAGCTG-3', nucleotides 953 TO 975 ) and 2 (5'TCCTACCCCCATAATTTGATCCAC-3 'nucleotide 1249 to 1226) described by Barlough et al., (1994) resulting in an amplification of a DNA fragment of 297 bp. The initiators 3 (5 'GTTCCAGCAACTGCAAACAGTAGCAATG-3' nucleotide 997-1024) and 4 (5'ACCTTTCTGCTTCTTCATTTAATTTCCC3'-nucleotide 1181 to 1154) were used in the second amplification, resulting in a final fragment of 185 bp (Rimstad et al., 1993). The amplification reactions were performed in a thermocycler, and consisted of an initial cycle to denature the DNA strands, at 94°C for 5 minutes, 35 cycles: 94°C - 1 minute, 56°C - 1 minute, 72°C - 45 seconds; final extension at 72°C for 7 minutes, 4°C to collect the sample. The samples and amplified positive and negative controls, consisting of monolayers of goat synovial membrane, inoculated with a reference sample of CAEV, along with molecular markers, were subjected to 1% agarose gel electrophoresis in TBE (Tris, borate and EDTA 0.1 X), stained with ethidium bromide added to the gel (0.5 g / ml). The DNA strands were visualized ultraviolet light translumination and photographed.

### ***In vitro* spermatozoa infection**

Only animals negative for the CAEV were used for *in vitro* spermatozoa infection, where after the swim up the spermatozoa rich supernatant was divided into three aliquots and then placed in contact with CAEV (Strain Cork– 105,3TCID<sub>50</sub>/mL culture medium – EMBRAPA CNPC).

They were placed in contact for 30 minutes, 60 minutes and 120 minutes; after each time, the rates were withdrawn, centrifuged and resuspended in PBS and later a rate was withdrawn (100 µL) and fixed for transmission electron microscopy and other rate was frozen at - 20°C for subsequent submission to the PCR test.

To prove the capability of the infecting virus strain, cells from synovial membrane goats in the same time of infection of spermatozoa (30, 60 and 120 min.), after infection the cells were maintained in culture until the onset of the cytopathic effect (ECP).

### **Transmission electron microscopy**

For the spermatozoa ultra-structural analysis a rate of 100µL of ejaculate was withdrawn, that was washed three times in PBS, then was placed in Karnowsky solution overnight (minimum of 12 hours), then 0.1 M cacodilate Sodium buffer solution. The suspension was then washed with 0.1 M cacodilate Sodium buffer solution and post-fixed in 1% osmium tetroxide and 0.8% potassium ferricyanide. Then the suspension was dehydrated with acetone and soaked in epoxy resin Sppur. Before the construction of ultra cuts, semi-thin sections (3µm) were prepared which were stained with toluidine blue. Subsequently, the cuts were made ultra (90nm), which were contrasted with uranyl acetate and lead citrate, which then could be examined in a transmission electron microscope. The samples were then analyzed, for CAEV presence and degenerative changes.

### **Statistical analysis**

To compare the results of the polymerase chain reaction among the group of naturally infected animals and animals experimentally infected with CAEV, we used the Mann-Whitney test at the level of five per cent of significance.

## **RESULTS AND DISCUSSION**

Regarding the findings in the technique of PCR, in samples from naturally infected animals was observed in one of the positive samples by PCR before the swim up, which was not observed in the same sample after it. In samples from artificially infected animals and

infected samples of sperm in vitro there was no positive sample by PCR before or after swim up (Table 1).

These results corroborate the findings of Andrioli et al., 1999; Travassos et al., 1999 and Ali Al Ahmad et al., 2008, however, in this work the frequency of appearance of positive samples was very low and was not detected positivity in any of the samples after the test swim up, this was the first time this technique was standardized for use in male goats in order to separate the sperm cells as macrophages or leukocytes that could be present later in the ejaculate, these cells which are known to target the infection of CAEV (Cork et al., 1974), and this technique proved quite efficient for this purpose.

According Iritani and Niwa (1977), the swim up is one of the most widely used techniques for separation of live sperm of other components of semen and cryoprotectants, as it allows a recovery of large quantity of sperm, sperm does not produce changes, remove other cell types and even microorganisms. For these reasons, is that the swim up can be used with an alternative to sperm from infected animals can be used with safety in biotechnology and artificial insemination and in vitro fertilization.

Samples infected in vitro, was observed in positive control, performed with the infection of MSC in the same time of infection of the samples of sperm, cytopathic effect at all times of infection (30', 60' and 120') to 7 days of cultivation (Fig. 1). With the appearance of cytopathic effect in different times of infection proved to virulence of the viral strain used, but failed to detect the presence of pro-viral DNA in sperm samples infected. What may have happened because the time of infection was not sufficient to cause infection of the same or because the infection is very recent and the virus is not yet at the stage of replication that includes the DNA of the cell leading to DNA pro-viral, object detection test for nested PCR (Al Ali Ahmad et al., 2008).

With respect to the samples for transmission electron microscopy, only in one of the samples come from animals that had been experimentally infected, there was a viral particle of CAEV in the midpiece region within vacuoles (Fig. 2). In another sample derived from naturally infected animal was also observed in the presence of vacuoles portion of midpiece, however, was not observed any viral particle in its interior (Fig. 3).

The visualization of a viral particle in the cytoplasm of a group of sperm artificially infected animals, suggests the possibility of the presence of a membrane receptor for sperm CAEV in goats, but with this work could not check whether replication of this virus is efficient in this cell type, as shown by Lamara et al. (2001, 2002) in the granulosa cells and in epithelial cells of oviduct respectively.

With the discovery of a particle of CAEV in a sperm, using the swim up to the possible separation of infected sperm cells would be irrelevant, since the sperm may be the vehicle of the CAEV, similar to what happens with HIV in of human sperm, as has been demonstrated by Bacceti et al. (1998), to demonstrate that through transmission electron microscopy and in situ hybridization of HIV particles in the region of the midpiece of sperm from men infected naturally. Samples of semen of experimentally infected animals was not observed in any sample positive PCR test, however, of the samples submitted for transmission electron microscopy was viewed with a viral particle morphological characteristics similar to CAEV as described by Almeida (2003) and Bacceti et al., (1998) for Maedi Visna virus (MVV) and human immunodeficiency (HIV), the virus which are of the same family of CAEV and have same morphological characteristics.

In an experiment conducted by Andrioli et al. (1999), it was found that the frequency of appearance of CAEV in semen is not constant and can be higher in pure semen ejaculated unwashed and from animals that have suffered some testicular trauma. But none of the authors found the pro-virus in samples composed only of sperm, but in this experiment in transmission electron microscopy, the viral particle was seen in the cytoplasm of the midpiece region and not in the nucleus, which may have occurred by fact that the sperm cell is a haploid and have half the number of chromosomes than the prevalence of CAEV cells are the cells of the monocytic-fagocitário (Narayan, 1990) in haploid cells the virus can not find a place for into the genetic material of cells.

Another important place on the location of viral particles in the sperm, which is the region of the midpiece of them is rich in mitochondria, according Scheffler (1999), these organelles have the mitochondrial DNA, therefore, can assume that the viewing virus in this region may have been given because of that show preference for this type of DNA, but could not prove it if it can be replicated efficiently with this type of genetic material.

## CONCLUSIONS

Based on the results we can conclude that goat spermatozoa can be infected by CAEV and thus may serve as carriers of this virus that may infect the embryo at the moment of fertilization.

### Acknowledgments

The authors thank Embrapa-CNPC for financial, technical and scientific for this experiment, the Coordenação Aperfeiçoamento de Pessoal de Ensino Superior (CAPES) for financial support during the experiment and the Laboratory of Electron Microscopy at the University of Brasilia for all technical support.

### - Figures

**Figure 1**

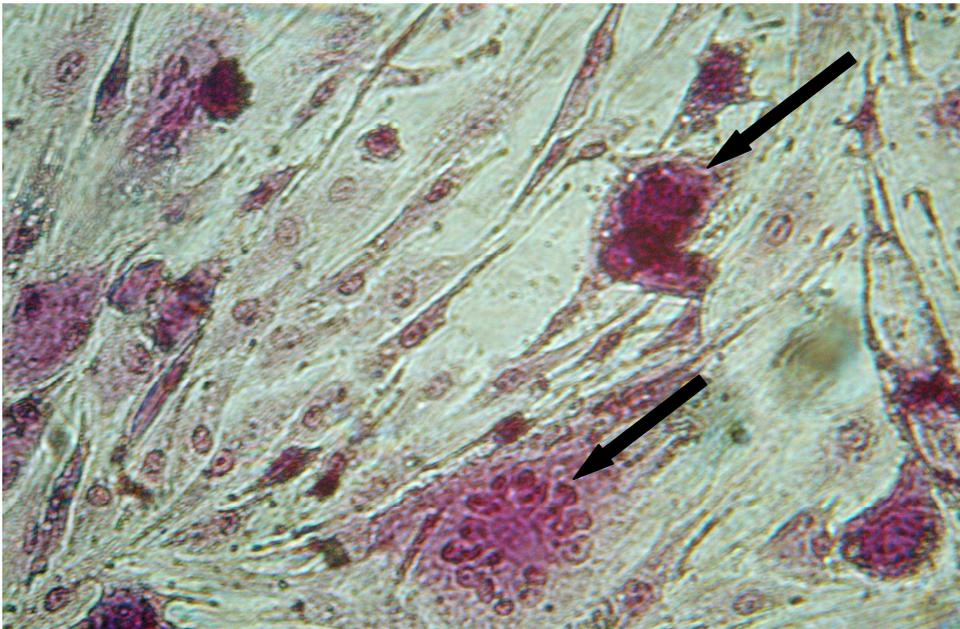


Figure 2

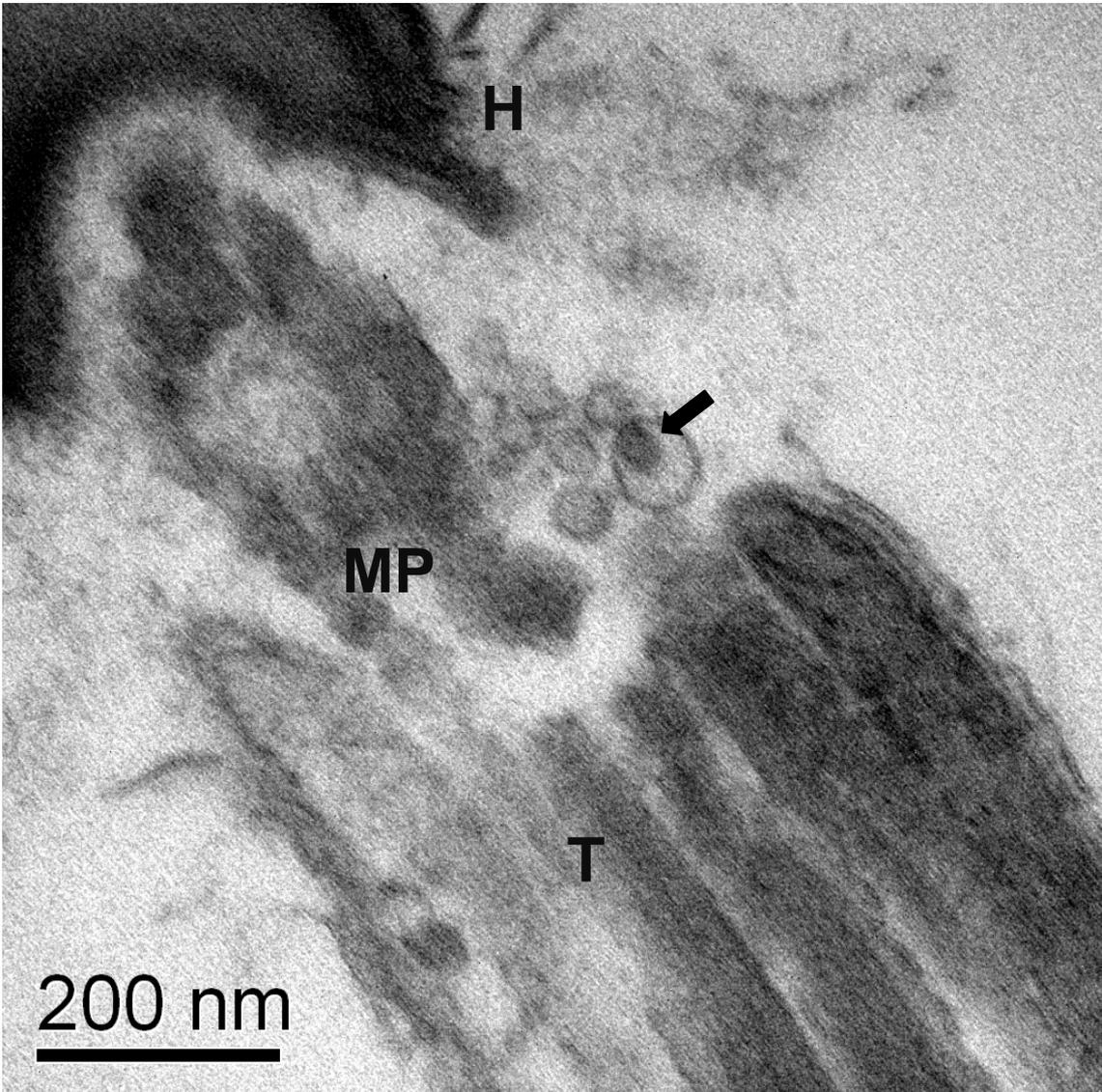
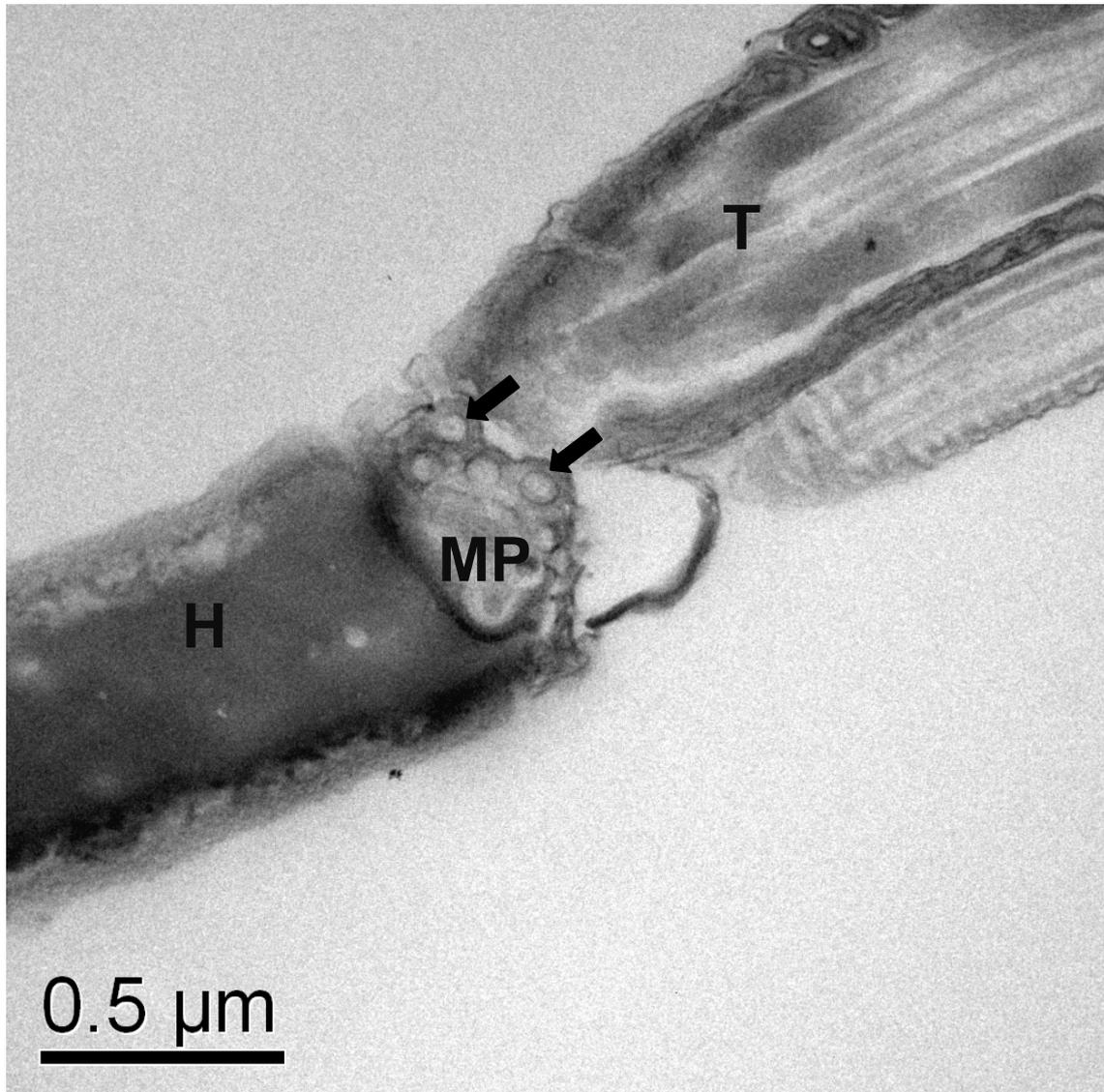


Figure 3



- Table

Group	N	BSU (+)	ASU (+)	BSU (-)	ASU (-)
Natural infection	23	1	0	22	23
Artificial infection	22	0	0	22	22
Total	45	1	0	44	45

**- Legends**

Fig. 1 - Cytopathic effect (multinucleated giant cells - arrows) in MSC used as positive control of virus-CAEV Cork (Magnificant 400x).

Fig. 2 - Electronic micrograph of spermatozoa come from animals artificially infected with the CAEV presenting at the middle piece vesicles and some of them in a viral particle within it (arrow). H (head), T (tail) and (MP) midpiece.

Fig. 3 - Electronic micrograph of spermatozoa come from animals naturally infected with the CAEV presenting at the middle piece several vesicles (arrows). H (head), T (tail) and (MP) midpiece.

Table 1 - Number of samples tested by the seminal test of polymerase chain reaction (PCR-nested) before the swim up (BSU) and after the swim up (ASU) in groups of animals infected with natural and artificial

## **9. CAPÍTULO 4**

### **Avaliação imunohistoquímica e ultra-estrutural de gametas e embriões caprinos infectados com o CAEV**

Evaluation immunohistochemistry and ultrastructural of gametes and embryos goats infected with CAEV

Periódico: Arquivos do Instituto Biológico (Submetido em dezembro de 2008)

## **Avaliação imunohistoquímica e ultra-estrutural de gametas e embriões caprinos infectados com o CAEV**

Aracely Rafaelle F. Ricarte<sup>1</sup>, Alice Andrioli<sup>2</sup>, Raymundo R. Pinheiro<sup>2</sup>, Sônia N. Bão<sup>3</sup>, Juliana S. Silva<sup>3</sup>, Shélida V. Braz<sup>3</sup>, Khesller Patricia O. Name<sup>3</sup>, Isabel B. Lima-Verde<sup>4</sup>, Ismênia F. Brito<sup>2</sup>, Ronaldo P. Dias<sup>2</sup>, Tereza Dávila Freitas Aguiar<sup>1</sup>, Tânia Valeska M. Dantas<sup>1</sup>, Suzana Aparecida C. Araújo<sup>1</sup>, Diogo Manuel L. P. Cavalcanti<sup>5</sup>, Ney Rômulo O. Paula<sup>1</sup>, Maria Fátima da S. Teixeira<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>Laboratório de Virologia, Faculdade de Veterinária, Universidade Estadual do Ceará, Fortaleza, CE, Brasil. Avenida Paranjana, nº1700, Campus do Itaperi, Fortaleza-CE, CEP: 60.740-903. Fone/Fax: (85) 3101-9849.

\*Autor para correspondência: labovirfavetuece@yahoo.com.br

### **RESUMO**

O objetivo do presente estudo foi caracterizar a ocorrência de degeneração, e ainda a presença do vírus da artrite encefalite caprina e susceptibilidade dos folículos ovarianos, espermatozóides e embriões caprinos ao mesmo. Para isto, foram analisados espermatozóides e folículos ovarianos através das técnicas de imunohistoquímica e microscopia eletrônica de transmissão, antes e após infecção *in vitro* com o CAEV e ainda embriões caprinos produzidos *in vivo* oriundos de cabras negativas e positivas para o CAEV, os quais foram submetidos à análise ultra-estrutural. Na imunohistoquímica das amostras seminais, observou-se imunomarcagem positiva em amostras de animais infectados naturalmente, artificialmente e em amostras infectadas *in vitro*. Nas amostras de tecido ovariano observou-se a imunomarcagem na região do estroma. Na análise ultra-estrutural, observou-se espermatozóide com alterações degenerativas e folículos e embriões íntegros. Com estes resultados pode-se concluir que folículos ovarianos não são susceptíveis ao CAEV, porém espermatozóides caprinos podem ser infectados, contudo, não foi possível comprovar se estes são realmente capazes de carrear este vírus para o interior do oócito, dando origem a embriões infectados com o CAEV.

**Palavras-Chave:** Espermatozóides, embriões, folículos e CAEV.

<sup>2</sup> Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (EMBRAPA) – Centro Nacional de Pesquisa em Caprinos (CNPIC), Sobral, CE, Brasil.

<sup>3</sup> Laboratório de Microscopia Eletrônica, Universidade de Brasília, Brasília, DF, Brasil.

<sup>4</sup> Laboratório de Manipulação de Folículos Pré-Antrais, Universidade Estadual do Ceará, Fortaleza, CE, Brasil.

<sup>5</sup> Laboratório de Histologia e Embriologia, Universidade Federal Rural do Semi-Árido, Mossoró, RN, Brasil.

## **Evaluation immunohistochemistry and ultrastructural of gametes and embryos goats infected with CAEV**

### **ABSTRACT**

The aim of this study was to characterize the occurrence of degeneration, and even the presence of the virus and caprine arthritis encephalitis susceptibility of ovarian follicles, spermatozoa and embryos at the same goats. For this, we analyzed spermatozoa and ovarian follicles before and after infection *in vitro* with CAEV through the techniques of immunohistochemistry and transmission electron microscopy and goat embryos produced *in vivo* from goats negative and positive for CAEV, which were submitted to ultrastructural analysis. In seminal Immunohistochemistry of the samples, we observed marking positive in samples from naturally infected animals, and in artificially infected samples *in vitro*. Samples of ovarian tissue was observed at marking in the stroma. In ultra-structural analysis, it was observed with degenerative changes spermatozoa and embryos and follicles intact. With these results we can conclude that ovarian follicles are susceptible to CAEV, but spermatozoa goats can be infected with CAEV, however, it was not possible to verify if they are really able to carry this virus into the oocyte resulting in embryos infected with CAEV.

Key words: spermatozoa, embryos, follicles and CAEV.

### **INTRODUÇÃO**

O vírus da artrite encefalite caprina (CAEV), provoca uma importante enfermidade infecciosa em caprinos. Este pertence ao gênero *Lentivirus* (CORK et al., 1974), e tem como característica preponderante causar uma enfermidade crônica, com um longo período de incubação e de difícil controle (NARAYAN, 1990), sendo as células do sistema monocítico-fagocitário o principal alvo da infecção *in vivo* (ZINK et al., 1990).

O DNA proviral do CAEV já foi detectado em tecidos do trato reprodutivo como útero, oviduto, ovário, glândula mamária (FIENI et al., 2003), em células do cumulus oophorus (ALI AL AHMAD et al., 2005) e em sêmen de machos infectados (ANDRIOLI et al., 1999; TRAVASSOS et al., 1999; ALI AL AHMAD 2008a). Em estudos *in vitro*, este vírus demonstrou ser capaz de se replicar com eficiência em células epiteliais do oviduto (LAMARA et al., 2002) e em células da granulosa (LAMARA et al., 2001). Não tendo sido

detectada ainda a presença, ou possíveis alterações provocadas por este vírus no oócito, embriões ou no interior de espermatozóides caprinos.

A principal medida de controle desta enfermidade é o sacrifício dos animais soropositivos (OIE, 1996), podendo levar assim, a perdas de animais com alto valor genético. Na tentativa de evitar estas perdas, a biotécnica de transferência de embriões (FREITAS et al., 1999) já foi utilizada com sucesso. Neste contexto, o resgate e a utilização de material genético de animais portadores desta enfermidade, desponta como uma alternativa promissora para o aproveitamento dos gametas de fêmeas e machos portadores do CAEV.

O sucesso para o aproveitamento desses gametas depende da qualidade e sanidade dos mesmos. Sendo assim, para utilização do material genético de animais soropositivos para o vírus da CAE, faz-se necessário uma avaliação da presença e dos efeitos deste sobre a integridade dos oócitos, espermatozóides e embriões a fim de se verificar a viabilidade na utilização deste material em biotécnicas reprodutivas. Desta forma, o objetivo do presente estudo foi caracterizar a ocorrência de degeneração, e ainda a presença do vírus da artrite encefalite caprina, bem como, a susceptibilidade nos folículos ovarianos, espermatozóides e embriões caprinos ao mesmo.

## **MATERIAL E MÉTODOS**

### **- Delineamento Experimental**

Foram analisados espermatozóides e folículos ovarianos antes e após infecção *in vitro* com o CAEV através das técnicas de imunohistoquímica e microscopia eletrônica de transmissão e ainda embriões caprinos produzidos *in vivo* oriundos de cabras negativas e positivas para o CAEV, os quais foram submetidos à análise ultra-estrutural.

### **- Amostras de sêmen**

Foram utilizados sêmen de 10 machos caprinos, sendo 4 machos infectados naturalmente com o CAEV, 4 infectados experimentalmente e 2 negativos, atestados pelos testes de Imunodifusão em gel de agarose (IDGA) e Reação em cadeia da polimerase (PCR). Após a coleta, cada ejaculado foi separado em grupos antes e após o *swim up*.

A coleta de sêmen foi realizada através do método da vagina artificial, onde foi utilizada uma fêmea em estro para estimular o macho, e quando este efetuou o salto, o

prepúcio foi desviado com a mão para o interior da vagina artificial. Em seguida, o tubo contendo o sêmen foi tampado para proteger o ejaculado da poeira, luz solar e agitação e levado para o laboratório onde foi processado. Logo após a coleta, uma alíquota (200 µL) antes do *swim up* foi retirada e teve uma parte fixada em formol tamponado a 10% para realização da imunohistoquímica e outra parte fixada em fixador Karnovsky para realização da microscopia eletrônica de transmissão.

#### **- Técnica de *Swim up***

As alíquotas de cada ejaculado que foram submetidas ao *swim up*, seguiram a metodologia descrita por GONÇALVES et al. (2001), onde cerca de 200µL de cada amostra foi colocada no fundo de um tubo de centrifuga e em seguida em cima do sêmen, o meio Gamete® (Vitrolife). Esses tubos foram colocados com inclinação para formar um ângulo de 45° em estufa a 5% de CO<sub>2</sub> e temperatura de 39°C por 45 min. Em seguida, o sobrenadante rico em espermatozóides foi aspirado e transferido para outro tubo para ser centrifugado com rotação de 900g por 10 min. Após a centrifugação, o sobrenadante foi desprezado e o pellet de espermatozóides teve uma parte destinada a imunohistoquímica e outra parte à microscopia eletrônica de transmissão.

#### **- Infecção *in vitro* do sêmen**

Foram utilizadas para infecção *in vitro* apenas espermatozóides de animais negativos para o CAEV. Após a coleta seminal foram retiradas três alíquotas de 200 µL de sêmen puro, as quais foram colocadas em contato com CAEV (Cepa Cork – 105,3TCID<sub>50</sub>/mL de meio de cultura – EMBRAPA CNPC) (ANDRIOLI-PINHEIRO, 2001). Das três alíquotas, uma ficou em contato com o CAEV por 30, outra por 60 e a última por 120 minutos. Após cada período de contato, as alíquotas foram retiradas, centrifugadas (900g por 10 min.), ressuspensas em PBS e posteriormente foi retirada uma alíquota de 100 µL, a qual foi fixada para microscopia eletrônica de transmissão e outra alíquota de mesmo volume foi fixada em formol tamponado a 10% e destinada a imunohistoquímica.

Para comprovar a capacidade infectante da cepa viral, foi realizada a infecção de células de membrana sinovial caprina nos mesmos tempos de infecção dos espermatozóides (30, 60 e 120 min.). Após a infecção, as células foram mantidas em cultivo até o aparecimento de efeito citopático (ECP).

### **- Obtenção dos folículos ovarianos**

Os folículos ovarianos foram obtidos a partir de ovários provenientes de animais de abatedouro local, sendo utilizados somente os animais que estavam comprovadamente negativos para CAEV através do teste de IDGA. A região cortical destes ovários foi então fragmentada em três partes e os fragmentos obtidos foram acondicionados em placas de 20 poços contendo Meio Essencial Mínimo (MEM – Gibco®) até o momento da infecção *in vitro*.

### **- Infecção *in vitro* dos folículos ovarianos *in situ***

Cada poço foi inoculado com a amostra padrão CAEV (Cepa Cork – 105,3TCID<sub>50</sub>/mL de meio de cultura – EMBRAPA CNPC) e ficaram em contato por 30, 60 e 120 minutos, em estufa a 5% de CO<sub>2</sub> em temperatura de 37°C (CRAWFORD; ADAMS, 1981). Após este tempo, as amostras foram fixadas em formol tamponado a 10% e fixador Karowisky e destinadas a imunohistoquímica e microscopia eletrônica de transmissão respectivamente.

### **- Imunohistoquímica**

Para a análise imunohistoquímica, onde se tentou localizar topograficamente a proteína p28 do CAEV em sêmen e ovários de caprinos, utilizou-se metodologia descrita por ARAÚJO et al. (2004). Foi feita a elaboração dos esfregaços das amostras seminais em lâminas histológicas além de cortes histológicos dos ovários, com espessura de 5µm cada, sendo posteriormente realizada a recuperação de antígenos. Para isto, as lâminas foram incubadas em tampão citrato 10mM (pH 6,0) com o auxílio de um forno microondas em potência máxima (700 watts), onde as amostras foram colocadas por três vezes com três minutos de duração cada. A atividade da peroxidase endógena foi bloqueada utilizando-se 3% de peróxido de hidrogênio (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) em metanol, com duas trocas de cinco minutos cada. Para bloquear as ligações inespecíficas, as amostras foram incubadas em soro canino por 20 minutos. As secções foram então tratadas com soro contendo anticorpos específicos contra o CAEV (IgG1 anti-p28) por um período de 18 horas a uma temperatura de 4°C. Em seguida foram lavadas em PBS e incubadas com IgG anti-caprino conjugada a peroxidase por 30 minutos a 37°C a uma diluição de 1:500. A reação foi revelada pela adição do

diaminobenzidina tetrahydroclorídeo por 7 minutos. As lâminas foram contracoradas com hematoxilina de Mayer por 1 minuto, montadas e analisadas em um microscópio óptico.

#### **- Obtenção dos embriões**

Foram utilizadas seis fêmeas caprinas da raça anglo-nubiana com escore corporal médio igual a dois. Destas, quatro eram positivas para o CAEV pelo teste de IDGA e duas negativas, constituindo o grupo controle. Foi utilizado sêmen de machos negativos para inseminar as fêmeas positivas e sêmen de machos positivos para inseminar fêmeas negativas para o CAEV.

Todas as fêmeas foram submetidas ao protocolo de superovulação, onde esponjas impregnadas com medroxiprogesterona foram inseridas na vagina, sendo este o dia 0, do tratamento de superovulação. No dia nove foi feita uma aplicação única de PGF 2 $\alpha$  (Ciosin®) e iniciou-se a aplicação de FSH (Foltropin®) por quatro dias consecutivos, sendo duas aplicações diárias com intervalo de 12 horas. No dia 11 foram retiradas as esponjas, as fêmeas foram inseminadas três vezes, tendo sido realizada a primeira inseminação 24h após a retirada das esponjas, quando as fêmeas apresentaram sinal de estro. Foi utilizado sêmen fresco e resfriado tendo um tempo médio de intervalo entre as inseminações de seis horas. Nos tempos de 72, 96 e 120 horas após as inseminações foi aplicado por via intra-muscular Flunixin Meglumine (Banamine®) e 84 horas após o início do estro foi aplicado LH (Lutalise®).

As coletas de embrião foram realizadas por laparotomia e lavagem dos cornos uterinos no 5° e 6° dia após a última inseminação artificial, segundo metodologia descrita por ANDRIOLI-PINHEIRO (2001).

Após as coletas, as estruturas recuperadas (oócitos e embriões) foram fixadas e destinadas à análise ultra-estrutural.

#### **- Microscopia Eletrônica de Transmissão**

Para análise ultra-estrutural dos espermatozoides, foi retirada uma alíquota de 100 $\mu$ L do ejaculado, a qual foi lavada três vezes em PBS. As amostras de tecido ovariano com tamanho de 1mm<sup>3</sup>, os embriões e oócitos recuperados foram acondicionadas separadamente em tubos eppendorf. Posteriormente todas as amostras foram fixadas por 12 horas a 4°C em fixador Karnovsky (2% de paraformaldeído e 2,5% de glutaraldeído em tampão cacodilato de sódio 0,1M com pH 7,2) . Após esta fixação, as amostras foram lavadas com solução tampão

0,1M de Cacodilato de Sódio e pós-fixadas em tetróxido de ósmio 1% e 0,8% de ferricianeto de potássio. Em seguida, foram desidratadas com acetona e impregnadas em resina epóxi Sppur. Antes da confecção dos cortes ultrafinos, foram preparadas secções semi-finas (3µm) as quais foram coradas com azul de toluidina. Posteriormente, foram confeccionados os cortes ultrafinos (90nm), os quais foram contrastados com acetato de uranila e citrato de chumbo, para que então pudessem ser examinados no microscópio eletrônico de transmissão (Jeol, Tokyo, Japão). As amostras foram então analisadas, quanto a presença do CAEV, bem como a presença de alterações degenerativas.

## **RESULTADOS**

### **- Imunohistoquímica**

Na imunohistoquímica, as amostras seminais oriundas de animais infectados naturalmente apresentaram imunomarcção positiva em 2 amostras antes do swim up. Nas amostras pertencentes a animais infectados experimentalmente, observou-se imunomarcção em 1 amostra antes e em 1 depois do swim up (Fig. 1). Nas duas amostras infectadas *in vitro* também foi observada imunomarcção positiva (Tabela 1), indicando a presença da proteína p28 do CAEV. Vale ressaltar que este achado ainda não havia sido descrito na literatura para este tipo celular.

Nas amostras ovarianas, observou-se marcação positiva em apenas uma amostra na região do estroma (Fig. 2), não tendo sido apresentada nenhuma marcação nas células da granulosa ou no oócito.

### **- Microscopia Eletrônica de Transmissão**

Na avaliação ultra-estrutural foram observados espermatozóides normais e íntegros, tendo sido verificado no grupo dos animais infectados naturalmente apenas sinais de degeneração tais como a presença de vesículas na região da peça intermediária.

Os folículos de cabras infectadas encontrados na microscopia eletrônica de transmissão estavam normais, sem sinais de alteração, com um núcleo oocitário íntegro, localizado no centro do oócito e organelas distribuídas uniformemente no citoplasma. As mitocôndrias apresentaram membrana mitocondrial contínua e crista periférica. Também foi observada a presença de retículo endoplasmático liso e as células da granulosa apresentavam-se normais, como pode se observar na figura 3.

Na análise ultra-estrutural dos embriões foi observada zona pelúcida intacta, espaço perivitelínico e massa celular interna constituída por células de aspecto irregular, com núcleo oval localizado centralmente (Fig. 4). No citoplasma foi observada a presença de retículo endoplasmático rugoso, polirribossomos e mitocôndrias. Observou-se também oócitos não fertilizados, que apresentaram zona pelúcida íntegra e células internas degeneradas, porém em ambas as estruturas recuperadas (embriões e oócitos) não foi verificada a presença de qualquer partícula viral no seu interior ou aderido à porção externa da zona pelúcida.

## DISCUSSÃO

Como foi demonstrado neste trabalho, na imunohistoquímica observou-se a presença da proteína p28 do CAEV nos espermatozóides. Os achados anteriores baseavam-se na detecção do CAEV em pulmão de caprinos (SERAKIDES et al., 1996; STORSET et al. 1997, GUEDES et al., 2001) e de outro *Lentivirus*, o Maedi visna vírus (MVV), o qual já foi detectado por imunomarcção em pulmão (ARAÚJO et al., 2004), em hepatócitos e em células cardíacas (BRELLOU et al., 2007).

Com esta demonstração da susceptibilidade de espermatozóides ao CAEV, presume-se que estes possam ser veiculadores do CAEV para o embrião, apesar de se ter a comprovação de que a zona pelúcida funciona como uma barreira efetiva contra a entrada de patógenos (ALI AL AHMAD et al., 2005), desde que estes não sejam carregados pelo espermatozóide no momento da fecundação, fenômeno esse que já foi comprovado em embriões humanos fertilizados com espermatozóides de homens infectados com o Vírus da Imunodeficiência Humana (HIV), um *Lentivirus* com características semelhantes ao CAEV (BACCETI et al., 1998; CORK et al., 1974).

Com relação a ausência de marcação positiva nos folículos na imunohistoquímica dos ovários, os achados contradizem as colocações de LAMARA et al. (2001) e ALI AL AHMAD et al. (2005) os quais observaram que as células da granulosa e do *cumulus* são susceptíveis ao CAEV. Porém corroboram as afirmações de ZINK et al. (1990) que confirma ser as células de predileção da infecção do CAEV as células do sistema monocítico-fagocitário e fibroblastos, principais componentes da membrana sinovial caprina e córtex ovariano.

Na análise ultra-estrutural dos folículos ovarianos das cabras infectadas foram observados folículos normais com as mesmas características de folículos de cabras sadias como observados por LUCCI et al. (2001), SILVA et al. (2002) e RICARTE (2005).

A avaliação ultra-estrutural dos embriões caprinos oriundos de fêmeas infectadas com o CAEV foi realizada pela primeira vez nesta espécie. Os achados não revelaram a presença de partícula viral no interior dos mesmos, bem como demonstraram características ultra-estruturais semelhantes às de embriões eqüinos, conforme descrito por PERES et al., (2007).

Apesar de ter verificado que os espermatozoides caprinos são susceptíveis ao CAEV, não se observou a presença de partículas virais no interior de embriões. Isto pode ser explicado pelo fato da presença do CAEV no sêmen ser intermitente (ANDRIOLI et al. 2003), ou seja, pode estar associado à possibilidade de nem todos os espermatozoides apresentarem receptores para este vírus. Sendo assim, pode ter ocorrido que os espermatozoides utilizados na inseminação dos animais poderiam não estar infectados, ou simplesmente porque o vírus apresentava-se no estágio de DNA pró-viral, impossibilitando a visualização da partícula viral pela microscopia eletrônica de transmissão.

## **CONCLUSÃO**

Com estes resultados pode-se concluir que folículos ovarianos não são susceptíveis ao CAEV, porém espermatozoides caprinos podem ser infectados com o CAEV. Contudo, não foi possível comprovar se estes são realmente capazes de carrear este vírus para o interior do oócito, dando origem a embriões infectados com este vírus.

## **AGRADECIMENTOS**

Os autores agradecem à EMBRAPA-CNPQ, pelo apoio financeiro, técnico e científico para realização deste experimento. À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Ensino Superior (CAPES), pelo apoio financeiro, em forma de bolsa cedida à doutoranda Aracely R. F. Ricarte durante o experimento. Ao Laboratório de Microscopia Eletrônica da Universidade de Brasília, ao Laboratório de Virologia da Universidade Estadual do Ceará e ao Laboratório de Histologia e Embriologia da Universidade Federal Rural do semi-árido, pelo apoio técnico-científico.

**- Tabela**

**Tabela 1- Amostras seminais testadas pela imunohistoquímica antes do *swim up* (ASU) e depois (DSU) nos diferentes grupos**

Grupo	N	ASU (+)	DSU (-)
Infecção Natural	4	2	-
Infecção Artificial	4	1	1
Infecção <i>in vitro</i>	2	2	-
TOTAL	10	5	1

- Figuras

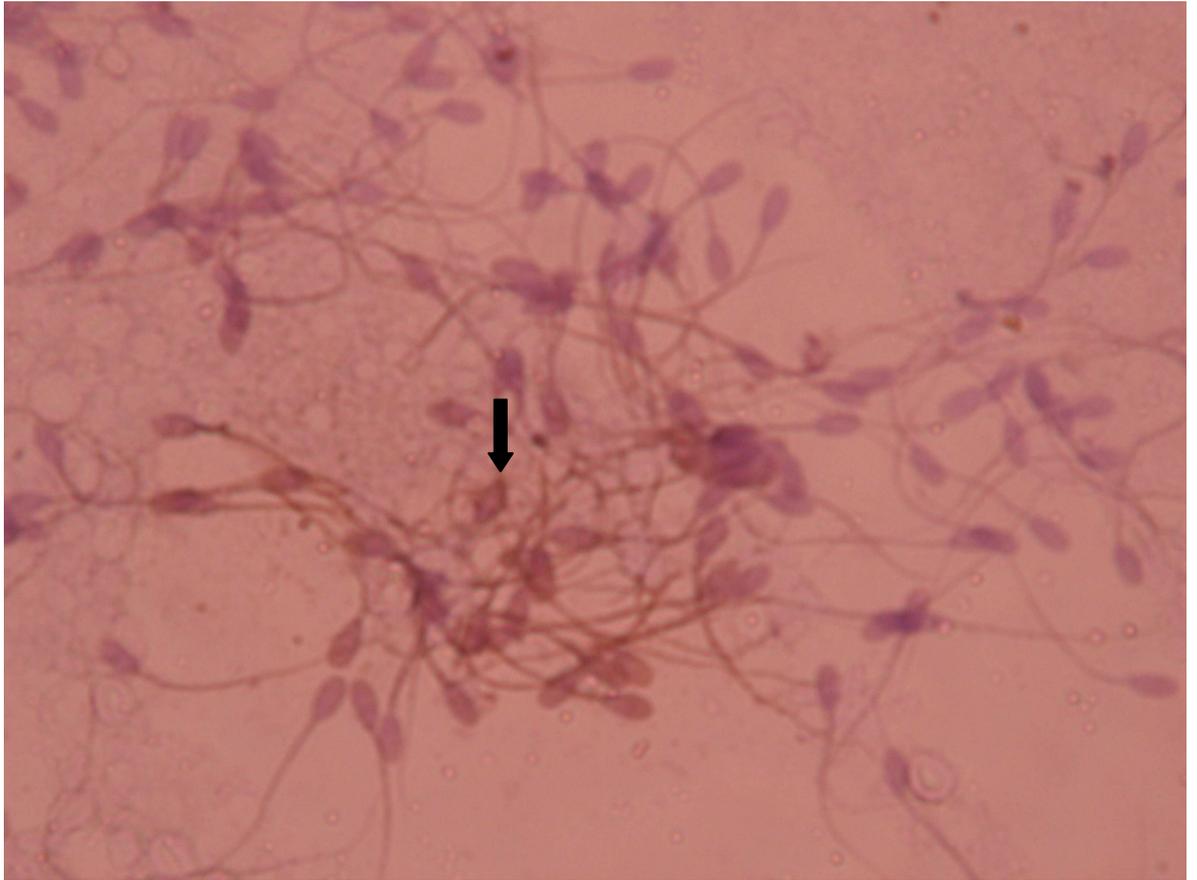


Fig. 1 – Espermatozoides caprinos submetidos à imunohistoquímica demonstrando marcação positiva (seta). (Aumento 400X).

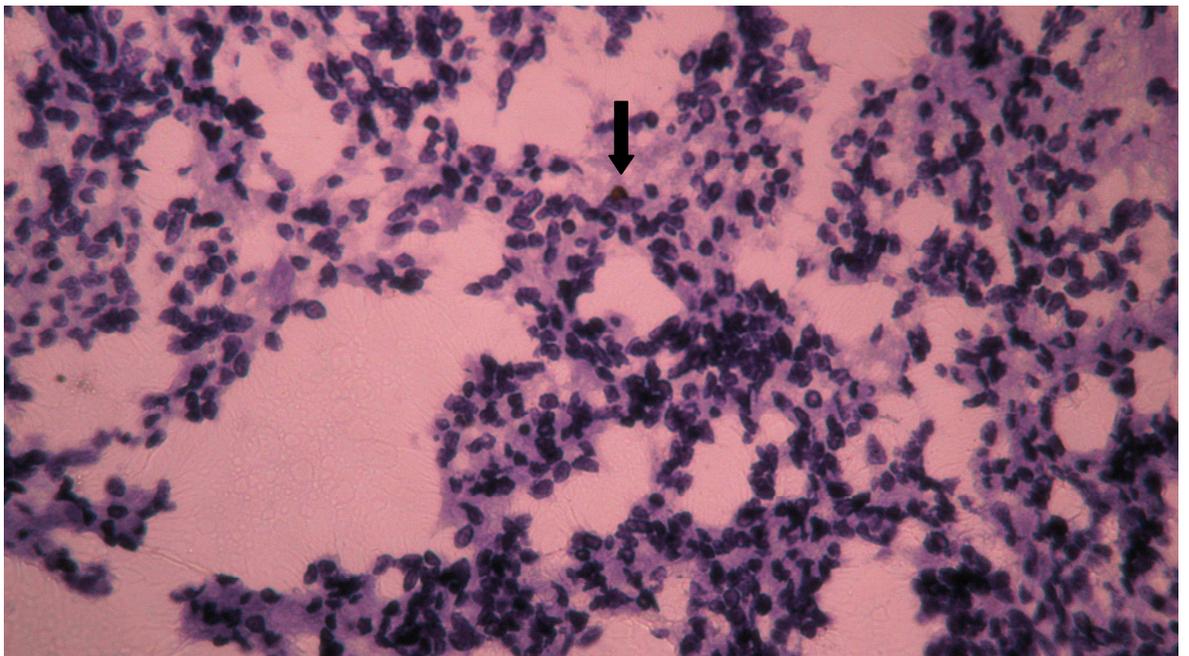


Fig. 2 - Tecido ovariano submetido à imunohistoquímica demonstrando marcação positiva em fibroblasto do estroma (seta). (Aumento 100X).

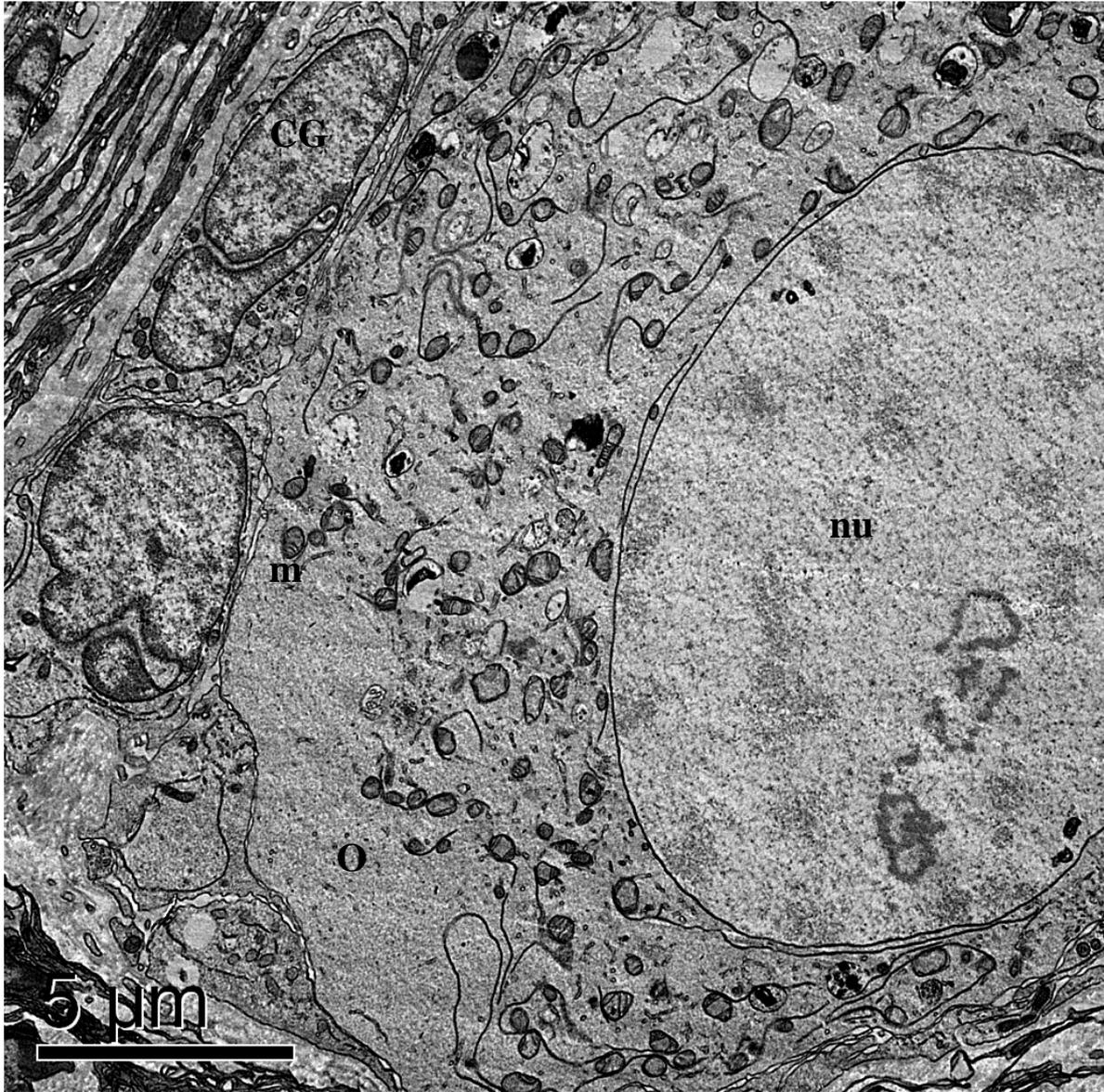


Fig. 3 – Micrografia eletrônica de um folículo ovariano normal oriundo de cabra infectada naturalmente com o CAEV. (Aumento 6.000X). nu: núcleo; m: mitocôndria; CG: células da granulosa; O: oócito.

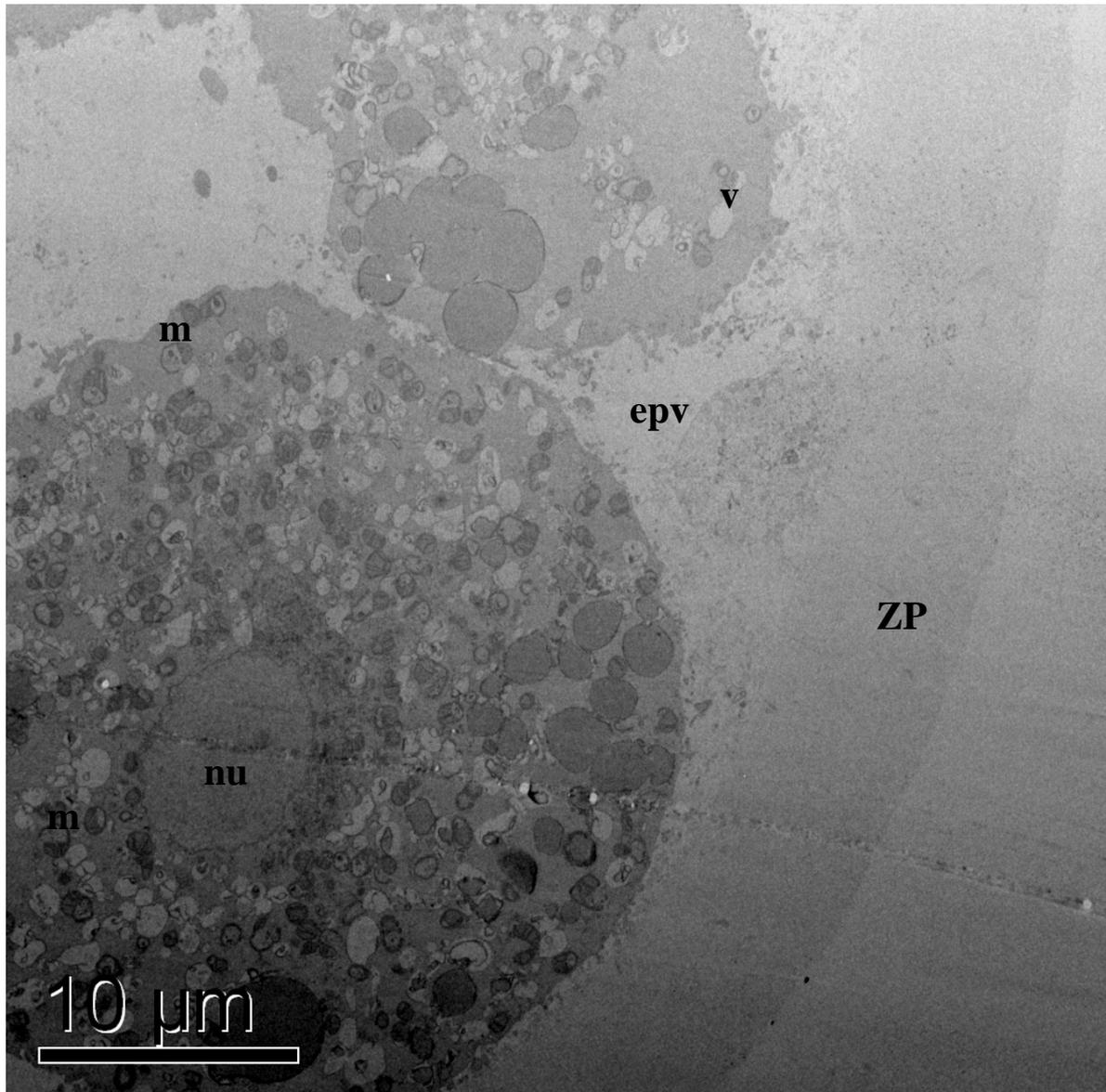


Fig. 4 – Micrografia eletrônica de embrião oriundo de fêmea negativa e macho positivo para o CAEV. (Aumento 3.000X). ZP: zona pelúcida; epv: espaço perivitelínico; nu: núcleo; m: mitocôndrias; v: vacúolos.

## 10 CONCLUSÕES

- Por todos os achados observados pode-se concluir que:

- 1) O descarte de um animal de elevado valor zootécnico, poderá acarretar um atraso para o melhoramento genético e perdas econômicas drásticas para um rebanho;
- 2) A infecção pelo vírus da artrite encefalite caprina não influencia na recuperação de embriões de fêmeas caprinas infectadas naturalmente;
- 3) Espermatozóides caprinos podem ser infectados pelo CAEV;
- 4) A técnica de *swim up* pode ser eficiente na espécie caprina para separação dos espermatozóides dos demais tipos celulares presentes no ejaculado;
- 5) Os folículos ovarianos não são susceptíveis ao CAEV, porém espermatozóides caprinos podem ser infectados com o CAEV, contudo, não foi possível comprovar se estes são realmente capazes de carrear este vírus para o interior do oócito dando origem a embriões infectados com o CAEV.

## 11 PERSPECTIVAS

- 1) Deve se ter cuidados para que através das biotecnologias não se venha a veicular patógenos, para isto, a biologia molecular no futuro irá auxiliar cada vez mais no diagnóstico e controle de enfermidades víricas nos rebanhos.
- 2) São necessários trabalhos mais esclarecedores quanto à possibilidade de veiculação do CAEV pelos embriões, pois isto poderia dizimar rebanhos e provocar sérios prejuízos econômicos, tornando inviável a produção de caprinos.
- 3) Trabalhos com o intuito de se elucidar a possibilidade de veiculação de patógenos pelas biotecnologias reprodutivas são de extrema importância, pois podem revelar novas fontes de infecção e conduzir a novas formas de manejo mais adequado para se evitar a transmissão de doenças.
- 4) Apesar dos indícios da transmissão do CAEV através de espermatozoides, são necessários mais trabalhos utilizando-se técnicas como a RT-PCR, Hibridização *in situ*, e de ensaios da replicação viral do CAEV no interior dos gametas e de embriões, com o intuito de se averiguar a possibilidade de replicação eficiente e transmissão deste vírus no momento da fecundação.

## 12 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABREU, S. R. O; CASTRO, ROBERTO S.; NASCIMENTO, S. A; SOUZA, M. G. Produção de antígeno nucleoprotéico do vírus da artrite encefalite caprina e comparação com o do vírus Maedi-Visna para utilização em teste de imunodifusão em ágar gel. **Pesq. Vet. Bras.** v.18, n. 2, p. 57-60, abr./jun. 1998.

ADAMS, D.S., KLEVJER, A.P., CARLSON, J.L., et al. Transmission and control of caprine arthritis-encephalitis virus. **Am. J. Vet. Res.**, v. 44, p. 1670-1675, 1983.

ALI AL AHMAD, M.Z.; FIENI, F.; MARTIGNAT, L. et al. Proviral DNA of caprine arthritis encephalitis virus (CAEV) is detected in cumulus oophorus cells but not in oocytes from naturally infected goats. **Theriogenology**, v. 41, p. 41-67, 2005.

ALI AL AHMAD, M.Z.; FIENI, F.; GUINGUEN, L. et al. Cultured early goat embryos and cells are susceptible to infection with caprine encephalitis virus. **Virology**, v. 353, p.307-315, 2006.

ALI AL AHMAD, M.Z.; FIENI, F.; PELLERIN, J.L. et al. 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, 2008a.

ALI AL AHMAD, M.Z.; CHEBLOUNE, Y.; BOUZAR, B.A. et al. Lack of risk of transmission of caprine arthritis-encephalitis virus (CAEV) after an appropriate embryo transfer procedure. **Theriogenology**, v. 1, p. 408-415, 2008b.

ALMEIDA, Nei de Carvalho. **Isolamento e identificação do vírus Maedi/Visna através de microscopia eletrônica de transmissão de animal comprovadamente soropositivo pelo IDGA**. 2003. 68 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias). Universidade Estadual do Ceará, Fortaleza, 2003.

AMORIM, C.A.; RONDINA, D.; RODRIGUES, A.P.R.; COSTA, S.H.F.; GONÇALVES, P.B.D.; FIGUEIREDO, J.R.; GIORGETTI, A. Isolated ovine primordial follicles

cryopreserved in different ethylene glycol concentrations. **Theriogenology**, v.60, p.735-742, 2003.

ANDRIOLI-PINHEIRO, A. **Métodos de Colheita e de inovulação de embriões caprinos (Capra hircus, LINNAEUS, 1758) e os efeitos de repetidas colheitas na vida reprodutiva de doadoras**. 1993. 100p. Dissertação (Mestrado em Reprodução Animal). Universidade de São Paulo, São Paulo, 1993.

ANDRIOLI, A.; GOUVEIA, A.M.G.; PINHEIRO, R.R. Detecção do DNA pró-viral do Lentivirus caprino em sêmen de bodes naturalmente infectados. **Rev. Bras. Reprod. Anim.**, v. 23, n. 3, p. 420-420, 1999.

ANDRIOLI-PINHEIRO, Alice. **Vírus da Artrite Encefalite Caprina: PCR e isolamento viral em amostras de sêmen, fluido uterino e embriões**. 2001. 68 p. Tese (Doutorado em Ciência Animal). Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2001.

ANDRIOLI, A.; GOUVEIA, A. M. G. ; MOURA-SOBRINHO, P. A. ; PINHEIRO, R. R.; SALLES, H. O. Transferência de Embriões em cabras naturalmente infectadas pelo Lentivirus caprino. **Revista Brasileira de Medicina Veterinária**, v. 24, p. 215-220, 2002.

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

ARAÚJO, S.A.C. **Identificação do maedi/visna vírus em tecido pulmonar de ovinos naturalmente infectados**. 2004. 80 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias). Universidade Estadual do Ceará, Fortaleza, 2004.

ASSIS, A.P.M.; GOUVEIA, A.M. Evidência sorológica de Lentivirus (Maedi Visna/Artrite Encefalite Caprina) em rebanhos nos estados de Minas Gerais, Rio de Janeiro, Bahia, Ceará. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE MEDICINA VETERINÁRIA, 23., Recife. **Anais...** Recife, Sociedade Brasileira de Medicina Veterinária, 1994. p.104.

BACCETTI, B.; BENEDETTO, A.; COLLODEL, G.; CARO, A.; GARBUGLIA, A.R.; PIOMBONI, P. The debate on the presence of HIV-1 in human gametes. **Journal of Reproductive Immunology**, v. 41, p. 41-67, 1998.

BAKER J.C. The clinical manifestations of bovine viral diarrhea infection. **Vet. Clin. North Am.**, v. 11, n 3, p. 425-445, 1995.

BANKS, K.L.; ADAMS, D.S.; MCGUIRE, T.C. et al. Experimental infection of sheep by caprine arthritis-encephalitis virus and goats by progressive pneumonia virus. **Am. J. Vet. Res.**, v.44, p.2037-2311, 1983.

BARIL, G.; REMY, B.; LEBOUUEUF, B. et al. Synchronization of estrus in goats: the relationship between eCG binding plasma, time of occurrence of estrus and fertility following artificial insemination. **Theriogenology**, v. 45, n. 2, p. 1553-1559, 1993.

BARLOUGH, J.; EAST, N.; ROWE, J.D. Double-nested polymerase chain reaction for detection of caprine arthritis-encephalitis virus proviral DNA in blood, milk, and tissues of infected goats. **Journal of Virology Methods**, v. 50, p. 101-114, 1994.

BARTH, A.D.; OKO, R.J. **Abnormal Morphology of Bovine Spermatozoa**. Ames, Iowa, Iowa State University Press, 1989.

BEARDEN, H.J.; FUQUAY, J.W. **Applied Animal Reproduction**. New Jersey: Prentice-Hall, 4<sup>a</sup> ed., 1997, 307p.

BOGDAN, J., WEST, K., CLARK, E., KONOBY, C., HAINES, D., ALLAN, G., MCNEILLY, F., MEEHAN, B., ELLIS, J.A. Association of porcine circovirus 2 with reproductive failure in pigs: a retrospective study, 1995-1998. **Can. Vet. J.**, v. 42, p. 548-550, 2001.

BOSCH P, HERNANDEZ-FONSECA HJ, MILLEN DM, WININGER JD, MASSEY B, LAMB SV, BRACKETT BG. Development of antral follicles in cryopreserved cat ovarian tissue transplanted to immunodeficient mice. **Theriogenology**, v.61, p.581-594, 2004.

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

BRELLOU, G.D.; ANGELOPOULOU, K.; POUTAHIDIS, T.; VLEMMAS, I. Detection of Maedi-Visna Virus in the Liver and Heart of Naturally Infected Sheep. **Journal of Comparative Pathology**, v. 136, p. 27-35, 2007.

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

BROWNLIE J. The pathogenesis of bovine viral diarrhea virus infections. **Rev. Sci. Tech. OIE**, v. 9, p. 43-59, 1990.

CALLADO, A. K. C., CASTRO, R. S.; TEIXEIRA, M. F. S. Lentivírus de Pequenos Ruminantes (CAEV e Maedi-Visna): revisão e perspectivas. **Pesq. Vet. Bras.**, Jul/Set., v.21, n.3, p.87-97, 2001.

CALVETE, J.J.; NESSAU, S.; MANN, K.; SANZ, L.; SIEME, H; KLUG, E.; TÖPFERPETERSEN, E. Isolation and biochemical characterization of stallion seminal plasma proteins. **Reproduction Domestic Animal**, Berlin, v.29, p.411-426, 1994.

CAMP, J.C.; WILDT, D.E.; HOWARD, P.K.; STUART, L.D.; CHAKRABORTY, P.K. Ovarian activity during normal and abnormal length estrus cycles in the goat. **Biology of Reproduction**. v.28, n. 3, p. 673-681, 1983.

CARROL, J.; WHITTINGHAM, D.G.; WOOD, M.J. et al. Extra-ovarian production of mature viable mouse oocytes from frozen primary follicles. **J. Reprod. Fert.**, v. 90, p. 321-327, 1990.

CASTRO RS, LEITE RC, ABREU JJ. Prevalence of antibodies to selected viruses in bovine embryos donors and recipients from Brazil, and its implications in international embryo trade. **Trop Anim Hlth Prod**, v.24, p.173-176, 1992.

CHEMINEAU, P, CAGNIÉ, Y., GUÉRIN, Y., et al. **Training Manual on artificial insemination in sheep and goats**. Rome : FAO (Animal Production and Health Paper n°83), 1991. 222p.

CHEMINEAU, P.; DAVEAU, A.; MAURICE, F.; DELGADILLO, J.A. Seasonality of estrus and ovulation is not modified by subjecting female Alpine goats to a tropical photoperiod. **Small Ruminant Research**. v. 8, p. 299-312, 1992.

CONCHA-BERMEJILLO, A.; MAGNUS-CORRAL, S.; BRODIE, S.J.; DeMARTINI, J.C. Veneral shedding of ovine lentivirus in infected rams. **American Journal of Veterinary Research**, v. 57, n. 5, p. 684-688, 1996.

CORK, L.C.; HADLON, W.J. ;CRAWFORD, T.B. Infectious leucoencephalomyelitis of young goats. **The Journal Infectious Disease**, v.129, n 2, p134-141, 1974.

CORTELL, J.M. **Collection, processing and artificial insemination of goat semen**. Nouzilly – France: INRA, 1981, 28p.

CORTVRINDT, R.; SMITZ, J. *In vitro* Follicle Growth: Achievements in Mammalian Species. **Reprod. Dom. Anim.**, v. 36, p. 3 -9, 2001.

CRAWFORD, T.B.; ADAMS, D.S. Caprine arthritis-encephalitis: clinical features and presence of antibody in selected populations. **J. Am. Vet. Méd. Assoc.**, v. 178, p. 713-719. 1981.

CUNNINGHAM, J.G. **Tratado de Fisiologia Veterinária**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan,1993. 454p.

CUTLIP, R.C., LEHMKUHL, H.D., JACKSON, T.A. Intrauterine transmission of ovine progressive pneumonia virus. **Am. J. Vet. Res.** v. 42, p. 1795–1797,1981.

EAST, N. E.; ROWE, J. D.; DAHLBERG, J.E.; THEILEN, G.H.; PEDERSEN, N.C. Modes of transmission of caprine arthritis encephalitis virus infection. **Small Ruminant**, v. 10, p. 251-262, 1993.

EVANS, G.; MAXWELL, W.M.C. **Inseminación artificial de ovejas y cabras**. Zaragoza: Editorial Acribia, 1990, 194p.

FELDMAN EC, NELSON RW. **Canine and feline endocrinology and reproduction**. Philadelphia: WB Saunders, 1996.

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

FIGUEIREDO, J.R.; RODRIGUES, A.P.R.; AMORIM, C.A.; Manipulação de Oócitos Inclusos em Folículos Ovarianos Pré-antrais – MOIFOPA. In: **Biotécnicas Aplicadas à Reprodução Animal**. São Paulo: Livraria Varela, 2001. p. 227-256.

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

FREITAS, V.J.F.; BARIL, G.; MARTIN G.B. et al. Physiological limits to further improvement in the efficiency of estrus synchronization in goats. **Reproduction, Fertility and Development**, v. 9, p. 551-556, 1997.

FREITAS, V.J.F.; CAVALCANTE, T.V.; SALLES, H.O.; TEIXEIRA, M.F.S. Embryo transfer from seropositive goats for caprine arthritis-encephalitis virus (CAEV) with birth of seronegative kid. **Ciência Animal**, v. 9, p. 5-9, 1999.

GEORGE, L.L.; ALVES, C.E.R.; CASTRO, R.R.L.; **Histologia Comparada**. 2.ed. São Paulo: Roca, 1998. 286p.

GIVENS MD, STRINGFELLOW DA, RIDDELL KP, GALIK PK, NAVARRE CB. Normal calves produced after transfer of in vitro fertilized embryos cultured with an antiviral compound. **Theriogenology**, v. 65, p. 344–355, 2006.

GONÇALVES PBD, VISITIN JA, OLIVEIRA MAL, MONTAGNER MM, COSTA LFS. Produção *in vitro* de embriões. In: **Biotécnicas aplicadas à reprodução animal**. São Paulo: Livraria Varela, 2001. p.195-226.

GONZALEZ-STAGNARO, C. Comportamiento reproductivo de las razas locales de rumiantes en el trópico americano. **Reproduction des Ruminants en Zone Tropical**, v. 20, n. 1, p. 1-83, 1984.

GOUVEIA A.M.G., SANTA ROSA J., PINHEIRO R.R. et al.. **Acompanhamento e avaliação da primeira fase do programa de controle da artrite encefalite caprina viral (AEC) no rebanho do Centro Nacional de Pesquisa de Caprinos-Embrapa**. Embrapa/CNPC, Sobral. 1996. 123p.

GRADIL, C.M.; WATSON, R.E.; RENSHAW, R.W.; GILBERT, R.O.; DUBOVI, E.J. Detection of bovine immunodeficiency virus DNA in the blood and semen of experimentally infected bulls. **Veterinary Microbiology**, v. 70, p. 21-31, 1999.

GRANADOS, L.B.C.; DIAS, A.J.B.; SALES, M.P. **Aspectos Gerais da Reprodução de Caprinos e Ovinos**. Projeto PROEX/UENF, Campo dos Goytacazes. 2006. 54p.

GROM, J.; HOSTNIK, P.; TOPLAK, I.; MAGANJA, D.B. Molecular detection of BHV-1 in artificially inoculated semen and in the semen of a latently infected bull treated with dexamethasone. **The Veterinary Journal**, v. 171, p. 539-544, 2006.

GUEDES, M.I.M.C.; SOUZA, J.C.A.; GOUVEIA, A.M.G. Infecção experimental em cabritos pelo vírus da artrite encefalite. **Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.**, v.53, n. 1, p. 15-20, 2001.

GUERIN, B.; LE GUIENNE, B.; CHAFFAUX, S.; HARLAY, T.; ALLIETTA, M.; THIBIER, M. Contamination des ovocytes et des embryons fécondés in vitro après infection expérimentale de vaches donneuses par la virus bovine de type I (BHV-I). **Rec. Med. Vet.**, v. 165, p.827-833, 1989.

GUERIN, B.; LE GUIENNE, B.; ALLIETA, M.; HARLAY, T.; THIBIER, M. Effects de la contamination par le BHV1 sur la maturation et la fécondation in vitro des oocytes des bovins. **Rec. Med. Vet.**, v. 166, p. 911-917, 1990.

GUERIN B, NIBART M, LE GUIENNE B, HUMBLLOT P. Sanitary risks related to embryo transfer in domestic species. **Theriogenology**, v.47, p.33-42, 1997.

HAASE, A.T. Pathogenesis of lentivirus infections. **Nature**, v. 322, n.10, p. 130-136, 1986.

HAFEZ, E.S.E.; HAFEZ, B. **Reprodução Animal**, 7ed. São Paulo: Manole, 2004. 513p.

HARE, W.C.D. **Enfermedades transmissibles por el semen y las técnicas de transferencia de embriones**. Paris: Office International des Epizooties, 1985. 83p. (Série Técnica, 4).

HARKISS G.D.; WATT N.J. Lentivirus infections and their detection. **Goat Vet. Soc. J.** v. 11, n. 1, p.19-25, 1990.

HENNAWATI; FLETCHER, I.C. Reproduction in Indonesian sheep and goats at two level of nutrition. **Animal Reproduction Science**, v. 12, p. 77-84, 1986.

HIRSH, D.C.; ZEE, Y.C. **Microbiologia Veterinária**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2003. 446p

HOTZEL, I.; BASTOS, E.S.; RAVAZZOLO, A.P. et al. Caprine arthritis-encephalitis virus: isolation and identification in Rio Grande do Sul, Brasil. **Braz. J. Med. Iol. Res.**, v. 26, p. 1175-1179, 1993.

HULSHOF, S.C.J. FIGUEIREDO, J.R., BECKERS, J.F. et al. Isolation and characterization of preantral follicles from foetal bovine ovaries. **Vet. Quart.** v. 2, p. 78-80, 1994.

IBGE. **Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística**. Censo Agropecuário 2007. Disponível em: <[http://www.ibge.gov.br/home/estatistica/indicadores/agropecuaria/producao\\_agropecuaria/default.shtm](http://www.ibge.gov.br/home/estatistica/indicadores/agropecuaria/producao_agropecuaria/default.shtm)>. Acesso em: 03 fev., 2008.

IRITANI, A.; NIWA, K. Capacitation of bull spermatozoa and fertilization *in vitro* of cattle follicular oocytes matured in culture. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 50, p. 119-121, 1997.

JOHNSON, A.L. Intracellular mechanisms regulating cell survival in ovarian follicles. **Animal Reproduction Science**, v. 78, p. 185–201, 2003.

JORDAN, H.L.; HOWARD, J.; SELTON, R.K.; WILDT, D.E.; TOMPKINS, W.A.; KENNEDY-STOSKOPF, S. Transmission of Feline Immunodeficiency Virus in Domestic Cats via Artificial insemination. **Journal of Virology**, v. 70, n° 11, p. 8224–8228, 1996.

JORDAN, H.L.; HOWARD, J.; SELTON, R.K.; WILDT, D.E.; TOMPKINS, W.A.; KENNEDY-STOSKOPF, S.. Horizontal transmission of feline immunodeficiency virus with semen from seropositive cats. **Journal of Reproductive Immunology**, v. 41, p. 341-357, 1998.

KHAN, B.U.; SINHA, N.K.; WANI, G.M.; SAHNI, K.L. Note on breeding performance in Jamnapari goats. **Indian Veterinary Journal**. v. 58, p. 251, 1981.

KREUTZ, L.C. Imunidade contra vírus. In: **Imunodiagnóstico em Medicina Veterinária**. Campo Grande: Embrapa Gado de Corte, 2001. p 19-45.

LAMARA A, FIENI F, MSELLI-LAKHAL L, TAINTURIER D, CHEBLOUNE Y. Efficient replication of caprine arthritis encephalitis virus in goat granulose cell. **Virus Res**, v.79, p.165-172, 2001.

LAMARA, A.; FIENI, F.; MSELLI-LAKHAL, L.; CHTAGNON, G.; BRUYAS, J.F.; TAINTURIER, D.; BATTUT, I.; FORNAZERO, C.; CHEBLOUNE, T. Early embryonic

cells from in vivo produced goat embryos transmit the caprine arthritis encephalitis virus (CAEV). **Theriogenology**, v. 58, n. 6, p. 1153-1163, 2002.

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

LUCCI, C.,M; SILVA, J.R.V.; CARVALHO, C.A. et al. Light microscopical and characterization of goat preantral follicles. **Small Ruminant Research**, v 41, p. 61-69, 2001.

MELO, A.C.M., FRANKE, C.R. Soroprevalência da infecção pelo vírus da Artrite-Encefalite Caprina (CAEV) no rebanho de caprinos leiteiros da região da grande Fortaleza, Ceará, Brasil. **Ciência Rural**, v.27, n.1, p.113-117, 1997.

MIES FILHO, A. **Reprodução dos Animais**. Porto Alegre: Sulina. 1987.

MITTELHOLZER, C.; JOHANSSON, I.; OLSSON, A.K.; RONÉUS, M.; KLINGEBORN, B.; BELÁK, B. Recovery of Swedish *Equine arteritis viruses* from semen by cell culture isolation and RNA transfection. **Journal of Virological Methods**, v. 133, p. 48-52, 2006.

MOCHIDA Y, TAKEMURA Y, KANDA T, HORIE Y. Fertilized eggs obtained from transplation of frozem ovaries and parthenogenesis in combination with artificial insemination of frozen sêmen of the silkworm, *Bombyx mori*. **Criobiology**, v.46, p.153-160, 2003.

MOLOKWU, E.C.I.; IGONO, N.O. **Reproductive cycle of the Nigerian Savana Brown goat**. In: Proceedings of the third International Conference on Goat Production and Disease.Tucson, p. 312, 1982.

MORI, Y.; OKAMURA, H. Effects of timed melatonin infusion on prolactin secretion in pineal denervated goat. **Journal of Pineal Research**, v. 3, p. 77-86, 1986.

MOOJEN, V. et al. Evidência de infecção pelo *Lentivírus* (maedi/visna e artrite encefalite caprina) em caprinos no Rio Grande do Sul, Brasil. **Arq Fac. de Med. Vet. UFRGS**, v.14, p.77-78, 1986.

MÜLLER, K.; MÜLLER, P.; HERMANN, A. Transbilayer motion of spin-labelled phospholipids in the plasma membrane of epididymal and ejaculated ram spermatozoa. **Journal of Reproduction and Fertility**, Colchester, v.111, p. 81-89, 1997.

NARAYAN, O. Immunopathology of lentiviral infections in ungulate animals **Current Opinion in Immunology**, 1990, V. 2, n. 3, p. 399-402.

NUNES, J.F.; CIRÍACO, A.L.T.; SUASSUNA, U. **Produção e reprodução de caprinos e ovinos**. Fortaleza, 1997. Ed.LCR. 2a ed. 199p.

---

NUNES, J.F. **Inseminação artificial em caprinos**. p. 111-125. In: Biotécnicas aplicadas a reprodução animal. São Paulo: Livraria Varela, 2001.

OFFICE INTERNATIONAL DES EPIZOOTIES (OIE). **Manual of standarts for diagnostic tests and vaccines**. World Organization for Animal Health. P. 369-373, 1996.

OLIVEIRA, A.A.P.; LIMA, V.P.M.S. **Aspectos econômicos da caprino-ovinocultura tropical brasileira**. In: I Semana da Caprinocultura e da Ovinocultura Tropical Brasileira. Sobral, p. 7-46. 1994.

O'NEIL, L.L., BURKHARD, M.J., DIEHL, L.J., HOOVER, E.A. Vertical transmission of feline immunodeficiency virus. **AIDS Res. Human Retroviruses**, v. 1, p. 171-182, 1995.

O'NEIL, L.L., BURKHARD, M.J., HOOVER, E.A. Frequent perinatal transmission of feline immunodeficiency virus by chronically infected cats. **J. Virol.**, v. 70, p. 2894-2901, 1996.

OTOI T, YAKAMOTO K, KOYAMA N, SUZUKI T. Cryopreservation of mature bovine oocytes by vitrification in straws. **Criobiology**, v.37, p.77-85, 1998.

PENSAERT, M.B.; SANCHEZ JR., R.E.; LADEKJÆR-MIKKELSEN, A.S.; ALLAN, G.M.; HANS, J. Nauwynck. Viremia and effect of fetal infection with porcine viruses with special reference to porcine circovirus 2 infection. **Veterinary Microbiology**, n. 98, p. 175-183, 2004.

PERES, K.R.; FERNANDES, C.B.; ALVARENGA, M.A.; LANDIM-ALVARENGA, F.C. Análise da viabilidade e da ultra-estrutura de embriões obtidos de éguas superovuladas. **Vet. e Zootec.** v.14, n.1, p. 52-61, 2007.

PEÇANHA EP, ANTUNES OAC, TANURI A. Estratégias farmacológicas para a terapia anti-AIDS. **Quím Nova**, v.25, p.1108-1116, 2002.

PHILPOTT M. The dangers of disease transmission by artificial insemination and embryo transfer. **Br Vet J**, v.149, p.339-369, 1993.

PINHEIRO, R.R., EGITO, A.S., SANTA ROSA, J., et al. **Artrite encefalite caprina viral (CAEV)**. Sobral, CE: EMBRAPA-CNPC, 1989. 5p. (EMBRAPA-CNPC. Comunicado Técnico, 19).

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

PINHEIRO, R.R.; GOUVEIA, A.M.G.; ALVES, F.S.F. Prevalência da infecção pelo vírus da artrite encefalite caprina no estado do Ceará, Brasil. **Ciência Rural**, Santa Maria, v.31, n.3, p.449-454, 2001.

RAZ, T.; CORRIGAN, M.; LOOMIS, P.; CARD, C. Effects of equine arteritis virus-positive semen on mare fertility. **Animal Reproduction Science**, (in press), 2006.

REICHENBACH HD, OLIVEIRA MAL, LIMA PF, SANTOS FILHO AS, ANDRADE JCO. Transferência e criopreservação de embriões bovinos. In: **Biotécnicas aplicadas à reprodução animal.** São Paulo: Varela, 2001. p.127-177.

RESTALL, B.J. Seasonal variation in reproductive activity in Australian goats. **Animal Reproduction Science**, v. 27, p. 305-318, 1992.

RESTALL, B.J.; RESTALL, H.; WALKDEN-BROWN, S.W. The induction of ovulation in anovulatory goats by oestrus females. **Animal Reproduction Science**, v. 40, p. 299-303, 1995.

RIBEIRO, S.D.A. **Caprinocultura: Criação Racional de Caprinos.** São Paulo: Nobel, 1997. 318p.

RICARTE, A.R.F. **Caracterização morfológica e ultra-estrutural de folículos pré-antrais de cabras naturalmente infectadas com vírus da artrite encefalite caprina.** 2005. 60 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias). Faculdade de Veterinária, Universidade Estadual do Ceará, Fortaleza, 2005.

RIERA, S. **Reproductive efficiency and management in goats.** In: Proceedings of III International Conference Goat Production Disease, Tucson, p. 162-174, 1982.

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

RIMSTAD, E., EAST, N.E, TORTEN, M. Delayed seroconversion following naturally acquired caprine arthritis-encephalitis virus using recombinant gag proteins. **American Journal Veterinary Research**, v. 54, n. 11, p. 1858-1862, 1993.

RODRIGUES APR, AMORIM CA, COSTA SHF, MATOS MHT, SANTOS RR, LUCCI CM, BÁO SN, OHASHI OM, FIGUEIREDO JR. Cryopreservation of caprine ovarian tissue using glycerol and ethylene glycol. **Theriogenology**, v.61, p.1009-1024, 2004.

ROMERO, C.C.; FIENI, F.; PELLERIN, J.L.; ROUX, C.; CHEBLOUNE, Y.; PEPIN, M. Detection of Maedi Visna Virus in Oocytes and Granulosa Cells Using Double Nested-PCR From Naturally Infected Sheep. **Reproduction Fertility and Development**, v. 16, n. 4, p. 511, 2004.

RONDINA, D. **Effect of nutritional state on quantitative and qualitative development of ovarian preantral follicles in does SRD (*Capra hircus* L.)**. University of Florence, 1998, 81p. Ph.D. Thésis.

RUTKOSKI, J.K.; WERENICZ, R; REISCHAK, D; WENDELSTEIN, A.C.; V. MOOJEN, V.; RAVAZZOLO, A.P. Detecção da infecção pelo vírus da artrite-encefalite caprina: imunodifusão em ágar e reação em cadeia da polimerase com “primers” degenerados. **Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.**, v.53, n.6, p.635-640, 2001.

SALLES, H.O.; ANDRIOLI, A.; SOARES, A.T.; MOURA SOBRINHO, P. A. Influência da artrite encefalite caprina na resposta superovulatória. **Ciência Animal**, v. 1, p. 37-40, 1998.

SANTOS RR, RODRIGUES APR, MARTINS FS, MATOS MHT, CELESTINO JJH, FIGUEIREDO JR. Preservação de folículos pré-antrais de pequenos ruminantes. **Ciência Animal**, v.14, p.7-19, 2004.

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

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

SAUMANDE, J. Folliculogenesis in the ruminants. **Rec. Med. Vet.**, v. 167, p. 205-218, 1991.

SCHEFFLER, I. E. **Mitochondria**. San Diego, University of California, 1999.

SERAKIDES, R., NUNES, V.A., PEREIRA, M.F. Estudo clínico, anatomopatológico e imuno-histoquímico de pulmões de cabras naturalmente infectadas pelo vírus da artrite encefalite caprina (CAE). **Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.**, v.48, p.415-424, 1996.

SILVA LDM. **Tecnologia do sêmen canino**. In: Simpósio Cearense de Ciência Animal, 1, 1999, Fortaleza. Anais... Fortaleza: Sociedade Cearense de Ciência Animal, 1999. p.43-49.

SILVA LDM, SILVA AR, CARDOSO RCS. Inseminação artificial em cães. In: **Biotécnicas aplicadas à reprodução animal**. São Paulo: Varela, 2001. p. 69-95.

SILVA J.R.V.; FERREIRA, M.A.L.; COSTA, S.H.F. et al. Degeneration rate of preantral follicles in the ovaries of goats. **Small Ruminant Research**, v. 43, p.203-209, 2002.

SILVA, JBA. **Vírus da Artrite Encefalite Caprina (CAEV) em folículos pré-antrais de cabras naturalmente infectadas**. 2006. 90f. Tese (Doutorado em Ciências Veterinárias) - Universidade Estadual do Ceará, Fortaleza, 2006.

SINGH EL. The disease control potential of embryos. **Theriogenology**, v.27, p.9-20, 1987.

SIMPLÍCIO, A.A.; FIGUEIREDO, E.A.P.; RIERA, G.S.; FOOTE, W.C. Puberty in four genotypes of female goats in Northeast Brazil. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**. v. 25, p. 455-459, 1990.

SINGH, E. L. The disease control potential of embryos. **Theriogenology**, v. 27, n. 1, p. 9-20, 1987.

SMITH, M.C.; CULTLIP, R. Effects of infection with caprine arthritis-encephalitis virus on milk production in goats. **J. Am. Vet. Med. Assoc.**, v. 193, p. 63-67, 1988.

STOREY BY, NOYLES EE, THOMPSON KA. Comparison of glycerol, other polyols, trealose, and raffinose to provide a defined cryoprotectant medium for mouse sperm cryopreservation. **Criobiology**, v.37, p.45-58, 1998.

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

STREZEZEK, J.; KORDAN, W.; KOSTYRA, H.; ZABORNIAK, A. Purification and partial characterization of a 5,700 Da sperm motility inhibiting factor from seminal plasma of boar. **Animal Reproduction Science**, Amsterdam, v.29, p.5-52, 1992.

THIBAUT, C., LEVASSEUR, M.C. **La reproduction chez les mammifères et l'homme**. Ed. INRA, 1992.

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

TRAVASSOS, C.; BENÔIT, C.; VALAS, S. Caprine arthritis-encephalitis virus in semen of naturally infected bucks. **Small Ruminant Research**, v. 32, p. 101-106, 1999.

UPRETI, G.C.; OLIVER, J.E.; DUGANZICH, D.M.; MUNDAY, R.; SMITH, J.F. Development of a chemically defined ram semen diluent (RSD-1). **Animal Reproduction Science**, Amsterdam, v.37, p. 143-157, 1995.

VANROOSE, G.; NAUWYNCK, H.; VAN SOOM, A.; VANOPDENBOSCH, E.; DE KRUIF, A. Susceptibility of zona-intact and zona-free in vitro produced bovine embryos at different stages of development to infection with bovine herpesvirus-1. **Theriogenology**, 47, 1389-1402, 1997.

VARMUS H. Retroviruses. **Science**, v.240, p.1427-1435, 1998.

WALKDEN-BROWN, S.W.; RESTALL, B.J.; HENNIAWATI. The male effect in the Australian Cashmere goat. 3. Enhancement with buck nutrition and use of oestrus females. **Animal Reproduction Science**, v. 32, p. 69-84, 1993.

WALKDEN-BROWN, S.W.; RESTALL, B.J. **Environmental and social factors affecting reproduction.** In: VI INTERNATIONAL CONFERENCE OF GOATS, Beijing, 1996, p. 762-775.

WHEELER MB, CHOI SJ, VOELKER GR, WALTERS EM, CEZAR GG. Produção de animais transgênicos nas espécies domésticas: tecnologia e aplicações. In: **Biotécnicas aplicadas à reprodução animal.** São Paulo: Varela, 2001. p.303-340.

WILKERSON, M.J., DAVIS, W.C., BASZLER, T.V. et al. Immunopathology of chronic lentivirus-induced arthritis. **Am. J. Pathol.**, v. 146, p. 1433-1443, 1995.

WRATHALL, A.E. Embryo transfer and disease transmission in livestock a review of recent research. **Theriogenology**, v.43, p. 81-88, 1995.

WU, J.; EMERY, B.R.; CARREL, D.T. *In vitro* Growth, Maturation, Fertilization, and Embryonic Development of Oocytes from Porcine Preantral Follicles. **Biology of Reproduction**, v. 64, p. 375-381, 2001.

ZINK, M.C., YAGER, J.A., MYERS, J.D. Pathogenesis of caprine arthritis-encephalitis virus cellular localization of viral transcripts in tissues of infected goats. **Am. J. Pathol.** 1990; 2:164-54.

**ANEXOS**



## Possibilidades de aplicação de biotecnologias reprodutivas em animais de produção acometidos por agentes víricos

*Possibility of application of reproductive biotechnologies in production animals infected with viral agents*

Aracely Rafaelle Fernandes Ricarte<sup>1,3</sup>, Suzana Aparecida Costa de Araújo<sup>1</sup>, Tânia Valeska Medeiros Dantas<sup>1</sup>, Edmara Chaves Costa<sup>1</sup>, Jean Berg Alves da Silva<sup>2</sup>, Maria Fátima da Silva Teixeira<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Laboratório de Virologia, Faculdade de Veterinária, Universidade Estadual do Ceará, Fortaleza, CE, Brasil. Avenida Paranjana, nº1700, Campus do Itaperi, Fortaleza-CE, CEP: 60.740-903

<sup>2</sup>Faculdade de Veterinária, Universidade Federal Rural do Semi-árido, Mossoró, RN, Brasil

<sup>3</sup>Correspondência: aracelyrfr@yahoo.com.br

### Resumo

As biotécnicas reprodutivas são empregadas com o intuito de potencializar o aproveitamento do material genético dos animais com melhores desempenhos. No entanto, quando um reprodutor é acometido por algum agente vírico, é automaticamente descartado da reprodução, o que representa grande perda de material genético. É necessário, antes do uso de qualquer biotécnica, que seja confirmada a ausência de patógenos, utilizando-se algumas técnicas moleculares no auxílio do diagnóstico sanitário dos gametas, evitando, assim, a veiculação de patógenos por meio dessas técnicas. Objetivou-se neste trabalho fazer um levantamento bibliográfico e apontar perspectivas de utilização dos gametas de animais acometidos por agentes víricos, empregando diferentes biotecnologias reprodutivas.

**Palavras-chave:** biotecnologias, reprodução, agentes víricos.

### Abstract

*Reproductive biotechnologies have been used with the intention of exploiting genetic material of more productive animals. However, when a viral agent infects a sire, the animal is automatically discarded from the process, which represents great loss of genetic material. It has been seen that these biotechnologies may be used, when gametes are proved to be free of viral agents using molecular techniques to make the diagnose, preventing, by this way, propagation of infectious agents. The objective of this study was to do a bibliographic survey and to show how germplasm of animals infected by viral agents could not be discarded using different reproductive biotechnologies.*

**Keywords:** biotechnologies, reproduction, viral agents.

### Introdução

Ao longo de centenas de anos, o homem tem procurado potencializar o aproveitamento do material genético dos seus melhores animais domésticos, no intuito de obter descendentes com características semelhantes ou melhores do que as dos seus genitores (Hafez e Hafez, 2004). Dentre as biotecnologias utilizadas com maior frequência na produção animal, destacam-se a inseminação artificial, a transferência de embriões e a fecundação *in vitro*. Além dessas, existem técnicas que apresentam boas perspectivas para aplicação em larga escala no futuro, como a manipulação de oócitos inclusos em folículos ovarianos pré-antrais (MOIFOPA), a transgênese e a clonagem (Figueiredo *et al.*, 2001).

Porém, para que o animal expresse melhor seu desempenho produtivo e reprodutivo, é necessário que ele tenha um bom manejo e que esteja livre de enfermidades, uma vez que o acometimento de um reprodutor por agentes infecciosos pode impedir sua utilização para fins reprodutivos, além de levá-lo à morte, acarretando sérios prejuízos econômicos e perda de material genético de qualidade (Andrioli *et al.*, 2003). Com o objetivo de reduzir essas conseqüências, as biotecnologias reprodutivas vêm surgindo como uma alternativa para o resgate e a utilização do material genético desses animais.

Dentre as biotécnicas, a transferência de embriões vem sendo utilizada com segurança em animais acometidos por algumas enfermidades infecto-contagiosas. Após vários estudos, a Sociedade Internacional de Transferência de Embriões (IETS) sugeriu a utilização de algumas técnicas padronizadas na manipulação dos embriões, as quais poderiam reduzir o risco de transmissão de enfermidades, demonstrando ser esta técnica, na atualidade, a que apresenta um menor risco de transmissão de patógenos quando aplicada com material genético de animais enfermos (Guerin *et al.*, 1997). Desse novo potencial biotecnológico, surge a necessidade de se realizarem pesquisas aprofundadas com as demais biotécnicas no intuito de se averiguar a possibilidade de utilização dessas técnicas com segurança nesses animais. Sendo assim, o objetivo do presente estudo foi fazer um levantamento bibliográfico sobre o risco de transmissão de patógenos pela reprodução e avaliar a



possibilidade de multiplicação de material genético dos animais de elevado valor zootécnico, acometidos por enfermidades infecto-contagiosas, utilizando diferentes biotecnologias reprodutivas.

### Utilização de material genético de animais com infecções víricas em biotecnologias reprodutivas

Os vírus são capazes de infectar, tanto o homem, como os animais. Para que consigam infectar um determinado tipo celular, é necessário que a célula possua receptores para o vírus, o que determina a patogenicidade do mesmo (Kreutz, 2001).

Com o advento da biologia molecular, tem-se estudado de forma mais precisa a patogenicidade de vários microrganismos. Alguns vírus que anteriormente se imaginava infectar um determinado tipo celular têm demonstrado predileção também por células do trato reprodutivo. Devido ao tamanho dos vírus e à sua forma de infecção, esses são de difícil controle, diagnóstico e tratamento. Por esses aspectos, a principal forma de controle de várias enfermidades víricas é a separação e o sacrifício dos animais acometidos nos rebanhos, o que pode levar a um atraso no melhoramento genético e a graves perdas econômicas.

Neste sentido, o aproveitamento de gametas de animais acometidos por agentes víricos utilizando diferentes biotecnologias reprodutivas surge como uma alternativa para se evitar a perda de material genético de animais de alto valor zootécnico. Cada biotécnica tem seus entraves, mas vale ressaltar aqui algumas possibilidades para a aplicação das biotécnicas com segurança em animais enfermos.

#### *Inseminação Artificial (IA)*

A inseminação artificial é uma técnica que tem como objetivo depositar o sêmen diretamente no trato genital da fêmea após a sua obtenção (Silva, 1999). Essa técnica pode ser utilizada como um meio alternativo quando da impossibilidade de realização de monta natural, devido a problemas anatômicos e comportamentais, ou ainda, quando se utiliza sêmen congelado (Feldman e Nelson, 1996). Essa biotécnica também apresenta como vantagens a possibilidade de armazenamento de sêmen por tempo indefinido e a disseminação mais rápida do material genético de machos, bem como a redução de custos e de estresse com transporte de animais (Silva *et al.*, 2001).

A transmissão de patógenos pelo sêmen é bastante relevante, uma vez que na IA várias fêmeas são inseminadas com um único ejaculado, havendo, dessa forma, a possibilidade de introdução de novas cepas de microrganismos mais virulentas em um rebanho inteiro (Andrioli *et al.*, 2003). Sendo assim, a utilização de sêmen requer um cuidado redobrado, visto que este pode ser contaminado de várias formas.

O sêmen pode ser contaminado por microrganismos procedentes dos testículos, do epidídimo, das glândulas anexas, da uretra e do prepúcio, ou os patógenos podem ganhar acesso ao sistema reprodutor, pelo sangue e líquidos tissulares extravasados para esse sistema, nas bacteremias ou viremias, ou no caso de qualquer inflamação ou infecção nesses órgãos. Além disso, o sêmen pode contaminar-se no meio externo, por agentes presentes no ambiente, na pele do reprodutor, nos materiais utilizados (caso não sejam adequadamente esterilizados) na coleta e manipulação do sêmen, e, no caso da congelação do sêmen em *pellets*, pode ocorrer contaminação no nitrogênio líquido a partir de outras amostras de *pellets* contaminados (Hare, 1985; Thibier e Guérin, 2000).

Fatores como lesões, inflamações e infecções no órgão reprodutor podem desencadear maior fluxo de células sanguíneas para o sêmen e, juntamente com estas células, podem ser carreados patógenos. Outros aspectos importantes como o estágio da doença, o estado imunológico ou nutricional e a associação com outras enfermidades podem ser relevantes para a contaminação seminal (Concha-Bermejillo *et al.*, 1996; Pinheiro *et al.*, 2001).

Atualmente, o comércio de sêmen é mais procurado do que o de animais, em virtude do desenvolvimento das técnicas de criopreservação desses materiais associado a vantagens como praticidade, economia e aspectos sanitários do comércio de germoplasma. Porém, as pesquisas sobre o risco de disseminação de patógenos via sêmen não foram totalmente elucidativas, sendo uma necessidade atual o incremento dessa linha de pesquisa para um melhor controle do avanço das enfermidades víricas, principalmente daquelas de caráter crônico, em que o aparecimento de sintomas é tardio (Andrioli *et al.*, 2003).

Pelo fato de se ter observado que alguns vírus, como os lentivírus de pequenos ruminantes (LVPR) apresentam-se no sêmen de forma intermitente, ou seja, apenas alguns ejaculados apresentam o patógeno (Concha-Bermejillo *et al.*, 1996; Andrioli-Pinheiro, 2001), uma alternativa para utilizar o material genético desses animais seria o de testar alíquotas de sêmen por meio de técnicas moleculares mais sensíveis, como a PCR, e utilizar apenas as amostras seminais negativas para o patógeno. Essa conduta é recomendada até mesmo para aqueles reprodutores tidos como saudáveis, uma vez que estes podem estar com alguma virose de caráter crônico e ainda não se terem soroconvertido e, conseqüentemente, não demonstrarem sinais clínicos (Andrioli *et al.*, 2003).



### *Transferência de Embriões (TE)*

A transferência de embriões é uma biotécnica que permite recolher embriões de uma fêmea doadora e transferi-los para fêmeas receptoras com a finalidade de completarem o período de gestação. Sua importância básica para a produção animal consiste na possibilidade de uma fêmea produzir um número de descendentes muito superiores ao que seria possível obter fisiologicamente durante sua vida reprodutiva. Para o melhoramento zootécnico, essa biotécnica é um importante instrumento porque acelera e confere maior precisão no processo de seleção animal (Reichenbach *et al.*, 2001).

Um pouco diferente do que acontece com o sêmen, para que ocorra a transmissão de um patógeno pelo embrião, é necessário que o patógeno esteja presente dentro do oócito, em associação ou mesmo aderido à zona pelúcida (ZP), ou que esteja presente nos fluidos no quais os embriões são recolhidos, manipulados, criopreservados ou transferidos (Singh, 1987; Wrathall, 1995).

Outro fator importante na transmissão de agentes pelo embrião é a patogenia da doença, especialmente quanto à predileção do patógeno pelo trato genital. Agentes carregados pelo sangue podem, também, ganhar acesso ao trato genital, aumentando o risco no caso de qualquer hemorragia uterina, o que ocorre, inevitavelmente, durante a colheita de embriões. No caso de outros agentes de doenças que têm predileção por pele ou vísceras, a probabilidade de contaminação do embrião é remota, todavia tais agentes, ocasionalmente, produzem infecções generalizadas, e mesmo as localizadas podem causar contaminação dos meios, das soluções e do equipamento (Andrioli *et al.*, 2003).

A TE torna possível a obtenção de um grande número de crias em um curto intervalo de tempo e tem sido considerada a técnica mais segura para o trânsito internacional de material genético (Castro *et al.*, 1992; Philpott, 1993). Isto se deve à utilização das normas sanitárias da Sociedade Internacional de Transferência de Embriões (IETS) as quais têm o intuito de minimizar os riscos de transmissão de patógenos. Dentre essas normas, está a não utilização de embriões com zona pelúcida rompida, pois essa região se caracteriza como uma barreira natural contra a entrada de patógenos no embrião. Outra técnica adotada é a lavagem dos embriões, a qual visa retirar por lavagem qualquer patógeno que possa estar aderido à zona pelúcida, podendo se utilizar para isto meios de lavagem que contenham enzimas que facilitem essa remoção, como a tripsina (Pinheiro *et al.*, 2001).

Desta forma, a TE pode suprir a necessidade de rápida reposição dos animais puros infectados, com obtenção de crias sadias e manutenção da qualidade genética do plantel, possibilitando a importação de material genético com segurança, mesmo se utilizando fêmeas infectadas, obtendo, com isso, resultados satisfatórios no âmbito econômico, sanitário, reprodutivo e do melhoramento genético (Andrioli *et al.*, 2003).

### *Produção in vitro de embriões (PIV)*

Essa é uma biotécnica utilizada, alternativamente, para acelerar a produção de animais geneticamente superiores e impedir o descarte precoce de fêmeas geneticamente privilegiadas e que não podem reproduzir de forma natural ou até mesmo pela transferência de embriões. A PIV consiste nas etapas de colheita, maturação, fecundação de oócitos e cultivo de zigotos (Gonçalves *et al.*, 2001).

Para essa biotecnologia, são levados em consideração os mesmos riscos de contaminação do sêmen ou dos embriões citados anteriormente. Valendo ressaltar que o espermatozóide pode, na ocasião da fecundação, carrear o patógeno consigo para dentro do oócito, podendo o agente da doença estar no interior do espermatozóide, na sua superfície ou no líquido seminal, o que irá comprometer todo o esforço para produzir embriões em larga escala.

Atualmente, para o uso dessas biotécnicas, existe um controle bem maior de infecções bacterianas, tanto dos gametas que são submetidos a lavagens com soluções assépticas para remover microrganismos que possam estar aderidos a eles, quanto dos meios e soluções utilizadas na manipulação, que são produzidos com assepsia adequada e contém antibióticos na sua formulação. Uma vez que diversos estudos foram realizados com sucesso, testando-se o uso de antibióticos nos meios de coleta, maturação, fecundação e cultivo, os profissionais da área passaram a utilizar este recurso rotineiramente para prevenir possíveis contaminações (Gonçalves *et al.*, 2001).

Pensando nisso, Givens *et al.* (2006) testaram a utilização de um composto antiviral o 2-(4-[2-imidazolil] fenil)-5-(4-metoxifenil) furano (DB606) contra o vírus da diarreia viral bovina (BVDV), na produção *in vitro* de embriões bovinos, observando que a utilização do antiviral não interferiu no sistema de cultivo dos embriões, nem nas taxas de prenhez, nascimento e viabilidade de neonatos. Esse experimento demonstra a possibilidade de utilização de agentes antivirais como medida preventiva contra contaminações por vírus em meios de maturação, fecundação e de cultivo de oócitos, espermatozóides e embriões manipulados *in vitro*. Semelhante ao que já ocorre com a utilização de antimicrobianos contra bactérias e fungos nas biotecnologias reprodutivas, os antivirais podem ser também utilizados preventivamente em todas as manipulações, necessitando para isto da realização de pesquisas para elucidar a ação efetiva dos antivirais e avaliação dos efeitos citotóxicos deles para as células reprodutivas, o que poderá possibilitar no futuro a utilização de material genético de animais com infecção viral.



### *Manipulação de oócitos inclusos em folículos ovarianos pré-antrais (MOIFOPA)*

A MOIFOPA é uma biotécnica que consiste no isolamento ou resgate de folículos pré-antrais (FOPAS) a partir de ovários, seguido das etapas de conservação e/ou cultivo folicular, visando ao crescimento, maturação e fecundação *in vitro* dos oócitos previamente inclusos em FOPAS. As vantagens do emprego atual e futuro dessa biotécnica vão desde o aumento da eficiência reprodutiva de animais de alto valor zootécnico, passando pela utilização de ovários de animais portadores de patologias graves de ovidutos e/ou útero, até a recuperação de rebanhos eliminados por problemas sanitários (Figueiredo *et al.*, 2001).

Recentemente, em cabras portadoras do vírus da artrite encefalite caprina, Silva (2006) observou pela técnica de PCR *nested* a presença desse vírus nos folículos pré-antrais desses animais, porém, ainda não se sabe a localização exata desse vírus no folículo, se no oócito, ou nas células da granulosa, as quais já demonstraram ser permissivas a esse vírus *in vitro* (Lamara *et al.*, 2001).

Para se evitar a contaminação de folículos pré-antrais em cultivo, o ideal seria realizar um teste diagnóstico molecular nas amostras do tecido ovariano e, ainda assim, mesmo com o resultado negativo para algum patógeno, seria aconselhável realizar o cultivo dos folículos isoladamente, para que um único folículo contaminado não venha a comprometer os demais.

### *Criopreservação*

A técnica de criopreservação de gametas foi desenvolvida com intuito de formar bancos de germoplasma animal. Esta tem sido protocolada e utilizada para a preservação de material genético como sêmen (Storey *et al.*, 1998), embriões (Otoi *et al.*, 1998) e oócitos oriundos de folículos antrais (Bosch *et al.*, 2004; Mochida *et al.*, 2003) e pré-antrais (Amorim *et al.*, 2003; Rodrigues *et al.*, 2004) de alguns animais domésticos.

O objetivo da preservação consiste em garantir que as células permaneçam com uma baixa taxa metabólica durante um determinado período de estocagem, podendo, durante esse período, serem resgatadas a fim de continuar o seu desenvolvimento normal. Entretanto, para que isso seja possível mesmo após longos períodos de preservação, alguns fatores essenciais para a sobrevivência das células devem ser levados em consideração, tais como: temperatura, tempo de preservação, tipo e concentração do crioprotetor, dentre outros (Santos *et al.*, 2004).

Já foi citada a possibilidade de contaminação de amostras seminais criopreservadas em *pellets* por meio de nitrogênio líquido, a partir de outras amostras de *pellets* contaminados inseridos em tal cultura, o que também poderia acontecer com embriões ou oócitos (Hare, 1985; Thibier e Guérin, 2000). A conservação de material genético também pode ser feita por meio de fragmentos de ovário, sendo esta uma opção estratégica para conservar as funções gametogênicas e esteroidogênicas, porém esses fragmentos são utilizados posteriormente para transplante, seja para o mesmo animal ou não (Santos *et al.*, 2004), podendo conter patógenos que venham a contaminar outras amostras por meio do nitrogênio líquido e também as receptoras do fragmento transplantado.

Para que isto não venha a ocorrer, seria ideal que cada amostra, antes de ser criopreservada, fosse testada por meio de técnicas bastante sensíveis como a PCR, sendo as amostras positivas descartadas e somente as negativas preservadas para poderem posteriormente ser utilizadas com segurança (Silva, 2006).

### *Transgênese*

O objetivo da biotécnica de transgênese é produzir animais que possuam uma incorporação estável de fragmento de DNA exógeno em sua linhagem germinativa. As técnicas atualmente adotadas na obtenção de animais transgênicos são: microinjeção de genes em pronúcleos de oócitos fecundados, transferência de DNA mediada por espermatozoides durante a fecundação *in vitro*, transferência nuclear com células somáticas, biobalística, dentre outras (Wheeler *et al.*, 2001).

A transgênese é a única biotecnologia da reprodução em que a presença de um vírus em alguns casos é de fundamental importância, isto porque um dos métodos de transferência de genes é utilizando-se retrovírus (Varmus, 1998).

Os retrovírus são vírus pertencentes à família Retroviridae; são RNA vírus que possuem uma enzima transcriptase reversa, imprescindível para sua replicação, capaz de promover a síntese de uma cópia de DNA de fita dupla a partir do RNA viral. Pela ação da integrase, o DNA transcrito é integrado de forma estável ao genoma da célula hospedeira, comportando-se, então, como um gene celular residente, podendo permanecer dessa forma por longos períodos ou prosseguir a sua replicação com posterior tradução de proteínas, montagem da partícula viral e saída dessa da célula por brotamento (Peçanha *et al.*, 2002).

Por esta capacidade de tradução e integração ao genoma celular, os retrovírus são utilizados como um sistema natural de transferência para introduzir DNA em vários tipos de células de mamíferos. Tanto retrovírus naturais, quanto aqueles produzidos por engenharia genética podem ser utilizados para infectar células de embriões de mamíferos. A principal vantagem da transferência de genes, mediada por retrovírus, é a facilidade técnica de expor vírus a embriões em vários estádios de desenvolvimento. No entanto, o tamanho da seqüência



de DNA transferida é limitado, e o gene inserido não é sempre expresso na segunda geração (Varmus, 1998).

Apesar de se empregar agentes infecciosos, o controle sanitário nessa biotecnologia é imprescindível, mas vale ressaltar que o risco de contaminação é descartado quando se faz uso de retrovírus inespecíficos para a espécie animal em que se deseja empregar esta biotécnica. Desta forma, o vírus utilizado deve ser inofensivo para os embriões transgênicos.

A realização de estudos com o intuito de se averiguar a sanidade e a possibilidade de utilização do material genético de animais acometidos por enfermidades víricas é importante, as principais razões já foram citadas anteriormente. Porém, deve-se ter cuidado para que o uso de biotecnologias não venha a veicular ainda mais patógenos. Nesse contexto, o desenvolvimento de métodos de diagnóstico pelo uso da biologia molecular vem cada vez mais auxiliar o controle de enfermidades víricas nos rebanhos.

### Referências

- Amorim CA, Rondina D, Rodrigues APR, Costa SHF, Gonçalves PBD, Figueiredo JR, Giorgetti A.** Isolated ovine primordial follicles cryopreserved in different ethylene glycol concentrations. *Theriogenology*, v.60, p.735-742, 2003.
- Andrioli-Pinheiro A.** Vírus da Artrite Encefalite Caprina: PCR e isolamento viral em amostras de sêmen, fluido uterino e embriões. 2001. 68f. Tese (Doutorado) - Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2001.
- Andrioli A, Gouveia AMG, Pinheiro RR.** Seleção de sêmen de reprodutores portadores do vírus da artrite encefalite caprina através da técnica de reação em cadeia da polimerase. Sobral, Comunicado técnico. EMBRAPA-CNPC, 2003, n.50, 23 p.
- Bosch P, Hernandez-Fonseca HJ, Millen DM, Wininger JD, Massey B, Lamb SV, Brackett BG.** Development of antral follicles in cryopreserved cat ovarian tissue transplanted to immunodeficient mice. *Theriogenology*, v.61, p.581-594, 2004.
- Castro RS, Leite RC, Abreu JJ.** Prevalence of antibodies to selected viruses in bovine embryos donors and recipients from Brazil, and its implications in international embryo trade. *Trop Anim Hlth Prod*, v.24, p.173-176, 1992.
- Concha-Bermejillo A, Magnus-Corral S, Brodie SJ, Demartini JC.** Veneral shedding of ovine lentivirus in infected rams. *Am J Vet Res*, v. 7, p.684-688, 1996.
- Feldman EC, Nelson RW.** *Canine and feline endocrinology and reproduction*. Philadelphia: WB Saunders, 1996.
- Figueiredo JR, Rodrigues APR, Amorim CA.** Manipulação de oócitos inclusos em folículos ovarianos pré-antrais - MOIFOPA. In: Gonçalves PBD, Figueiredo JR, Freitas VJF. *Biotécnicas aplicadas à reprodução animal*. São Paulo: Varela, 2001. p.227-260.
- Givens MD, Stringfellow DA, Riddell KP, Galik PK, Navarre CB.** Normal calves produced after transfer of in vitro fertilized embryos cultured with an antiviral compound. *Theriogenology*, v. 65, p. 344-355, 2006.
- Gonçalves PBD, Visitin JA, Oliveira MAL, Montagner MM, Costa LFS.** Produção *in vitro* de embriões. In: Gonçalves PBD, Figueiredo JR, Freitas VJF. *Biotécnicas aplicadas à reprodução animal*. São Paulo: Varela, 2001. p.195-226.
- Guerin B, Nibart M, Le Guienne B, Humblot P.** Sanitary risks related to embryo transfer in domestic species. *Theriogenology*, v.47, p.33-42, 1997.
- Hafez B, Hafez ESE.** Reprodução Animal, 7.ed. Barueri: Manole, 2004, p.97-103.
- Hare WCD.** *Enfermedades transmissibles por el semen y las tecnicas de transferencia de embriones*. Paris: Office International des Epizooties, 1985.
- Kreutz LC.** Imunidade contra vírus. In: Madruga CR, Araújo FR, Soares CO. *Imunodiagnóstico em Medicina Veterinária*. Campo Grande: Embrapa Gado de Corte, 2001. p.19-45.
- Lamara A, Fieni F, Mselli-Lakhal L, Tainturier D, Chebloune Y.** Efficient replication of caprine arthritis encephalitis virus in goat granulose cell. *Virus Res*, v.79, p.165-172, 2001.
- Mochida Y, Takemura Y, Kanda T, Horie Y.** Fertilized eggs obtained from transplantation of frozen ovaries and parthenogenesis in combination with artificial insemination of frozen sêmen of the silkworm, *Bombyx mori*. *Criobiology*, v.46, p.153-160, 2003.
- Otoi T, Yakamoto K, Koyama N, Suzuki T.** Cryopreservation of mature bovine oocytes by vitrification in straws. *Criobiology*, v.37, p.77-85, 1998.
- Peçanha EP, Antunes OAC, Tanuri A.** Estratégias farmacológicas para a terapia anti-AIDS. *Quím Nova*, v.25, p.1108-1116, 2002.
- Philpott M.** The dangers of disease transmission by artificial insemination and embryo transfer. *Br Vet J*, v.149, p.339-369, 1993.
- Pinheiro RR, Gouveia AMG, Alves FSF.** Prevalência da infecção pelo vírus da artrite encefalite caprina no estado do Ceará, Brasil. *Ci Rur*, v.31, p.449-454, 2001.
- Reichenbach HD, Oliveira MAL, Lima PF, Santos Filho AS, Andrade JCO.** Transferência e criopreservação de embriões bovinos. In: Gonçalves PBD, Figueiredo JR, Freitas VJF. *Biotécnicas aplicadas à reprodução*



*animal.*. São Paulo: Varela, 2001. p.127-177.

**Rodrigues APR, Amorim CA, Costa SHF, Matos MHT, Santos RR, Lucci CM, Bão SN, Ohashi OM, Figueiredo JR.** Cryopreservation of caprine ovarian tissue using glycerol and ethylene glycol. *Theriogenology*, v.61, p.1009-1024, 2004.

**Santos RR, Rodrigues APR, Martins FS, Matos MHT, Celestino JJH, Figueiredo JR.** Preservação de folículos pré-antrais de pequenos ruminantes. *Ci Anim*, v.14, p.7-19, 2004.

**Silva JBA.** *Vírus da Artrite Encefalite Caprina (CAEV) em folículos pré-antrais de cabras naturalmente infectadas.* 2006. 90f. Tese (Doutorado em Ciências Veterinárias) - Universidade Estadual do Ceará, Fortaleza, 2006.

**Silva LDM.** Tecnologia do sêmen canino. In: Simpósio Cearense de Ciência Animal, 1, 1999, Fortaleza. Anais... Fortaleza: Sociedade Cearense de Ciência Animal, 1999. p.43-49.

**Silva LDM, Silva AR, Cardoso RCS.** Inseminação artificial em cães. In: Gonçalves PBD, Figueiredo JR, Freitas VJF. *Biotécnicas aplicadas à reprodução animal.* São Paulo: Varela, 2001. p.69-95.

**Singh EL.** The disease control potential of embryos. *Theriogenology*, v.27, p.9-20, 1987.

**Storey BY, Noyles EE, Thompson KA.** Comparison of glycerol, other polyols, trehalose, and raffinose to provide a defined cryoprotectant medium for mouse sperm cryopreservation. *Criobiology*, v.37, p.45-58, 1998.

**Thibier M, Guérin B.** Hygienic aspects of storage and use of semen for artificial insemination. *Anim Reprod Sci*, v.62, p.233-251, 2000.

**Varmus H.** Retroviruses. *Science*, v.240, p.1427-1435, 1998.

**Wheeler MB, Choi SJ, Voelker GR, Walters EM, Cezar GG.** Produção de animais transgênicos nas espécies domésticas: tecnologia e aplicações. In: Gonçalves PBD, Figueiredo JR, Freitas VJF. *Biotécnicas aplicadas à reprodução animal.* São Paulo: Varela, 2001. p.303-340.

**Wrathall AE.** Embryo transfer and disease transmission in livestock a review of recent research. *Theriogenology*, v.43, p.81-88, 1995.

---