

**UNIVERSIDADE ESTADUAL VALE DO ACARAÚ
PROGRAMA DE MESTRADO EM ZOOTECNIA**

**UTILIZAÇÃO DO DODECIL SULFATO DE SÓDIO (SDS) NO LEITE E
COLOSTRÓ COMO INATIVADOR QUÍMICO DO VÍRUS DA ARTRITE-
ENCEFALITE CAPRINA**

ANA LÍDIA MADEIRA DE SOUSA

**SOBRAL - CE
FEVEREIRO - 2016**



UNIVERSIDADE ESTADUAL VALE DO ACARAÚ
PROGRAMA DE MESTRADO EM ZOOTECNIA

**UTILIZAÇÃO DO DODECIL SULFATO DE SÓDIO (SDS) NO LEITE E
COLOSTRÓ COMO INATIVADOR QUÍMICO DO VÍRUS DA ARTRITE-
ENCEFALITE CAPRINA**

ANA LÍDIA MADEIRA DE SOUSA

SOBRAL - CE
FEVEREIRO - 2016

ANA LIDIA MADEIRA DE SOUSA

UTILIZAÇÃO DO DODECIL SULFATO DE SÓDIO (SDS) NO LEITE E
COLOSTRO COMO INATIVADOR QUÍMICO DO VÍRUS DA ARTRITE-
ENCEFALITE CAPRINA

Dissertação apresentada ao Programa de
Mestrado em Zootecnia, da Universidade
Estadual Vale do Acaraú, como requisito
parcial para obtenção do Título de
Mestre em Zootecnia.

Área de Concentração: Produção Animal

ORIENTADOR:
PROF. DR. RAYMUNDO RIZALDO PINHEIRO

CO-ORIENTADORA:
PROF. DRA. ALICE ANDRIOLI

SOBRAL - CE
FEVEREIRO – 2016

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação

Universidade Estadual Vale do Acaraú

Sistema de Bibliotecas

Sousa, Ana Lúcia Madeira de
UTILIZAÇÃO DO DODECIL SULFATO DE SÓDIO (SDS) NO LEITE
E COLOSTRO COMO INATIVADOR QUÍMICO DO VÍRUS DA
ARTRITE-ENCEFALITE CAPRINA [recurso eletrônico] / Ana Lúcia
Madeira de Sousa. -- Sobral, 2016.

1 CD-ROM: il. ; 4 ³/₄ pol.

CD-ROM contendo o arquivo no formato pdf do trabalho
acadêmico com 88 folhas.

Orientação: Prof. Dr. Raymundo Rizaldo Pinheiro.

Co-Orientação: Prof.^a Dra. Alice Andrioli.

Dissertação (Pós-graduação em Zootecnia) - Universidade
Estadual Vale do Acaraú / Centro de Ciências Agrárias e Biológicas

1. Sistema monicítico-fagocitário. 2. inativação química. 3.
CAEV. I. Título.

ANA LIDIA MADEIRA DE SOUSA

**UTILIZAÇÃO DO DODECIL SULFATO DE SÓDIO (SDS) NO LEITE E
COLOSTRO COMO INATIVADOR QUÍMICO DO VÍRUS DA ARTRITE-
ENCEFALITE CAPRINA**

Dissertação defendida e aprovada em: 29 / fevereiro / 2016 pela Comissão

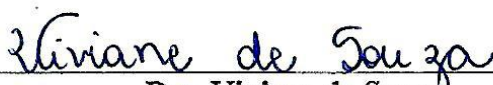
Examinadora:



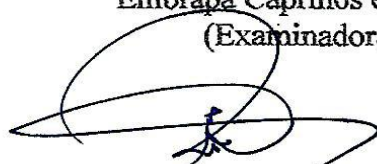
Dra. Alice Andrioli
Embrapa Caprinos e Ovinos
(Co-orientadora e examinadora)



Dra. Kelma Costa de Souza
Instituto Vale do Acaraú - IVA
(Examinadora)



Dra. Viviane de Souza
Embrapa Caprinos e Ovinos
(Examinadora)



Dr. Raymundo Rizaldo Pinheiro
Universidade Estadual Vale do Acaraú – UVA
Embrapa Caprinos e Ovinos
Presidente

SOBRAL - CE
FEVEREIRO - 2016

*Á minha família, porto seguro em minha vida,
principalmente aos meus pais, Francisca e José Maria.*

Dedico

AGRADECIMENTOS

A **DEUS**, pelo dom da vida, e por todas as maravilhas que me concede todos os dias;

Ao Mestrado em Zootecnia, em especial a todos os professores pelos ensinamentos. Além da coordenação do curso, professora Aline e a Joyce, por sempre estarem dispostas a ajudar;

À CAPES pela concessão da bolsa;

À EMBRAPA por fornecer todo o aparato para a realização do experimento;

Aos meus pais, Francisca e José Maria, que apesar das dificuldades, me ensinarem os valores da vida, por darem-me muito amor e carinho em todos os momentos, e sempre acreditarem em meus sonhos;

Aos meus irmãos, Sandra, Sergio e Felipe, e aos meus sobrinhos travessos, Arthêmys, Arthur, Luan e Laura, por sempre estarem próximos a mim nos momentos difíceis e nas horas de descontração;

Ao Jael Martins, meu companheiro de todas as horas, pela compreensão, carinho, amor e paciência durante esta jornada;

Ao Dr. Rizaldo, querido orientador, e exemplo a ser seguido, obrigada pelas oportunidades, pelos ensinamentos, por estar sempre disponível e por acreditar na capacidade de sua equipe;

Á Dra. Alice, exemplo de mulher, pesquisadora e mãe, obrigada pelos ensinamentos, disponibilidades e co-orientação;

Ás Dras. Viviane e Kelma por fazerem parte da banca de qualificação e de defesa, e auxílio nas correções dos capítulos;

Às minhas queridas “Viruletes”: Juscilânia e Dalva, por sempre estarem disponíveis, independente do momento, pelas horas de descontração, mais uma vez, muito obrigada pela sincera amizade de vocês;

Aos meus amigos Wanderlan e Edgar pela ajuda nas coletas e na realização dos testes laboratoriais;

Aos meus queridos amigos de Embrapa: Renato, Milena, Kelma, Thiago, Carla, Samile, e mais uma vez, Dalva, Laninha, Wanderlan, Edgar e Davi por sempre poder contar com a ajuda de vocês, que foi crucial para a realização do experimento;

Aos amigos de turma de mestrado: Katiane, Dalilian, Priscila, Ylana, Bruna, Graziela, Romênia, Anacláudia, Ylana, Joiane e Fábio por fazerem parte dessa jornada comigo;

Aos meus queridos amigos: Daniele, Sueli e Rafael por me concederem momentos de descontração, alegria e apoio nas horas difíceis;

Ao João Ricardo e a Jéssica, obrigada por sempre estarem disponíveis para ajudar, mesmo que essa ajuda fosse depois do expediente;

Ao Eduardo, pela grande ajuda nas experimentações a campo;

Á Osmarilda, por sempre está disposta a ajudar nas atividades do laboratório;

Aos funcionários e amigos da EMBRAPA, laboratoristas e manejadores: Dona Helena, Nóbrega, Jamile, Márcio, Felipe, Agenor, Diniz, Gonzaga, Valdir, Carlos, Expedito e os colegas Orlando e Alex;

A todos, muito obrigada!

“O mundo está nas mãos daqueles
que tem a coragem de sonhar e correr o
risco de viver seus sonhos.”

Paulo Coelho

SUMÁRIO

	PÁGINAS
LISTA DE TABELAS.....	XI
LISTA DE FIGURAS.....	XII
LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS.....	XIV
RESUMO GERAL.....	XVI
GENERAL ABSTRACT.....	XVIII
CONSIDERAÇÕES INICIAIS.....	19
CAPÍTULO 1 - REFERENCIAL TEÓRICO.....	20
INTRODUÇÃO.....	21
LENTIVIRUS DE PEQUENOS RUMINANTES.....	21
Etiologia.....	21
Constituição viral do CAEV.....	22
Tropismo viral	23
Transmissão	24
Sinais clínicos	25
Tratamento, controle e diagnóstico	27
Perdas econômicas	29
COLOSTRO E LEITE: DEFINIÇÕES BÁSICAS	29
Caracterização, composição química, imunológica e microbiológica	29
Tratamentos Térmicos no Colostro e Leite.....	31
Utilização do Dodecil Sulfato de Sódio no Leite.....	32
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	34
CAPÍTULO 2 - AVALIAÇÃO <i>IN VITRO</i> DO DODECIL SULFATO SÓDIO (SDS) EM COLOSTRO E LEITE CAPRINO:	
atividade citotóxica e inibição viral.....	44
RESUMO	45
ABSTRACT	46
INTRODUÇÃO	47
MATERIAL E MÉTODOS	48
Local e período do experimento	48

Coleta, separação e cultura de leucócitos do sangue.....	48
Coleta de colostro e leite de cabra	49
Tratamento com SDS em colostro e leite	49
Avaliação das células somáticas do colostro e leite	50
Co-cultivo com membrana sinovial caprina (MSC)	50
Extração de DNA do leite e colostro	51
Extração de DNA-proviral de sobrenadante celular	51
Reação em cadeia da polimerase <i>Nested</i> (nPCR).....	52
RESULTADOS E DISCUSSÃO	53
Citotoxicidade do SDS em macrófagos do sangue caprino	53
Citotoxicidade do SDS em células somáticas do colostro e leite.....	55
Efeito do tratamento do colostro e leite caprino com SDS.....	57
Co-cultivo com MSC e células somáticas do colostro e leite.....	58
Análise da suspensão e sobrenadante celular do co-cultivo de colostro e leite por nPCR.....	61
CONCLUSÕES.....	63
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	64
CAPÍTULO 3 - AVALIAÇÃO <i>IN VIVO</i> DO DODECIL SULFATO DE SÓDIO (SDS) COMO INATIVADOR QUÍMICO DO VÍRUS DA ARTRITE - ENCEFALITE CAPRINA (CAEV) EM LEITE E COLOSTRO.....	67
RESUMO.....	68
ABSTRACT.....	69
INTRODUÇÃO.....	70
MATERIAL E MÉTODOS	71
Local e período do experimento	71
Grupos experimentais	71
Diluição do SDS	72
Preparo do inóculo com o SDS e administração do colostro/leite.....	72
Avaliação das alíquotas de colostro e leite positivo para CAE.....	73
Monitoramento dos Animais Experimentais.....	74
Testes de diagnóstico	75
RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	77

PÁGINAS

Avaliação da receptividade dos cabritos ao colostro e leite tratado com SDS.....	77
Resultado do nPCR em colostro e leite caprino	79
Acompanhamento molecular e sorológico dos animais experimentais....	80
CONCLUSÃO.....	83
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	84
CONSIDERAÇÕES FINAIS	88

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO 2	PÁGINA
Tabela 1. Níveis dos efeitos citopáticos nas células de MSC após co-cultivo com células de colostro e leite tratados com SDS.....	59
 CAPÍTULO 3 	
Tabela 1. Descrição dos grupos experimentais.....	72
Tabela 2. Administração do colostro ou leite caprino durante o período do experimento.....	73
Tabela 3. Acompanhamento individual por meio de testes de nPCR e WB dos animais experimentais e controles, Sobral – CE.....	82

LISTA DE FIGURAS

CAPÍTULO 1	PÁGINA
Figura 1. Morfologia do vírus da Artrite-Encefalite Caprina.....	22
Figura 2. Esquemática do genoma viral do CAEV.....	23
Figura 3. Sintomatologia clínica da CAE.....	26
Figura 4. Testes de diagnósticos diretos para CAE.....	27
Figura 5. Testes de imunodiagnósticos para CAE.....	28
Figura 6. Representação química do SDS.....	32
CAPÍTULO 2	
Gráfico 1. Citotoxicidade do SDS em macrófagos do sangue caprino.....	53
Figura 1. Cultura de Macrófagos à diferentes concentrações de SDS.....	54
Figura 2. Avaliação do SDS em colostro caprino.....	55
Figura 3. Avaliação do SDS em leite caprino.....	56
Figura 4. Eletroforese em gel de agarose a 2% corado com brometo de etídio, Exibindo a amplificação do DNA proviral do CAEV (187pb) das amostras de colostro e leite.....	57
Figura 5. Co-cultivo com células de MSC e células somáticas do colostro e do leite.....	60
Figura 6. Eletroforese em gel de agarose a 2% corado com brometo de etídio, exibindo a amplificação do DNA proviral do CAEV (187pb) de 21, 42 e 63 dias de co-cultivo das amostras de colostro e leite.....	61

CAPÍTULO 3

PÁGINA

Figura 1. Efeito do tratamento com SDS <i>in vivo</i>	78
Figura 2. Eletroforese em gel de agarose a 2% corado com brometo de etídio, exibindo a amplificação do DNA proviral do CAEV (187pb) das amostras de colostro e leite de cabras positivas para CAE	80

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

%	Porcentagem
®	Marca registrada
°C	Graus Celsius
µL	Microlitros
Å	Amperes
A	Anfotericina
Ac	Anticorpo
Ag	Antígeno
BIV	Sigla e inglês do Vírus da Imunodeficiência Bovina
C ⁺	Controle positivo
C-	Controle negativo
CAE	Sigla e inglês da Artrite-Encefalite Caprina
CAEV	Sigla e inglês do Vírus da Artrite-Encefalite Caprina
CAEV- Cork	Cepa padrão do Vírus da Artrite-Encefalite Caprina
cel/µL	Células por microlitro
cel/cm ²	Células por centímetro quadrado
CEUA	Comissão de Ética no Uso de Animais
ClCa	Cloreto de cálcio
Cm	Centímetros
CO ₂	Dióxido de carbono
CP	Concentração padrão
DAB	Diaminobezidina
dATP	d'Trifosfato de adenina
dCTP	d'Trifosfato de citidina
dGTP	d'Trifosfato de guanina
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DNase	Desoxiribonuclease
dNTPs	d'Trifosfato de nucleosídeo
dTTP	d'Trifosfato de timidina
EDTA	Ethylenediaminetetraacetic acid
ELISA	<i>Enzyme Linked Immunosorbent Assay</i>
EMBRAPA	Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária
FIV	Sigla e inglês do Vírus da imunodeficiência felina
G	Força centrípeta gravitacional
g	Gramas
h	Horas
H	Hidrogênio
H ₂ O	Molécula de água
HCl	Ácido clorídrico
HeLa	Células humanas de cultura contínua usada em pesquisas científicas
HIV	Sigla e inglês do Vírus da imunodeficiência humana adquirida
HIV-1	Sigla e inglês do Vírus da imunodeficiência humana adquirida tipo I
HPV	Sigla e inglês do Papiloma Vírus

HSV	Sigla e inglês do Hesper Vírus
IBGE	Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
IDGA	Imunodifusão em Gel de Agarose
IUPAC	Sigla e inglês da União Internacional de Química Pura e Aplicada
KCl	Cloreto de potássio
Kg	Quilograma
KH₂PO₄	Fosfato monopotássico
LTR	Long terminal repeat
LVPR	Lentivírus de Pequenos Ruminantes
m	Metro
M	Molar
MAGI	Multinuclear Activation of Galactosidase Indicator
ME	Mix de extração
MEM	Meio essencial mínimo
Mg²⁺	Magnésio
MgCl₂	Cloreto de magnésio
min	Minutos
mL	Mililitros
MM	Mister mix
mM	Milimolar
MN	Membrana de nitrocelulose
MNC	Membrana nictitante caprina
MSC	Membrana sinovial caprina
MVV	Vírus Maedi-Visna
Na₂HPO₄	Fosfato dissódico
NaCl	Cloreto de sódio
nPCR	Reação em cadeia da polimerase nested (aminhada)
ORF	Open reading frames
P/S	Penicilina e estreptomicina
Pb	Pares de base
PBS	Tampão sódio fosfato
PCR	Reação em cadeia da polimerase
<i>Pellet</i>	Pequenas porções de material aglomerado ou comprimido
pH	Potencial de hidrogênio
PMSF	Phenylmethylsulphonyl fluoride
<i>Pool</i>	Amostra preparada a partir de uma seleção representativa de amostras iniciais
PV	Peso vivo
RPMI	Meio roswell park memorial institute
RNA	Ácido ribonucleico
SDS	Dodecil sulfato de sódio
SDS-PAGE	Eletroforese em gel de poliacrilamida com dodecil sulfato de sódio
SFB	Soro feral bovino
SLS	Lauril sulfato de sódio
TA	Tampão de amostra

RESUMO GERAL

A Artrite-Encefalite Caprina (CAE) é uma enfermidade incurável que afeta caprinos, causando uma infecção multissistêmica e crônica, que ocasiona grandes perdas econômicas. Clinicamente, os animais são acometidos com mastite, artrite, emagrecimento progressivo, pneumonia e problemas neurológicos. O agente causador, o vírus da Artrite-Encefalite Caprina (CAEV) apresenta tropismo por células da linhagem monocítica-fagocitária, que estão diretamente associadas a principal via de transmissão, por meio da ingestão de leite e colostro provindo de cabras infectadas. Deste modo, o controle por esta via é de suma importância. Atualmente, vem se desenvolvendo pesquisas para o uso de aditivos químicos no leite, que possam conservar o colostro ou leite, e inativar agentes microbiológicos presentes. Dentre estes, o dodecil sulfato de sódio (SDS) vem apresentando resultados satisfatórios na inativação química do vírus da imunodeficiência humana (HIV) em leite e como biocida em colostro caprino. Portanto, visou-se avaliar a atividade do SDS como inativador químico do vírus da CAE, tanto *in vitro* quanto *in vivo*. No experimento *in vitro*, avaliou-se a citotoxicidade e as propriedades de inativação viral do SDS no colostro e no leite caprino, por meio de culturas de macrófagos e co-cultivo em membrana sinovial caprina (MSC). Fez-se uso do SDS a 1%; 0,5%; 0,25%, durante 15 minutos, nos tratamentos do colostro e do leite. Removeu-se o SDS por meio de lavagens com tampão fosfato. Em seguida, as amostras foram destinadas a testes moleculares e ao co-cultivo com MSC, durante 63 dias. Após o co-cultivo, houve avaliação dos efeitos citopáticos virais, característicos ao lentivírus caprino, ocasionados nas células de MSC. Experimentalmente, no colostro, observou-se que o SDS (0,25; 0,5 e 1%) apresentou, uma atividade inibitória contra o CAEV, sem ocorrer à inativação viral. No leite, o SDS a 0,25; 0,5% apresentou atividade inibitória contra o CAEV, e na concentração de 1% de SDS houve inativação do vírus em cultura. No teste *in vivo*, utilizaram-se 31 cabritos recém-nascidos, e negativos para CAE, confirmado por meio de testes de reação em cadeia da polimerase *nested* (nPCR) e *Western Blot* (WB). Os cabritos foram alimentados com colostro e leite providos de cabras positivas para CAE, tratados com SDS nas mesmas concentrações do teste *in vitro*, com tempo de ação de 15 minutos. Os animais foram acompanhados por nPCR nos seguintes momentos: 0 h, 7, 15, 30 dias e mensalmente até seis meses de vida e no WB foram acompanhados a 0 h, 90, 120, 150 e 180 dias. Observou-se que as três concentrações de SDS no colostro não trouxeram alterações clínicas significativas no

período de 24h de tratamento. Entretanto, com a continuidade da administração do SDS no leite nas concentrações de 0,5% e 1,0% observou-se diarreia leve, e morte de mais de 50% dos animais, respectivamente. Além disso, as três concentrações de SDS não foram efetivas na inativação do CAEV no colostro e leite caprino, comprovada pela soroconversão dos animais.

Palavras-chave: Sistema monicítico-fagocitário, inativação química, WB, nPCR

GENERAL ABSTRACT

Arthritis-Encephalitis Caprina (CAE) is an incurable disease that affects goats. Causes a multisystemic infection and chronic, which causes important economic losses and clinically animals are affected with mastitis, arthritis, progressive weight loss, pneumonia and neurological problems. Caprine Arthritis-Encephalitis virus (CAEV) presents tropism for cells of monocytic-phagocytic lineage, which are directly associated with the main route of viral transmission through milk and colostrum intake stemmed infected goats. Thus, the control in this way is extremely important. Currently, the use of preservatives and chemical additives for milk has been developing, seeking new agents that can save colostrum or milk, and inactivate microbiological agents presente. Among these, sodium dodecyl sulfate (SDS) has been showing satisfactory results in chemical inactivation of human immunodeficiency virus (HIV) milk and goats as a biocide in colostrum. Therefore, sought to evaluate the activity of the SDS in concentrations of 0.25; 0.5; 1% both in vitro and in vivo. In vitro experiment, the cytotoxicity and viral inactivation properties of SDS in colostrum and goat milk it was investigated by culture of macrophages and co-cultivation caprine synovial membrane (CSM). Was made using 1% SDS; 0,5%; 0,25% (more effective concentrations from previous tests with the study of blood macrophages) for 15 minutes in the treatment of colostrum and milk, and this was removed by washing with phosphate buffer. Then, the samples were designed to molecular assays and co-culture with CSM for 63 days. Experimentally, colostrum, it was found that SDS (0,25; 0,5 and 1%) showed an inhibitory activity against CAEV viral inactivation without occur. In milk, SDS 0.25; 0,5% had inhibitory activity against CAEV, and a concentration of 1% SDS was likely inactivation of the virus in culture. In the in vivo test, they used 31 newborn goats, and negative for CAE by means of polymerase chain reaction test (nPCR) and *Western blot* (WB). These animals were fed colostrum and provided with positive goats milk by CAE, treated with SDS at concentrations of 0,25; 0,5; 1% in 15 minutes activity. The animals were followed by PCR at the following times: 0 hours, 7 days, 15 days, 30 days and monthly up to six months of life and the WB were followed 0h, 90, 120, 150 and 180 days. We observed that the three SDS concentration in colostrum did not cause significant changes in clinical treatment period of 24 hours. However, with continued administration SDS milk in 0.5% and 1,0% concentrations was observed mild diarrhea and death of more than 50% of animals respectively. In

addition, the three concentrations of SDS were not effective in the inactivation of CAEV in goats colostrum and milk, confirmed the seroconversion of the animals.

Keywords: monocyte-phagocyte system, chemical inactivation, WB, nPCR

CONSIDERAÇÕES INICIAIS

A Artrite-Encefalite Caprina (CAE) é uma enfermidade infectocontagiosa que acometem caprinos, causando uma infecção multissistêmica, incurável e crônica. É provocada pelo vírus da Artrite-Encefalite Caprina (CAEV), que pertence ao gênero *Lentivirus* dentro da família Retroviridae.

A CAE tem como principal via de transmissão à ingestão de leite e colostro provindo de cabras infectadas. Deste modo, o controle por esta via é de suma importância, pois uma única ingestão de colostro e/ou leite de cabras soropositivas pode ser suficiente para infectar cabritos nascidos soronegativos. Em animais recém-nascidos, os leucócitos provindos do colostro materno são conhecidos por serem absorvidos no intestino e entrar na circulação periférica, expondo os animais a infecção por meio do trato gastrointestinal, tanto pelo vírus livre como pelo pro-vírus presente no interior de monócitos/macrófagos. Além disso, esta enfermidade compromete seriamente a viabilidade econômica da produção leiteira, por ocasionar aumento no nível de células somáticas presentes no leite (evidenciando a presença de infecção viral), queda na qualidade do leite, a predisposição às infecções secundárias da glândula mamária. Considerando que, atualmente, poucos são os rebanhos leiteiros caprinos no Brasil que não estejam infectados com o vírus da CAE, há a necessidade de implementação de programas de controle eficazes, baratos e práticos.

Estudos vêm sendo realizados em busca de aditivos químicos para o leite, que podem ser definidos como qualquer composto químico e/ou processo que, quando aplicados no leite, retardam alterações causadas pelo crescimento microbiológico de agentes como bactérias, fungos e até vírus.

Dentre estes compostos, o dodecil sulfato de sódio (SDS), que apresenta propriedades biocidas, vem gerando resultados satisfatórios, quando relacionado à inativação química do HIV-1 no leite materno, nas concentrações de 0,1%. Tem apresentado eficiência no uso como antimicrobiano em colostro, nas concentrações de 1% de SDS, quando oferecido a cabritos, onde estes não apresentaram disfunção imunológica e nutricional. A partir dessas evidências, o SDS seria um inativador químico eficiente no controle da CAE. Portanto, uma abordagem citotóxica e de controle viral tanto *in vitro* com *in vivo* se faz necessária para avaliar a ação deste composto quando inserido no colostro ou leite caprino.

CAPÍTULO 1

REFERENCIAL TEÓRICO

INTRODUÇÃO

No Nordeste, a caprinocultura brasileira possui um efetivo de 8.023.070 animais, que representam 91,04% do rebanho nacional, onde os estados da Bahia, Pernambuco, Piauí, Ceará e Paraíba são respectivamente, os mais representativos desta atividade produtiva (IBGE, 2006).

A criação de caprinos está associada aos sistemas tradicionais de subsistência, e aos fatores econômicos, onde a produção animal tende a ser intensificada, exigindo sistemas de criações mais eficientes (SÁ; SÁ, 2006). Entretanto, o manejo alimentar, reprodutivo e sanitário, com diagnósticos tardios de diversas doenças com etiologias diferentes, interferem drasticamente no desempenho da caprinocultura nessa região (PINHEIRO et al., 2003; BRITO, 2009; CARNEIRO, 2011).

A sanidade animal se faz ferramenta indispensável na caprinocultura, podendo repercutir na produção e reprodução animal associado ao produto final desta atividade (CASTRO; MELO, 2001). Um dos problemas sanitários de relevância são as Lentivirose de Pequenos Ruminantes (LVPR), enfermidades provindas de dois grupos filogenéticos, o Vírus da Artrite-Encefalite Caprina (CAEV) e o Vírus Maedi-Visna (MVV) (CRAWFORD; ADAMS, 1981; PASICK, 1998).

Geralmente, essas enfermidades acarretam consideráveis perdas na produção caprina e ovina, podendo comprometer a rentabilidade da atividade na exploração animal (PINHEIRO, 1989). Além disso, ambas as infecções têm como principais sinais clínicos a artrite, encefalite, mastite e com menor frequência problemas respiratórios acometendo animais de todas as idades, independente do sexo ou da raça (FRANKE, 1998).

LENTIVIROSES DE PEQUENOS RUMINANTES (LVPRs)

Etiologia

As LVPRs se caracterizam como enfermidades infectocontagiosas, abrangendo dois importantes grupos filogenéticos, o CAEV e o MVV, que outrora, eram considerados patógenos espécie-específicos, infectando caprinos e ovinos respectivamente. Entretanto, estudos evidenciaram que são capazes de proporcionar

infecção cruzada entre as espécies (PISONI et al., 2005; RAVAZZOLO et al., 2006; SOUZA et al., 2012).

O gênero *Lentivirus*, que provem da família Retroviridae, também pertence a este gênero outros vírus de interesse veterinário e humano, como: o vírus da Anemia Infecciosa Equina (AIEV), das imunodeficiências humana (HIV), bovina (BIV), felina (FIV) e símia (SIV). São complexos não oncogênicos, que geralmente infectam e se multiplicam em monócitos, macrófagos e/ou linfócitos, causando infecção persistente e multi-sistêmica (AIEV, MVV e CAEV), ou associada à síndrome de imunodeficiência (SIV, HIV e FIV) (CLEMENTS; PAYNE, 1994; GONDA, 1994; REISCHAK, 2000; PINHEIRO, 2001).

Constituição viral do CAEV

O CAEV possui conformação de vírions envelopados, com cerca de 80 a 100 nm de diâmetro, com núcleo cônico e denso, contendo duas moléculas idênticas de RNA fita simples, não complementares, com aproximadamente 9000 a 10000 pares de bases, uma molécula de transcriptase reversa dependente de Mg^{2+} e proteínas do nucleocapsídeo (Figura 1) (GONDA et al., 1986). O envelope está associado covalentemente com as glicoproteínas transmembranárias e de superfície. A matriz também é outra estrutura presente na partícula viral e esta está situada entre o capsídeo e o envelope (PEPIN et al., 1998).

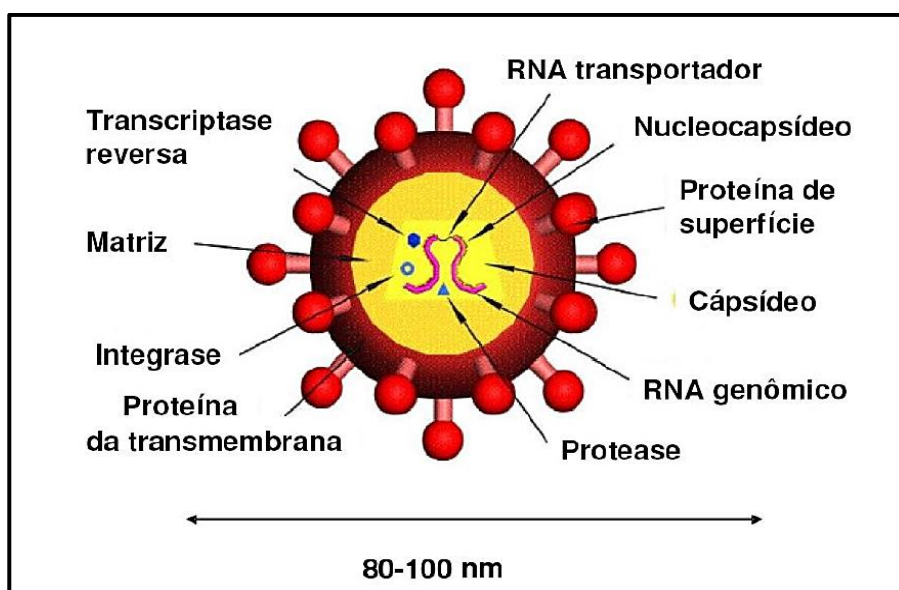


Figura 1. Morfologia do Vírus da Artrite-Encefalite Caprina (BORDERÍAS, 2004)

O genoma é composto por genes estruturais (*gag*, *env* e *pol*), genes de regulação (*tat*, *rev* e *vif*) e por duas regiões não traduzidas, únicas, situadas nas extremidades 5' (RU5) e 3' (RU3), que apresentam elementos promotores da transcrição do RNA viral (Figura 2). O DNA proviral resultante da retrotranscrição apresenta duas regiões terminais não codificadoras (LTR – *long terminal repeat*). Os genes estruturais dispostos da extremidade 5' para 3' do genoma são *gag*, *pol* e *env*, além de pequenas ORF (*open reading frames*): *tat*, *rev* e *vif*, que codificam proteínas reguladoras (CLEMMENTS; PAYNE, 1994; GONDA, 1994).

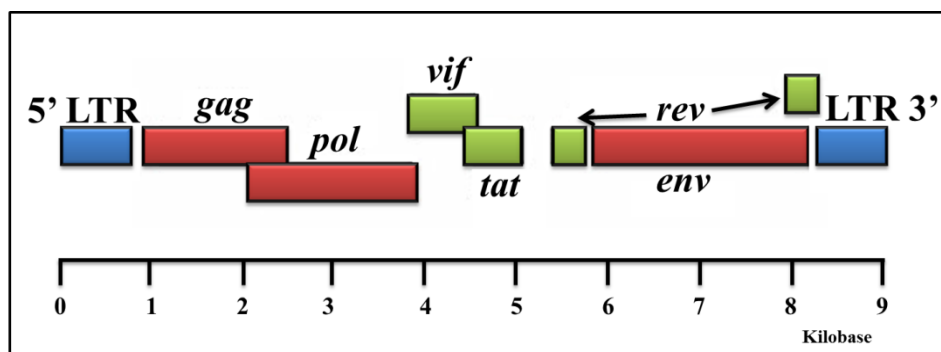


Figura 2. Esquematização do genoma viral do CAEV (OLSEN, 2001), com adaptações.

Tropismo viral

Os LVPR possuem tropismo por células da linhagem monocítico-fagocitária. Nestas células, a expressão viral está estreitamente associada à diferenciação e maturação dos monócitos em macrófagos (GENDELMAN et al., 1986; NARAYAN et al., 1983), sendo que *in vivo*, infectam principalmente esta linhagem celular, onde os macrófagos em geral são os mais infectados (NARAYAN; CLEMMENTS, 1989; LUJÁN et al., 1994; BRODIE et al., 1995). Linfócitos também são infectados, entretanto não possuem multiplicação viral (ZINK; JOHNSON, 1994).

Segundo Zink et al. (1990), outras células podem também servir como áreas de replicação viral, como as células da membrana sinovial, oligodentrócitos (PERK, 1990), as células epiteliais intestinais. Contudo, o tropismo vírico por células do sistema imune, particularmente monócitos e macrófagos, é o principal fator responsável pela habilidade dos lentivírus em causar infecções crônicas e persistentes por toda a vida do animal.

Segundo Mselli-Lakhal et al. (1999), culturas de células epiteliais do leite caprino demonstraram susceptibilidade à infecção com CAEV tanto *in vitro* quanto *in vivo*. Além disso, estas células infectadas naturalmente ou experimentalmente, apresentaram um título viral maior que 10^6 TCID₅₀/mL. No entanto, sem apresentarem efeitos citopáticos característicos da infecção pelo lentivírus em cultura. Esta resposta à infecção não é exclusiva de células epiteliais caprinas. Linhagens de células epiteliais humanas, derivadas de diferentes órgãos, também têm demonstrado produzir HIV-1 na ausência de efeito citopático (YAHY et al, 1992; TONIOLO et al., 1995).

O RNA viral foi detectado em células endoteliais, epiteliais, fibroblásticas, células do sistema nervoso, como o plexo coroide e células da glândula mamária (ZINK et al., 1990; BRODIE et al., 1995; SANNA et al., 1999, MSELLI-LAKHAL et al., 1999; LERONDELLE et al., 1999).

Transmissão

O CAEV infecta às células do sistema monocítico-fagocitário, e estas, que estão presentes no sangue, colostro, leite entre outros fluídos biológicos, estabelecem as principais vias de transmissão do vírus. Os rebanhos livres, geralmente se infectam pelo contato com animais portadores, recém-introduzidos no rebanho (ZINK; JOHNSON, 1994).

A transmissão lactogênica é um modelo natural de infecção reconhecida pelos lentivírus de modo geral. Desempenha um papel fundamental na biologia dos LVPRs, além de outros lentivírus, tais como o HIV e o SIV, por exemplo. De fato, esta via de transmissão é considerada o principal modo de infecção por LVPRs em caprinos, garantindo uma disseminação do vírus entre gerações e sua persistência no rebanho, a nível populacional (PISONI et al., 2010; PÉPIN et al., 1998).

A ingestão de leite e colostro provindo de cabras infectadas torna-se a principal via de transmissão da CAE, devido à extensa quantidade de células infectadas, dentre elas, monócitos e/ou macrófagos (ROWE et al., 1992). Cabritos que nascem de matrizes soronegativas e que recebem colostro e/ou leite de cabras soropositivas, logo se tornam infectados, pois uma única ingestão desses fluidos é suficiente para contaminá-los (RADOSTITS et al., 2002).

Os leucócitos maternos são conhecidos por serem absorvidos no intestino em animais recém-nascidos e entrarem na circulação periférica (SCHNORR; PEARSON,

1984). A grande permeabilidade do intestino de animais recém-nascidos facilita a entrada do vírus através da ingestão de colostro infectado (PÉPIN et al., 1998). Segundo Herrmann-Hoesing et al., (2007), os animais são expostos a infecção na ingestão do colostro, tanto pelo vírus livre como pelo pro-vírus presente no interior de monócitos/macrófagos.

Dentre outras vias de transmissão da CAE, destacam-se:

- Via reprodutiva: a detecção do vírus no sêmen de reprodutores, naturalmente e experimentalmente infectados, sugere, a transmissão por esta via (TRAVASSOS et al., 1999; ANDRIOLI et al., 2002; 2006; SOUZA, 2012), sendo recomendado que estes animais sejam retirados dos sistemas de reprodução (GOUVEIA, 1994);
- Via horizontal: descreve-se como o contato direto entre animais, por meio de fezes, saliva, secreções urogenital e respiratória (ADAMS et al., 1983; RADOSTITS et al., 2002). Souza et al., (2015) verificou que o contato direto, por 30 dias, de animais infectados e sadios causou a infecção de 75% (6/8) dos animais sãos;
- Via vertical: ocorre por via transplacentária. Segundo East et al., (1993) esta via também é possível, uma vez que foi observada a soroconversão em cabritos separados logo após o nascimento e alimentados com colostro e leite bovino pasteurizado. Apesar da baixa frequência, a transmissão ocorre, e tem repercussão no programa de controle (RODRIGUES, 2012).

Sinais clínicos

Os principais indicativos clínicos da CAE são: presença de lesões nas articulações, no sistema respiratório, sistema nervoso e nas glândulas mamárias, além do emagrecimento progressivo dos animais (Figura 3) (PISONI et al., 2007).

A forma articular é considerada a mais importante, geralmente observada em animais com mais de oito meses de idade. Com o avançar da enfermidade o animal apresenta aumento de volume da articulação, claudicação intensa e dificuldade de locomoção (CRAWFORD; ADAMS, 1981; OLIVER et al., 1981; GONZALEZ et al., 1987; CUTLIP et al., 1988). A sintomatologia nervosa da CAE ocorre mais frequentemente em crias e, ocasionalmente em adultos. Os cabritos apresentam dificuldade de locomoção, que progride para uma paralisia, evoluindo para tetraplegia (RADOSTITS et al., 2002; PUGH, 2004).

Na forma mamária, as cabras podem desenvolver mastite aguda ou crônica. Essa se instala durante a lactação e caracteriza-se por uma inflamação intersticial com endurecimento do úbere, e a consistência da glândula mamária apresenta-se rígida à palpação. Além disso, esta enfermidade pode promover a redução dos níveis de gordura, de proteína, e o aumento de células somáticas no leite de cabras infectadas (SMITH; CUTLIP, 1988; BRITO, 2009; CARNEIRO, 2011). Essa forma clínica traz grande preocupação ao caprinocultor, pois a infecção pelo CAEV está diretamente relacionada com a produção leiteira na qual diminui significativamente na presença da enfermidade (BRITO, 2009; KONISHI et al., 2011).

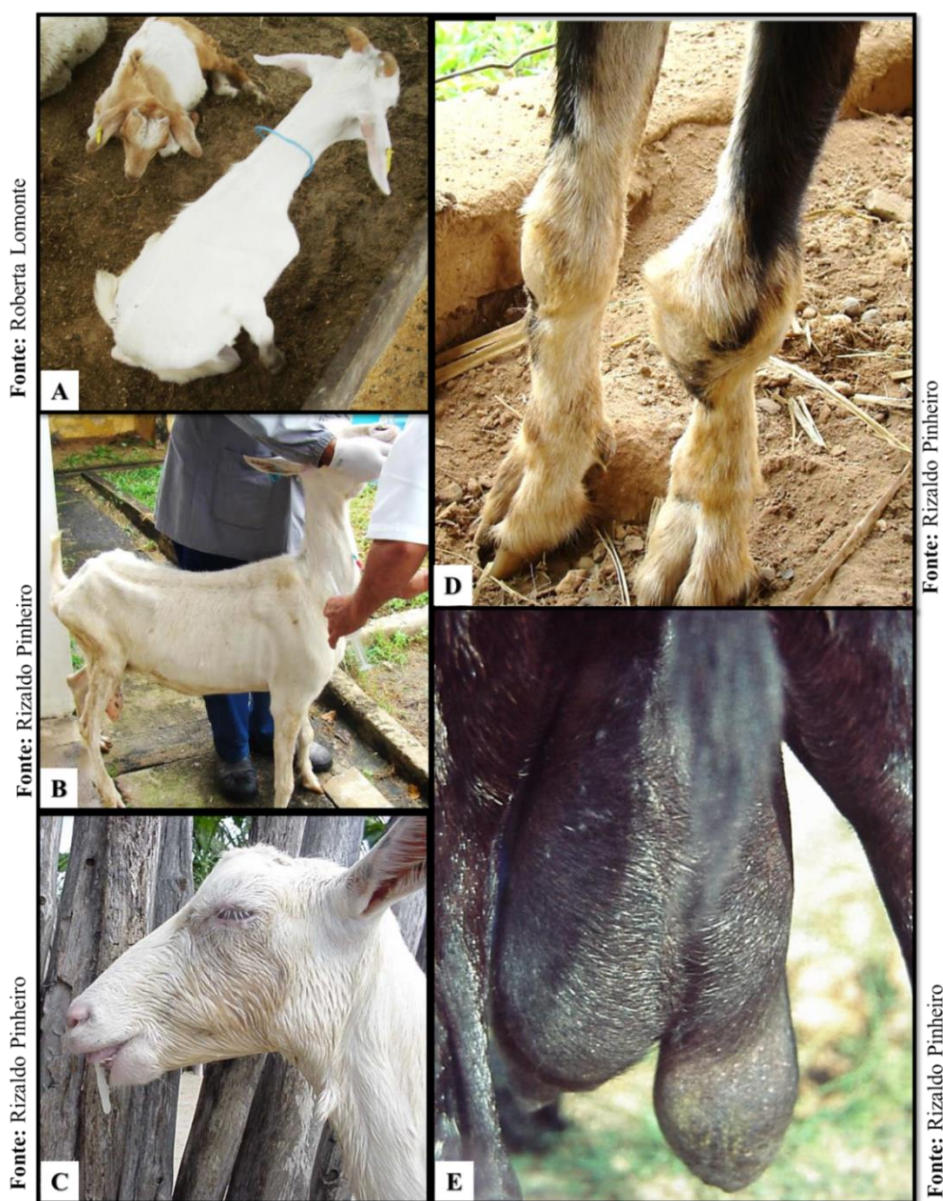


Figura 3. Sintomatologia clínica da CAE. A: Sintomatologia nervosa; B: Emagrecimento progressivo; C: Pneumonia; D: Aumento de índice articular; E: Mastite.

Tratamento, controle e diagnóstico

Não existe tratamento específico para a CAE, e os animais acometidos representam fonte de infecção e seus sintomas se agravam com o passar do tempo. Na obtenção do controle da CAE, o diagnóstico clínico não é suficiente para determinar a doença, pois os sinais clínicos podem ser confundidos com os de outras enfermidades (OLIVEIRA, 2006).

O diagnóstico baseia-se em testes diretos e indiretos, por meio da detecção do vírus, ou material genético deste, e/ou por provas sorológicas, através da detecção de anticorpos anti-CAEV, respectivamente. Na forma direta, pode-se utilizar a detecção de material genético do vírus, por meio da reação em cadeia da polimerase (PCR) (Figura 4-A), um teste sensível na detecção de pequenas quantidades de ácidos nucléicos virais, que demonstra a presença de DNA-proviral tanto *in vivo*, como *in vitro* (FEITOSA, 2007).

Outra forma de diagnóstico direto, é o isolamento viral, por meio amostras de animais vivos, tanto pelo co-cultivo em células de membrana sinovial caprina (MSC), como leucócitos do sangue periférico, células somáticas do leite (PINHEIRO et al., 2001), sêmen e fluidos uterinos (ANDRIOLI, 2001), em que a detecção viral é realizada por meio da visualização dos efeitos citopáticos (Figura 4-B), dentre eles a formação de sincícios, vacuolização e alto nível de destruição celular (PINHEIRO et al., 2001).

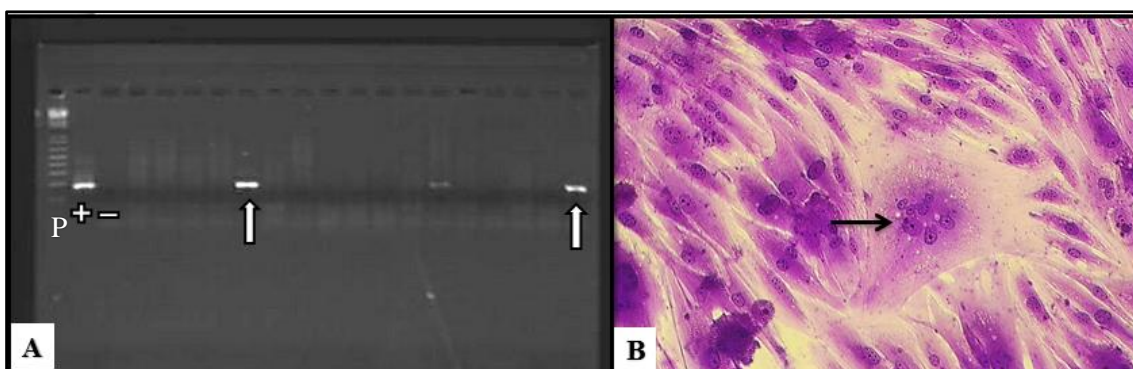


Figura 4. Testes de diagnósticos diretos para CAE. A: Gel de eletroforese - PCR *nested*, indicando padrão molecular (P), controles positivo e negativo (+ e -) e animais positivos (setas); B: célula multinucleada (seta), infectada por LVPR).

Os testes indiretos fazem a detecção de anticorpos específicos para o antígeno, em amostras de soro sanguíneo ou outras secreções que os possuam. Dentre esses testes encontra-se o teste de Imunodifusão em Gel de Agarose (IDGA) (PUGH, 2004; TIGRE et al., 2006), o *Immunoblotting* ou *Western Blot* (WB), *Enzyme Linked Immunosorbent Assay* (ELISA), entre outros (Figura 5).

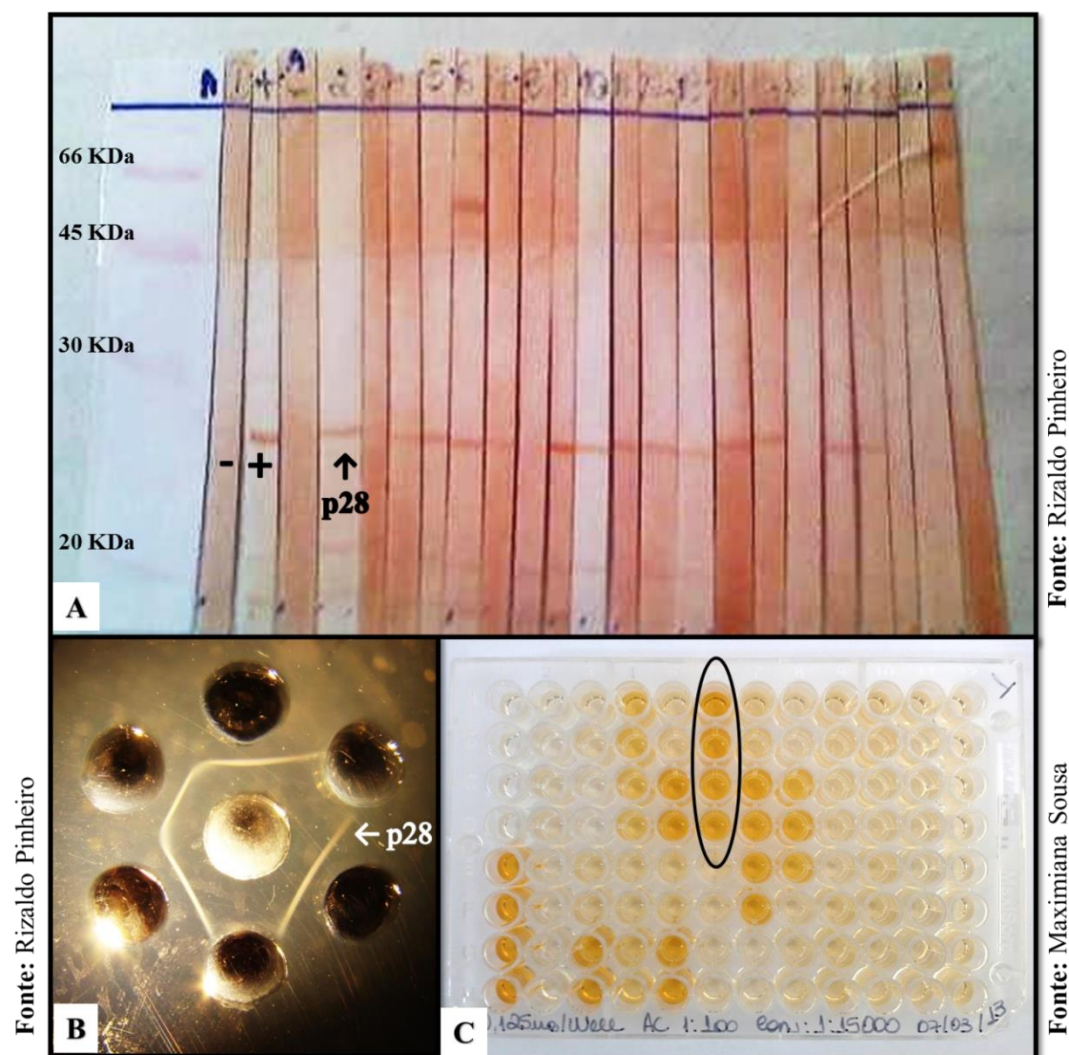


Figura 5: Testes de imunodiagnósticos. A e B: Testes de WB e IDGA, o diagnóstico é indicado pela presença da proteína imunogênica p28 (setas); C: ELISA, o resultado é indicado pela reação colorimétrica nos poços (círculo).

O WB é uma técnica imunoenzimática de detecção de proteínas, empregada em estudos bioquímicos e imunológicos (REGITANO; COUTINHO, 2001). Este teste é considerado mais preciso, por conseguir detectar melhores resultados, sem apresentar muita variações. Seu princípio consiste na separação das proteínas virais, pela da técnica de eletroforese, transferência para uma membrana e realização de reação

imunoenzimática. O WB tem a capacidade de detectar anticorpos numa diluição de até 256 vezes maior que o IDGA e 32 vezes maior que o ELISA (PINHEIRO et al., 2012).

Perdas econômicas

Dentre as perdas diretas causadas pela CAE, temos a forma articular, que pode incapacitar os reprodutores de realizarem a monta natural (PINHEIRO et al., 1999). Além disso, a perda de peso e a debilidade em animais adultos são em função da dificuldade de locomoção, que conseqüentemente afeta o estado nutricional (BOHLAND; D'ANGELINO 2005; GREGORY et al., 2009).

A mastite destaca-se como maior relevância, em razão do comprometimento da produção leiteira, que induz a predisposição às infecções secundárias da glândula mamária, (SMITH; CUTLIP, 1988), queda na produção e qualidade do leite (BRITO, 2009). Pode ocorrer ainda a mastite intersticial, que é considerada a mais frequente nos rebanhos de caprinos leiteiros (LARA et al., 2005).

Outros fatores relevantes são: descarte precoce dos animais e a renovação forçada dos rebanhos, além do baixo aproveitamento do potencial genético dos caprinos infectados (FRANKE, 1998). Segundo Brito (2009) o CAEV pode inviabilizar os parâmetros reprodutivos de rebanhos caprinos, principalmente na taxa de infertilidade, comprometendo a concepção e o peso vivo das crias ao nascer.

Como perdas indiretas decorrentes da CAE têm-se a desvalorização dos rebanhos e a ascensão de barreiras comerciais para produtos de multiplicação animal, como: matrizes, reprodutores, sêmen, embriões, dentre outras (FRANKE, 1998; PINHEIRO et al., 2001; MODOLO et al., 2003). Considerando-se que não há tratamento que elimine o vírus, quando o animal já se encontra infectado (CALLADO et al., 2001; GHANEM et al., 2009), é importante a prevenção do contágio da CAE no rebanho.

COLOSTRO E LEITE: DEFINIÇÕES BÁSICAS

Caracterização, composição química, imunológica e microbiológica

O colostro é caracterizado como uma secreção, provinda da glândula mamária nas últimas semanas do período de gestação, que detém de nutrientes essenciais para o

desenvolvimento nutricional e imunológico do recém-nascido. Possui cor branco-amarelada, é composto por vitaminas e minerais, e apresenta grande quantidade de proteínas. Detém de uma grande quantidade de imunoglobulinas: IgG, IgA e IgE, sendo a IgG, de maior concentração, representando cerca de 65 a 90% do total de imunoglobulinas (TIZARD, 1985). O colostro dispõe ainda de células somáticas, proteínas de ação antibacteriana e enzimas com alta capacidade para quebrar ligações químicas (SANTOS, 1989; BUSH, 1989).

Segundo Regulamento da Inspeção Industrial e Sanitária de Produtos de Origem Animal (RIISPOA, 1952), o leite é definido como uma secreção láctea, praticamente livre de colostro, obtida a partir da ordenha completa de fêmeas. Este tem em sua composição geral: 87% de água, além de carboidratos, lipídeos, proteínas, numerosos sais minerais, lactose, uréia, ácido láctico, creatinina, aminoácidos e vitaminas hidrossolúveis. Entre os minerais, destacam-se o cálcio, sódio, cloretos e fosfatos. A presença e os teores de proteína, gordura, lactose, sais minerais e vitaminas determinam a qualidade e composição do leite, que, por sua vez, são influenciadas pela alimentação, manejo, genética e raça do animal (MADALENA et al., 2001). Em relação aos componentes químicos, segundo Sotillo e Méndez (1994), as alterações mais drásticas encontram-se no período de transição, que ocorre entre o colostro e o leite. A composição do colostro vai se equiparando quimicamente ao leite conforme são realizadas as ordenhas. Os teores de proteína, minerais e vitaminas vão diminuindo e, em contrapartida, os teores de água, gordura e lactose aumentam (GONZÁLEZ, 2003).

No processo de síntese e secreção do leite e colostro, por meio dos alvéolos da glândula mamária, estes se mantêm estéreis. Entretanto, na ordenha ou na sucção da cria, estes podem se contaminar com micro-organismos originários do interior da glândula mamária, da superfície das tetas e do úbere, além dos utensílios e equipamentos de ordenha (MADALENA et al., 2001). As bactérias são os principais micro-organismos envolvidos à contaminação do leite, uma vez que, os vírus, leveduras e fungos tem influência reduzida nos processos de contaminação (FONSECA; SANTOS, 2007). No leite, o crescimento bacteriológico acontece de acordo com temperatura em que ele se encontra. Portanto, os micro-organismos contaminantes do leite podem ser divididos em três categorias: os mesófilos, que se multiplicam rapidamente quando o leite não está armazenado sob refrigeração, os termodúricos (termófilos) que sobrevivem à pasteurização e os psicrotróficos, que se multiplicam em temperaturas baixas (7°C ou menos). Dentre as bactérias psicrotróficas e mesófilas mais comum que

afetam o leite, temos os gêneros: *Pseudomonas*, *Micrococcus*, *Bacillus*, *Clostridium*, *Achromobacter*, *Lactobacillus*, *Flavobacterium* e *Staphylococcus*. Os gêneros *Clostridium* e *Bacillus*, também são considerados termodúricos, podendo ser resistentes aos procedimentos de pasteurização do leite (MADALENA et al., 2001).

As células somáticas que constituem o leite podem ser do tipo epitelial ou de defesa. As epiteliais são oriundas da descamação natural do epitélio secretor da glândula mamária e as células de defesa, geralmente leucócitos (macrófagos, linfócitos e neutrófilos), são aquelas que migram da corrente sanguínea para os alvéolos, em resposta a uma reação inflamatória, quando a glândula mamária sofre algum tipo de agressão, por exemplo, uma infecção. A principal causa do aumento da contagem de células do leite é devido à resposta inflamatória da glândula mamária, que na maioria dos casos, é resultado de uma infecção bacteriana. Devido às lesões no tecido mamário, as células secretoras reduzem a capacidade de produzir e secretar o leite, isso explica a perda de qualidade e a redução na produção do animal (MADALENA et al., 2001).

Tratamentos Térmicos no Colostro e Leite

O procedimento de termização pode ser realizado em colostro, leite de transição e leite comum. No colostro, por exemplo, este é retirado das matrizes recém-paridas, acondicionado em garrafas plásticas, as quais depois de vedadas são destinadas ao banho-maria à 56°C por uma hora. Ao retirar as garrafas, espera-se esfriar a temperatura ambiente quando então são conservadas em freezer à temperatura de -15°C (ANDRADE, 2008).

O leite pode ser conservado por meio da pasteurização, um método que mantém as características organolépticas e nutritivas, e assegura a destruição dos microorganismos patogênicos, tornando-o um alimento sadio (CHEFTEL et al., 1989; RIEDEL, 1996). Admitem-se dois tipos de pasteurização: a lenta e a rápida. Na pasteurização lenta, que consiste em aquecer o leite a 63 - 65°C por 30 minutos, seguido de resfriamento a 4 °C. Durante o tempo de aquecimento, o leite é moderadamente agitado para evitar aderências às paredes do recipiente, promover aquecimento uniforme de todas as suas partículas e, ao mesmo tempo, evitar a formação de espuma (PRATA, 2001; LEITE et al., 2006). A pasteurização rápida do tipo High Temperature Short Time (HTST), por sua vez, consiste em aquecer o leite a 72 - 75°C por 15 a 20

segundos, seguido de choque térmico por meio do resfriamento imediato até 5°C de temperatura (LEITE et al., 2006).

Utilização do Dodecil Sulfato de Sódio no Leite

Em estudos realizados por Urdaneta et al. (2005), observa-se o uso de um surfactante, com o propósito de inativação química do HIV em leite humano. Este químico, cujo nome é dodecil sulfato sódio (SDS) ou lauril sulfato de sódio (SLS), possui fórmula química $\text{NaC}_{12}\text{H}_{25}\text{SO}_4$ (IUPAC, 2014) e é um agente tensoativo, com propriedades detergentes. Destes, o SDS possui forma *zwitterionica*, que em solução aquosa, apresenta duas porções diferentes, uma polar e a outra apolar, em extremidades opostas de uma única molécula (Figura 6). A extremidade polar é formada por um grupo sulfato, enquanto a porção oposta, apolar é composta por um hidrocarboneto de cadeia longa, que pode ser linear, ramificada, ou aromática, dependendo da solução diluente (SINGER; TJEERDEMA, 1993).

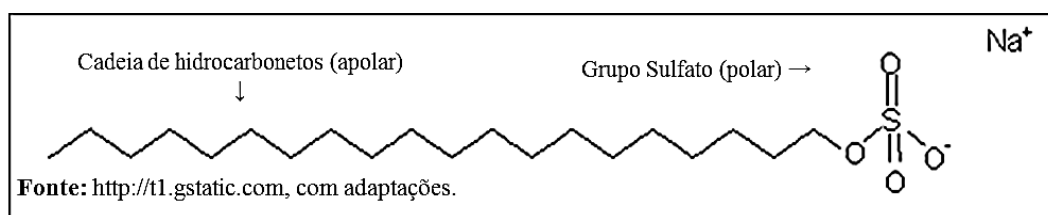


Figura 6 - Representação química do SDS

A estrutura química do SDS foi descrita pela primeira vez por Lottermoser e Stoll no ano de 1933, na Alemanha entre as duas guerras mundiais. Sendo depois, classificado como agente tensoativo ou surfactante, contendo de 6 - 18 átomos de carbono. O uso desse produto químico, como detergente, propagou a tecnologia química na primeira parte do século XIX, com o desenvolvimento de substituintes sintéticos para os detergentes de origem animal, usados na época (KIRK-OTHMER, 1984).

A natureza química do SDS o torna muito útil devido sua capacidade de equilíbrio iônico, solubilizante de gorduras e óleos, e na formação de microemulsões. Apresenta aplicabilidade como: ingrediente de produtos de limpeza, fabricação de cosméticos, além de funcionar como uma ferramenta de pesquisa biológica (SINGER; TJEERDEMA, 1993). O SDS possui propriedades citolíticas, que são muito úteis na preparação de materiais subcelulares, como: membranas plasmáticas, organelas e material genético, para estudos bioquímicos. E também contribuiu para o

desenvolvimento proteômico, na identificação de proteínas e determinação de estruturas por eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) (SHAPIRO et al., 1967).

Além de aplicabilidades químicas e biológicas, o SDS apresenta característica biodegradável (COOK; GOLDMAN, 1974). Segundo Anderson et al. (1990), este composto é susceptível a degeneração por populações de bactérias planctônicas, presentes em rios e oceanos poluídos, indicando a capacidade biodegradável do SDS. Estudos recentes, demonstram que a *Pseudomona aeruginosa* dispõem da enzima *alquil-sulfatase* (SdsA1), a qual possuem propriedades degenerativas para o SDS, podendo ser explorada em processos industriais, bem como em biorremediação de locais contaminados com produtos à base deste químico (CHATURVEDI; KUMAR, 2013).

Em contato direto com células, o SDS provoca efeitos físicos e bioquímicos. A estrutura alvo-principal é a membrana celular, independente do tipo de célula (BENOIT et al., 1987; PARTEARROYO et al., 1990). Os efeitos citotóxicos são dependentes da concentração absoluta e razões molares de lipídio/surfactante. Em concentrações inferiores de surfactante, as membranas celulares perdem a sua capacidade de barreira, aumentando a permeabilidade (KALMANZON et al., 1992), ao passo que, em concentrações iguais ou superiores de surfactante/lipídio, ocorre a lise celular (PARTEARROYO et al., 1990).

O SDS têm propriedades desnaturantes de proteínas, como inativador viral, e tem-se mostrado um potente inibidor da infecciosidade de vírus envelopados e não envelopados, atuando na dissociação do envelope viral e proteínas do capsídeo por desnaturação. Em vírus como o HIV-1 (Imunodeficiência Humana), HSV (Herpes Vírus) e HPV (Papiloma Vírus), o mecanismo do SDS mostrou eficiência na inativação química, desnaturando proteínas do envelope e/ou do capsídeo viral (PIRET et al., 2002). Além disso, estudos já demonstraram que o SDS a 0,1% pode ser eficaz na inativação do HIV-1 em leite, sendo que as concentrações do tratamento proposto são relatadas dentro de limites seguros para ingestão de SDS por crianças (URDANETA et al., 2005; KREBS et al., 1999).

Em adição, estudos indicam que o SDS é um biocida eficiente no colostro, e que cabritos alimentados com 1% de SDS, não sofrem déficit na transferência passiva imune e saúde animal (MORALES-DE LA NUEZ et al., 2011). A partir dessas evidências, o SDS seria propenso à inativação química, e um possível controlador da transmissão do CAEV na via digestiva por meio do colostro e leite.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ADAMS, D. S.; KLEVJER-ANDERSON, P.; CARLSON, J. L.; MCGUIRE, T. C.; GORHAM, J.R. Transmission and control of Caprine Arthritis-Encephalitis virus. **American Journal Veterinary Research**, v.44, n.9, p.1670-1675, 1983.
- ANDERSON, D. J.; DAY, M. J.; RUSSELL, N. J.; WHITE, G. F. Die-away kinetic analysis of the capacity of epilithic and planktonic bacteria from clean and polluted river water to biodegrade sodium dodecyl sulfate. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 56, n. 3, p.758-763, 1990.
- ANDRADE, M. L. R. **Avaliação da dinâmica de absorção do colostro em caprinos das raças saanen e moxotó explorados no semi-árido cearense**. 2008. 60f. Dissertação (Mestrado Em Zootecnia) - Universidade Estadual Vale Do Acaraú – UVA, Sobral – CE, 2008.
- ANDRIOLI, A. **Vírus da Artrite e Encefalite caprina: nPCR e isolamento viral em amostras de sêmen, fluido uterino e embriões**. 2001. Belo Horizonte, 68f. Tese (Doutorado em Ciência Animal) – Curso de pós-graduação em Ciência Animal, Universidade Federal de Minas Gerais – UFMG, Belo Horizonte - MG, 2001.
- ANDRIOLI, A.; GOUVEIA, A. M. G.; MARTINS, A. S. Fatores de risco na transmissão do lentivírus caprino pelo sêmen. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.41, n.8, p.1313-1319, 2006.
- ANDRIOLI, A.; GOUVEIA, A. M. G.; MOURA-SOBRINHO, P.A. Transferência de embriões em cabras naturalmente infectadas pelo lentivírus caprino. **Revista Brasileira de Medicina Veterinária**, v.24, n.1, p.215-220, 2002.
- BENOIT, J.; CORMIER, M.; WEPIERRE, J. Effect of proteins on the assessment of surfactant cytotoxicity by an in vitro test: Possible correlation with in vivo data. **Toxicology In Vitro**. v.1, n.2, p.91-96, 1987.
- BOHLAND, E.; D'ANGELINO, J. L. Artrite-Encefalite Caprina: avaliação dos aspectos produtivos e reprodutivos de animais infectados e não infectados. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, v.42, n.2, p.81 – 88, 2005.

- BORDERÍAS, M. N. P. **Seguimiento de la infección por el Virus de Maedi Visna en una explotación de ganado ovino.** 2004. 88f. Trabalho de Conclusão de Curso- Facultad de Veterinária, Universidad Complutense, Madrid, 2004.
- BRITO, R. L. L. **Implicações da Artrite-Encefalite Caprina na reprodução, produção e na qualidade do leite de cabras.** 2009. 107f. Dissertação (Mestrado em Zootecnia) - Universidade Estadual Vale do Acaraú - UVA, Sobral – CE, 2009.
- BRODIE, S.; PEARSON, L.; ZINK, M. C.; BICKLE, H. M.; ANDERSON, B. C.; MARCOM, K. A.; DEMARTINI, J.C. Ovine lentivirus expression and disease. Virus replication, but not entry, is restricted to macrophages of specific tissues. **American Journal of Pathology**, v.146, n.1, p.250-263, 1995.
- BUSH, L. J. Como obter o máximo rendimento do colostro. **Gado Holandês**, v.54, n.160, p.50-51, 1989.
- CALLADO, A. K. C.; CASTRO, R. S.; TEIXEIRA, M. F. S. Lentivírus de pequenos ruminantes (CAEV e Maedi-Visna): Revisão e perspectivas. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.21, n.3, p.87-97, 2001.
- CARNEIRO, F.F.D. **Perdas econômicas decorrentes da Artrite-Encefalite Caprina.** 97f. Dissertação (Mestrado em Zootecnia) - Universidade Estadual Vale do Acaraú - UVA, Sobral - CE, 2011.
- CASTRO, R. S.; MELO, L. E. H. CAEV e Maedi-Visna: importância na saúde e produtividade de caprinos e ovinos e a necessidade de seu controle no Nordeste brasileiro. **Ciência Veterinária nos Trópicos**, v. 4, n. 2, p. 315-320, 2001.
- CHEFTEL, J. C.; CHEFTEL, H.; BESANÇON, P. **Métodos de conservación – calor.** In: **Introducción a la bioquímica y tecnología de los alimentos.** v.2, Zaragoza: Acríbia, 1989, p. 236-271.
- CLEMENTS, J. E. PAYNE, S. L. Molecular basis of the pathobiology of lentiviruses. **Virus Research**, v.32, n.2, p. 97-109, 1994.
- COOK, T.M.; GOLDMAN, C.K. Degradation of anionic detergents in Chesapeake Bay. **Chesapeake Science**, v.15, n.1, p. 52-55, 1974.

- CRAWFORD, T.B.; ADAMS D.S. Caprine arthritis-encephalitis: clinical features and presence of antibody in selected goat populations. **Journal of American Veterinary Medicine Association**, v. 178, n.7, p.713-719, 1981.
- CUTLIP, R. C.; LEHMKUHL, H. D.; SCHMERR, M. J. F.; BROGDEN, K. A. Ovine progressive pneumonia (maedi-visna) in sheep. **Veterinary Microbiology**. v. 17, n.3, p. 237-250, 1988.
- 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 Research**, v. 10, n.3, p. 251-262, 1993.
- FEITOSA, A. L.V. L. **Análise filogenética de lentivirus de pequenos ruminantes isolados do Ceará**. 2007. 98p. Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias) – Faculdade de Veterinária, Universidade Estadual do Ceará - UECE, Fortaleza - CE, 2007.
- FONSECA, L.F.L.; SANTOS, M.V. **Estratégia para controle de mastite e melhoria da qualidade do leite**. 2ª ed. Barueri: Manole, 2007, p. 314.
- FRANKE, C.R. **Controle Sanitário da Artrite-Encefalite Caprina**. Salvador: EDUFBA, 1998. p.70.
- GENDELMAN, H. E.; NARAYAN, O.; KENNEDY-STOSKPF, S.; KENNEDY, P. G. E.; GHOTBI, Z.; CLEMENTS, J. E.; STANLEY, J.; PEZESHKPOUR, G. Tropism of sheep lentivirus for monocytes: susceptibility to infection and virus gene expression increase during maturation of monocytes to macrophages. **Journal Virology**, v. 1, n. 58, p. 67-74, 1986.
- GHANEM, Y.M.; EL-KHODERY, S.A.; SAAD, A.A.; ELRAGABY, S.A.; ABDELKADER, A.H.; HEYBE, A. Prevalence and risk factors of Caprine Arthritis-Encephalitis virus infection (CAEV) in Northern Somalia. **Small Ruminant Research**, v.85, n.2, p.142-148, 2009.
- GONDA, M. A. Molecular biology and virus-host interactions of lentiviruses. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 724, n.1, p.22-42, 1994.

GONDA, M. A.; BRAUM, M. J.; CLEMENTS, J. E.; PYPHER, J. M.; WONGSTAAL, F.; GALLO, R. C.; GILDEN, R. V. Human T-cell lymphotropic virus type III shares sequence homology with a family of pathogenic lentiviruses. **Proceedings National Academy Science**, v. 83, n.11, p. 4007-4011, 1986.

GONZÁLEZ, F. H. D. **Introdução à Bioquímica Clínica Veterinária**. Porto Alegre: UFRGS, 2003. p.66.

GONZALEZ, L.; GELABERT, J. L.; MARCO, J. C.; SAEZ-DE-OKARIZ, C. Caprine arthritis encephalitis in the Basque country, Spain. **Veterinary Record**, v. 120, n.2, p. 102-109, 1987.

GOUVEIA, A. M., SANTA ROSA, J., PINHEIRO, R. R., ALVES, F. S. F., VIDAL, C. E. S. Implantação de um programa de controle da CAEV em sistemas epidemiológicos distintos. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE MED. VETERINÁRIA, 23, Recife-PE. **Anais...** Recife: 1994. p. 102.

GREGORY, L.; LARA, M.C.C.S.H.; VILLALOBOS, E.M.C.; HASEGAWA, M.Y.; CASTRO, R.S.; RODRIGUES, J.N.M.; ARAÚJO, J.; KELLER, L.W.; DURIGON, E.L. Detecção do vírus da Artrite-Encefalite Caprina em amostras de leite de cabras pela reação em cadeia da polimerase (PCR) e nested-PCR. **Ars Veterinaria**, v.25, n.3, p.142-146, 2009.

IBGE - **Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística**. Censo agropecuário, 2006. Disponível em: >http://www.ibge.gov.br/home/presidencia/noticias/noticia_visualiza.php?id_noticia< acesso em: 23/03/2014.

IUPAC - **International Union of Pure and Applied Chemistry**. The IUPAC Network, 2014. Disponível em: > <http://www.acdlabs.com/iupac/nomenclature/> < acesso em: 27/11/2014.

KALMANZON, E.; ZLOTKIN, E., COHEN, R.; BARENHOLZ, Y. Liposomes as a model for the study of the mechanism of fish toxicity of sodium dodecyl sulfate in sea water. **Biochimica et Biophysica Acta** v.1103, n.1, p.148-156, 1992.

KIRK-OTHMER. **Encyclopedia of chemical technology**, 3rd ed. New York: John Wiley and Sons, 1984.

- KONISHI, M.; NAGURA, Y.; TAKEI, N.; FUJITAB, M.; HAYASHIC, K.; TSUKIOKAD, M.; YAMAMOTOA, T.; KAMEYAMAA, K.; SENTSUIA, H.; MURAKAMIA, K. Combined eradication strategy for CAE in a dairy goat farm in Japan. **Small Ruminant Research**, v.99, n.1, p.65-71, 2011.
- KREBS, F.C.; MILLER, S.R.; MALAMUD, D.; HOWETT, M.K.; WIGDAHL, B. Inactivation of human immunodeficiency virus type 1 by nonoxynol-9, C31G, or an alkyl sulfate, sodium dodecyl sulfate. **Antiviral Research**, v.43, n.3, p.157-173, 1999.
- LARA, M. C. C. S. H.; BIRGEL JUNIOR, E. H.; GREGORY, L.; BIRGEL, E. H. Aspectos clínicos da Artrite-Encefalite dos caprinos. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 57, n. 6, p.736-740, 2005.
- LEITE, Z. T. C.; VAITSMAN, D. S.; DUTRA, P. B.; GUEDES, A. Leite e alguns de seus derivados – da antiguidade à atualidade. **Química Nova**, São Paulo, v. 29, n. 4, p. 876 - 880, 2006.
- LERONDELLE, C.; GODET, M.; MORNEX, JF. Infection of primary cultures of mammary epithelial cells by small ruminant lentiviruses. **Veterinary Research**, v.5, n.30, p.467-474,1999.
- LUJÁN, L.; BEGARA, I.; COLLIE, D. D. S.; WATT, N. J. Ovine lentivirus (Maedi-Visna virus) protein expression in sheep alveolar macrophages. **Veterinary Pathology**, v.31, n.6, p.695-703, 1994.
- MADALENA, F. E.; MATOS, L. L.; HOLANDA JÚNIOR, E. V. **Produção de leite e sociedade: uma análise crítica da cadeia do leite no Brasil**, Belo Horizonte: FEPMVZ, 2001. p. 25-36.
- MODOLO, J. R.; STACHISSINI, A. V. M.; CASTRO, R. S.; RAVAZZOLO, A. P. **Planejamento de saúde para o controle da Artrite-Encefalite caprina**. Botucatu: Cultura Acadêmica, 2003. p.80.
- MORALES-DE LANUEZ, A.; MORENO-INDIAS, I.; SANCHEZ-MACIAS, D.; CAPOTE, J.; JUSTE, M.C.; CASTRO, N.; HERNANDEZ-CASTELLANO, L.E.; ARGUELLO, A. Sodium dodecyl sulfate reduces bacterial contamination in goat

- colostrum without negative effects on immune passive transfer in goat kids. **Journal of Dairy Science**, v.94, n.1, p.410-415, 2011.
- MSELLI-LAKHAL, L.; GUIGUEN, F.; FORNAZERO, C.; DU, J.; FAVIER, C.; DURAND, J.; GREZEL, D.; BALLEYDIER, S.; MORNEX, J. F.; CHEBLOUNE, Y. Goat milk epithelial cells are highly permissive to CAEV infection in vitro. **Virology**, v.259, n.1, p.67-73, 1999.
- MULLER, L. D.; SYHRE, D. R. Influence of Chemicals and Bacterial Cultures on Preservation of Colostrum. **Journal of Dairy Science**, v. 58, n.6, p. 957-961, 1975.
- NARAYAN, O.; CLEMENTS, J.E. Biology and pathogenesis of lentiviruses. **Journal of General Virology**, v.70, n.7, p.1617-1639, 1989.
- NARAYAN, O.; KENNEDY-STOSKOPF, S.; SHEFFER, D.; GRIFFIN, D.E.; CLEMENTS, J.E. Activation of caprine arthritis-encephalitis virus expression during maturation of monocytes to macrophages. **Infection and Immunity**, v. 41, n. 1, p. 67-73, 1983.
- OLIVEIRA, A. A. F. **Sanidade animal**. In: CHAPAVAL, L.; OLIVEIRA, A. A. F.; ALVES, F. S. F.; ANDRIOLI, A.; ARAÚJO, A. M.; OLIVINDO, C. S. Manual do produtor de cabras leiteiras. Viçosa: Aprenda Fácil. Cap. 6. p. 128- 155, 2006.
- OLIVER, R. E.; GORHAM, J. R.; PARISH, S. F.; HADLOW, W. J.; NARAYAN, O. Ovine progressive pneumonia: pathologic and virologic studies on the naturally occurring disease. **American Journal of Veterinary Research**, v. 42, n.9, p. 1554-1559, 1981.
- PARTEARROYO, M. A.; OSTOLAZA, H., GONI, F. M.; BARBERA-GUILLEM, E. Surfactant-induced cell toxicity and cell lysis. **Biochemical Pharmacology**, v.40, n.6, p.1323-1328, 1990.
- PASICK, J. Maedi-Visna virus and caprine Arthritis-Encephalitis virus: Distinct species or quasispecies and its implications for laboratory diagnoses. **Canada Journal Veterinary**, v. 62, n.4, p. 241- 244, 1998.
- PÉPIN, M.; VITU, C.; RUSSO, P.; MORNEX, J.F.; PETERHANS, E. Maedi-Visna virus infection in sheep: a review. **Veterinary Research**, v.29, n.3, p.341-367, 1998.

- PERK, K. Presence of viral particles in neural cells of goats with caprine arthritis encephalitis. **Research in Veterinary Science**, v.49, n.3, p. 367-369, 1990.
- PINHEIRO, R. R.; ANDRIOLI, A.; SIDER, L. H.; SANTIAGO, L. B.; OLIVEIRA, E. L.; SOUSA, A. L. M.; ALVES, F. S. F.; CRUZ, J. C. M. Lentiviroses em pequenos ruminantes: principais métodos de diagnóstico. **Comunicado Técnico EMBRAPA**, n.107, p.1-32, 2012.
- PINHEIRO, R. R.; CHAGAS, A. C. S.; ANDRIOLI, A.; ALVES, F. S. F. Viroses de pequenos ruminantes. Sobral: Embrapa Caprinos, 30 p. **Embrapa Caprinos**. Série Documentos, 46, 2003.
- PINHEIRO, R. R. **Vírus da Artrite-Encefalite Caprina: Desenvolvimento e padronização de ensaios imunienzimáticos (ELISA e Dot-Blot) e estudo epidemiológico no Estado do Ceará**. 2001. 115f. Tese (Doutorado em Ciência Animal) - Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte - MG, 2001.
- PINHEIRO R.R. Artrite-Encefalite Caprina viral (CAEV). Sobral. Comunicado Técnico. **EMBRAPA-CNPC**, n.19, p.1-5, 1989.
- PIRET, J.; DÉSORMEAUX A.; BERGERON, M.G. Sodium Lauryl Sulfate, a Microbicide Effective Against Enveloped and Nonenveloped Viruses. **Current Drug Targets**. v.3, n.1, p. 17-30, 2002.
- PISONI, G.; BERTONI, G.; MANAROLLA, G.; VOGT, H. R.; SCACCABAROZZI, L.; LOCATELLI C.; MORONI, P. Genetic analysis of small ruminant lentiviruses following lactogenic transmission. **Virology**, v.407, n.1, p. 91–99, 2010
- PISONI, G.; MORONI, P.; TURIN, L.; BERTONI, G. Compartmentalization of small ruminant lentivirus between blood and colostrum in infected goats. **Virology**, v. 369, n.1, p. 119-130, 2007.
- PISONI, G.; QUASSO, A.; MORONI, P. Phylogenetic analysis of small-ruminant lentivirus subtype B1 in mixed flocks: Evidence for natural transmission from goats to sheep. **Virology**, v.339, n.2, p.147–152, 2005.
- PRATA, L. F. **Fundamentos de ciência do leite**. São Paulo: Unesp, 2001. p.287.

- PUGH, D. G. **Clínica de ovinos e caprinos**. São Paulo: Roca, 2004. p. 513.
- RADOSTITS, O. M.; GAY, C. C.; BLOOD, D. C.; HINCHCLIFF, K. W. **Clínica veterinária: um tratado de doenças dos bovinos, ovinos, suínos, caprinos e equinos**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2002. p. 1098 – 1101.
- RAVAZZOLO, A. P.; NENCI, C.; VOGT, H. R.; WALDVOGEL, A.; OBEXER-RUFF, G.; PETERHANS, E.; BERTONI, G. Viral load, organ distribution, histopathological lesions, and cytokine RNA expression in goats infected with a molecular clone of the caprine arthritis encephalitis virus. **Virology**, v.350, n.1, p.116–127, 2006.
- REGITANO, L. C. A.; COUTINHO, L.L. *Biologia molecular aplicada à produção animal*. Brasília: **EMBRAPA. Informação tecnológica**, p.215, 2001.
- REISCHAK, D. **Lentivirus de pequenos ruminantes imunofluorescência utilizando isolados brasileiros para diagnosticar sorológico de infecção em ovinos e caprinos**. Porto Alegre, 2000. 132p. (Dissertação de Mestrado). Universidade Federal do Rio Grande do Sul – UFRGS, Porto Alegre – RS, 2000.
- RIEDEL, G. **Controle Sanitário do Alimento**. 2ª ed., São Paulo: Atheneu, 1996. p.230.
- RIISPOA - **REGULAMENTO DA INSPEÇÃO INDUSTRIAL E SANITÁRIA DE PRODUTOS DE ORIGEM ANIMAL**, Título VIII - Inspeção Industrial e Sanitária do Leite e Derivados, Capítulo I - Leite em Natureza. p.78-92. Disponível em >http://www.agricultura.gov.br/arq_editor/file/Aniamal/MercadoInterno/Requisitos/RegulamentoInspecaoIndustrial.pdf> acesso em: 15/03/2016.
- RODRIGUES, A. S. **Padronização e utilização de testes sorológicos como ferramentas para controle da Artrite-Encefalite Caprina em rebanho leiteiro semi-intensivo**. 2012 88f. Dissertação de Mestrado (Mestrado em Medicina Veterinária), Universidade Estadual do Ceará – UECE, Fortaleza – CE, 2012.
- ROWE, J. D.; EAST, N. E.; THUNNOND, M. C.; FRANTI, C. E.; PEDERSEN, N. C. Cohort study of natural transmission and two methods for control of caprine arthritis encephalitis virus infection in goats on a California dairy. **American Journal of Veterinary Research**, v.53, n.12, p.2386-2395, 1992.

- SÁ, C. O.; SÁ, J. L. Criação de ovinos e os sistemas de produção. **FarmPoint**, 2006. Online. Disponível em: < <http://www.farmpoint.com.br/.aspx> >. Acesso em: 05/10/14.
- SANNA, E.; SANNA, M.P.; VITALI, C.G.; RENZONI, G.; SANNA, L.; SPANO, S.; ROSSI, G.; LEONI, A. Proviral DNA in the brains of goats infected with caprine arthritis-encephalitis virus. **Journal of Comparative Pathology**, v.12, n.3, p.271–276, 1999.
- SANTOS, G. T. dos. Transmissão da imunidade passiva colostrar em ruminantes. **Gado Holandês**, v.54, n.159, p.27-35, 1989.
- SHAPIRO, A. L.; VIFIUELA, E.; MAIZEL, J.V. Molecular weight estimation of polypeptide chains by electrophoresis in SDS-polyacrylamide gels. **Biochemical and Biophysical Research**, v.28, n.5, p. 815-820,1967.
- SINGER, M. M.; TJEERDEMA, R.S. Fate and effects of the surfactant sodium dodecyl sulfate. **Reviews of Environmental Contamination and Toxicology**. v.133, n.1, p.95–149, 1993.
- SMITH, M.C.; CUTLIP, R. Effects of infection with Caprine Arthritis-Encephalitis virus on milk production in goats. **Journal of American Veterinary Medical Association**, v.193, n.1, p.63-67, 1988.
- SOTILLO, A. Q.; MÉNDEZ, M. L. H. **La leche de cabra**. Murcia: Universidade, Secretariado de publicaciones, 1994. p.90.
- SOUZA, K. C.; PINHEIRO, R. R.; SANTOS, D. O; BRITO, R. L. L.; RODRIGUES, A. S; SIDER, L. H.; PAULA, N. R. O.; AVILA, A. A; CARDOSO, J. F. S.; ANDRIOLI, A. Transmission of the caprine arthritis–encephalitis virus through artificial insemination. **Small Ruminant Research**, v.109, n.2, p.193–198, 2012.
- SOUZA, T.S.; PINHEIRO R.R.; LIMA, C.C.V. Transmissão Interespécie dos Lentivírus de Pequenos Ruminantes: Revisão e Desafios, **Acta Veterinaria Brasilica**, v.6, n.1, p.23-34, 2012.
- SOUZA, T. S.; PINHEIRO R. R.; COSTA, J. N.; LIMA, C. C. V; ANDRIOLI, A.; AZEVEDO, D. A. A, SANTOS, V. W. S; ARAÚJO, J. F; SOUSA, A. L. M;

- PINHEIRO, D. N. S.; FERNANDES, F. M. C.; COSTA NETO, A. O. Interspecific transmission of small ruminant lentiviruses from goats to sheep. **Brazilian Journal of Microbiology**, v.46, n.3, p. 867-874, 2015.
- TIGRE, D.M.; CAMPOS, G.S.; SARDEI, S.I. Isolamento e identificação do Vírus da Artrite-Encefalite Caprina, a partir do co-cultivo de células mononucleares do sangue com células de membrana sinovial de cabra. **Revista de Ciências Médicas e Biológicas**, v. 5, n. 2, p. 124-131, 2006.
- THORMAR, H.; BALZARINI, J.; DEBYSER, Z.; WITVROUW, M.; DESMYTER, J.; CLERCQ, E. Inhibition of visna virus replication and cytopathic effect in sheep choroid plexus cell cultures by selected anti-HIV agents. *Antiviral Res.*, v.27, n.1, p.49-57, 1995.
- TIZARD, I. **Introdução à Imunologia Veterinária**. 2a ed, São Paulo: Rocca, 1985. p.329
- TONIOLO, A.; SERRA, C.; CONALDI, P. G.; BASOLO, F.; FALCONE, V.; DOLEI, A. Productive HIV-1 infection of normal human mammary epithelial cells. **AIDS**, v.9, n.8, p.859–866 1995.
- TRAVASSOS, C.; BENOÎT, C.; VALAS, S.; SILVA, A. G.; PERRIN, G. Caprine Arthritis-Encephalitis Virus in semen of naturally infected bucks. **Small Ruminant Research**, v. 32, n. 2, p. 101-106, 1999.
- URDANETA, S.; WIGDAHL, B.; NEELY, E. B.; BERLIN, C. M., JR.; SCHENGRUND, C. L.; LIN, H. M.; HOWETT, M. K. Inactivation of HIV-1 in breast milk by treatment with the alkyl sulfate microbicide sodium dodecyl sulfate (SDS). **Retrovirology**, v. 2, n.1, p.28, 2005.
- YAHY, N.; BAGHDIGUIAN, S.; MOREAU, H.; FANTINI, J. Galactosyl ceramide (or a closely related molecule) is the receptor for human immunodeficiency virus type 1 on human colon epithelial HT29 cells. **Journal of Virology**, v. 66, n.8, p.4848–4854, 1992.
- ZINK, M. C., JOHNSON, L. K. Pathobiology of lentivirus infections of sheep and goats. **Virus Research**, v.32, n.2, p.139-154, 1994.

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. **American Journal of Pathology**, v.136, n.4, p.843-854, 1990.

CAPÍTULO 2

AVALIAÇÃO *IN VITRO* DO DODECIL SULFATO SÓDIO (SDS) EM COLOSTRO E LEITE CAPRINO: atividade citotóxica e inibição viral

RESUMO

Este estudo objetivou avaliar *in vitro* a citotoxicidade e as propriedades de inativação viral do dodecil sulfato de sódio (SDS) em colostro e em leite caprino. Inicialmente, para testes de concentrações efetivas do SDS, culturas de macrófagos sanguíneos em placas de 24 poços, foram incubadas em ambiente de CO₂, por 15 minutos, com SDS à 1%; 0,5%; 0,25%; 0,1%; 0,05%, 0,025%; 0,005%, e em seguida realizada a contagem de macrófagos vivos por cm². Posteriormente, se fez uso do SDS a 1%; 0,5%; 0,25%, durante 15 minutos, nos tratamentos do colostro e do leite, e este foi removido por meio de lavagens com tampão fosfato. Em seguida, as amostras foram destinadas ao teste de reação em cadeia da polimerase *nested* (nPCR) e ao co-cultivo com membrana sinovial caprina (MSC), durante 63 dias. Após o co-cultivo, houve avaliação dos efeitos citopáticos virais, característicos ao lentivírus caprino, ocasionados nas células de MSC. Experimentalmente, no colostro, observou-se que o SDS (0,25; 0,5 e 1%) apresentou, uma atividade inibitória contra o CAEV, sem ocorrer à inativação viral. No leite, o SDS a 0,25; 0,5% apresentou, atividade inibitória contra o CAEV, e na concentração de 1% de SDS houve inativação do vírus em cultura.

Palavras-chave: Sistema monicítico-fagocitário, inativação química, lise celular, surfactante.

ABSTRACT

This study evaluated in vitro cytotoxicity and the properties of viral inactivation of sodium dodecyl sulfate (SDS) in colostrum and goat milk. Initially, for effective concentrations of SDS tests, cultures of blood macrophages in 24-well plates were incubated in CO₂ environment for 15 minutes with 1%; 0,5%; 0,25%; 0,1%; 0,05%, 0,025%; 0,005% of SDS, and then conducted to living macrophages count per cm². Subsequently use was made 1%; 0,5%; 0,25% of SDS for 15 minutes in the treatment of colostrum and milk, and this was removed by washes with phosphate buffer. Then the samples were intended to molecular assays and cultivation caprine synovial membrane (CSM). for 63 days. After cultivation, there were evaluation of viral cytopathic effects characteristic to the lentivirus goats, caused in CSM cells. Experimentally, colostrum, it was found that SDS (0,25; 0,5 and 1%) showed an inhibitory activity against Caprine Arthritis-Encephalitis virus (CAEV) viral inactivation without occur. In milk, SDS 0.25; 0,5% had inhibitory activity against CAEV, and a concentration of 1% SDS was likely inactivation of the virus in culture.

Keywords: Monocyte-phagocyte system, chemical inactivation, cell lysis, surfactant

INTRODUÇÃO

Os monócitos e macrófagos desempenham um papel chave na regulação do sistema imunológico, orientando as respostas imunes inatas e específicas (FLORES, 2007). Estas células estão presentes em tecidos, no sangue, colostro, leite entre outros fluídos biológicos e estabelecem as principais vias de transmissão dos lentivírus de pequenos ruminantes. A patogenia da Artrite-Encefalite Caprina (CAE) está diretamente relacionada às células do sistema monocítico-fagocitário, com enfoque no processo de diferenciação e maturação dos monócitos em macrófagos, onde ocorre a multiplicação viral (ZINK; JOHNSON, 1994).

A ingestão de leite e colostro infectados com o vírus torna-se a principal via de transmissão da enfermidade (ROWE et al., 1992). Cabritos nascidos de matrizes soronegativas e que recebem colostro e/ou leite de cabras soropositivas, logo se tornam infectados, pois uma única ingestão é suficiente para os animais serem contaminados (RADOSTITS et al., 2002). Os leucócitos maternos são conhecidos por serem absorvidos no intestino em animais recém-nascidos e entrarem na circulação periférica (SCHNORR; PEARSON, 1984). Segundo Herrmann-Hoesing et al. (2007), os animais são expostos a infecção através do trato gastrointestinal, na ingestão do colostro, tanto pelo vírus livre como pelo pro-vírus presente no interior de monócitos/macrófagos. Por ser uma enfermidade incurável, de caráter infectocontagioso, que acarreta grandes perdas econômicas em caprinos e ovinos, é importante o controle da principal via de contágio.

Estudos correlacionam a atividade inibitória de micro-organismos com o uso de aditivos químicos para o leite (MULLER; SYHRE 1975; KREBS et al., 1999; URDANETA et al., 2005). Dentre estes, o dodecil sulfato de sódio (SDS) é um agente surfactante, com propriedades lisantes e citolíticas, além de possuir uma capacidade de equilíbrio iônico e solubilizante de gorduras e óleos. Funciona como uma ferramenta de pesquisa biológica no âmbito bioquímico e proteômico (SHAPIRO et al., 1967; SINGER; TJEERDEMA, 1993). Em contato direto com células, sua estrutura alvo é a membrana celular (BENOIT et al., 1987; PARTEARROYO et al., 1990). Os efeitos citotóxicos são dependentes da concentração absoluta e razões molares de lipídio/surfactantes (PARTEARROYO et al., 1990).

Como inativador viral, o SDS tem propriedade desnaturante de proteínas, mostrando-se um potente inibidor da infecciosidade de vírus envelopados e não

envelopados, atuando na solubilização do envelope viral e das proteínas do capsídeo, por desnaturação (PIRET et al., 2002). Estudos, em culturas celulares, avaliaram uma possível atividade antiviral do SDS com o HIV-1 (vírus da imunodeficiência humana tipo I), o HSV (herpes vírus) e o HPV (papiloma vírus) (PIRET et al., 2002).

Krebs et al. (1999) demonstraram que o SDS a 0,1% no leite pode ser eficaz na inativação do HIV-1. Segundo Urdaneta et al. (2005) e Krebs et al. (1999), esta concentração de SDS se encontra dentro de limites seguros para consumo infantil. Além disso, Morales-De la Nuez et al. (2011) observaram que o SDS é um biocida eficiente no colostro, e que cabritos alimentados com colostro contendo 1% de SDS não sofreram déficit na transferência passiva imune e nem alterações na sua saúde. A partir dessas evidências, questiona-se que o SDS poderia ser usado no controle da transmissão do vírus da CAE pelo colostro e leite. Diante do exposto, o objetivo desta pesquisa foi averiguar *in vitro* a citotoxicidade à nível celular e as propriedades de inativação viral do SDS no colostro e leite caprino.

MATERIAL E MÉTODOS

Este estudo foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Embrapa Caprinos e Ovinos de acordo com o protocolo de Nº 012/2014.

Local e período do experimento

O Experimento foi realizado na Embrapa Caprinos e Ovinos, nos laboratórios de virologia, biologia molecular e patologia clínica, no período de janeiro de 2014 até dezembro de 2015.

Coleta, separação e cultura de leucócitos do sangue

O sangue de 10 caprinos adultos foi coletado por venipunção da jugular com auxílio de coletor, agulha e tubos do tipo vacutainer® de 5 mL, com EDTA (etileno-diamino-tetracético). As amostras foram centrifugadas a 3000 g por 15 min. Os leucócitos foram transferidos para microtubos de 1,5 mL, tipo *ependorf*®. A obtenção destas células foi realizada através de três lavagens com solução de cloreto de amônia a 0,84% (Sigma-Aldrich®) e duas com tampão de fosfato - PBS 1X¹, por meio de

¹ Tampão sódio-fosfato (PBS 1X): 8g de NaCl; 0,2g de KCl; 0,2g de KH₂PO₄; 1,15g de Na₂HPO₄; 1000 mL de H₂O (reagentes: Sigma-Aldrich®)

centrifugação à 1.500 g, por 5 min cada. Obteve-se um total de 500 µL de leucócitos, onde 45 µL foram destinados à contagem quantitativa e diferencial. Em seguida, os leucócitos foram diluídos em 28 mL em meio Roswell Park Memorial Institute (RPMI - 1640 Medium - Sigma-Aldrich®), obtendo-se em torno de $2,0 \times 10^5$ cel/µL e distribuídos, em triplicata, em placas de 24 poços, sendo 600 µL de células por poço. As placas foram incubadas durante três dias em estufa a 5% de CO₂. Posteriormente, trocou-se o meio das placas, adicionando 2,0 mL de RPMI tratado com SDS nas concentrações: 1%; 0,5%; 0,25%; 0,1%; 0,05%, 0,025%; 0,005% e o controle negativo. As placas foram novamente incubadas em ambiente de CO₂, por 15 min. Em seguida, foram coradas com azul de Tripán (0,3%) e realizou-se a contagem dos macrófagos vivos por cm²/ poço.

Coleta de colostro e leite de cabra

O colostro de 10 cabras adultas, recém-paridas e soropositivas para CAE, por meio do teste de *Western blot* (WB), foi coletado após a limpeza do teto, com auxílio de gaze e álcool 70%. Coletou-se, em tubos de 15 mL, aproximadamente 12 mL de colostro de cada animal. Em seguida, as amostras foram levadas ao laboratório de virologia, onde foi formado um *pool* de colostro, sendo este subdividido, em tubos de 15 mL, em 12 alíquotas de 10 mL cada. A coleta de leite foi realizada após 30 dias, seguindo a mesma metodologia.

Tratamento com SDS em colostro e leite

As amostras de colostro e de leite foram mantidas em tubos de 15 mL, e adicionou-se o SDS a 0,25; 0,5 e 1%, em triplicata, em temperatura ambiente, durante 15 min. Constituíram-se também o controle negativo (sem adição de SDS). Após o procedimento de ação do SDS, houve a centrifugação por 3.000 g durante 15 min, a 4°C. Em seguida, com auxílio de uma espátula, retirou-se a camada lipídica e descartou-se o sobrenadante. Logo após, transferiu-se o *pellet* para microtubos tipo *ependorf*®, contendo 1000 µL PBS 1X e realizou-se a homogeneização em vórtex para uma nova centrifugação nas mesmas condições. Este procedimento de lavagem foi realizado cinco vezes. Por fim, descartou-se 900 µL do sobrenadante e homogeneizou-se o *pellet* com os 100 µL restantes no microtubo (SARDI et al., 2012; ANGELOPOULOU et al., 2005; KARANIKOLAOU et al., 2005).

Avaliação das células somáticas do colostro e leite

Para a avaliação das células somáticas do colostro e leite, retirou-se 30 µL de cada amostra das triplicatas e distribuiu-se em placas de 24 poços. Em seguida, as células foram coradas com azul de Tripán (0,3%), para a visualização dos efeitos destrutivos de SDS.

Co-cultivo com membrana sinovial caprina (MSC)

As triplicatas das amostras de células de colostro e de leite (provindas da etapa de tratamento com SDS em colostro e leite) foram combinadas em *pool*, sendo que 50 µL do *pool* de cada tratamento e dos controles foram destinados ao teste de reação em cadeia da polimerase *nested* (nPCR). O restante foi centrifugado para a retirada do PBS 1X e acréscimo de meio essencial mínimo (MEM - Gibco®), tratado com 2% de anfotericina B (Sigma-Aldrich®), 3% de penicilina e estreptomicina (P/S - Gibco®), 1% de gentamicina (Sigma-Aldrich®) e 10% de soro fetal bovino (SFB - Gibco®), em seguida distribuída em placas de 24 poços na quantidade de 100 µL, em oito repetições. Os poços foram acrescidos de 1900 µL de MEM tratado. As placas foram armazenadas em ambiente a 5% de CO₂, a 37 °C, por 24 h. Após esse período, foram adicionadas células de MSC, na 8ª passagem, na concentração de 2,0 x 10⁵ cel/µL, e mantidas em estufa nas mesmas condições anteriores. Foram realizadas trocas periódicas de meio a cada sete dias e tripsinização celular a cada 21 dias, totalizando 63 dias de cultivo. Os sobrenadantes foram coletados e separados por tratamento, para a realização nPCR. Após o período de cultivo, 4 poços de cada tratamento foram corados com cristal violeta (0,1%), para a visualização dos efeitos citopáticos, e os demais foram tripsinizados e a suspensão celular destinada a nPCR.

Extração de DNA-proviral do leite e colostro

Extraíu-se o DNA amostral com o preparo do mix de extração (ME) contendo 380 µL de solução de digestão² e 20 µL Proteinase K³, por amostra. Adicionou-se

² Solução de digestão: Tris-HCl 10 mM (trizma base a 0,121g, para 80 mL de H₂O) + 0,372 g de EDTA; 0,0584g de NaCl, SDS à 0,5%)

³ Proteinase K: 20 mg/mL, Tris-HCl 10 mM (trizma base a 0,121g, para 80 mL de H₂O, pH: 7,5) + 0,29 g de ClCa + 100 mL de glicerol (reagentes: Sigma-Aldrich®).

então, 400 µL do ME a cada microtubo com o *pellet* de células. Os tubos foram levados ao banho-maria a 55°C por 2 h, sendo homogeneizados cada 30 min. Após incubação, foram centrifugados por 5 min a 16.100 g, e os sobrenadantes transferidos para um novo microtubo. Em seguida, adicionou-se 200 µL de cloreto de lítio (7,5 M) e as amostras foram submetidas à -80 °C de temperatura, por 10 min. Posteriormente, foram centrifugadas por 15 min a 16.100 g. O sobrenadante de cada amostra foi novamente transferido para um novo microtubo. Adicionou-se 1.000 µL de etanol 100% e inverteram-se os tubos aproximadamente 50 vezes, até a precipitação do DNA. Em seguida, os microtubos foram novamente centrifugados a 16.100 g, por 10 min. Após, adicionou-se 1.000 µL de etanol 70%, e as amostras foram centrifugadas a 16.100 g por 5 min. Então, o sobrenadante foi cuidadosamente descartado e os tubos invertidos em papel de filtro por 30 min. Posteriormente, ressuspendeu-se o *pellet* em 50 µL de água estéril, homogeneizou-se em vórtex e incubou-se em banho-maria a 55 °C por 5 min, seguido de nova homogeneização. Por fim, centrifugou-se cada amostra por 10 segundos a 16.100 g e estocou a -20 °C (GRIMBERG et al., 1989).

Extração de DNA-proviral de sobrenadante e suspensão celular

Nos períodos de 21, 42 e 63 dias de cultivos, os sobrenadantes e suspensão celular de cada tratamento foram coletados e armazenados a -20 °C. Para a extração do DNA-proviral, as amostras foram centrifugadas a 100 g, durante 5 min. Em seguida, o *pellet* de células foi transferido para microtubos, e as amostras foram lavadas duas vezes com 300 µL de PBS 1X e centrifugadas nas mesmas condições anteriores. Posteriormente, ressuspendeu-se as amostras em 300 µL de tampão de lise⁴, durante 2 min em temperatura ambiente. Em seguida, o material foi centrifugado à 600 g/10 min. Os sedimentos foram lavados com 300 µL de PBS 1X e centrifugados a 600 g/10 min. Logo após, 50 µL de tampão de PCR⁵ foram adicionados em cada amostra, juntamente com 1µL de Proteinase K, e em seguida homogeneizados. As amostras foram mantidas em banho-seco a 56°C, durante 60 min. Posteriormente, as amostras foram levadas ao

⁴ Tampão de lise: Sucrose 320 mM + Tris-HCl 10 mM, pH 7,5 + MgCl₂ 25 mM + Triton x-100 1% (v/v) (reagentes: Sigma-Aldrich®)

⁵ Tampão de PCR: 100µl de Tampão de PCR 10X s/magnésio (10mM tris HCl, pH 8,0; 50mM KCl) + 40µl de 1,0mM MgCl₂ + 50µl de 5% glicerol + 5µl de 0,05% Tween20 (diluído 1:1 em água) + 1000µl de água (q.s.p) (reagentes: Sigma-Aldrich®)

banho-maria a 100° C, durante 10 min e em seguida foram acondicionadas em freezer – 20°C.

Reação em cadeia da polimerase *Nested* (nPCR)

Para a amplificação do DNA foram realizados dois *rounds* de PCR. No primeiro, o *mister mix* (MM) foi preparado usando 36,35 µL de água livre de DNase, o Kit PCR⁶, os iniciadores do gene *gag*: *Primer 1*⁷ e *Primer 2*⁸, em 1 µL cada (Sigma-Aldrich®). Aliquotou-se 47 µL do MM em microtubos, e em seguida, adicionaram-se 3 µL das amostras a serem testadas, os controles positivo e negativo da reação. As amostras foram levadas ao amplificador *mastercycler epgradientS eppendorf® realplex*, programado com quatro estágios distintos. O primeiro à 94 °C por cinco min (desnaturação inicial). O segundo, com 35 ciclos, nas temperaturas: 94°C/60 segundos (desnaturação), 56°C/ 60 segundos (anelamento), 72°C/45 segundos (extensão). O terceiro estágio ocorreu com 72 °C por sete min (extensão final) e o último estágio conservou as amostras à 4 °C de temperatura.

Para o segundo *round*, preparou-se novamente o MM, nas mesmas condições anteriores, utilizando, neste caso, os *Primer 3*⁹ e *Primer 4*¹⁰, também iniciadores do gene *gag*. Distribui-se o 49 µL MM em microtubos juntamente com 1 µL do produto do 1° *round*. Novamente, direcionaram-se as amostras ao termociclador para a amplificação molecular. Posteriormente, os produtos de nPCR das amostras foram separados por eletroforese em gel de agarose a 2% contendo brometo de etídio (2,5 µl em 50 ml) em tampão de corrida¹¹. Por fim, as bandas presentes no gel foram visualizadas em luz ultravioleta (UV) e fotodocumentadas (BARLOUGH et al., 1994; SALTARELLI et al., 1990).

⁶ Kit nPCR: 5 µL Tris HCl + KCl pH:8,0; 3 µL MgCl₂; 0,25 µL dNTPs (dATP, dCTP, dGTP, dTTP) e 0,4 µL de Taq DNA polimerase (reagentes: Sigma-Aldrich®)

⁷ *Primer 1*: CAAGCAGCAGGAGGGAGAAGCTG (Sigma-Aldrich®)

⁸ *Primer 2*: TCCTACCCCATTAATTTGATCCAC (Sigma-Aldrich®)

⁹ *Primer 3*: GTTCCAGCAACTGCAAACAGTAGCAATG (Sigma-Aldrich®)

¹⁰ *Primer 4*: ACCTTTCTGCTTCTTCATTTAATTTCCC (Sigma-Aldrich®)

¹¹ Tampão de corrida: 53,90 g de trizma base; 3,72 g de EDTA - ethylenediaminetetraacetic acid; 27,5 g de ácido bórico (reagentes: Sigma-Aldrich®)

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Citotoxicidade do SDS em macrófagos do sangue caprino

Na diluição e contagem diferencial dos leucócitos, obteve-se aproximadamente $2,0 \times 10^5$ leucócitos/ μL , e cerca de 7,5% dessas células foram monócitos/macrófagos.

Após aplicação e atividade do SDS na cultura de macrófagos, pode-se observar um aumento progressivo da atividade citolítica do SDS diretamente proporcional a sua concentração. Nas concentrações de 1%, 0,5% e 0,25% não foram observados células vivas, em comparação ao controle negativo, que apresentou uma média de 10.065 macrófagos por poço (Gráfico 1). No entanto, nas culturas onde se administrou o SDS em menores concentrações (0,1%; 0,05%, 0,025%; 0,005%) verificou-se, em média, os seguintes valores: 3.939, 5.434, 7.092 e 9.582 de macrófagos vivos, respectivamente.

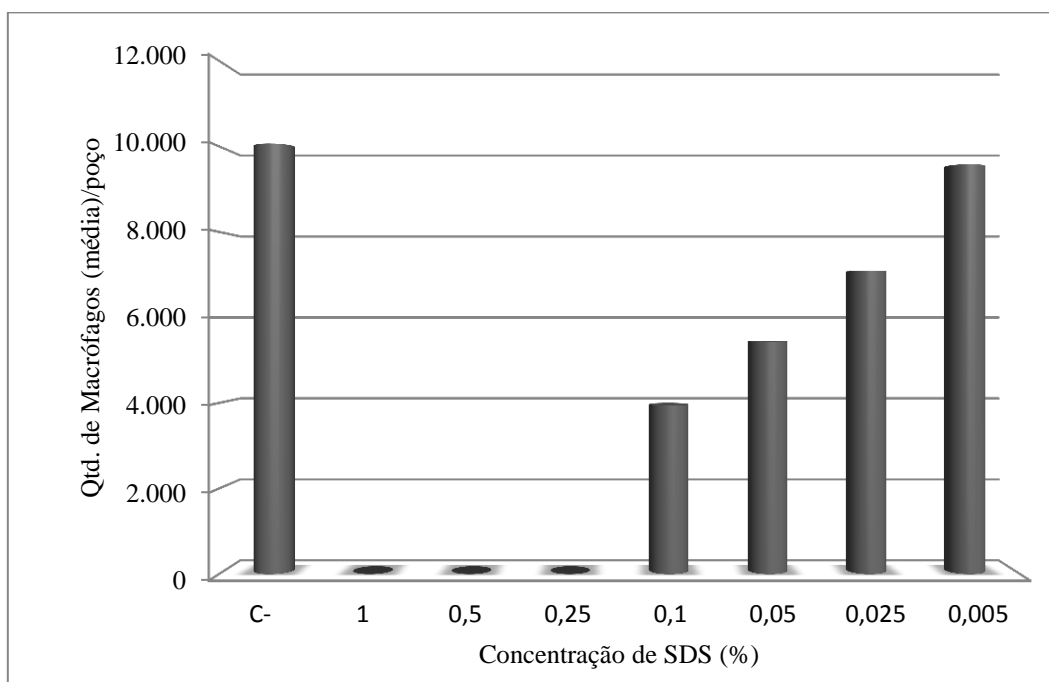


Gráfico 1. Citotoxicidade do SDS em macrófagos do sangue caprino. Quantidade média de macrófagos vivos por poço em diferentes concentrações de SDS.

Isto ocorreu, muito provavelmente, devido aos efeitos citolíticos serem dependentes da concentração absoluta e razões molares de lipídio/surfactantes. Em concentrações inferiores de surfactantes, as membranas celulares perdem a sua

capacidade de barreira, aumentando a permeabilidade e, portanto, podendo levar a um sofrimento celular (KALMANZON et al., 1992), ao passo que, em concentrações iguais ou superiores de surfactantes/lipídio, ocorre a lise celular (PARTEARROYO et al., 1990).

A Figura 1 mostra a destruição celular, que se apresentou gradativa de acordo com a concentração de SDS utilizado na cultura. Nos tratamentos com as concentrações de 1, 0,5 e 0,25% (figura 1- B, C e D) houve destruição total dos macrófagos presentes nos poços. Porém, na concentração de 0,1% pode-se observar a presença de macrófagos vivos (figura 1 - E). Sendo os macrófagos fontes de replicação do CAEV (ZINK; JOHNSON, 1994), somente com a destruição deles é que ocorrerá a efetiva inativação viral, contribuindo, assim, para o seu controle.

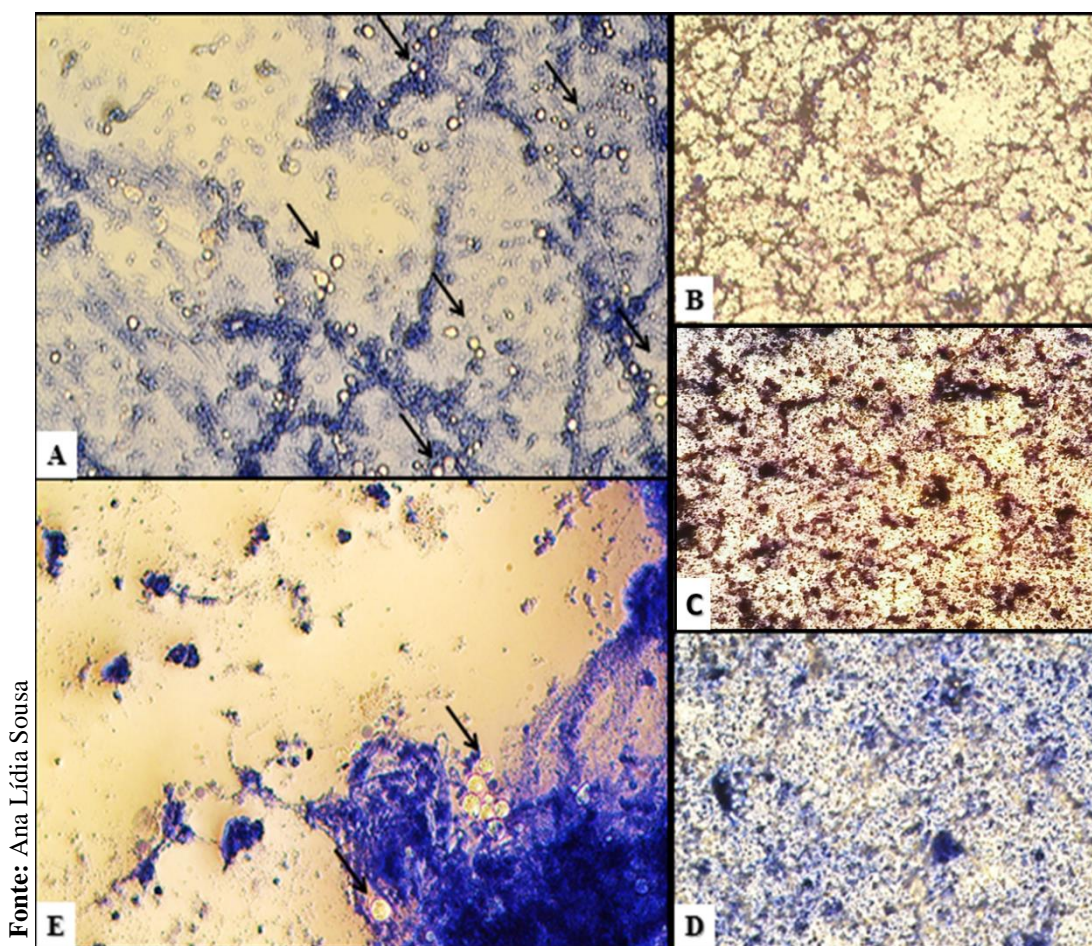


Figura 1. Cultura de Macrófagos submetida à diferentes concentrações de SDS. **A:** Controle negativo (aumento 100x), **B, C, D, E:** concentração de SDS de 1%; 0,5%; 0,25% (aumento 100x); 0,1% (aumento 200x) respectivamente.

Citotoxicidade do SDS em células somáticas do colostro e leite

Na Figura 2, observou-se as propriedades citolíticas do SDS no colostro. Nas concentrações de 0,25 e 0,5%, não ocorreu destruição celular, provavelmente devido a grande quantidade de gordura presente no mesmo (Figura 2, B e C). Verificaram-se alguns indicativos de destruição celular com o SDS a 1%, evidenciado, principalmente pela redução do número de células (Figura 2, D). Os efeitos citolíticos do SDS, observados nas células do colostro, foram moderados devido às proporções de gorduras serem superiores as de surfactantes, tornando assim, possível a redução nos processos de sofrimento e lise celular (PARTEARROYO et al., 1990; KALMANZON et al., 1992).

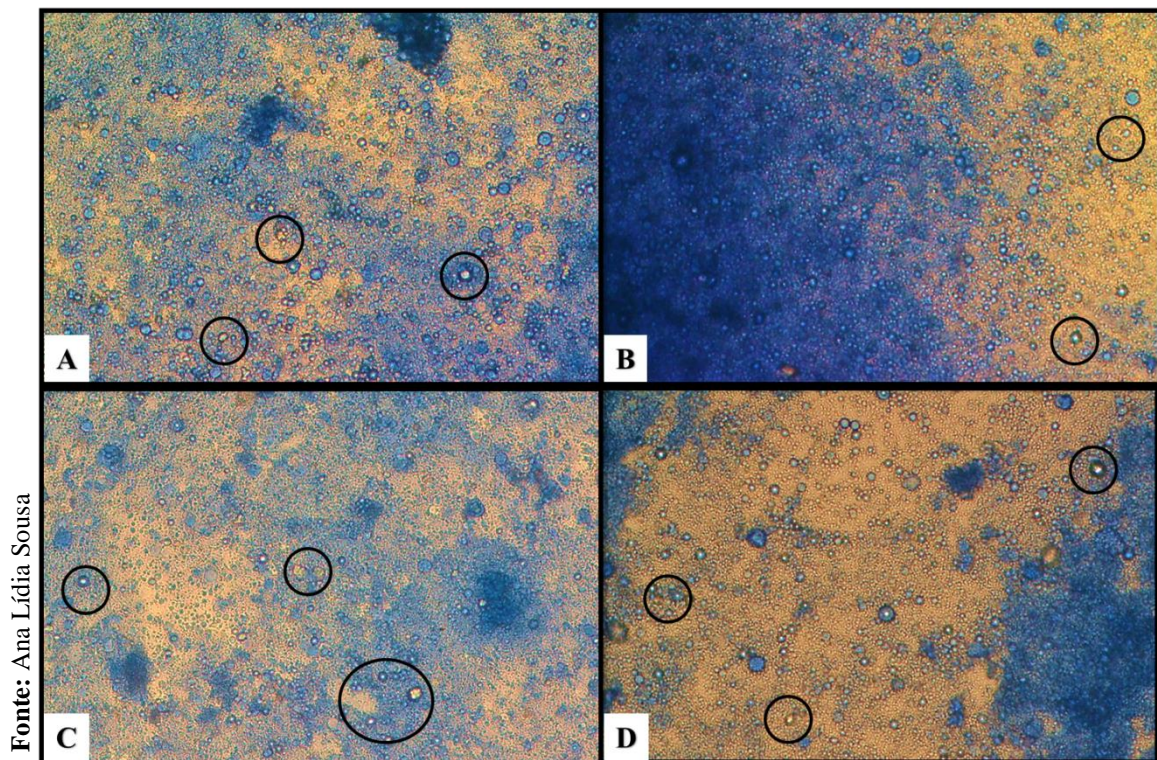
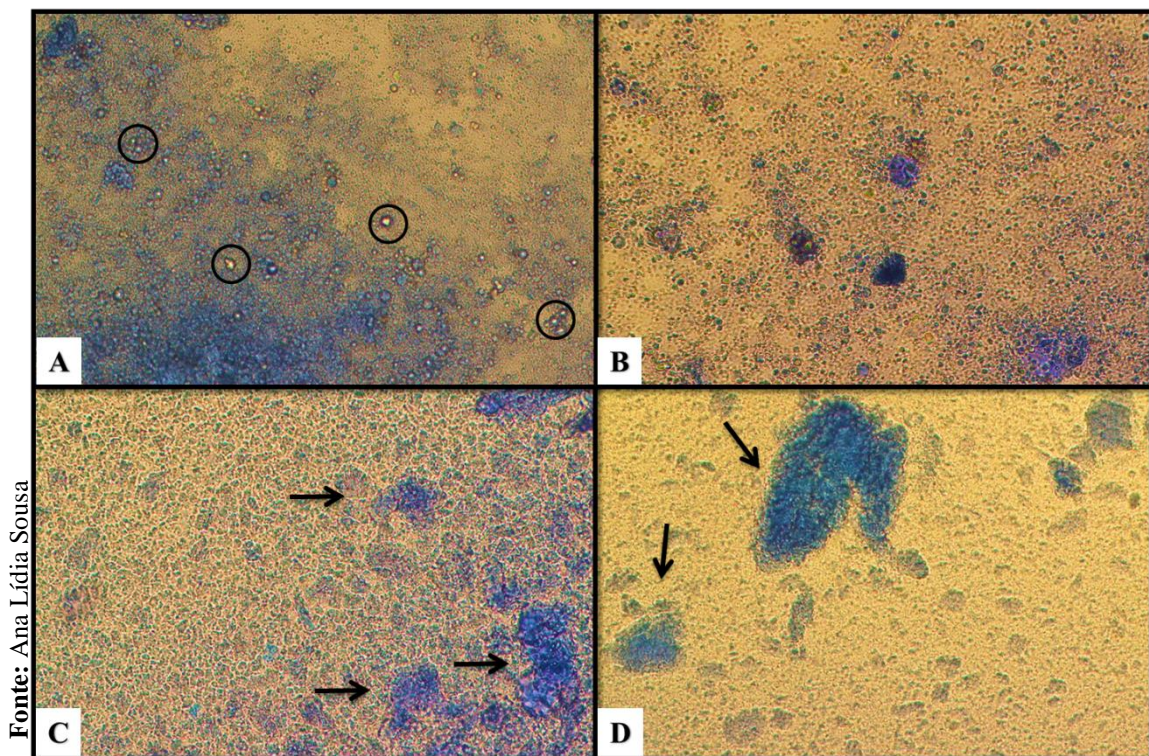


Figura 2. Avaliação da ação do SDS em colostro caprino. **A:** controle negativo. **B, C:** SDS nas concentrações de 0,25% e 0,5%, respectivamente, com a presença de células vivas e sem destruição celular. **D:** SDS a 1%, com a presença de células vivas e leve destruição celular (aumento 100x).

No leite observou-se na concentração de 0,25% de SDS leve destruição celular, mantendo a integridade da grande maioria das células presentes (Figura 3, B). Entretanto, nas concentrações de 0,5 e 1% houve destruição total das células presentes, comparando-as ao controle negativo (Figura 3, C e D).

As alterações observadas no leite foram mais evidentes que no colostro, provavelmente devido as maiores proporções de surfactantes em relação à quantidade de gordura, o que promoveu maior lise celular e, conseqüentemente, a perda da atividade biológica das células presentes no leite. Segundo Bartnik (1992), o SDS quando adicionado em altas concentrações, e o nível de surfactante ultrapassa o nível de lipídios celulares, três fases de interação podem ser estabelecidas. Na primeira fase, o tensoativo pode causar alterações na permeabilidade da membrana. Na segunda fase, se o tensoativo excede concentração citolítica, a estrutura lamelar da membrana (arranjo da bicamada lipídica) é solubilizada, resultando em liberação de proteínas, lipoproteínas e micelas, e a completa lise celular. Na terceira fase, ocorre a separação de fosfolipídios e desnaturação estrutural de proteínas. O SDS está entre os tensoativo iônicos capazes de realizar ligações covalentes que geralmente resultam em alterações conformacionais e concomitante perda de atividade biológica.



Fonte: Ana Lídia Sousa

Figura 3. Avaliação de diferentes concentrações de SDS no leite caprino. **A:** controle negativo, com a presença de células vivas. **B:** SDS à 0,25%, com a presença de leve destruição celular e pequenos aglutinados de debris celulares (setas). **C e D:** concentração de 0,5 e 1% de SDS, com elevado nível de lise celular e grandes aglutinados de debris celulares (setas) (aumento 100x).

Efeito do tratamento do colostro e leite caprino com SDS

O gel de eletroforese com os resultados da nPCR das amostras de colostro e leite antes e após os tratamentos com SDS nas concentrações de 0,25; 0,5 e 1% durante 15 min está apresentado na figura 4. Observa-se que tanto as amostras de colostro quanto as de leite positivos para a CAE não apresentaram degradação do DNA após os tratamentos, expressando resultado positivo independente das concentrações do SDS.

Ademais, as bandas de DNA-proviral de LVPR no colostro tornaram-se gradativamente mais evidentes, após os tratamentos com o SDS. Observou-se que, quanto maior a concentração de SDS no colostro, mais evidente foi a expressão de DNA-proviral. Nesse caso, como o SDS é um detergente com a capacidade de solubilizar lipídeos e proteínas (SHAPIRO et al., 1967; SINGER; TJEERDEMA, 1993), provavelmente, estes foram gradualmente degradados de acordo com as concentrações em cada amostra, expondo mais facilmente o material genético para os processos de extração de DNA. No leite esta ação não foi observada.

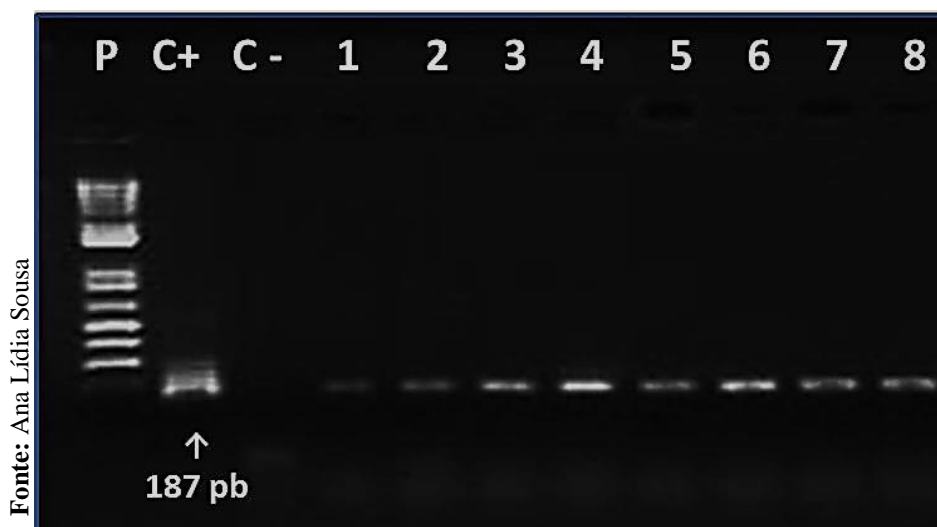


Figura 4. Eletroforese em gel de agarose a 2% corado com brometo de etídio, exibindo a amplificação do DNA proviral do CAEV (187pb) das amostras de colostro e leite. P (padrão molecular: DNA ladder 1kb); C+ (controle positivo da reação); C- (controle negativo da reação); 1 (amostra de colostro sem tratamento); 2, 3 e 4 (amostras de colostro tratados com SDS a 0,25; 0,5 e 1%, respectivamente); 5 (amostra de leite sem tratamento), 6, 7 e 8 (amostras de leite tratado com SDS a 0,25; 0,5 e 1%, respectivamente).

Co-cultivo com MSC e células somáticas do colostro e leite caprino

A Tabela 1 mostra a relação de efeitos citopáticos virais, visualizados nas células de MSC após 63 dias de co-cultivo com as células de colostro e de leite caprino, tratados com SDS a 0,25; 0,5 e 1%, durante 15 min.

Nos tratamentos realizados com o colostro adicionado de 0,25 e 0,5 de SDS, observou-se uma diminuição gradual na presença de sincícios, destruição celular e vacuolizações, em relação ao tratamento controle, sem a adição de SDS (S/SDS). Na concentração de 1% não foram observados efeitos citopáticos característicos de infecção pelo CAEV.

Em relação ao leite, o tratamento com SDS a 0,25 ocasionou redução na presença de sincícios e destruição celular, em relação ao tratamento controle (S/SDS). Foi observada leve vacuolização, somente nas células do tratamento controle (S/SDS), e nos demais tratamentos com concentrações de SDS, não se observou este efeito citopático. Na concentração de 0,5 e 1% de SDS não foram visualizados efeitos citopáticos que caracterizassem uma infecção viral pelo CAEV.

A redução dos efeitos citopáticos virais observadas nos co-cultivos de leite e colostro, podem ser provenientes da ação antiviral do SDS. Segundo Piret et al. (2002), o SDS em contato com partículas virais livres, mostra-se um potente inibidor da infecciosidade de vírus envelopados e não envelopados, atuando na desnaturação de proteínas do capsídeo e envelope de vírus com o HIV-1, HSV e HPV. Em relação aos monócitos/macrófagos o SDS pode promover alterações na permeabilidade da membrana celular e na estrutura lamelar da membrana (arranjo da bicamada lipídica), que pode ser solubilizada. Isto dependerá das razões molares do produto químico e dos lipídios do meio (BARTNIK, 1992; BENOIT et al., 1987; PARTEARROYO et al., 1990).

Tabela 1. Níveis dos efeitos citopáticos nas células de MSC após co-cultivo com células de colostro e leite tratados com SDS.

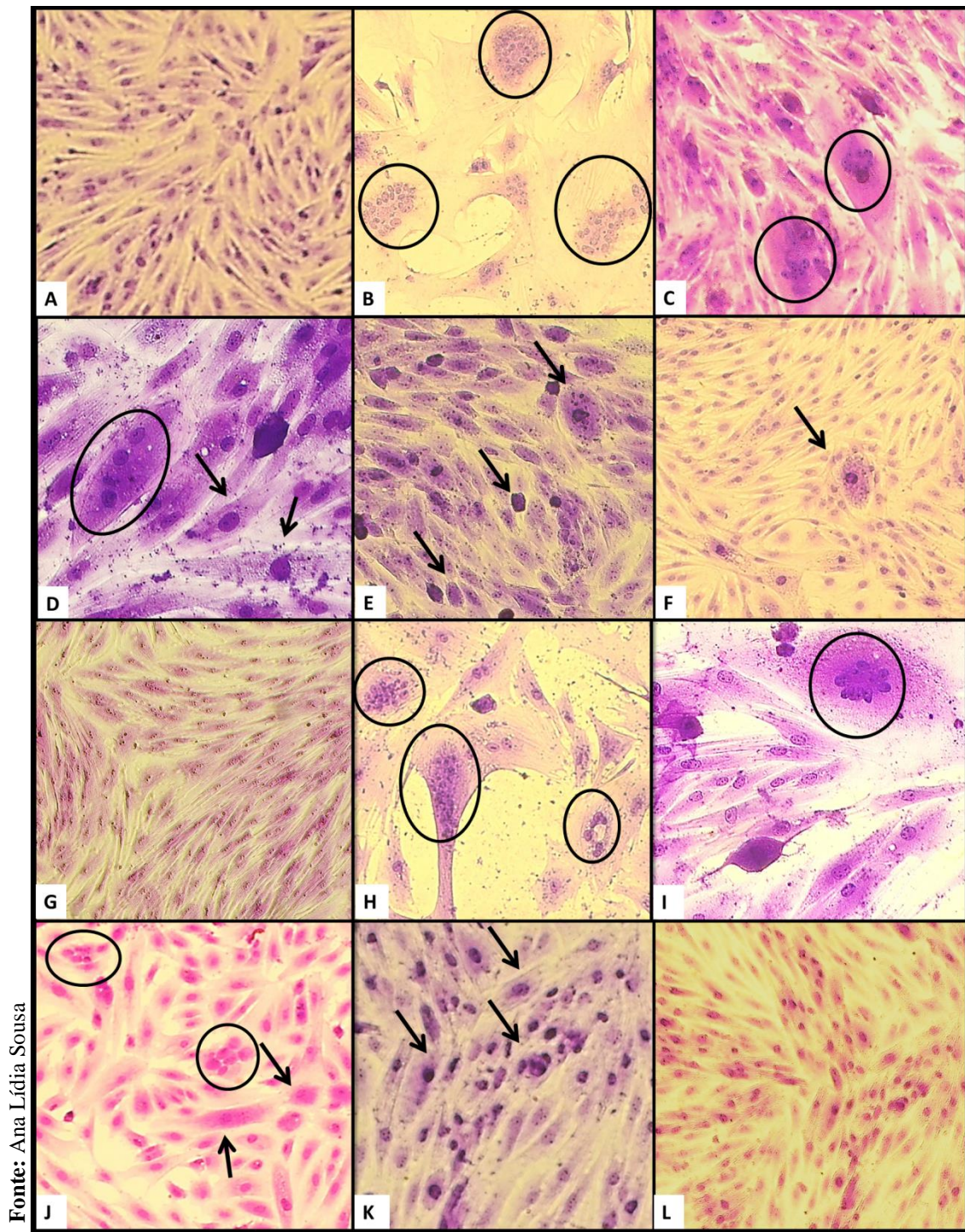
Efeitos Citopáticos	Tratamentos com SDS (%)											
	Colostro						Leite					
	C ⁻	C ⁺	S/SDS	0,25	0,5	1	C ⁻	C ⁺	S/SDS	0,25	0,5	1
Sincício	-	+++	++	+	-	-	-	+++	++	+(+)	-	-
Vacuolização	-	++	+	(+)	-	-	-	++	(+)	-	-	-
Destruição Celular	-	+++	+	(+)	(+)	-	-	+++	++	+(+)	-	-

C⁻: controle negativo; C⁺: controle positivo, S/SDS: sem SDS. -: sem efeito citopático; (+): efeito muito leve; +: efeito leve; +(>): efeito leve a moderado; ++: efeito moderado; +++: efeito intenso.

A Figura 5 mostra os efeitos citopáticos virais visualizados nas culturas provindas das células de colostro e de leite caprino tratados com SDS. Observou-se células multi-nucleadas, vacuolização e destruição celular, nas culturas sem adição de SDS (Figura 5, C e I). Estes efeitos citopáticos virais foram depreciados gradualmente, conforme a concentração de SDS dos tratamentos. Ao passo que, nas concentrações de SDS de 1% no colostro, não se observaram células com características de infecção viral (Figura 5, E). No leite, este efeito foi observado nas concentrações de SDS a 0,5 e 1% (Figura 5, K e L).

Além disso, nas concentrações de 0,5 e 1% no colostro e no leite, evidenciaram-se células de descamação da glândula mamária caracterizadas por formas mais arredondadas e núcleo maior em comparação com as da MSC (Figura 5, E, F e K - setas). Células estas, provindas, provavelmente, células de descamação da glândula mamária, oriundas do colostro ou leite.

Os efeitos citopáticos virais se mostrou mais atenuante nas amostras de colostro em comparação às amostras de leite. Essa diferença pode está diretamente relacionada às células de defesa (monócitos e macrófagos) e as moléculas lipídicas, que se fazem presentes em maior quantidade no colostro, fazendo com que o SDS não seja tão eficiente, devido às proporções de gorduras serem superiores as de surfactantes, tornando assim, possível a redução nos processos de sofrimento e lise celular (PARTEARROYO et al., 1990; KALMANZON et al., 1992). Em relação aos monócitos/macrófagos, quando não destruídos carregam o vírus a nível celular e de rebanho (HERRMANN-HOESING et al., 2007).



Fonte: Ana Lúcia Sousa

Figura 5. Co-cultivo com células de MSC e células somáticas do colostro e do leite. A e G: controle negativo da cultura, somente células de MSC (aumento 100x e 125x, respectivamente); B e H: controle positivo da cultura, com presença de sincícios (cepa padrão CAEV-Cork) (aumento 100x); C e J: tratamento controle (S/SDS) com as células de colostro e de leite, respectivamente, com a presença de sincício, vacuolização e destruição celular (aumento 200x). D, E e F: tratamento com SDS a 0,25; 0,5 e 1% no colostro, respectivamente. D: SDS a 0,25% observa-se presença de sincício com quatro núcleos (círculo) e células de tamanho visivelmente maior (aumento 200x). E: tratamento com SDS a 0,5%, com presença de células visivelmente maiores e arredondadas (setas) (aumento 200x). F: tratamento com SDS a 1%, sem presença de efeitos citopáticos, somente algumas células de morfologia diferenciada das demais, provenientes do colostro (seta) (aumento 100x). J, K e L: tratamento com SDS a 0,25; 0,5 e 1% no leite, respectivamente.; J: tratamento com SDS a 0,25%, com presença de sincício com seis núcleos (círculo) e células de tamanho visivelmente maior (aumento 200x); K: tratamento com SDS a 0,5%, com presença de células visivelmente maiores (setas) (aumento 200x); L: tratamento com SDS a 1%, sem presença de efeitos citopáticos (aumento 100x).

Análise da suspensão e sobrenadante celular do co-cultivo de colostro e leite por nPCR

Nas análises da suspensão e sobrenadante celular, pelo teste de nPCR, observou-se, que ao longo de 63 dias de co-cultivo, as amostras de colostros apresentaram resultados positivos pelo menos uma vez, independente do tratamento com SDS (Figura 6, A e B).

Em relação às amostras providas do co-cultivo do leite, os tratamentos com SDS nas concentrações de 0,25 e 0,5% apresentaram resultado positivo em todas as reações. No entanto, a concentração de SDS a 1% não apresentou resultado positivo em nenhuma das amostras moleculares ao longo do experimento (Figura 6, C e D).

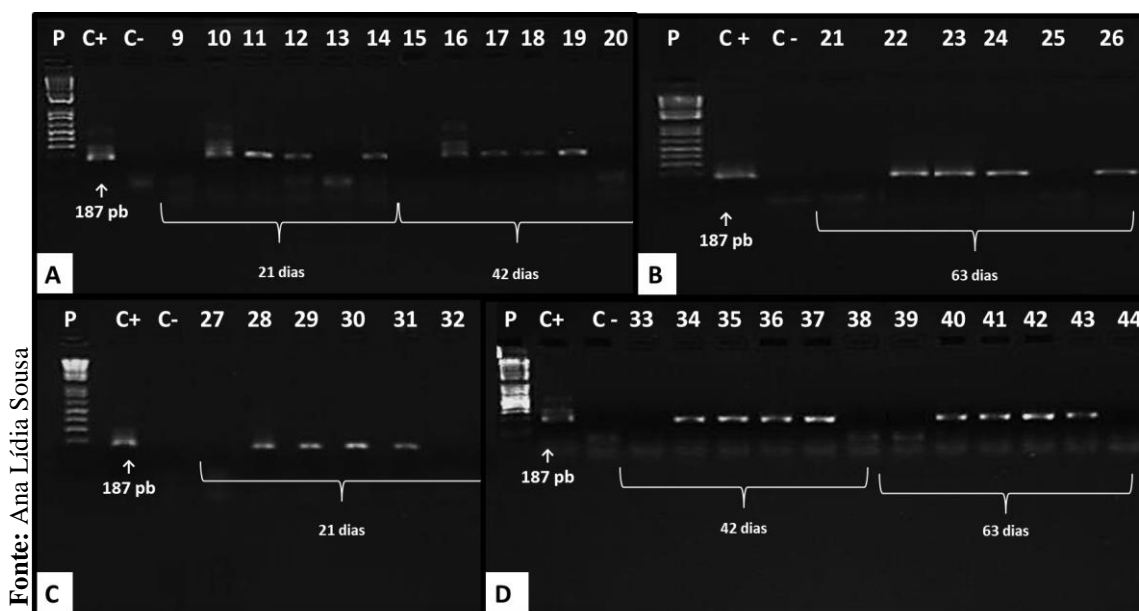


Figura 6. Eletroforese em gel de agarose a 2% corado com brometo de etídio, exibindo a amplificação do DNA proviral do CAEV (187pb) de 21, 42 e 63 dias de co-cultivo das amostras de colostro e leite. A e B referente aos testes com colostro: P (padrão molecular: DNA ladder 1kb); C+ (controle positivo da reação); C- (controle negativo da reação); 9, 15 e 21 (controles negativos da cultura); 10, 16 e 22 (controles positivos da cultura); 11, 17 e 23 (tratamento controle, colostro S/SDS), 12, 13,14, 18, 19, 20, 24, 25, 26 (amostras dos tratamentos com SDS a 0,25; 0,5 e 1%, de 21, 42 e 63 dias, respectivamente). C e D: referente aos testes com leite: P (padrão molecular: DNA ladder 1kb); C+ (controle positivo da reação); C- (controle negativo da reação); 27, 33 e 39 (controles negativos da cultura); 28, 34 e 40 (controles positivos da cultura); 29, 35 e 41 (tratamento controle, colostro S/SDS), 30, 31, 32, 36, 37, 38, 42, 43 e 44 (amostras dos tratamentos com SDS a 0,25; 0,5 e 1%, respectivamente).

Os dados encontrados neste estudo mostraram que o SDS apresentou atividade inibitória contra o CAEV no colostro, pois os efeitos citopáticos foram diminuindo gradativamente conforme as concentrações, no entanto sem proporcionar uma completa

inativação viral. Em relação ao leite, o SDS em concentrações de 0,25 e 0,5%, obteve atividade inibitória parcial contra o CAEV, pois os efeitos citopáticos foram diminuindo conforme as concentrações. Entretanto a concentração de 1% de SDS desempenhou uma completa inativação viral contra o CAEV em cultura, devido a presença de células sem características infecciosas do vírus, e o nPCR negativo para o CAEV.

Realizando um comparativo entre a atividade viral do SDS no CAEV e os dados encontrados na literatura referentes ao HIV-1, observa-se, que o SDS, para obter um resultado significativo na inativação viral do CAEV, necessitou de concentrações até 10 vezes maiores do que as usadas por Urdaneta et al. (2005), que em suas pesquisas, avaliaram um sistema rápido *in vitro* (MAGI - Multinuclear Activation of Galactosidase Indicator) que quantifica a infecciosidade viral após o tratamento microbicida, e constataram que o uso de SDS à 0,1 e 0,5%, durante 10 minutos, em culturas células HeLa, foi suficiente para inibir totalmente o índice de infecção viral ocasionado pelo HIV-1 em leite materno. As concentrações utilizadas em estudos realizados por Krebs et al. (1999) no HIV-1 foram de 0,025 à 0,05% de SDS, ou seja, entre 20 e 40 vezes menor em relação a concentração de 1% utilizadas no presente estudo.

Uma maior resistência dos LVPR em relação ao HIV também foi observada por Thormar et al. (1994), quando utilizaram vários inibidores virais, dentre eles: lectinas derivadas de plantas (LOA, GNA, NPA, CA, GlcNAc, UDA, Gal-4, GalNAc, SNA-II, BPA, IRA, SBA, Neu5Ac, Gal / GalNAc), TIBO-RT (inibidor da transcriptase reversa) e o AZT (3'-Azido-2',3'-dideoxythymidine). Estes autores verificaram que, para inativação do MVV, necessitou-se de uma quantidade de 12 a 40 vezes maior de lectinas, 200 a 300 vezes maior de TIBO-RT e 5 a 10 vezes maior de AZT, que as utilizada no HIV.

CONCLUSÕES

Os níveis citotóxicos foram diretamente proporcionais às concentrações molares de SDS/lipídeos presentes no colostro ou no leite caprino, sendo que no leite, o SDS apresentou maior nível de citotoxicidade, devido a menor quantidade de gordura presente.

A atividade viral, nas concentrações de 0,25; 0,5 e 1% de SDS no colostro promoveu inibição parcial dos efeitos citopáticos virais.

No leite, o SDS nas concentrações de 0,25 e 0,5% inibiram parcialmente, enquanto que a concentração a 1% promoveu a inativação eficiente do vírus da CAE.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ANGELOPOULOU, K.; KARANIKOLAOU, K.; PAPANASTASOPOULOU, M. First partial characterisation of small ruminant lentiviruses from Greece. **Veterinary Microbiology**, v.109, n.2, p.1-9, 2005.
- BARLOUGH, J.; EAST N.; ROWE, J.D.; VAN-HOOSEAR, K.; DEROCK, E.; BIGORNIA, L.; RIMSTAD, E. Double-nested polymerase chain reaction for detection of caprine arthritis-encephalitis virus proviral DNA in blood, milk and tissues of infected goats. **Journal of Virological Methods**, v.50, n.1-3, p. 101-114, 1994.
- BARTNIK, F.G. **Interaction of anionic surfactants with proteins, enzymes, and membranes. In Gloxhuber Ch, Kiinstler K (eds) Anionic surfactants: Biochemistry, toxicology, dermatology**, 2nd ed. Marcel Dekker: New York, p. 1-42, 1992.
- BENOIT, J.; CORMIER, M.; WEPIERRE, J. Effect of proteins on the assessment of surfactant cytotoxicity by an in vitro test: Possible correlation with in vivo data. **Toxicology In Vitro**, v.1, n.2, p.91-96, 1987.
- FLORES, E. F. **Virologia Veterinária**, Ed. da UFSM, Santa Maria, 2007. p. 67.
- GRIMBERG, J.; NAWOSCHIK; BELLUSCIO, L.; MECKEE, R.; TURCK. A.; EISENBERG, A. **Nucleic Acids Research**, v. 17, n 20, p. 83-90, 1989.
- HERRMANN-HOESING, L. M.; PALMER, G. H.; KNOWLES, D. P. Evidence of proviral clearance following postpartum transmission of an ovine lentivirus. **Virology**, v. 362, n.1, p.226–234, 2007.
- KARANIKOLAOU, K.; ANGELOPOULOU, K.; PAPANASTASOPOULOU, M.; KOUMPATI-ARTOPIOU, M.; PAPADOPOULOS, O.; KOPTOPOULOS, G. Detection of small ruminant lentiviruses by nPCR and serology tests in field samples of animals from Greece. **Small Ruminant Research**, v.58, n.2, p.181-187, 2005.

- KREBS, F.C.; MILLER, S.R.; MALAMUD, D.; HOWETT, M.K.; WIGDAHL, B.
Inactivation of human immunodeficiency virus type 1 by nonoxynol-9, C31G, or an alkyl sulfate, sodium dodecyl sulfate. **Antiviral Research**, v.43, n.3, p.157-173, 1999.
- MORALES-DE LANUEZ, A.; MORENO-INDIAS, I.; SANCHEZ-MACIAS, D.; CAPOTE, J.; JUSTE, M.C.; CASTRO, N.; HERNANDEZ-CASTELLANO, L.E.; ARGUELLO, A. Sodium dodecyl sulfate reduces bacterial contamination in goat colostrum without negative effects on immune passive transfer in goat kids. **Journal of Dairy Science**, v.94, n.1, p.410-415, 2011.
- MULLER, L. D.; SYHRE, D. R. Influence of Chemicals and Bacterial Cultures on Preservation of Colostrum. **Journal of Dairy Science**, v. 58, n.6, p. 957–961,1975.
- PARTEARROYO, M. A.; OSTOLAZA, H., GONI, F. M.; BARBERA-GUILLEM, E. Surfactant-induced cell toxicity and cell lysis. **Biochemical Pharmacology**, v.40, n.6, p.1323-1328, 1990.
- PIRET, J.; DÉSORMEAUX A.; BERGERON, M.G. Sodium Lauryl Sulfate, a Microbicide Effective Against Enveloped and Nonenveloped Viruses. **Current Drug Targets**. v.3, n.1, p. 17-30, 2002.
- RADOSTITS, O. M.; GAY, C. C.; BLOOD, D. C.; HINCHCLIFF, K. W. **Clínica veterinária: Um tratado de doenças dos bovinos, ovinos, suínos, caprinos e eqüinos**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2002. p. 1098 – 1101.
- ROWE, J. D.; EAST, N. E.; THUNNOND, M. C.; FRANTI, C. E.; PEDERSEN, N. C. Cohort study of natural transmission and two methods for control of caprine arthritisecephalitis virus infection in goats on a California dairy. **American Journal of Veterinary Research**, v.53, n.12, p.2386-2395, 1992.
- SALTARELLI, M.; QUERAT, G.; KONINGS, D.A M; VIGNE, R.; CLEMENTS, J.E. Nucleotide and transcriptal analysis of molecular clones of CAEV which generate infections virus. **Virology**, v.179, n.1, p. 347-364, 1990.

SARDI, S.I.; TORRES, J.A.; BRANDÃO, C.F.L.; TIGRE, D.M.; CAMPOS, G.S. Early Detection of goats infected with Lentivirus Small Ruminant virus by ELISA assay. **Revista de Ciências Médicas e Biológicas**, v.11, n.1, p. 35-40, 2012.

SCHNORR K.L.; PEARSON L.D. Intestinal absorption of maternal leucocytes by newborn lambs. **Journal of Reproductive Immunology**, v.6, n.5, p.329-337, 1984.

SHAPIRO, A. L.; VIFIUELA, E.; MAIZEL, J.V. Molecular weight estimation of polypeptide chains by electrophoresis in SDS-polyacrylamide gels. **Biochemical and Biophysical Research**, v.28, n.5, p. 815-820,1967.

SINGER, M. M.; TJEERDEMA, R.S. Fate and effects of the surfactant sodium dodecyl sulfate. **Reviews of Environmental Contamination and Toxicology**. v.133, n.1, p.95–149, 1993.

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

URDANETA, S.; WIGDAHL, B.; NEELY, E. B.; BERLIN, C. M., JR.; SCHENGRUND, C. L.; LIN, H. M.; HOWETT, M. K. Inactivation of HIV-1 in breast milk by treatment with the alkyl sulfate microbicide sodium dodecyl sulfate (SDS). **Retrovirology**, v. 2, n.1, p.28, 2005.

ZINK, M. C., JOHNSON, L. K. Pathobiology of lentivirus infections of sheep and goats. **Virus Research**, v.32, n.2, p.139-154, 1994.

CAPÍTULO 3

AVALIAÇÃO *IN VIVO* DO DODECIL SULFATO DE SÓDIO (SDS) COMO INATIVADOR QUÍMICO DO VÍRUS DA ARTRITE- ENCEFALITE CAPRINA (CAEV) EM LEITE E COLOSTRO

RESUMO

O objetivo da pesquisa foi avaliar *in vivo* a ação do dodecil sulfato de sódio (SDS) no colostro e leite caprino infectado com o vírus da Artrite-Encefalite Caprina (CAEV), bem como a receptividade dos cabritos a ingestão do leite e colostro tratados com o químico. Foram utilizados 31 animais distribuídos em três grupos experimentais que receberam colostro e leite com concentrações de SDS de 0,25; 0,5 e 1%, durante seis dias de tratamento. Foram constituídos, também, dois grupos controles, negativo e positivo. Observou-se que as três concentrações de SDS no colostro não promoveram alterações clínicas significativas no período de 24h de tratamento. Entretanto, com a continuidade da administração do SDS no leite nas concentrações de 0,5% e 1,0% observou-se diarreia leve e morte em mais de 50% dos animais, respectivamente. Além disso, as três concentrações de SDS não foram efetivas na inativação do CAEV no colostro e leite caprino, comprovada pela soroconversão dos animais.

Palavras-Chave: Inativação viral, Macrófagos, Surfactante

ABSTRACT

Objective of the research was to assess in vivo the action of sodium dodecyl sulfate (SDS) in colostrum and milk goats infected with the Caprine Arthritis-Encephalitis virus (CAEV) and the receptivity of the animals to the milk and colostrum intake treated with the chemical. Were used 31 newborn goats divided into three experimental groups receiving milk and colostrum with SDS concentrations of 0,25; 0,5 and 1% during six days of treatment. Were constituted also two controls, positive and negative groups. It was observed that the three SDS concentration in colostrum did not cause significant changes in clinical treatment period of 24 hours. However, with continuity of administration SKS milk in 0.5% and 1.0% concentrations was observed mild diarrhea and death of more than 50% of animals respectively. Additionally, the three concentrations of SDS were not effective in the inactivation of CAEV in goats colostrum and milk, confirmed the seroconversion of the animals.

Keywords: viral inactivation; macrophages; surfactant

INTRODUÇÃO

As lentiviroses de pequenos ruminantes (LVPRs) são enfermidades causadas por vírus da família Retroviridae, gênero *Lentivirus*, representados por dois grandes grupos filogenéticos, o vírus da Maedi-Visna (MVV) e o vírus da Artrite-Encefalite Caprina (CAEV) (PISONI et al., 2005). A Artrite-Encefalite Caprina (CAE) é uma enfermidade incurável, de caráter infectocontagioso (ADAMS; CRAWFORD, 1981), que acarreta, de modo geral, grandes perdas econômicas à caprinocultura (GREENWOOD, 1995; CARNEIRO, 2011), e clinicamente, ocasiona pneumonia intersticial, encefalite, artrite, mastite, emagrecimento progressivo (PHELPS; SMITH, 1993), além de problemas neurológicos em cabritos, responsável por incoordenação, tremores musculares e paralisia (CALLADO et al., 2001).

O vírus da CAE apresenta tropismo por células do sistema monocítico-fagocitário, e estas, se fazem presentes no sangue, colostro, leite, entre outros fluídos biológicos (ZINK; JOHNSON, 1994). A transmissão lactogênica (via colostro e leite) é um modelo natural de infecção, reconhecida pelos lentivírus de modo geral, que garante uma disseminação do vírus entre gerações, e sua persistência em rebanhos, em nível populacional. Além disso, desempenha um papel fundamental na biologia dos LVPRs, por tratar-se da principal via de transmissão da lentivirose (PISONI et al., 2010; PÉPIN et al., 1998), devido à extensa quantidade de células infectadas presentes no leite e colostro, dentre elas, monócitos e/ou macrófagos (ROWE et al., 1992). Segundo Herrmann-Hoesing et al. (2007), os animais são expostos a infecção, através do trato gastrointestinal, pela ingestão do colostro infectado, tanto pelo vírus livre como pelo pro-vírus presente no interior de monócitos/macrófagos.

Estudos correlacionam a atividade inibitória de micro-organismos com o uso de aditivos químicos para o leite (MULLER; SYHRE 1975; KREBS et al., 1999; URDANETA et al., 2005). Dentre estes, o dodecil sulfato de sódio (SDS) é um agente surfactante, com propriedades lisantes e citolíticas, que apresenta uma possível atividade antiviral, em protótipos do HIV-1 (Imunodeficiência Humana), HSV (herpes vírus) e HPV (papiloma vírus) em culturas celulares (PIRET et al., 2002). Urdaneta et al. (2005) e Krebs et al. (1999) demonstraram que o SDS a 0,1% pode ser eficaz na inativação do HIV-1 no leite e relataram que esta concentração está de acordo com os limites seguros para o consumo infantil. Além disso, outros estudos indicam que o SDS a 1% no colostro, é um biocida eficiente, e que os cabritos alimentados não sofreram

déficit na transferência passiva imune, bem como problemas de saúde (MORALES-DE LA NUEZ et al., 2011).

Questiona-se que o SDS poderia ser usado no bloqueio da transmissão do vírus da CAE pelo colostro e leite. Diante do exposto, o objetivo da pesquisa foi avaliar *in vivo* a ação do dodecil sulfato de sódio (SDS) no colostro e leite caprino infectado com o vírus da Artrite-Encefalite Caprina, além da receptividade dos animais ao produto químico.

MATERIAL E MÉTODOS

Este estudo foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Embrapa Caprinos e Ovinos de acordo com o protocolo de N° 012/2014.

Local e período do experimento

O experimento foi realizado nos laboratórios de virologia, biologia molecular e patologia clínica e no campo experimental da Embrapa Caprinos e Ovinos, no período de fevereiro a novembro de 2015. A Embrapa está localizada no Município de Sobral, na região norte do Estado do Ceará (latitude 3° 45'0,5" sul, longitude 40° 20'45,8" oeste, 111 metros de altitude). O clima da região, pela classificação de Köppen, é Aw de Savana (MILLER, 1971), caracterizado por um período chuvoso (inverno) de janeiro a junho e um período seco (verão) de julho a dezembro, com temperaturas elevadas ao longo do ano, apresentando médias máximas de 32°C e mínimas de 22°C e pluviosidade média de 759 mm/ano.

Grupos experimentais

As concentrações de SDS à 0,25; 0,5 e 1 % foram testados em 31 cabritos, machos, nascidos de fêmeas comprovadamente negativas pelo teste *Western blot* (WB) e reação em cadeia de polimerase *nested* (nPCR). Cada grupo experimental foi composto de sete cabritos. Formaram-se também dois grupos controle (positivo e negativo), composto de cinco animais cada (Tabela 1). O grupo controle positivo recebeu colostro e leite de animais positivos sem tratamento. No grupo controle

negativo, os cabritos receberam colostro e leite de animais negativos tratados termicamente (56°C por uma hora). Os animais foram separados imediatamente após o nascimento, pesados e submetidos aos mesmos testes de nPCR e WB.

Tabela 1. Descrição dos Grupos Experimentais

Grupos	Nº de Animais	Tratamento
C ⁺	5	Controle Positivo
C ⁻	5	Controle Negativo
G1	7	SDS à 0,25%
G2	7	SDS à 0,5%
G3	7	SDS à 1%

Diluição do SDS

Adaptou-se a metodologia utilizada por Urdaneta et al. (2005) para a diluição do SDS. Preparou-se, portanto, uma concentração padrão (CP) a 10%, utilizando-se 100 g de SDS (C₁₂H₂₅NAO₄S - CQuímica®) para cada 1000 mL de água milli-Q estéril, e a armazenou em temperatura ambiente e ao abrigo de luz, até a sua utilização. Para a formação das concentrações de 0,25; 0,5 e 1% utilizaram-se, respectivamente, 25, 50 e 100 mL da CP para cada litro de colostro ou de leite caprino utilizado na alimentação dos animais de cada grupo experimental.

Preparo do inóculo com o SDS e administração do colostro/leite

Colostro e leite frescos, de cabras sabidamente positivas por meio dos testes de nPCR e WB, foram coletados diariamente e combinados em *pool* por coleta. Antes de qualquer tratamento coletou-se uma alíquota (10 mL) de colostro ou de leite para o teste de nPCR, para identificar a presença do vírus da CAE nas amostras. Em seguida, o *pool* de colostro ou de leite foi tratado com SDS nas concentrações de 0,25; 0,5 e 1%, durante 15 min, e oferecido aos cabritos. Os tratamentos com o *pool* de colostro e de leite foram administrados aos animais, conforme mostra Tabela 2, e a administração dos tratamentos ocorreram por um período de seis dias.

Tabela 2. Administração do colostro ou leite caprino durante o período do experimento

Grupo	Tratamento	Período	Quant. (PV) ¹	Especificação
(C ⁺) ²	Colostro	24h	10%	Colostro/leite provindo de cabras positivas.
	Leite	5d	20%	
(C ⁻) ³	Colostro	24h	10%	Colostro tratado termicamente e leite pasteurizado.
	Leite	5d	20%	
G1	Colostro	24h	10%	Colostro/leite tratado com 0,25% de SDS
	Leite	5d	20%	
G2	Colostro	24h	10%	Colostro/leite tratado com 0,5% de SDS
	Leite	5d	20%	
G3	Colostro	24h	10%	Colostro/leite tratado com 1% de SDS
	Leite	5d	20%	

¹:quantidade de alimento a partir do peso vivo do animal, ²:Controle positivo, ³:controle negativo.

Avaliação das alíquotas de colostro e leite positivo para CAE

- **Preparo das amostras**

As alíquotas de leite e colostro provindo das cabras positivas para CAE foram centrifugadas a 3.000 g, durante 15 min, a 4°C. Em seguida, com auxílio de uma espátula, retirou-se a camada lipídica e descartou-se o sobrenadante. Logo após, transferiu-se o *pellet* para microtubos tipo *eppendorf*®, contendo 1000 µL PBS 1X. Realizou-se a homogeneização em vórtex e uma nova centrifugação nas mesmas condições. Este procedimento de lavagem foi realizado cinco vezes. Por fim, descartou-se 900 µL do sobrenadante e homogeneizou-se o *pellet* com os 100 µL restantes no microtubo (SARDI et al, 2012; ANGELOPOULOU et al., 2005; KARANIKOLAOU et al., 2005).

- **Extração de DNA do leite e Colostro**

Extraiu-se o DNA amostral com o preparo do mix de extração (ME) contendo 380 µL de solução de digestão¹² e 20 µL Proteinase K¹³, por amostra. Adicionou-se então, 400 µL do ME a cada microtubo com o *pellet* de células. Os tubos foram levados

¹² Solução de digestão: Tris-HCl 10 mM (trizma base a 0,121g, para 80 mL de H₂O) + 0,372 g de EDTA; 0,0584g de NaCl, SDS à 0,5%)

¹³ Proteinase K: 20 mg/mL, Tris-HCl 10 mM (trizma base a 0,121g, para 80 mL de H₂O, pH: 7,5) + 0,29 g de ClCa + 100 mL de glicerol (reagentes: Sigma-Aldrich®).

ao banho-maria a 55°C por 2 h, sendo homogeneizados a cada 30 min. Após incubação, foram centrifugados por 5 min a 16.100 g, e os sobrenadantes transferidos para um novo microtubo. Em seguida, adicionou-se 200 µL de cloreto de lítio (7,5 M) e as amostras foram submetidas à -80 °C de temperatura, por 10 min. Posteriormente, foram centrifugadas por 15 min a 16.100 g. O sobrenadante de cada amostra foi novamente transferido para um novo microtubo. Adicionou-se 1.000 µL de etanol 100% e inverteram-se os tubos aproximadamente 50 vezes, até a precipitação do DNA. Em seguida, os microtubos foram novamente centrifugados a 16.100 g, por 10 min. Após, adicionou-se 1.000 µL de etanol 70%, e as amostras foram centrifugadas a 16.100 g por 5 min. Então, o sobrenadante foi cuidadosamente descartado e os tubos invertidos em papel de filtro por 30 min. Posteriormente, ressuspendeu-se o *pellet* em 50 µL de água estéril, homogeneizou-se em vórtex e incubou-se em banho-maria a 55 °C por 5 min, seguido de nova homogeneização. Por fim, centrifugou-se cada amostra por 10 segundos a 16.100 g e estocou a -20 °C (GRIMBERG et al., 1989).

Monitoramento dos Animais Experimentais

- **Coletas de sangue e preparo das amostras**

Os animais foram submetidos às coletas de sangue, para os testes de diagnóstico, que foram realizadas às 0h, 7 dias, 15 dias, 30 dias e mensalmente até finalizar o período de 6 meses. O sangue dos animais foi coletado por venipunção da jugular com auxílio de coletor, agulha e tubos do tipo vacutainer® de 5mL, com EDTA (etileno-diamino-tetracético) e com tubos de 10 mL sem anticoagulante. As amostras foram centrifugadas a 3000 g por 15 min. Os soros sanguíneos, provindo dos tubos sem anticoagulante, foram armazenados em microtubos tipo *ependorf*® e congelados a -20°C até a realização do WB. As amostras com EDTA foram submetidas a centrifugação e extraíram-se os leucócitos. Estes foram transferidos para microtubos de 1,5 mL, tipo *ependorf*®. A obtenção destas células foi realizada por meio de três lavagens com cloreto de amônia (0,84%) e duas com 1000 µL tampão sódio fosfato¹⁴, por meio de centrifugação à 1.500 g por 5 min cada. Após a última lavagem, retirou-se

¹⁴ Tampão sódio fosfato (PBS 1 X): 8g de NaCl; 0,2g de KCl; 0,2g de KH₂PO₄; 1,15g de Na₂HPO₄; 1000 mL de H₂O

900 μL do sobrenadante, e homogeneizaram-se as células com os 100 μL restantes. Posteriormente, as amostras foram armazenadas a $-20\text{ }^\circ\text{C}$.

- **Extração de DNA de leucócitos do sangue**

Extraíu-se o DNA amostral com o preparo do mix de extração (ME) contendo 380 μL de solução de digestão¹⁵ e 20 μL Proteinase K¹⁶, por amostra. Adicionou-se então, os 400 μL do ME a cada microtubo com o *pellet* de células. Os tubos foram levados ao banho-maria a 55°C por 2 h, homogeneizando-os a cada 30 min. Após incubação, foram centrifugados por cinco minutos a 16.100 g, e transferiu-se, o sobrenadante, para um novo microtubo. Em seguida, adicionou-se 200 μL de cloreto de lítio (7,5 M) e as amostras foram submetidas à $-80\text{ }^\circ\text{C}$, por 10 min, e centrifugadas por 15 min a 16.100 g. O sobrenadante de cada amostra foi novamente transferido para um novo microtubo. Adicionou-se 1.000 μL de etanol 100% e inverteram-se os tubos aproximadamente 50 vezes, até a precipitação do DNA. Em seguida, os microtubos foram novamente centrifugados a 16.100 g, por 10 min. Após, adicionou-se um mL de etanol 70%, e as amostras foram centrifugadas a 16.100 g por 5 min. Então o sobrenadante foi cuidadosamente descartado e os tubos invertidos em papel de filtro por 30 min. Posteriormente, ressuspendeu-se o *pellet* em 50 μL de água estéril, homogeneizou-se em vortex e incubou-se em banho-maria a 55°C por 5 min, seguido de nova homogeneização. Por fim, centrifugou-se cada amostra por 10 segundos a 16.100 g e as estocou a $-20\text{ }^\circ\text{C}$ (GRIMBERG et al., 1989).

Testes de diagnóstico

- **Reação em cadeia da polimerase *nested* (nPCR)**

Para a amplificação do DNA foram realizados dois *rounds* de PCR. No primeiro, o *mister mix* (MM) foi preparado usando 36,35 μL de água livre de DNase, o

¹⁵ Solução de digestão: Tris-HCl 10 mM (trizma base a 0,121g, para 80 mL de H₂O) + 0,372 g de EDTA; 0,0584g de NaCl, SDS à 0,5%) (reagentes: Sigma-Aldrich®)

¹⁶ Proteinase K: 20 mg/mL [Tris-HCl 10 mM (trizma base a 0,121g, para 80 mL de H₂O, pH: 7,5) + 0,29 g de ClCa + 100 mL de glicerol] (reagentes: Sigma-Aldrich®)

Kit PCR¹⁷, os iniciadores do gene *gag*: *Primer 1*¹⁸ e *Primer 2*¹⁹, em 1 µL cada (Sigma-Aldrich®). Aliquotou-se 47 µL do MM em microtubos, e em seguida, adicionaram-se 3 µL das amostras a serem testadas, os controles positivo e negativo da reação. As amostras foram levadas ao amplificador *mastercycler epgradientS eppendorf® realplex*, programado com quatro estágios distintos. O primeiro à 94 °C por cinco min (desnaturação inicial). O segundo, com 35 ciclos, nas temperaturas: 94°C/60 segundos (desnaturação), 56°C/ 60 segundos (anelamento), 72°C/45 segundos (extensão). O terceiro estágio ocorreu com 72 °C por sete min (extensão final) e o último estágio conservou as amostras à 4 °C de temperatura.

Para o segundo *round*, preparou-se novamente o MM, nas mesmas condições anteriores, utilizando, neste caso, os *Primer 3*²⁰ e *Primer 4*²¹, também iniciadores do gene *gag*. Distribui-se o 49 µL MM em microtubos juntamente com um µL do produto do 1º *round*. Novamente, direcionou-se as amostras ao termociclador para a amplificação molecular. Posteriormente, os produtos de nPCR das amostras foram separados por eletroforese em gel de agarose a 2% contendo brometo de etídio (2,5 µl em 50 ml) em tampão de corrida²². Por fim, as bandas presentes no gel foram visualizadas em luz ultravioleta (UV) e fotodocumentadas (BARLOUGH et al., 1994; SALTARELLI et al., 1990).

- **Western blot (WB)**

Para a realização do WB, utilizou-se antígeno (Ag) produzido pelo Laboratório de Virologia da Embrapa Caprinos e Ovinos. O Ag derivou de cultivos secundários de membrana sinovial caprina (MSC), infectadas com cepa padrão CAEV-Cork (PINHEIRO et al., 2011).

Na realização da eletroforese SDS-PAGE, utilizou-se gel de separação a 12,5% e gel de concentração a 4%. No preparo das amostras, 6,2 µL de Ag CAEV-Cork foram diluídos em 8,8 µL de tampão de amostra (TA), e adicionados no primeiro poço e 20µL de amostra padrão (GE Healthcare, Amersham™, LMW Electrophoresis, 17-004-01) no

¹⁷ Kit NPCR: 5 µL Tris HCl + KCl pH:8,0; 3 µL MgCl₂; 0,25 µL dNTPs (dATP, dCTP, dGTP, dTTP) e 0,4 µL de Taq DNA polimerase (reagentes: Sigma-Aldrich®)

¹⁸ *Primer 1*: CAAGCAGCAGGAGGGAGAAGCTG (Sigma-Aldrich®)

¹⁹ *Primer 2*: TCCTACCCCATTAATTTGATCCAC (Sigma-Aldrich®)

²⁰ *Primer 3*: GTTCCAGCAACTGCAAACAGTAGCAATG (Sigma-Aldrich®)

²¹ *Primer 4*: ACCTTTCTGCTTCTTCATTTAATTTCCC (Sigma-Aldrich®)

²² Tampão de corrida: 53,90 g de trizma base; 3,72 g de EDTA - ethylenediaminetetraacetic acid; 27,5 g de ácido bórico (reagentes: Sigma-Aldrich®)

poço seguinte do gel. Ajustou-se o aparelho para 170V, 1Å por 2h (PINHEIRO et al., 2011). Após a separação proteica, houve transferência passiva destas, para membrana de nitrocelulose (MN - Dura-blottm 0,45µm - SIGMA), por meio da montagem de placas de vidro com o gel e a MN em forma de sanduíche, segundo metodologia descrita por Tesoro-Cruz et al. (2009).

Realizou-se o bloqueio das MN com PBS-1X, por uma hora, a temperatura de 25 à 27 °C. Em seguida, foram lavadas com tampão fosfato-Twinm (PBS-T 0,05%), três vezes por 5 min cada lavagem. Pós-lavagem, as membranas foram cortadas em tiras e enumeradas. Em tubos de ensaio, colocou-se 2,45 mL de tampão fosfato (PBS-1X), as tiras e 50 µL dos soros sanguíneos, sob leve agitação por 30 min. Em seguida, lavaram-se as tiras três vezes com PBS-T 0,05% por 5 min. O conjugado IgG coelho anti-cabra (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) foi diluído a 1:20.000 e distribuído nas tiras, nas condições anteriormente descritas. Após uma hora, as tiras foram lavadas com PBS-T 0,05% por duas vezes e uma lavagem com PBS 1X, por cinco min cada. Para a revelação usou-se o substrato (5 mg de 4-cloronaphthol, 8,32 mL de PBS 1X; 10 mg Diaminobezidine - DAB, 10 mL de PBS 1X; 1,66 mL de metanol) sobre as tiras, por 30 segundos em ambiente escuro. A reação foi acompanhada e interrompida com água destilada (PINHEIRO et al., 2011).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Avaliação da receptividade dos cabritos ao colostro e leite tratado com SDS

Durante o período de aleitamento experimental, os animais do grupo G1 não apresentaram alterações clínicas, mostrando boa receptividade ao consumir o leite e o colostro tratados com SDS em todas as concentrações (Figura 1 – A). Os animais pertencentes ao grupo G2 e G3, obtiveram boa aceitação do colostro tratado com SDS a 0,5 e 1%, respectivamente, sem apresentar possíveis danos fisiológicos. Contudo, observou-se, que no período de ingestão do leite, nas mesmas concentrações de SDS, ambos os grupos apresentaram rejeição ao consumo do leite tratado. Para a aceitação pelos animais, ao leite tratado, adicionou-se, a cada 200 mL de leite, 2g de palatilizante Nesquik (Nestle®). Verificou-se que, após 24 horas de tratamento, todos os animais do grupo G2 (7/7) apresentaram leve diarreia, provavelmente, devido ao

consumo do leite com o surfactante (Figura 1 – B). Ainda assim, os animais permaneceram no experimento até a finalização dos seis dias de administração do químico.



Fonte: Ana Lídia Sousa

Figura 1. Efeito do tratamento com SDS *in vivo*. A: grupo G1 apresentou boa aceitação ao colostro/leite com SDS a 0,25 %. B: animal do grupo G2 apresentou diarreia. G3: animais mortos (4/7) com o tratamento.

Em relação ao grupo G3, após 24h o consumo do leite tratado com SDS a 1%, 57,1% (4/7) dos animais vieram a óbito e os demais apresentaram forte diarreia e apatia, muito provavelmente em decorrência da ingestão do SDS (Figura 1 – C). Diante do fato, optou-se pela suspensão do tratamento para manutenção e acompanhamento dos animais restantes até o fim do experimento.

Estes efeitos adversos, que ocorreram nos animais dos grupos G2 e G3, decorreram provavelmente da ação lisante do SDS, que não foi totalmente emulsificado aos lipídios presentes no leite, gerando possíveis lesões nas células presentes nas paredes gastrointestinais dos animais.

O SDS pode ocasionar alterações na permeabilidade da membrana celular, já que, em contato direto com células, sua estrutura alvo é a membrana celular (BENOIT et al., 1987; PARTEARROYO et al., 1990). Além do mais, o SDS em altas

concentrações, pode ocasionar três fases de interação entre surfactante/lipídeos. Na primeira fase, o tensoativo pode causar alterações na permeabilidade da membrana. Em seguida a estrutura lamelar da membrana (arranjo da bicamada lipídica) é solubilizada, resultando em liberação de proteínas, lipoproteínas e micelas, e a completa lise celular, caracterizando a segunda fase. Por fim, pode ocorrer à separação de fosfolipídios e desnaturação estrutural de proteínas (terceira fase) (BARTNIK, 1992).

Segundo Morales-de La Nuez et al. (2011), o tratamento com SDS a 1% em colostro de cabra, proporcionou a redução da carga bacteriana e a menor destruição do nível de IgG, em comparação aos dados observados na pasteurização. Além disso, cabritos alimentados com SDS a 1% no colostro não apresentaram déficit patológicos e alterações na transferência passiva-imune do animal.

Kimura e Yoshida (1982), em estudos farmacológicos, observaram a redução das atividades enzimáticas, após a administração dietética do SDS a 0,25% na alimentação de camundongos. Durante a experimentação, foram observadas diarreia, esfoliação das membranas gastrointestinais e a desnutrição dos animais.

Os dados observados nesse estudo, com a administração somente do colostro tratado com o SDS corroboram com Morales-de La Nuez et al. (2011), nos quesitos de transferência passiva imune e na saúde animal. Em adição, o SDS pode ocasionar efeitos adversos, quando administrado na alimentação, corroborando com os dados de Kimura e Yoshida (1982).

Resultado do nPCR em colostro e leite caprino

Na figura 2, observa-se os testes de nPCR das amostras de colostro e de leite que foram utilizados ao longo dos seis dias de aleitamento experimental. Notou-se resultado positivo em duas das três amostras de colostro. No leite, foi detectado DNA-proviral em 70% (7/10) das amostras ao longo do aleitamento. Portanto, observa-se que os animais foram expostos ao vírus em todos os dias do aleitamento.

A detecção do CAEV no leite pode sugerir a presença de infecção viral da glândula mamária, e apresentar um *status* de eliminação do vírus por esta via de transmissão (PERETZ et al., 1993). Deste modo, ocorre absorção do vírus no leite, por meio desta via, que favorece a disseminação da enfermidade (HERRMANN-HOESING et al., 2007)

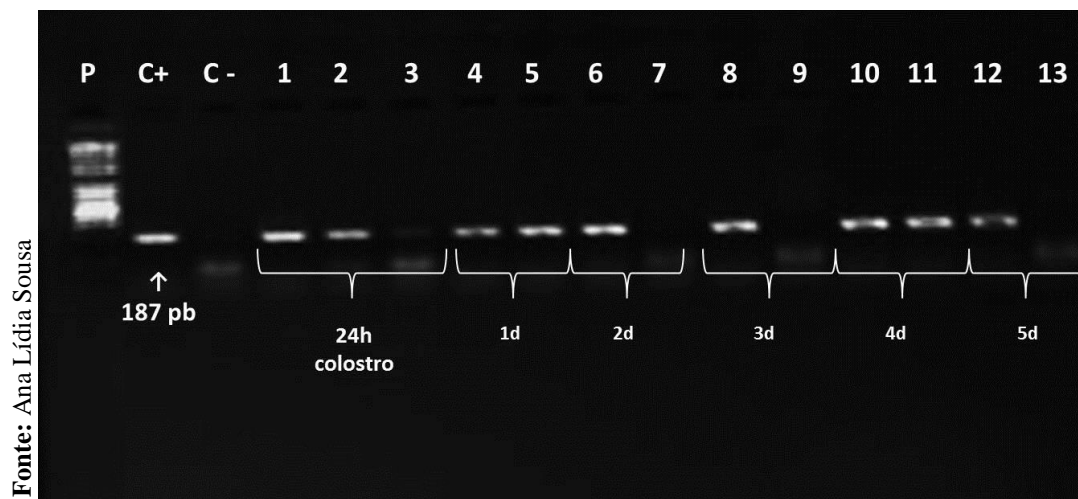


Figura 2. Eletroforese em gel de agarose a 2% corado com brometo de etídio, exibindo a amplificação do DNA proviral do CAEV (187pb) das amostras de colostro e leite de cabras positivas para CAE. P (padrão molecular: DNA ladder 1kb); C+ (controle positivo da reação); C- (controle negativo da reação); 1, 2 e 3 (amostra de colostro); 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12 e 13 (amostras de leite manhã e tarde, respectivamente).

Acompanhamento molecular e sorológico dos animais experimentais

A tabela 3 apresenta o acompanhamento mensal, por meio dos testes de nPCR e WB, dos grupos experimentais que foram submetidos aos tratamentos com SDS a 0,25; 0,5 e 1% no colostro e leite. Nas coletas realizadas após o nascimento dos animais (0h), para os testes de nPCR e WB, obteve-se o diagnóstico negativo dos animais com exceção de um animal pertencente ao G1, o qual foi eliminado do experimento, por apresentar resultado positivo para CAE no teste de WB.

Em relação ao teste de nPCR, os animais dos grupos G1 e G2 apresentaram resultado positivo desde as primeiras coletas após a experimentação (7 dias), e na coleta referente aos 180 dias, 60% (3/5) dos animais do grupo G1, e 40% (2/5) do grupo G2, apresentaram resultado de nPCR positivo para a lentivirose. Em relação aos animais do grupo G3, o diagnóstico positivo para CAE foi observado somente na coleta de 150 dias de experimentação, onde somente 33,3% (1/3) foram positivos, e aos 180 dias de coleta, 100% (3/3) dos animais foram positivos para CAE no teste molecular. Os dados encontrados neste estudo mostram que as concentrações de SDS analisadas no leite e colostro caprino não promoveram uma efetiva inativação dos lentivírus *in vivo*, expondo os animais a infecção.

No teste de WB, avaliado aos 90 dias, verificou-se a presença de anticorpos anti-LVPR em todos os grupos que receberam colostro/leite de animais positivos (G1-

33,3%; G2 - 42,8%; G3 - 66,7%; e o Grupo controle positivo - 80%) confirmando que ocorreu infecção e ativação do sistema imunológico. Verificou-se, também, que estes grupos apresentaram animais positivos em todas as coletas posteriores (120 dias; 150 dias e 180 dias). Importante salientar que a presença de anticorpo anti-LVPR até 70 dias, detectado pelo WB muito provavelmente seja de origem materna, pois teriam vindo junto com o colostro e leite - imunidade passiva (SOUSA et al., 2015). Como foi evidenciado resultado positivo a partir de 120 dias de experimentação, muito provavelmente, as concentrações de SDS não foram eficazes na inativação viral, demonstrando transmissão por meio da ingestão do colostro e leite contaminados.

Apesar de Piret et al. (2002) relatarem que o SDS é um potente inibidor da infecciosidade de vírus envelopados e não envelopados através de propriedades desnaturantes de proteínas, não ocorreu, neste estudo, inativação eficiente dos LVPR. Além disso, os dados *in vivo*, encontrados neste estudo, contradizem com os observados *in vitro* por Urdaneta et al. (2005), que avaliaram o nível de infecciosidade do HIV, após o tratamento com o SDS à 0,1 e 0,5%, durante 10 minutos. Segundo estes autores, as concentrações e o tempo de ação do SDS foram suficientes para inibir totalmente o índice de infecção viral do HIV-1, em leite materno. Este trabalho também não corrobora com Krebs et al. (1999), que constataram inibição do HIV-1, a partir das concentrações de 0,025 à 0,05% de SDS.

CONCLUSÃO

As concentrações de 0,25; 0,5 e 1% de SDS não apresentaram efeitos nutricionais e sanitários negativos aos animais que ingeriram colostro tratado. Entretanto, no leite, o SDS a 0,5 e 1%, gerou complicações gastrointestinais, evidenciadas por meio de diarreias profusas. Além disso, a adição de SDS nas concentrações de 0,25; 0,5 e 1% no colostro e leite não promoveu a inativação do vírus da CAE expondo os animais à infecção.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ANGELOPOULOU, K.; KARANIKOLAOU, K.; PAPANASTASOPOULOU, M. First partial characterisation of small ruminant lentiviruses from Greece. **Veterinary Microbiology**, v.109, n.2, p.1-9, 2005.
- BARLOUGH, J.; EAST N.; ROWE, J.D.; VAN-HOOSEAR, K.; DEROCK, E.; BIGORNIA, L.; RIMSTAD, E. Double-nested polymerase chain reaction for detection of caprine arthritis-encephalitis virus proviral DNA in blood, milk and tissues of infected goats. **Journal of Virological Methods**, v.50, n.1-3, p. 101-114, 1994.
- BARTNIK, F.G. **Interaction of anionic surfactants with proteins, enzymes, and membranes. In Gloxhuber Ch, Kiinstler K (eds) Anionic surfactants: Biochemistry, toxicology, dermatology**, 2nd ed. Marcel Dekker: New York, p 1-42, 1992.
- BENOIT, J.; CORMIER, M.; WEPIERRE, J. Effect of proteins on the assessment of surfactant cytotoxicity by an in vitro test: Possible correlation with in vivo data. **Toxicology In Vitro**, v.1, n.2, p.91-96, 1987.
- CALLADO, A.K.C.; CASTRO, R.S.; TEIXEIRA, M.F.S. Lentivírus de pequenos ruminantes (CAEV e Maedi-Visna): Revisão e perspectivas. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.21, n.3, p.87-97, 2001.
- CARNEIRO, F.F.D. **Perdas econômicas decorrentes da Artrite-Encefalite Caprina**. 97f. Dissertação (Mestrado em Zootecnia) - Universidade Estadual Vale do Acaraú - UVA, Sobral - CE, 2011.
- GREENWOOD, P.L. Effects of caprine arthritis-encephalitis virus on productivity and health of dairy goats in NewSouth Wales, Australia. **Preventive Veterinary Medicina**, n. 22, v. 1-2, p. 71-87, 1995.
- GRIMBERG, J.; NAWOSCHIK; BELLUSCIO, L.; MECKEE, R.; TURCK. A.; EISENBERG, A. **Nucleic Acids Research**, v.17, n 20, p. 83-90, 1989.

- HERRMANN-HOESING, L. M.; PALMER, G. H.; KNOWLES, D. P. Evidence of proviral clearance following postpartum transmission of an ovine lentivirus. **Virology**, v.362, n.1, p.226–234, 2007.
- KARANIKOLAOU, K.; ANGELOPOULOU, K.; PAPANASTASOPOULOU, M.; KOUMPATI-ARTOPIOU, M.; PAPADOPOULOS, O.; KOPTOPOULOS, G. Detection of small ruminant lentiviruses by nPCR and serology tests in field samples of animals from Greece. **Small Ruminant Research**, v.58, n.2, p.181-187, 2005.
- KIMURA, T.; YOSHIDA, A. Toxicity of detergent feeding and effect of the concurrent feeding of dietary fiber in rats. **Nutrition reports international Journal**, v.26, n.2, p.271-279, 1982.
- KREBS, F.C.; MILLER, S.R.; MALAMUD, D.; HOWETT, M.K.; WIGDAHL, B. Inactivation of human immunodeficiency virus type 1 by nonoxynol-9, C31G, or an alkyl sulfate, sodium dodecyl sulfate. **Antiviral Research**, v.43, n.3, p.157-173, 1999.
- MORALES-DE LANUEZ, A.; MORENO-INDIAS, I.; SANCHEZ-MACIAS, D.; CAPOTE, J.; JUSTE, M.C.; CASTRO, N.; HERNANDEZ-CASTELLANO, L.E.; ARGUELLO, A. Sodium dodecyl sulfate reduces bacterial contamination in goat colostrum without negative effects on immune passive transfer in goat kids. **Journal of Dairy Science**, v.94, n.1, p.410-415, 2011.
- PARTEARROYO, M. A.; OSTOLAZA, H., GONI, F. M.; BARBERA-GUILLEM, E. Surfactant-induced cell toxicity and cell lysis. **Biochemical Pharmacology**, v.40, n.6, p.1323-1328, 1990.
- PÉPIN, M.; VITU, C.; RUSSO, P.; MORNEX, J.F.; PETERHANS, E. Maedi-Visna virus infection in sheep: a review. **Veterinary Research**, v.29, n.3, p.341–367, 1998.
- PERETZ, G.; ASSO, J.; DEVILLECHAISE, P. Le C.A.E.V.: revue des connaissances actuelles et consequences pratiques. **Revue de Medecine Veterinaire**, v.144, n.2, p.93-98, 1993.
- PHELPS, S.L.; SMITH, M.C. Caprine arthritis encephalitis virus infection. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v.203, n.1, p.1663-1666, 1993.

- PINHEIRO, R. R.; BRITO, R. L. L. de; RODRIGUES, A. de S.; DIAS, R. P.; ANDRIOLI, A.; GOUVEIA, A. M. G. **Protocolo de immunoblotting para diagnóstico da artrite-encefalite caprina**. Sobral: Embrapa Caprinos e Ovinos, 2011. 4 f. (Embrapa Caprinos e Ovinos. Comunicado Técnico, 122).
- PIRET, J.; DÉSORMEAUX A.; BERGERON, M.G. Sodium Lauryl Sulfate, a Microbicide Effective Against Enveloped and Nonenveloped Viruses. **Current Drug Targets**, v.3, n.1, p. 17-30, 2002.
- PISONI, G.; BERTONI, G.; MANAROLLA, G.; VOGT, H. R.; SCACCABAROZZI, L.; LOCATELLI C.; MORONI, P. Genetic analysis of small ruminant lentiviruses following lactogenic transmission. **Virology**, v.407, n.1, p. 91–99, 2010
- ROWE, J. D.; EAST, N. E.; THUNNOND, M. C.; FRANTI, C. E.; PEDERSEN, N. C. Cohort study of natural transmission and two methods for control of caprine arthritisencephalitis virus infection in goats on a California dairy. **American Journal of Veterinary Research**, v.53, n.12, p.2386-2395, 1992.
- SALTARELLI, M.; QUERAT, G.; KONINGS, D.A M; VIGNE, R.; CLEMENTS, J.E. Nucleotide and transcriptal analysis of molecular clones of CAEV which generate infections virus. **Virology**, v.179, n.1, p. 347-364, 1990.
- SARDI, S.I.; TORRES, J.A.; BRANDÃO, C.F.L.; TIGRE, D.M.; CAMPOS, G.S. Early Detection of goats infected with Lentivirus Small Ruminant virus by ELISA assay. **Revista de Ciências Médicas e Biológicas**, v.11, n.1, p. 35-40, 2012.
- TESORO-CRUZ, E.; FERIA, I.A.R.; OROZCO, S.S.; HERNANDEZ, G.R., SILVA, G.R., VALLADARES, S.A.; BEKKER, M.V.C. Frequency of the serological reactivity against the caprine arthritis encephalitis lentivirus gp135 in children who consume goat milk. **Archives of Medical Research**, v.6, n.3, p. 204-207, 2009.
- URDANETA, S.; WIGDAHL, B.; NEELY, E. B.; BERLIN, C. M., JR.; SCHENGRUND, C. L.; LIN, H. M.; HOWETT, M. K. Inactivation of HIV-1 in breast milk by treatment with the alkyl sulfate microbicide sodium dodecyl sulfate (SDS). **Retrovirology**, v. 2, n.1, p.28, 2005.

ZINK, M. C., JOHNSON, L. K. Pathobiology of lentivirus infections of sheep and goats.
Virus Research, v.32, n.2, p.139-154, 1994.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

A administração do SDS em colostro e leite *in vitro*, apresenta níveis citotóxicos proporcionais às concentrações molares de SDS/lípídeos presentes no colostro ou no leite caprino.

Em relação à atividade viral, as concentrações de 0,25; 0,5 e 1% de SDS administradas no colostro promovem inibição parcial dos efeitos citopáticos virais do CAEV. E no leite, o SDS nas concentrações de 0,25 e 0,5% inibe parcialmente a atividade viral, enquanto que na concentração a 1% promove a inativação eficiente do vírus da CAE.

Na avaliação *in vivo*, a administração de SDS de 0,25; 0,5 e 1% não apresentaram efeitos nutricionais e sanitários aos animais que ingeriram colostro tratado. Entretanto, no leite, o SDS a 0,5 e 1%, promove complicações gastrointestinais, evidenciadas por meio de diarreias profusas. Além disso, o SDS nas concentrações de 0,25; 0,5 e 1% no colostro e leite não promove a inativação do vírus da CAE expondo os animais à infecção.

Contudo, serão necessárias novas pesquisas na área de inativação química microbiana para elucidar a atividade do SDS junto aos lentivírus de pequenos ruminantes. Estudos mais aprofundados da ação desde químico no colostro e leite devem ser realizados, já que os dados obtidos foram promissores.