

T 686.089 69
P 654 2
2001

Alice Andrioli Pinheiro

**VÍRUS DA ARTRITE E ENCEFALITE CAPRINA:
PCR E ISOLAMENTO VIRAL EM AMOSTRAS DE
SÊMEN, FLUIDO UTERINO E EMBRIÕES**

Tese apresentada à UFMG, como requisito parcial
para obtenção do grau de Doutor em Ciência
Animal.

Área: Medicina Veterinária Preventiva e
Epidemiologia

Orientadora: Aurora Maria Guimarães Gouveia

Belo Horizonte
UFMG-EV
2001

BIBLIOTECA UNIVERSITARIA

22/06/01

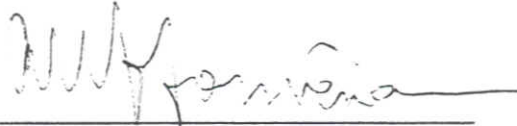
882001-05

0313-04260

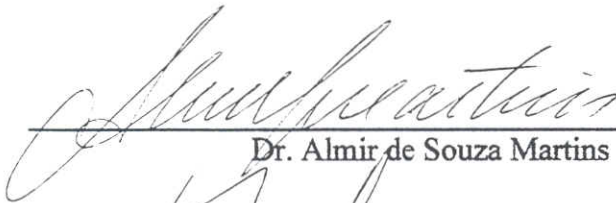
P654v Pinheiro, Alice Andrioli, 1963-
2001 Virus da artrite encefalite caprina: PCR e isolamento viral em amostras de sêmen, fluido uterino e embriões / Alice Andrioli Pinheiro. – Belo Horizonte : UFMG-Escola de Veterinária, 2001.
68p.: il.
Tese (doutorado) – Universidade Federal de Minas Gerais, Escola de Veterinária
1. Caprino – Doenças – Teses. 2. Artrite encefalite caprina – Teses. 3. Inseminação artificial – Teses. 4. Transferência de embriões– Teses. I. Título.

CDD – 636.390 89

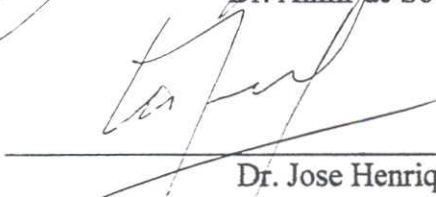
Tese defendida e aprovada em 9 de março de 2001, pela Comissão examinadora constituída por:



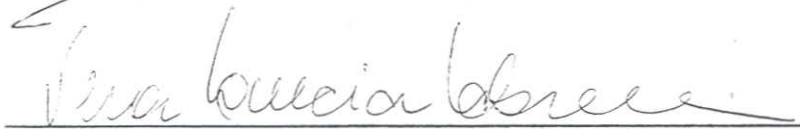
Dra. Aurora Maria Guimarães Gouveia
Orientadora



Dr. Almir de Souza Martins



Dr. Jose Henrique Bruschi



Dra. Vera Lúcia Viegas de Abreu



Dra. Zélia Inês Portela Lobato

Rizaldo

Incentivo e força

AGRADECIMENTOS

À Profa. Aurora Maria Guimarães Gouveia, pela orientação precisa, dedicação e exemplo profissional.

À Embrapa e ao Centro Nacional de Pesquisa de Caprinos, que me liberaram para a realização do curso.

À UFMG, que disponibilizou as condições técnicas e pessoal para a realização deste trabalho.

Ao Prof. Antônio de Pinho Marques Jr. – Departamento de Clínica e Cirurgia, pelo apoio e orientações

Ao Prof. Almir S. Martins do Instituto de Ciências Biológicas – Departamento de Fisiologia e Biofísica e

ao Prof. Maurílio A. Rocha da Escola de Veterinária, pela orientação na área de biologia molecular.

Às laboratoristas Creuza e Doraci pelo suporte técnico e amizade.

Ao CNPq e à FAPEMIG pelo auxílio financeiro que possibilitou a realização deste trabalho

A Melken Agrop. – Capril Bem Estar, sob coordenação do Méd.Vet. MSc. Joelmer S. Andrade, que disponibilizou sua infraestrutura, animais e técnicos que possibilitaram a realização das colheitas de embriões.

Aos amigos Diones, Pedro, Hevila, Eliane, Marcos e Patrícia pelo auxílio no trabalho.

SUMÁRIO

	RESUMO	10
	ABSTRACT	10
	PREFÁCIO	11
1.	INTRODUÇÃO	12
2.	LITERATURA CONSULTADA	16
2.1	Lentivírus de pequenos ruminantes (LVPR)	16
2.1.1	Classificação	16
2.1.2	Estrutura e genoma	16
2.1.3	Replicação	17
2.1.4	Células alvo	18
2.2	Vírus da Artrite Encefalite Caprina	19
2.2.1	Epidemiologia	19
2.2.2	Transmissão e controle	21
2.2.2.1	Fatores que afetam o risco de transmissão	21
2.2.2.2	Transmissão por leite e colostro	22
2.2.2.3	Transmissão horizontal por contato e por fômites	23
2.2.2.4	Transmissão vertical materno-fetal	23
2.2.2.5	Transmissão pelo sêmen	24
2.2.2.6	Transmissão por transferência de embriões	26
2.2.3	Diagnóstico laboratorial	30
2.2.3.1	Isolamento em cultivo de células	30
2.2.3.2	Reação em cadeia da polimerase (PCR)	31
3.	ESTUDOS EXPERIMENTAIS	33
3.1	Fatores que influenciam a presença do lentivírus caprino no sêmen	33
3.1.1	Introdução	33
3.1.2	Material e métodos	34
3.1.3	Resultados e discussão	37
3.2	Transferência de embriões como método de controle da artrite encefalite caprina viral ..	41
3.2.1	Introdução	41
3.2.2	Material e métodos	42
3.2.3	Resultados e discussão	44
3.3	Deteção <i>in vitro</i> do vírus da artrite encefalite caprina em embrião de cabras naturalmente infectadas	46
3.3.1	Introdução	46
3.3.2	Material e métodos	48
3.3.3	Resultados e discussão	52
4.	CONSIDERAÇÕES FINAIS E PERSPECTIVAS	56
5.	CONCLUSÕES	57
6.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	58

LISTA DE QUADROS

Quadro 1	Ocorrência do CAEV em países dos quais foram importados caprinos para a reprodução e/ou sêmen.	20
Quadro 2	Importação de caprinos e sêmen, de acordo com o Ministério da Agricultura nos anos de 1980 a 1994.	20
Quadro 3	Patógenos/enfermidades com risco de transmissão pelo sêmen em pequenos ruminantes.	25
Quadro 4	Infectividade de embriões ovinos após exposição <i>in vitro</i> ao patógeno e posterior lavagem.	28

Quadro 5	Transmissão de enfermidades pela transferência de embriões de doadoras infectadas para receptoras sadias. -----	29
Quadro 6	Iniciadores de oligonucleotídeos utilizados na PCR <i>Nested</i> para a identificação do DNA proviral do CAEV. -----	51

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Resultados da PCR <i>Nested</i> para o Lentivírus caprino, pré e pós injúria testicular, de machos caprinos infectados naturalmente com o CAEV e submetidos a lavagem ou não do sêmen -----	38
Tabela 2	Resultados da PCR <i>Nested</i> para o Lentivírus caprino, em sêmen lavado ou não lavado, de machos caprinos infectados naturalmente com o CAEV e submetidos a injúria testicular. ---	38
Tabela 3	Comparação entre isolamento viral e a PCR <i>Nested</i> na detecção do CAEV no sêmen. -----	40
Tabela 4	Resultados das provas de isolamento viral e PCR <i>Nested</i> de amostras de 10 cabras infectadas naturalmente com CAEV, para a detecção do DNA proviral. -----	54

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 -	Gel de agarose 1% corado com brometo de etídio. Reação em cadeia da polimerase – PCR <i>Nested</i> de amostras de sêmen de bodes infectados naturalmente com o CAEV, bandas de 185pb. Sendo M – marcador DNA Ladder; 1, 2 e 3 – amostras positivas; 4, 5, 6, 7, 8 - amostras negativas; 9 - controle positivo e 10 - controle negativo. -----	37
Figura 2 -	Sincício (setas) em cultura primária de MSC inoculada com sêmen de bodes infectados naturalmente com o CAEV, coloração cristal violeta 0,1%, aumento 200X. -----	40
Figura 3	Local da incisão para colheita de embriões pela técnica semi-transcervical. -----	49
Figura 4	Ovário com a presença de vários corpos lúteos. -----	49
Figura 5	Colheita de embriões pela técnica semi transcervical. -----	49
Figura 6	Sincício (seta) em cultura primária de MSC inoculada com fluido uterino de cabras infectadas naturalmente com o CAEV, coloração cristal violeta 0,1%, aumento 320X. -----	53
Figura 7	Sincício (seta) de cultura primária de MSC inoculada com fluido uterino de cabras infectadas naturalmente com o CAEV, coloração cristal violeta 0,1%, aumento 200X. -----	53
Figura 8	Gel de agarose 1% corado com brometo de etídio. Reação em cadeia da polimerase – PCR <i>Nested</i> de amostras de fluido uterino de cabras infectadas com o CAEV, bandas de 185pb. Sendo M – marcador DNA Ladder; 2 e 4 - amostras positivas; 1, 3, 5, 6, 7 e 8 – amostras negativas; 9 – controle negativo e 10 - controle positivo. -----	54

LISTA DE ABREVIATURAS

χ^2	Qui-quadrado
A	Ampère
EIAV	<i>Equine Infectious Anaemia Virus</i>
BIV	Vírus da imunodeficiência bovina
BSA	Albumina sérica bovina
BVDV	Vírus da diarreia viral bovina
CAE	Artrite encefalite caprina
CAEV	Vírus da artrite encefalite caprina
CFU	Unidades formadoras de colônia
CNPC	Centro Nacional de Pesquisa de Caprinos
DNA	Ácido desoxirribonucléico
ECP	Efeito citopático
Embrapa	Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária
<i>env</i>	Gene que codifica as proteínas do envelope viral dos retrovírus
FAO	Organização das Nações Unidas para a Agricultura e a Alimentação
FIV	Fecundação <i>in vitro</i>
FSHp	Hormônio foliculo estimulante suíno
<i>gag</i>	Gene viral que codifica as proteínas internas dos retrovírus
gp	glicoproteína
HIV	Vírus da imunodeficiência humana
IA	Inseminação artificial
IBR	Rinotraqueíte infecciosa bovina
IDGA	Imunodifusão em gel de ágar
IETS	Sociedade Internacional de Transferência de Embriões
IFN τ	Interferon Tau
Kb	kilobase
LA	Língua azul
LTR	Seqüências terminais longas repetidas
LVC	Lentivírus caprino
LVO	Lentivírus ovino
LVPR	Lentivírus de pequenos ruminantes
MEM	Meio essencial mínimo
MIDGA	microimunodifusão em gel de agarose
MSC	Membrana sinovial caprina
MVV	Vírus do Maedi-Visna
NC	nucleocapsídeo
OIE	Organização Internacional de Epizootias
pb	Pares de bases
PBS	Solução Salina Tamponada por Fosfato
PCAEV	Programa de controle da artrite encefalite caprina
PCR	Reação em cadeia da polimerase
PFU	Unidades formadoras de placas
<i>pol</i>	Gene que codifica as enzimas virais dos retrovírus
<i>rev</i>	Gene de regulação viral dos retrovírus
RNA	Ácido ribonucléico
RNA _m	RNA mensageiro
RT-PCR	Reação em cadeia da polimerase com a transcriptase reversa
SFB	Soro fetal bovino
SIV	Vírus da imunodeficiência simia
SRD	Sem raça definida

<i>tat</i>	Gene de regulação viral
TCID	<i>Tissue culture infectious dosis</i>
TE	Transferência de embriões
TM	Transmembrânica
<i>vif</i>	Gene de regulação viral
ZP	Zona pelúcida

RESUMO

O estudo sobre a possibilidade de veiculação do lentivírus caprino pela inseminação artificial (IA) e transferência de embrião (TE) tem grande importância nos programas de controle da artrite encefalite caprina (CAE) influenciando diretamente no comércio e importação de germoplasma. Foram avaliados neste experimento a presença do CAEV em amostras de sêmen, embrião, fluido uterino, e banho de lavagem dos embriões, através do isolamento viral e reação em cadeia da polimerase *Nested*, os fatores que influenciam na presença do vírus no sêmen, bem como o uso da TE como instrumento de controle da CAE. Comprovou-se a presença do CAEV no sêmen e fluido uterino, indicando o risco da transmissão do vírus pela monta natural, IA e também a possibilidade de transmissão materno fetal. Como o CAEV não foi detectado no embrião e nos meios de lavagem e foram obtidas crias saudáveis através da TE, o uso desta técnica, desde que sejam seguidas as normas sanitárias da IETS, é uma alternativa mais segura no aproveitamento do material genético de reprodutores e matrizes infectadas pelo CAEV.

Palavras-Chave: caprino, lentivírus, sêmen, embrião, PCR, isolamento viral

ABSTRACT

The study about the possibility of transmission of CAEV through the artificial insemination (AI) and embryo transfer (ET) has great importance in the control programs of CAE influencing directly on the trade and germoplasma importation. It was evaluated in this experiment the presence of CAEV in samples of semen, embryos, uterine fluid, and bath of wash of the embryos, through the viral isolation and PCR Nested techniques, as well as the factors that influence in the presence of the virus in the semen and the use of the ET as a instrument for the control of CAE. The presence of CAEV in the semen and uterine fluid was proven the risk of the transmission by natural breed, AI and also the fetal maternal transmission possibility. As the virus was not detected in the embryos and in the wash it was obtained kids healthy through the ET. Since sanitary norms of IETS are followed, the use of the ET, is a safe alternative in the use of the genetic material of males and females infected by CAEV.

Keywords: Goat, lentivirus, semen, embryo, PCR, viral isolation

PREFÁCIO

SANIDADE E REPRODUÇÃO

A partir de 1976, importações de caprinos de raças exóticas, procedentes de vários países, buscaram a introdução de potencial genético leiteiro, tendo ocorrido também a efetiva introdução de agentes infecciosos no Brasil pela importação de caprinos sem adequados critérios sanitários, com conseqüente dispersão de doenças infecciosas entre os rebanhos nacionais, dentre elas a CAE - artrite encefalite caprina. O caráter degenerativo crônico da doença, associado às práticas coletivas de manejo, comuns nas criações destinadas à produção de leite, proporcionou sua dispersão pelo País, tornando-se fundamental o estabelecimento de medidas de controle adequadas.

Com início em 1991, pesquisas vêm sendo desenvolvidas no Laboratório de Virologia Animal do Departamento de Medicina Veterinária Preventiva da Escola de Veterinária da UFMG, voltadas ao diagnóstico e controle da CAE: Assis 1994 (Tese - Mestrado - DMVP/EV-UFMG), Figueiredo 1995 (Tese - mestrado - DCC/EV-UFMG), Castro 1998 (tese - doutorado - DMVP/EV-UFMG), Coelho 1999 (Tese - Mestrado - DCC/EV-UFMG), Yorinori, 2001 (Tese - Mestrado - DMVP/EV-UFMG).

A ocorrência da CAE no Centro Nacional de Pesquisa de Caprinos (CNPC) - Embrapa motivou a elaboração e implantação, a partir de 1994, do PCAEV-Programa de Controle da CAE (Embrapa, 1994), de forma interinstitucional em parceria com o DMVP-EV-UFMG, estabelecendo e avaliando medidas sanitárias e de manejo planejadas estrategicamente dentro do conceito de Saúde Integrada, visando o controle gradual da lentivirose no rebanho de caprinos e ovinos do CNPC em Sobral (CE), e a elaboração de programas sanitários específicos para as distintas modalidades epidemiológicas encontradas no rebanho do CNPC as quais refletem a diversidade encontrada nos rebanhos nacionais em geral, variando de livres de infecção, a de baixa prevalência, e de média a alta prevalência.

As medidas de controle baseiam-se no bloqueio da transmissão do vírus a partir de animais infectados considerando as vias de infecção conhecidas e as que na época apresentavam-se pouco esclarecidas ou controversas - embrião, sêmen, fluido uterino, e ainda, fatores como soroconversão tardia, latência viral, latência sorológica, replicação restrita, manejo do rebanho e limitações na disponibilidade comercial de testes mais sensíveis (testes imunoenzimáticos e biomoleculares).

Procurou-se, inicialmente, evitar o contato entre animais soropositivos e soronegativos, que foram separados e identificados. Para o monitoramento sorológico das medidas de controle optou-se pela técnica de imunodifusão em gel de ágar (IDGA), em função da disponibilidade do imunoreagente comercial, maior facilidade de implantação imediata e treinamento da equipe, e considerou-se que a sensibilidade da prova seria adequada aos objetivos iniciais de controle.

As medidas sanitárias surtiram bom efeito, com redução gradativa das taxas e tendência de estabilização em patamares baixos (0,5 a 2,1 %), indicando possível influência de vias de transmissão então consideradas como secundárias - transplacentária e pelo sêmen - importantes vias de transmissão das lentivirose em outras espécies, e a necessidade de técnicas biomoleculares de alta sensibilidade tais como a PCR para pesquisa do agente (Embrapa, 1996).

A eliminação do vírus do plantel é dependente da retirada dos animais infectados, o que pode levar a considerável perda de material genético, e as biotecnologias reprodutivas possibilitam a obtenção de maior número de animais, apresentando-se com uma alternativa no aproveitamento do material genético de reprodutores e matrizes infectados pelo CAEV.

Desta forma, associando biotécnicas reprodutivas, técnicas virológicas clássicas, e de biologia molecular, a presente dissertação compõe parte integrante do **PCAEV**, e buscou disponibilizar técnicas biomoleculares mais sensíveis capazes de detectar com segurança, a presença do agente no sêmen e embriões, tornando possível que, ao final do decênio 1994-2003, o **PCAEV** tenha alcançado seus objetivos, com a permanência dos resultados negativos em quatro testes semestrais consecutivos, com a manutenção do potencial genético do plantel. Simultaneamente descreve achados inéditos que definem a potencialidade do sêmen, fluido uterino e embriões como fontes de transmissão e/ou como ferramentas de controle da CAE.

Prof.^a Dra. Aurora M. G. Gouveia
Professora da Escola de Veterinária da UFMG
Consultora Embrapa Caprinos
Coordenadora do Grupo de Pesquisas em Pequenos Ruminantes – GPPR-NPSA

1. INTRODUÇÃO

O fortalecimento do sistema agro-industrial da caprinocultura nacional demanda crescentes investimentos e avanços tecnológicos para os seus diversos segmentos, ou seja, produção, processamento dos seus produtos e comercialização. Dentre os diferentes setores que repercutem no aumento da produção animal as biotecnologias reprodutivas e o melhoramento genético têm atuação direta na obtenção de maior número de animais, com maior produção, seja de leite ou de carne.

Pesquisas sobre biotecnologias reprodutivas demonstram a crescente vantagem no uso destas técnicas para o aumento na produção (Thibier & Guérin, 2000a). A inseminação artificial (IA), uma das primeiras tecnologias desenvolvidas, está disponível aos caprinocultores e constitui grande potencial de aproveitamento genético de reprodutores. A transferência de embriões (TE) permite a obtenção de grande número de crias em curto intervalo de tempo, visando o aproveitamento maior de nossas matrizes de alta produção. Outras tecnologias reprodutivas como a fecundação *in vitro* (FIV), a clonagem e a sexagem de gametas tem sido estudadas com grandes perspectivas.

A criopreservação de sêmen e de embrião, aliada ao crescimento econômico da caprinocultura e do aumento na demanda pela introdução, nos rebanhos ou no País, de material genético novo e de alta produção, tem favorecido o comércio e o intercâmbio internacional de germoplasma. Além disso, a importação ou mesmo a comercialização nacional de sêmen e embrião, tem sido considerada uma forma mais segura quanto à introdução e disseminação de doenças infecciosas do que o animal vivo (Castro et al. 1992; Philpott, 1993; Thibier, 1994; Thibier & Guérin, 2000a) e apresenta grandes vantagens em relação ao transporte de animais, pois evitam o estresse do animal.

No entanto, as pesquisas sobre a transmissão de doenças pelo sêmen e pelo embrião ainda não

são conclusivas para muitos agentes (Kahrs et al., 1980; Wrathall, 1995), além disso, a IA possui um abrangente potencial de disseminação de enfermidades, pois várias fêmeas são inseminadas com um único ejaculado podendo causar grande prejuízo econômico e social, caso não sejam rigorosamente seguidas as normas sanitárias para o processamento do sêmen (Philpott, 1993). Em adição, a criopreservação pode facilitar a sobrevivência, em longo prazo, de certos patógenos, especialmente vírus e tem sido observado que os crioprotetores diminuem a eficiência dos antibióticos.

A tecnologia de TE não apenas revolucionou programas de melhoramento genético como também alterou drasticamente as abordagens reguladoras de certificação de trânsito internacional de material genético. A sanidade e qualidade dos embriões transportados internacionalmente são asseguradas pela excelência técnica e ética dos indivíduos ligados à sua colheita/produção e certificação. Desta forma, erros no processamento de embriões ou mesmo falhas em anotações podem ser potencialmente devastadoras do ponto de vista sanitário e genético, no entanto a supervisão direta de todos os processos envolvidos na tecnologia de embrião é impraticável (Stringfellow & Seidel, 1999) e embora o comércio de embriões seja sem dúvida mais seguro que o de animais e sêmen, a potencialidade de transmissão de enfermidades por esta via não pode ser negligenciada.

A natureza de uma doença, especialmente sua epidemiologia e impacto econômico potencial sobre populações de animais são fatores de elevada importância para autoridades veterinárias nacionais, quando forem calibrar as ameaças a países importadores, regiões ou rebanhos (Garner et al., 1995). Ou seja, deve-se levar em consideração a morbidade e mortalidade da doença, se a doença é endêmica ou não para a região que irá receber os embriões. Não obstante, a introdução de novas cepas merece atenção especial, pois podem ser mais virulentas que as nativas, além do que muitos agentes têm o potencial de se multiplicar e mudar muito e rapidamente e subseqüentemente se adaptar a novos

ambientes, como é o caso dos vírus RNA, os quais por não terem a função de leitura e correção genética, podem ter taxas de mutação de aproximadamente um milhão de vezes mais que a de animais e plantas. Consequentemente há uma enorme diversidade de populações de vírus RNA que podem se tornar mais patogênicos e causarem novas doenças se forem introduzidos em novos ambientes. O mesmo pode ocorrer com certas bactérias que tendem a ter rápidas taxas de mutações.

Este alarme crescente está relacionado não somente com a infecção exclusiva da fêmea inseminada/inovulada ou do rebanho e sim da problemática da introdução de patógenos exóticos no país importador. Esse risco potencial gera grande preocupação sobre o intercâmbio nacional e internacional deste material genético, demandando pesquisas que visem a comprovação de patógenos no sêmen e em embrião e consequentemente de pesquisas que aprimorem os métodos de diagnóstico com maior sensibilidade e especificidade, além de obrigar os países a adotarem rigorosos programas sanitários visando terem reprodutores e matrizes sadias para que possam exportar materiais genéticos e que os países importadores adotem medidas rigorosas de controle nas importações.

Recentemente o Ministério da Agricultura e Abastecimento (2001)¹ publicou nota técnica sobre a ocorrência de uma doença rara, conhecida como *Scrapie* ou paraplexia enzoótica, que afetou ovelhas no Sul do País e constatou-se que os animais positivos eram descendentes de uma matriz ovina importada dos Estados Unidos em 1989, sendo que são contraditórios os resultados de pesquisas sobre a possibilidade de transmissão desta enfermidade por TE (Foote et al., 1993; Foster et al., 1996).

No Brasil, importações de caprinos de alta linhagem procedentes de países com alta prevalência para a lentivirose caprina têm ocorrido no decorrer de vários anos e em 1986, Moojen et al., comprovam a presença do vírus da artrite encefalite caprina (CAEV) em um

rebanho que possuía caprinos importados. Outros relatos semelhantes comprovaram que a introdução e disseminação do CAEV no rebanho nacional ocorreram pelas importações de caprinos de raças leiteiras, procedentes de distintos países, sem adequada supervisão, acarretando em graves problemas sanitários (Assis & Gouveia, 1994).

A artrite encefalite caprina (CAE) tem acarretado grandes perdas econômicas nos rebanhos caprinos de produção leiteira, afetando caprinos de diferentes raças, idades e sexo. As perdas econômicas se caracterizam por morte de animais jovens, diminuição da produção láctea e perda de peso dos animais adultos devido a dificuldade de locomoção. Os reprodutores com graves problemas articulares tornam-se incapazes de realizar a monta ou mesmo a responderem a colheita de sêmen por vagina artificial e segundo Silva (1996) o problema sanitário de maior relevância nos rebanhos leiteiros é a verminose seguida da CAE.

A doença tem patogenia pouco conhecida, e alguns aspectos de sua patologia e vias de infecção são controversos, sendo que a principal via de transmissão do CAEV é a digestiva (Adams et al., 1983), porém 31% são atribuídas a outras vias (Rowe et al. 1991). Estudos epidemiológicos sobre esta enfermidade no País relatam alta prevalência, principalmente nos rebanhos leiteiros inclusive nos reprodutores, os quais geralmente são animais de raça pura ou mestiços utilizados no melhoramento de rebanhos nativos ou SRD. Pinheiro et al. (1999) relatam que de 68 reprodutores testados, nove (13,2%) apresentaram-se soropositivos, entre rebanhos nativos e leiteiros, de várias regiões do Ceará e que 60% dos rebanhos leiteiros da região metropolitana de Fortaleza apresentavam reprodutores positivos para o CAEV.

A presença do CAEV no rebanho da Embrapa - Centro Nacional de Pesquisa de Caprinos, motivou a elaboração, implantação e avaliação do Programa de Controle da CAEV (PCAEV), onde os diversos campos experimentais com características epidemiológicas distintas (variando de negativo a com alta prevalência de CAEV), e com movimentação de animais entre si, refletindo a situação encontrada nos plantéis nacionais onde ocorre a movimentação frequente de animais entre propriedades

1

<http://www.agricultura.gov.br/acs/releases.asp?noticia=319>

positivas e negativas para CAEV. O rebanho possuía um total de 1094 caprinos e a prevalência sorológica inicial do CAEV foi de 14,3% sendo que o setor com maior prevalência foi o dos reprodutores, onde dos treze bodes testados, sete eram soropositivos (53,9%) (Embrapa, 1994), sendo que o agravante, é que os lentivírus já foram detectados no sêmen de várias espécies incluindo ovinos e caprinos (Concha-Bermejillo et al., 1996; Andrioli et al., 1999; Travassos et al., 1999).

A manifestação da CAE em reprodutores e matrizes de alto valor genético tem acarretado em grandes problemas para os caprinocultores, pois a manutenção destes animais infectados no rebanho representa sérios problemas sanitários, porém o sacrifício é, muitas vezes, inviável, levando em consideração o grande prejuízo econômico e genético. Desta forma, há grande demanda para o aprimoramento dos programas de controle desta enfermidade, necessitando-se estabelecer as formas de transmissão deste patógeno e o aprimoramento dos métodos de diagnóstico.

O uso da TE como método rápido e seguro de obtenção de crias de animais infectados por certos agentes infecciosos surge como uma solução para a obtenção de material genético de animais infectados e tem sido estudada com resultados positivos, inclusive para as lentivirose de pequenos ruminantes (Chemineau et al., 1986; Wolfe et al., 1987; Andrioli-Pinheiro et al., 1996).

A Sociedade Internacional de Embriões (IETS), através de seu Comitê de Importação/Exportação, trabalhou por vários anos no auxílio da formulação de protocolos baseados em estudos científicos, a fim de evitar a transmissão de doenças pela TE. Esses protocolos são apresentados por completo nos apêndices da Organização Internacional de Epizootias (OIE). Mas, a comprovação se de fato não há a possibilidade de transmissão de patógenos pelo embrião, assim como pelo sêmen, requer a constatação de que o agente não se encontra neste meio ou que ele possa ser removido por técnicas que não prejudiquem o germoplasma. Desta forma, o aprimoramento de métodos diagnósticos mais sensíveis são requisitados para a detecção de patógenos no

sêmen e ovócito/embrião disponibilizados pelas novas biotecnologias reprodutivas.

Dentre as técnicas utilizadas para o diagnóstico direto de patógenos em sêmen e embrião incluem-se o isolamento viral, a microscopia eletrônica e a reação de cadeia de polimerase (PCR). Enquanto as duas primeiras técnicas são difíceis e onerosas, a PCR surge como uma técnica de diagnóstico rápida, fácil e com alta sensibilidade e especificidade, porém podem ocorrer falsos negativos devido à presença de substâncias inibidoras da PCR.

Enquanto não se comprova a possível veiculação das principais enfermidades pelo sêmen e embrião, normas oficiais para regulamentar a produção e o comércio de material genético livre de patógenos se fazem necessárias (Afshar & Eaglesome, 1990). Desta maneira a OIE definiu suas diretrizes (Hare, 1985). Nos Estados Unidos da América essas normas foram padronizadas em 1989, sob controle da Associação Nacional de Reprodução Animal (NAAB) (Philpott, 1993) e, recentemente a União Européia (EU) através da diretiva 93/60/EEC estabeleceu suas normas de controle. Países do MERCOSUL estão ainda, estudando normas para o comércio de sêmen, sendo essas exigências baseadas nas pesquisas da presença e transmissão de patógenos no sêmen contaminado.

Os padrões atuais de certificação internacional de embriões são baseados, substancialmente, nas recomendações do Código Internacional de Saúde Animal (*Internacional Animal Health Code*), da OIE e da Organização Mundial de Saúde Animal. Esses padrões visam conhecer tanto as propriedades inatas do embrião, como a eficácia de metodologias padronizadas de processamento de embriões e de métodos de eliminação de patógenos específicos, (Stringfellow & Seidel, 1999).

Com essas considerações o presente trabalho teve os seguintes objetivos:

- Validar a técnica de PCR *Nested* para a detecção do DNA proviral do CAEV em amostras de sêmen e embrião.
- Detectar por PCR *Nested* e isolamento viral se o DNA proviral do CAEV está

presente em ejaculados de machos naturalmente infectados.

- Avaliar a influência da lavagem do sêmen, bem como da presença de inflamação testicular causada por lesão traumática local, sobre a presença do CAEV no sêmen.
- Detectar por PCR *Nested* e isolamento viral se o DNA proviral do CAEV está presente em embrião, fluido uterino e meio de lavagem dos embriões, de doadoras naturalmente infectadas.
- Avaliar se embriões coletados de doadoras positivas e lavados podem transmitir o CAEV para as receptoras e crias de forma a assegurar se a técnica de TE pode ser utilizada como instrumento de controle da transmissão do CAEV.

2. LITERATURA CONSULTADA

2.1.- Lentivírus de pequenos ruminantes (LVPR)

2.1.1 – Classificação

A família *Retroviridae* é composta de três subfamílias - os oncovírus, spumavírus e os lentivírus - estando associada com enfermidades de curso rápido ou longo, doenças debilitantes, desordens neurológicas e imunodeficiências, como também viremia persistente na ausência de qualquer sintomatologia evidente da enfermidade. Apesar da variedade de interações com o hospedeiro, todos os retrovírus isolados são semelhantes na estrutura, organização do genoma e modo de replicação (Coffin, 1996).

Sigurdsson (1954) ao estudar o MVV, consagrou o termo "vírus lentos", que são assim denominados por causarem uma infecção crônica de evolução lenta, persistente,

progressiva e degenerativa (Narayan & Clements 1989; Petursson et al. 1992). São reconhecidos lentivírus associados aos primatas, ovinos, caprinos, eqüinos, gatos e bovinos. Os vírus causadores da Artrite-Encefalite Caprina (CAEV) e Maedi-Visna (MVV) em ovinos são lentivírus complexos, não oncogênicos, que têm reação cruzada entre si através de antígenos oriundos da região *gag* do genoma, e são chamados de Lentivírus de Pequenos Ruminantes (LVPR). A homologia genética entre o CAEV e MVV configura-se em uma correspondência em torno de 20%, sendo a proteína p28 identificada como comum a ambos (Roberson et al., 1982).

2.1.2 - Estrutura e genoma

Os LVPR são pleomórficos, esferóides, envelopados, com 80-100nm de diâmetro possuindo pequenas projeções do envelope dispersas em toda superfície (Clements et al., 1980). Persistindo no hospedeiro em associação ao genoma celular, o vírus é pouco resistente às condições ambientais. O calor (56°C) inativa o vírus no colostro ou no leite de cabras infectadas (Adams et al., 1983) e são susceptíveis a inativação por muitos produtos químicos em virtude do frágil envelope lipoprotéico do vírus. Soluções detergentes, fenóis, compostos quaternários de amônio, como também formalina e hipoclorito podem ser utilizados como desinfetante.

A porção viral mais externa (envelope fosfolipídico) é constituída pelos produtos do gene *env* - glicoproteínas (gp) de superfície e transmembrânica, que atuam na penetração do vírus nas células. O núcleo é constituído por produtos dos genes *gag* - as proteínas do capsídeo, nucleocapsídeo e matriz e a região *pol* - proteínas com funções enzimáticas responsáveis pelo processo de replicação viral (protease, transcriptase reversa e integrase), e pelo RNA genômico (Joag et al., 1996).

Os carboidratos presentes na superfície conferem as propriedades biológicas dos LVPR. O ácido siálico acarreta um marcante grau de resistência à degradação do vírus pelas enzimas proteolíticas e para a neutralização do agente por anticorpos, e, desta forma, estas propriedades facilitam a resistência a enzimas proteolíticas do trato gastrintestinal,

possibilitando a infecção das células intestinais e resistindo à imunidade humoral (Huso et al., 1988).

O genoma é composto de duas moléculas idênticas de RNA, lineares, de cadeia simples, não complementares e de polaridade positiva com tamanho de aproximadamente 10 Kb. O genoma do lentivírus caprino CAEV Cork foi sequenciado por Saltarelli et al. (1990). É formado pelos genes estruturais (*gag*, *pol* e *env*), os quais são traduzidos em proteínas que formam a partícula viral, regulatórios (*tat* e *rev*) e auxiliares (*vif*, *vpr/vpx*, *vpu* e *nef*) e por duas LTR (*long terminal repeats* – seqüências longas repetidas) localizadas nas extremidades 5' e 3' do genoma (Narayan et al., 1997) e que contém toda a informação essencial para o início e término da transcrição (Gonda, 1994).

O gene *gag* codifica três proteínas do capsídeo, sendo uma maior e duas menores. A proteína maior p24 ou ainda p27, induz a uma forte resposta de anticorpos no animal infectado, sendo desta forma, utilizada nos testes de diagnóstico. As proteínas menores são denominadas de proteínas da matriz ou p16 e a proteína do nucleocapsídeo ou p14 as quais são menos imunogênicas (Rosati et al., 1995). O gene *pol* codifica as enzimas envolvidas na replicação viral, as quais são a protease responsável pelas clivagens que separam os produtos de *gag* e *pol* do precursor comum, a transcriptase reversa que permite a transcrição do RNA genômico viral em DNA de fita dupla e a integrase que permite a transcrição do RNA genômico viral no genoma da célula hospedeira, sendo denominado, nesta fase, de provírus (Tavares & Pereira, 1999). O gene *env* codifica as glicoproteínas do envelope - de superfície ou gp135 e transmembrânica ou gp90, que são importantes marcadores imunológicos da infecção por LVPR (Gogolewski et al., 1985; Rosati et al., 1995).

Os genes *gag* e *pol* são os mais conservados, enquanto que o gene *env* é heterogêneo, devido a mutações pontuais (uma base) que ocorrem durante a replicação dos ácidos nucleicos dos retrovírus, por "erros" cometidos pela transcriptase reversa (Narayan & Clements, 1989).

As proteínas de regulação não estão presentes na partícula viral e somente são traduzidas durante a replicação viral na qual atuam (Narayan & Clements, 1989).

O gene *tat* do CAEV tem um papel dispensável para a replicação viral *in vitro* e *in vivo* (Harmache et al., 1995). Estudos com o gene *rev* (regulador da expressão das proteínas estruturais), sugerem ser ele essencial para a replicação viral *in vitro* (Gonda, 1994). A proteína *rev* não apresenta homologia significativa de aminoácidos entre MVV e CAEV (Saltarelli et al., 1990) e atua na regulação da expressão viral e infectividade, que provavelmente contribui para a patogênese dos LVPR.

O RNA genômico, através da transcriptase reversa, dará origem ao DNA proviral, que por sua vez irá se integrar ao genoma da célula hospedeira, sendo então denominada de provírus. O provírus possui nas extremidades 5' e 3' seqüências longas e repetidas (LTRs), que são regiões não traduzidas, que contém todas as informações necessárias para a iniciação e terminação da transcrição a partir do DNA proviral. As LTRs contém seqüências únicas derivadas da extremidade 5' (U5), e 3' (U3) e seqüências comuns a ambas extremidades do RNA genômico.

2.1.3 – Replicação

A característica principal dos vírus da família Retroviridae que os distingue de outros vírus refere-se ao processo de replicação viral onde o seu RNA fita simples é transcrito em DNA fita dupla, o qual se integra ao DNA celular (Coffin, 1996). Assim, o ciclo de replicação dos LVPR pode ser dividido em duas etapas principais: infecção e expressão. A fase de infecção dá origem ao provírus e a fase de expressão resulta na produção do RNA viral e formação de virions (Gonda, 1994). O ciclo de replicação dos LVPR consiste resumidamente na ligação do vírus pelas gp de seu envelope aos receptores da superfície celular, fusão do envelope à membrana celular, liberação do RNA viral no citoplasma da célula, onde é transcrito em DNA por ação enzimática da transcriptase reversa, trânsito do DNA para o núcleo da célula parasitada, integração do DNA viral em sítios, mais ou menos aleatórios do DNA celular para

a formação do provírus, síntese do RNA viral pela RNA polimerase II celular usando o provírus como molde (*template*), transcrição do genoma em RNA-mensageiros (RNAm), síntese das proteínas virais, montagem, construção do capsídeo e brotamento do vírus (Coffin, 1996; Petursson et al. 1992).

O provírus, uma vez integrado é estável não existindo evidências de qualquer mecanismo para remover o provírus do DNA da célula, para transposição direta deste para outro sítio, ou para replicação independente e como em muitas viroses, a expressão do provírus não requer auxílio de qualquer produto do gene viral. Finalmente, em muitos casos, os processos de replicação ocorrem sem um efeito significativo para a célula infectada, que, freqüentemente, continua se dividindo, e produzindo partículas virais. Uma consequência natural desta associação é que o processo de replicação deva estar sob algum tipo de controle, o qual previne a célula infectada de ser repetidamente reinfetada por vírus recém produzidos (Coffin, 1996). A integração do DNA proviral ao DNA da célula não é essencial à replicação dos lentivírus, mas é fundamental para a persistência da infecção (Haase, 1986).

2.1.4- Células alvo

Os LVPR *in vivo* replicam-se em células do sistema monocítico-fagocitário, sendo os macrófagos os preferencialmente infectados (Brodie et al., 1995). Tem-se observado a infecção não produtiva em linfócitos (Zink & Johnson, 1994) bem como a presença do RNA viral em células endoteliais, epiteliais, fibroblásticas e de plexo coróide (Zink et al., 1990; Brodie et al., 1995). Com base no seu tropismo por diferentes células hospedeiras, as lentiviruses podem ser separadas em dois grupos: o vírus da anemia infecciosa equina (EIAV) e os LVPR que replicam predominantemente em macrófagos e em contraste, os lentivírus de primatas e felino replicam tanto em macrófagos como em linfócitos. Esse tropismo por diferentes células implica nas diferentes manifestações clínicas destas doenças nas diferentes espécies (Clements & Zink, 1996).

O principal receptor do HIV é a molécula de superfície CD4 do linfócito T *Helper*, mas que

também está presente nos macrófagos. Pouco se sabe sobre o receptor ou receptores para LVPR, embora existam achados implicando antígenos de classe de histocompatibilidade II nas células do sistema imune. Outras moléculas de superfície podem também servir como receptores de MVV e CAEV (Petursson et al. 1992).

A infecção dos lentivírus resulta em padrões de doença que são únicos em cada espécie tanto no tempo de indução como no tipo da síndrome. Contudo, segundo Joag et al. (1996), todas as infecções apresentam certas características comuns:

- *Os lentivírus persistem indefinidamente*, em consequência da resposta imune celular e da habilidade do DNA proviral integrar no DNA da célula do hospedeiro;
- *Os lentivírus têm alta taxa de mutação*, e muitos mutantes permanecem viáveis e são selecionados por fatores do hospedeiro tais como resposta imune celular e humoral, e por tipos de células específicas em diferentes tecidos;
- *A infecção progride através de fases específicas*, sendo que a fase inicial, em geral, envolve intensa replicação viral produtiva em linfócitos e/ou células da linhagem dos macrófagos, e é acompanhada por ativação imunológica das células que distribuem vírus através do corpo ultrapassando barreiras fisiológicas, incluindo a barreira hemato-encefálica. Esta fase é seguida pelo desenvolvimento da resposta imune que causa redução na replicação viral, mas não elimina o vírus. Recidiva da replicação viral ocorre no último estágio, em virtude das variantes de escape do sistema imune ou devido a falha do sistema imune ou, ainda, em virtude de vários fatores externos estressantes ao hospedeiro.
- *Variação no tipo de doença*, pois os lentivírus que causam imunossupressão levam o hospedeiro ao risco de desenvolver neoplasias, bem como infecção e severas enfermidades por patógenos oportunistas. Várias espécies hospedeiras desenvolvem enfermidades associadas com replicação de lentivírus, em geral, estas são síndromes imunopatológicas que tem órgãos alvo específicos em diferentes

espécies de hospedeiros e que levam a enfermidade crônica progressiva. Estas são as síndromes dos quais os lentivírus são mais conhecidos em animais domésticos e tem períodos longos de incubação, início insidioso e progressivo da enfermidade levando à morte.

• *Variação no tempo de indução da enfermidade*, as enfermidades lentivirais podem se desenvolver dentro de dias, como visto na infecção viral SIV_{smm} PBj14 em macacos, ou após vários anos como visto em ovinos infectados com MVV ou em humanos infectados com HIV. Em adição a estes extremos estão os cursos brandos e recidivas decorrentes de infecção pelo EIAV.

2.2- Vírus da Artrite Encefalite Caprina

Artrite Encefalite Caprina (CAE) é uma enfermidade crônica e multi-sistêmica causada por lentivírus, tendo sido primeiramente descrita nos Estados Unidos da América, sob a forma de leucoencefalomielite em cabritos (Cork et al., 1974). O vírus foi isolado a partir de cultivo de membrana sinovial de caprinos com artrite, tendo sido detectadas partículas com características de retrovírus, passando a ser denominado CAEV - amostra 63 (Crawford et al., 1980).

A CAE tem acarretado grandes perdas econômicas nos rebanhos caprinos, principalmente os de produção leiteira, afetando caprinos de diferentes raças, idades e sexo, sendo os animais jovens de dois a quatro meses de idade os mais susceptíveis à doença na forma nervosa (Norman & Smith, 1983), enquanto os adultos com mais de oito meses apresentam poliartrite (Crawford et al., 1980; Al-Ani & Westweber, 1984; Gonzalez et al., 1987). Citam-se outras manifestações importantes, tais como pneumonia e mastite. Desta forma, as perdas econômicas se caracterizam por morte de animais jovens, expressiva diminuição da produção láctea e perda de peso dos animais

adultos devido à dificuldade de locomoção. Os reprodutores com graves problemas articulares tornam-se incapazes de realizar a monta ou mesmo a responderem a colheita de sêmen por vagina artificial.

O lentivírus caprino infecta monócitos e macrófagos, localizando-se e replicando-se em tecidos associados a macrófagos como sinóvia, glândula mamária, sistema nervoso central e pulmão.

A enfermidade apresenta sinais clínicos de evolução lenta, incluindo artrite, pneumonia e mastite, em animais adultos (Adams & Crawford, 1980; Brugere-Picoux, 1984; Zink et al., 1987; Greenwood et al., 1995). A CAE é uma enfermidade insidiosa, pois o tempo entre a infecção e o início dos sintomas pode demorar meses ou anos, sendo que alguns animais nunca mostram sinais clínicos da doença (Rowe & East, 1997), o que dificulta ainda mais o seu controle, e torna-nos mais alertas sobre o papel dos reprodutores na transmissão e manutenção da CAE no rebanho. Somente 35% das cabras infectadas demonstram sinais clínicos da enfermidade (East et al., 1987).

2.2.1 – Epidemiologia

Levantamentos epidemiológicos, utilizando diversas técnicas sorológicas demonstraram alta prevalência ou a ocorrência da infecção nos caprinos pelo CAEV, com distribuição cosmopolita, em diferentes países. A maior prevalência do CAE ocorre em países com exploração tecnificada (OIE/FAO, 1996), tais como: Canadá, França, Noruega, Estados Unidos, Suíça, Espanha onde se verificaram mais de 65% de animais soropositivos (Adams et al., 1984; Gonzáles et al., 1987), da maioria dos quais já foram notificadas importações pelo Brasil de caprinos e sêmen (Quadro 1 e 2) (BOLETIM DE DEFESA SANITÁRIA, 1980 – 1994).

Quadro 1. Ocorrência do CAEV em países dos quais foram importados caprinos para a reprodução e/ou sêmen.

País	Ano	Autor	Porcentagem soropositivos
Canadá	1984	Adams et al.	77,0 %
Espanha	1987	Gonzales et al.	82,5 %
França	1984	Adams et al.	77,0 %
Inglaterra	1985	Dawson & Wilesmith	10,3 %
Noruega	1984	Adams et al.	74,0 %
Suíça	1984	Adams et al.	65,0 %
	1990	Krieg & Peterans	42,0 %

Quadro 2. Importação de caprinos e sêmen, de acordo com o Ministério da Agricultura nos anos de 1980 a 1994.

Ano	País de origem	Nº cabeças	Sêmen (doses)
1980	Reino Unido	27	-
	Suíça	57	-
1981	Alemanha	49	-
	Reino Unido	91	-
	Suíça	7	-
1982	Reino Unido	78	-
1983	Alemanha	51	-
	França	100	-
1984	França	105	-
	Reino Unido	3	-
1985	Alemanha	28	-
	Canadá	4	-
	França	414	-
	Holanda	39	-
	Suíça	81	-
1986	França	426	-
	Suíça	37	-
1987	Canadá	196	-
	França	81	-
	Países baixos	45	-
	Suíça	23	-
	Reino unido	14	-
1988	França	195	-
	Suíça	23	-
1989	Reino Unido	16	-
		15	-
1991	Alemanha	19	-
	Reino Unido	3	-
	Suíça	2	-
1992	França	-	90
1993	França	-	918
1994	Alemanha	19	-
	Espanha	60	-

Fonte: BOLETIM DE DEFESA SANITÁRIA, 1980 - 1994.

No Brasil o CAEV foi isolado ou resultados sorológicos positivos foram diagnosticados nos seguintes Estados: Bahia (Fiterman, 1988), Ceará (Pinheiro et al., 1989), Espírito Santo (Gouveia et al., 1998), Goiás (Gouveia et al., 1998), Maranhão (Alves & Pinheiro, 1997), Minas Gerais, (Assis & Gouveia, 1994), Pará (Ramos et al., 1996), Paraíba (Souza et al., 1999), Pernambuco (Saraiva Neto et al., 1994), Piauí (Pinheiro et al., 1996), Rio de Janeiro (Assis & Gouveia, 1994), Rio Grande do Sul (Moojen et al., 1986) e São Paulo (Garcia et al., 1992).

Segundo Smith & Sherman (1994), em países que importam caprinos leiteiros, a prevalência da enfermidade é maior nos rebanhos que possuem animais importados, e é mínima ou inexistente nos animais nativos que não estiveram em contato com aqueles animais, entretanto, o risco de contaminação de caprinos das raças nativas é evidente quando considerada a existência de programas de melhoramento genético de raças nativas com raças leiteiras exóticas, com a possibilidade de haver dentre estes caprinos, animais falsos-negativos, ou mesmo animais não testados. Pinheiro et al. (2001) realizaram testes sorológicos em rebanhos onde foram implantados programas de melhoramento em raças nativas do Brasil e/ou SRD, e verificaram que a infecção foi significativamente maior nos machos, puros ou mestiços, indicando que esta categoria pode ser a fonte de infecção do rebanho.

2.2.2 - Transmissão e controle

2.2.2.1 - Fatores que afetam o risco de transmissão

A idade, raça e sexo dos animais parecem não intervir na sua suscetibilidade frente ao CAEV (Rowe & East, 1997), porém outros fatores como estresse, as infecções bacterianas e virais concomitantes podem aumentar o risco da infecção (Zink et al., 1987). Adams et al. (1983), sugeriram que alguns caprinos infectados com o lentivírus podem expressar o vírus mais do que os outros.

A porta de entrada do agente deve ser considerada, visto que East et al. (1993) obtiveram infecção em todos os cabritos inoculados intravenosamente com a dose infectante de 2×10^6 TCID₅₀ de CAEV e não observaram a infecção em cabritos que ingeriram leite com esta mesma dose infectante, indicando que a via de infecção influencia a eficiência da mesma. Isto também foi observado em humanos onde a soroconversão ocorreu mais rápido em pacientes que se contaminaram via sanguínea do que por outras vias (Imagawa et al. 1989).

Cheevers et al. (1988) demonstraram diferenças na patogenicidade de duas cepas virais, sendo que a amostra CAEV - 63 produziu lesões histológicas mais severas que a cepa CAEV Cork.

O CAEV encontra-se associado a macrófagos e monócitos, e como estas células estão presentes em vários espécimes biológicos, como sangue, leite, colostro entre outros, a pesquisa do agente nestes materiais e a possibilidade de transmissão têm sido estudadas, com intuito de estabelecer eficientes programas de controle da lentivirose caprina.

É bem estabelecido que a principal via de transmissão do CAEV é a digestiva, através da ingestão pelas crias de colostro ou leite oriundos de cabras infectadas (Adams et al., 1983; Rowe et al., 1992), porém a transmissão pode ocorrer, também, por outras vias onde há contato direto entre os animais, ou indiretamente por materiais contaminados com sangue ou leite de animais infectados (Al-Ani & Westweber, 1984).

Em estudo da prevalência de animais soropositivos, em rebanhos nos quais era adotada como medida de controle a alimentação dos cabritos com colostro ou leite após tratamento térmico, foi demonstrada a ocorrência de soroconversão tardia em alguns dos cabritos, particularmente quando animais adultos positivos eram mantidos no rebanho (East et al., 1993). Estas soroconversões tardias são provavelmente devidas à transmissão horizontal resultante do contato direto com adultos contaminados.

East et al. (1993) inocularam o CAEV por via endovenosa, em cabritos recém-nascidos e observaram que os animais tornaram-se soropositivos quatro semanas após a inoculação, e que os cabritos que se contaminaram por via oral, tornaram-se positivos entre oito e vinte semanas de idade, sugerindo que a rota de infecção pode influenciar a eficiência da mesma. A transmissão do CAEV por via intramamária também se revelou bastante efetiva segundo o relato de East et al. (1993) e Lerondelle et al. (1995), o que sustenta o papel da ordenhadeira mecânica como importante fator de disseminação do agente lentiviral.

O controle desta enfermidade é complexo devido ao seu caráter crônico e ao longo período de incubação (Zink et al., 1990). Aliado a isto, o estudo de todas as vias de transmissão do LVPR não são conclusivos. Porém, se por um lado a manutenção de animais infectados no rebanho representa sérias perdas econômicas, o sacrifício de todos os animais infectados é, muitas vezes, inviável, pois grande parte do rebanho pode estar acometido, além de representar grande perda de material genético. Desta forma, há grande demanda para o aprimoramento dos programas de controle desta enfermidade, necessitando-se estabelecer as formas de transmissão deste patógeno.

2.2.2.2 – Transmissão por leite e colostro

A ingestão de colostro ou leite de cabras infectadas tem sido relatada como a principal via de transmissão do CAEV (Adams et al., 1983; Rowe et al., 1992). Ellis et al. (1983) isolaram o CAEV em células presentes no colostro. Adams et al. (1983) e Ellis et al. (1986) demonstraram que cabritos que se alimentaram exclusivamente de colostro a partir do nascimento, se tornaram infectados. Anticorpos, contra o CAEV, mesmo presentes no colostro das cabras infectadas não impedem a infecção das crias em aleitamento (Ellis et al., 1986).

Adams et al. (1983) isolaram o CAEV em células presentes no leite, e East et al. (1993) relatam que o leite de 20 cabras naturalmente infectadas continha título infeccioso entre 10^2 e 10^6 TCID₅₀ de CAEV/mL e observaram que a soroconversão em dois de quatro cabritos que ingeriram leite de vaca contendo 2×10^7 TCID₅₀

de CAEV, e que doses inferiores (1×10^7 TCID₅₀ e 2×10^6 TCID₅₀) não causaram soroconversão em 10 cabritos, ao contrário da infecção intravenosa de 2×10^6 TCID₅₀ que acarretou a soroconversão de 5 dos 5 cabritos.

Adams et al. (1983) observaram que 100% dos cabritos que receberam *pool* de leite de cabras infectadas, que possivelmente possui maior carga viral, se infectaram comparados com 78% dos cabritos que mamaram exclusivamente das suas mães.

Até mesmo o soro do leite de cabras infectadas, o qual é comumente utilizado na alimentação de animais adultos, pode transmitir o CAEV, pois o vírus foi também detectado neste material (Russo et al., 1997).

O controle da enfermidade nos rebanhos tem se baseado, principalmente, em separar as crias logo após o parto, evitando o contato com mãe e alimentá-las com colostro artificial, de cabras negativas termizado (56°C por uma hora), ou de vaca, e leite pasteurizado. Porém este método, mesmo associado às técnicas de sincronização do estro e conseqüentemente dos partos, e à indução de parto, impõe a necessidade de controle rigoroso do manejo, sendo, portanto passível de falhas. Apesar da adoção destas medidas nos programas sanitários de controle da CAE, casos de animais positivos continuam ocorrendo, embora de forma débil, apresentando baixos índices de soroconversão comparado com os rebanhos onde o consumo de leite e colostro pelos cabritos é permitido (East et al., 1987; Rowe et al., 1991). Isto indica a possibilidade de transmissão do CAEV por outras vias (East et al., 1993).

East et al. (1993), relatam que 15% dos cabritos que foram privados de colostro e leite contaminados e isolados de cabras infectadas ao parto e que eram negativos ao nascer, soroconverteram. Rowe et al. (1991), calcularam que 69% das infecções por CAEV ocorrem pela ingestão de leite, sendo que 31% são atribuídas a outras vias.

Desta forma, o limitado sucesso dos programas de controle baseados somente na transmissão por leite e colostro entre a mãe infectada e sua prole enfatiza a necessidade da adição de outros

métodos de controle que considerem um maior espectro de vias de infecção.

2.2.2.3 – Transmissão horizontal por contato e por fômites

A separação entre os animais sadios e os portadores do CAEV é recomendável pois a transmissão horizontal pelo contato entre os animais, através de secreções e excreções pode ocorrer (Adams et al., 1983; Zinc et al., 1990). Adams et al. (1983) observaram que nove de 15 caprinos (60%) soroconverteram após 10 meses em um rebanho endemicamente infectado por CAEV. Presume-se que o contato direto é importante para a transmissão horizontal, e que a alta densidade animal aumenta a sua eficiência, pois o CAEV é predominantemente associado a monócitos e macrófagos (Narayan et al., 1983; Zink et al., 1987) e não é resistente ao meio ambiente. No entanto, Maar et al. (1995) observaram que a introdução de dois animais, da raça Anglo Nubiana, soropositivos para o CAEV, sendo um com sinais clínicos, num rebanho de cabras Angorá, sob alta densidade populacional por um período de um ano não acarretou na soroconversão de nenhum animal.

A transmissão do CAEV via secreções respiratórias e aerossóis, embora seja uma provável rota de infecção (Guedes, 1999), ainda não foi comprovada como em ovinos (Narayan & Cork, 1985; Narayan et al., 1983). No entanto, o CAEV foi isolado em macrófagos alveolares e de tecido do pulmão de cabras soropositivas com ou sem pneumonia intersticial (Ellis et al., 1988). Caprinos usualmente bufam e tosse ao se alimentarem ou mesmo nas suas interações comportamentais, o que causa descargas nasais e orais que podem favorecer a transmissão do CAEV.

A transmissão horizontal do CAEV, associada ao seu longo período de incubação com conseqüente atraso na soroconversão, limita a remoção imediata dos animais positivos, tornando difícil o controle e erradicação da enfermidade nos rebanhos, sendo que para cada animal positivo identificado nos rebanhos, outros podem estar incubando e transmitindo o vírus. Desta forma, a transmissão horizontal do CAEV tem grande importância epidemiológica (East, et al., 1987).

East et al. (1993), observaram a soroconversão, após quatro semanas, de três cabras que receberam a infusão intramamária contendo 2×10^7 TCID₅₀ do CAEV, indicando que a via intramamária é possível, no entanto, o aparecimento de anticorpos no leite foi observado apenas 28 dias após infusão. Cabras sadias se infectaram após serem ordenhadas mecanicamente com o mesmo equipamento usado logo após a ordenha de cabras CAE positivas (Woodard et al., 1982; Adams et al., 1983). No processo de ordenha mecânica pode ocorrer a infecção, visto que as ordenhadeiras podem armazenar leite contaminado e na ordenha de outro animal, este leite penetre na glândula mamária causando a infecção. Mamite característica foi descrita por Lerondelle (1989) em cabras infectadas pelo CAEV e a lactação parece induzir a expressão viral (Zinc et al. 1990).

2.2.2.4 - Transmissão vertical materno-fetal

A transmissão materno-fetal do EIAV (Dawson, 1988) e HIV (Pizzo, 1990; Working Group, 1995) estão bem documentadas. Há evidências de que a transmissão materno-fetal dos LVPR ocorra, mesmo que com baixa incidência (Adams et al., 1983; Ellis et al., 1983; East et al., 1993), podendo ocorrer através de duas possíveis vias: transmissão no útero e transmissão no canal vaginal durante o parto, através da inalação ou ingestão pela cria de fluidos maternos durante o nascimento. A presença de células infectadas pelo CAEV foi demonstrada no muco vaginal de fêmeas em estro (Rowe & East, dados não publicados apud Rowe; East, 1997). Em percentual variável entre 2,5% e 15%, tem-se observado a soroconversão de crias geradas por cabras soropositivas, nascidas de parto cesariana ou de parto assistido e separadas imediatamente, evitando-se qualquer contato com a mãe, e mantidas isoladas recebendo colostro e leite de vaca (Adams et al., 1983; Ellis et al., 1983; East et al. 1993).

A transmissão materno-fetal é apoiada também por evidências histológicas, visto que exames demonstraram alterações microscópicas similares às descritas para a CAE no endométrio de cabras infectadas (Ali, 1987).

A infecção perinatal pode ocorrer pela exposição da cria à saliva ou secreções respiratórias da mãe (Rowe; East, 1997).

Os órgãos reprodutivos apresentam grande quantidade de leucócitos, com mudanças na sua composição de acordo com o ciclo reprodutivo e estado fisiológico. A população de células que protege a vagina é comparável àquelas encontradas nas superfícies de mucosas expostas a antígenos ambientais, como o trato gastrointestinal e as vias respiratórias superiores.

A defesa imunológica do útero é um pré-requisito para a reprodução, pois o trato reprodutivo é repetidamente exposto a microrganismos resultantes da cópula, parto, e outras causas. A resposta imunológica é mediada por macrófagos localizados próximo ao epitélio uterino e no miométrio (Hansenn, 1997), os quais contribuem com sua capacidade fagocitária e de células apresentadoras de antígeno. No entanto, linfócitos T *Helper* são relativamente incomuns nos tecidos uterinos, sendo mais frequentes os linfócitos citotóxicos e supressores e grandes linfócitos granulares (Seamark, et al., 1992). A maioria das imunoglobulinas no útero são da classe IgG seguida da IgA.

No início da prenhez o trofoblasto de ruminantes produz interferon *tau* - $INF\tau$, que num processo que envolve ação parácrina no endométrio, atua no mecanismo de reconhecimento materno da prenhez (Thatcher et al., 1995; Newton et al., 1996). O $INF\tau$ produzido pelo trofoblasto tem ação antiviral, imunossupressora e antiproliferativa, além da atividade anti-luteolítica que aumenta a vida útil do corpo lúteo. Em caprinos foi observado que o $INF\tau$ causou supressão do crescimento de linfócitos em cultura e administração intramuscular causou aumento do tempo de vida do corpo lúteo.

2.2.2.5 – Transmissão pelo sêmen

A inseminação artificial (IA) tem contribuído muito para o aumento na produção animal e o melhoramento genético, porém o potencial de

disseminação de enfermidades ou defeitos genéticos é relevante, caso não sejam rigorosamente seguidas as normas técnicas e sanitárias para o processamento do sêmen.

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

Em pequenos ruminantes vários patógenos foram detectados no sêmen, com transmissão demonstrada ou potencial (Quadro 3) e dentre estes, deve-se dar atenção especial às doenças cujos sinais clínicos são raramente evidentes como a Língua Azul (LA) e a CAE (Philpott, 1993).

A transmissão do CAEV via sêmen em caprinos ainda não foi definitivamente comprovada, apesar de sua recente detecção no sêmen de bodes, experimental e naturalmente infectado (Travassos et al. 1998, 1999; Andrioli et al., 1999), sendo recomendado que os reprodutores infectados sejam retirados da reprodução o que representa grande perda deste potencial genético (Russo, 1983, EMBRAPA, 1994, 1996).

Adams et al. (1983) reportaram que cabras não soroconverteram após exposição ao sêmen ou a machos infectados. No entanto, ligeiro aumento nas taxas de soroconversão tem sido reportado em cabras cruzadas com bodes soropositivos comparadas com fêmeas cobertas com bodes soronegativos (Rowe et al., 1992).

Quadro 3. Patógenos/enfermidade com risco de transmissão pelo sêmen em pequenos ruminantes.

Patógeno/enfermidade	Presença demonstrada	Transmissão demonstrada	Transmissão provável
<i>Chlamydia sp</i>	X		X
<i>Border disease virus</i>	X		X
<i>B. ovis</i> e <i>B. melitensis</i>	X		X
Campylobacteriose bovina	X	X	
Vírus da febre aftosa	X	X	
Febre Q	X		X
Leptospirose	X	X	
Língua azul	X	X	
<i>Mycoplasma mycoides</i> , <i>Mycoplasma agalactie</i>	X		X
Peste dos pequenos ruminantes	X		X
Pox vírus	X		X
<i>Rinderpest</i>	X		X
Salmonelose (<i>S. abortus ovis</i>)	X		X

Adaptado de Hare, 1985.

Asso (1989) reportou que o CAEV não foi isolado do sêmen de 20 machos soropositivos, em cinco coletas, por um período de dois anos. Porém, a presença de células inflamatórias infectadas pelo vírus foi reportada em *swabs* prepuciais de vários bodes e em células aspiradas do epidídimo de um macho infectado (Rowe & East 1997). A presença de lentivírus em outras espécies também foi demonstrada em ovinos (Concha-Bermejillo et al., 1996), humanos (Mermin et al., 1991), bovinos (Nash et al., 1995b) e gatos (Jordan, et al. 1995). No entanto, o HIV tipo I tem sido relatado como se ligando ao espermatozóide humano e nele penetrando, tanto *in vitro* como *in vivo* (Baccetti et al., 1994). Partículas virais levadas para dentro dos ovócitos por espermatozóides infectados foram vistas por microscopia eletrônica e por técnicas de hibridização *in situ* (sonda de DNA) em zigotos e em blastômeros de embriões jovens.

Permanece não elucidado se fenômenos idênticos ocorrem com outros lentivírus que infectam animais, sendo estes associados ao fluido seminal ou leucócitos e não aos espermatozóides (Travassos et al., 1999; Nash et al. 1995a).

A presença do vírus da LA foi observada no sêmen de touro infectado, sendo que os espermatozóides apresentavam anomalias ultraestruturais e partículas semelhantes a vírus (Foster et al., 1980). Embora o vírus possa aparecer brevemente no sêmen de touros (Phillip et al., 1986), parece não ocorrer uma excreção prolongada associada com viremia persistente.

Lesões ou inflamações / infecções no órgão reprodutor podem desencadear o maior afluxo de células sangüíneas, e como as células alvo dos lentivírus são monócitos e macrófagos, a presença destas células inflamatórias no sêmen ou prepúcio pode aumentar o risco da transmissão dos lentivírus. Em pacientes portadores de HIV foi constatada correlação positiva entre a presença de leucócitos e do vírus no sêmen (Politch et al., 1994). Concha-Bermejillo et al. (1996) detectaram o lentivírus ovino no sêmen, somente após a infecção experimental por *Brucella ovis*, e a presença de leucócitos foi constatada nos ejaculados de todos os animais após a inoculação da bactéria. A presença do lentivírus no sêmen parece ter um caráter intermitente, não sendo constatado em todos os ejaculados do mesmo animal (Concha-Bermejillo et al., 1996).

Em humanos, outros fatores parecem influenciar a transmissão dos lentivírus pelo sêmen, tais como o estágio da doença, o estado imunológico ou nutricional e a associação com outras enfermidades (Alexander, 1990).

Em caprinos, o comportamento normal do bode durante a monta representa um risco de transmissão do CAEV, pois, frente à fêmea em estro, os bodes bufam e urinam com frequência.

Bielanski et al. (1992) relataram que os métodos físicos que são usados para separar os espermatozoides do fluido seminal antes do seu uso para fecundação *in vitro* não foram confiáveis para a remoção do vírus da diarréia bovina a vírus (BVD). E o congelamento do sêmen possibilita que muitos agentes possam sobreviver e os crioprotetores podem tornar os antibióticos menos efetivos (Philpott, 1993).

2.2.2.6 – Transmissão por transferência de embriões (TE)

A pesquisa sobre o risco da transmissão de agentes infecciosos por TE pode ser abordada por quatro formas principais (Singh, 1987):

“*In vitro in vitro*” – embriões de doadoras saudáveis são expostos ao agente infeccioso *in vitro* e posteriormente analisados quanto à presença do agente *in vitro*.

“*In vitro in vivo*” - embriões de doadoras saudáveis são expostos ao agente infeccioso *in vitro* e posteriormente analisados quanto à presença do agente *in vivo*, ou seja, transferindo os embriões para receptoras saudáveis.

“*In vivo in vivo*” – embriões são coletados de doadoras infectadas e analisados quanto à presença do agente *in vivo*; ou seja, transferindo os embriões para receptoras saudáveis.

“*In vivo in vitro*” - embriões são coletados de doadoras infectadas e analisados quanto à presença do agente *in vitro*.

A transmissão de agentes infecciosos através da TE requer a ocorrência dos seguintes eventos: exposição do embrião ao patógeno antes, durante ou após a colheita; ocorrência de infecção embrionária ou aderência do agente à zona pelúcida (ZP); sobrevivência do agente e

do embrião se infectado; que nenhum tratamento de desinfecção do embrião seja realizado ou o seja ineficiente; transporte de uma dose efetiva e infectante do patógeno e infecção do embrião/receptora susceptível (Stringfellow et al., 1991).

Para que ocorra a transmissão de um patógeno por TE é necessário que este esteja presente dentro do embrião (infecção embrionária verdadeira), em associação ou mesmo aderido à ZP, ou que esteja presente nos fluidos no qual os embriões são recolhidos, manipulados, criopreservados ou transferidos (Singh, 1987; Wrathall, 1995).

Outro fator importante na transmissão de agentes por embrião é a patogenia da doença, especialmente quanto à predileção do patógeno ao trato genital. Entre as principais doenças que afetam os órgãos reprodutores de pequenos ruminantes estão a brucelose, campilobacteriose, leptospirose, clamidiose, micoplasmoses. Agentes carreados pelo sangue podem prontamente ganhar acesso ao trato genital, aumentando o risco no caso de qualquer hemorragia uterina o que ocorre durante a colheita de embriões. No caso de outros agentes de doenças que tem predileção por pele ou vísceras, a probabilidade de contaminação do embrião é remota, todavia tais agentes ocasionalmente produzem infecções generalizadas, e mesmo as localizadas podem causar contaminação dos meios e soluções e do equipamento.

A infecção embrionária pode ocorrer nas seguintes circunstâncias: o patógeno pode estar dentro do ovócito antes da fertilização ou estaria no espermatozoide, penetrando no ovócito no momento da fecundação, ou ainda o patógeno poderia penetrar no embrião através da ZP após a fecundação. A infecção embrionária pode resultar em degeneração ou morte dos embriões, sendo estas visivelmente detectadas na avaliação dos embriões, e rejeitados para a transferência o que não incorre em nenhum risco quanto à transmissão de enfermidades, porém se o embrião permanece viável, o risco será grande, pois a lavagem dos embriões segundo as normas da Sociedade Internacional de Transferência de Embriões (IETS), não será eficiente para eliminar o agente.

Poucos patógenos têm sido demonstrados em ovócitos, ao contrário do sêmen, porém os patógenos têm sido associados ao plasma seminal e não ao espermatozóide o que diminui o risco da infecção embrionária (Eaglesome et al., 1980). Experimentalmente, alguns autores observaram, através de microscopia eletrônica, partículas tipo retrovírus nos ovócitos e embriões com ZP em camundongos, gatos e primatas (Bowen, 1980; Calarco & Szollosi, 1973; Kalter et al., 1974; Larsson et al., 1981), porém parece que estas partículas são retrovírus endógenos (provírus) e que sua expressão em ovócitos e embriões durante o desenvolvimento possa ser um evento comum, especialmente em camundongo, que tem sido mais estudado.

Esses retrovírus se originam de infecção de células de linhagem germinativa em uma geração ancestral e se tornam integradas como elementos conservados no genoma hospedeiro (Doolittle et al. 1989). A transmissão vertical para as gerações subsequentes via células germinativas (espermatozóide ou ovócito) ocorre de uma maneira análoga à de um caráter mendeliano herdado. A presença destes provírus no embrião é geralmente relacionada a efeitos carcinogênicos como a leucemia em murinos e felinos e tumores mamários em camundongos (Zeilmaker, 1969).

A penetração de patógenos através da ZP após a fecundação (infecção transzonal) tem sido relatada muito raramente e apenas em embriões de camundongos expostos experimentalmente a pequenos vírus, como a cepa Mengo do vírus da encefalomio-cardite e Coxsackie B (família *Picornaviridae*) (Gwatkin et al. 1966; Heggie & Gaddis, 1979). Todavia se a ZP estiver danificada ou ausente, a infecção por vírus pode ocorrer (Carthew et al., 1985; Eaglesome et al., 1980). Outra possibilidade de infecção transzonal ocorre na espécie suína, onde embriões viáveis foram observados portando o parvovírus suíno após exposição *in vitro* (Bane et al. 1990), sendo que para identificação, os autores utilizaram a técnica de hibridização de DNA, porém não ficou claro se o vírus estava realmente dentro do embrião ou aderido a sua ZP.

Estudos em rebanhos permanentemente infectados pelo vírus da BVD têm demonstrado a presença do vírus no oviduto e células da

granulosa (Booth et al., 1995) sendo que *in vitro*, o lentivírus caprino infecta e replica-se em células da granulosa (Lamara et al., 2000).

A ZP de bovinos e ovinos tem sido considerada uma barreira aos patógenos (Singh, 1987; Whathall, 1987), sendo que sua integridade é crítica na determinação do estado de sanidade dos embriões. Baseado neste fato, a IETS recomenda a lavagem dos embriões após a colheita, objetivando a retirada dos possíveis patógenos aderidos à ZP (Stringfellow & Seidel, 1999). As soluções de lavagem podem ter sua eficiência aumentada pela adição ao meio de antibióticos e de tripsina (Singh, 1988), porém esta só é eficiente para remoção de vírus que possuem envelopes, como é o caso dos lentivírus. Outros agentes, que aderem firmemente à ZP podem não ser removidos pela lavagem (Singh, 1987).

Pesquisas realizadas com embriões sem ZP expostos aos vírus da Língua Azul (LA), Febre Aftosa e rinotraqueíte infecciosa bovina (IBR) demonstraram que a lavagem não foi eficiente para a remoção do vírus (Bowen, et al., 1982; Singh et al., 1986; Bowen et al., 1985), o que não ocorreu com embriões com a ZP íntegra e lavados (Bowen, et al., 1982; Singh et al., 1986; Singh et al., 1982). Desta forma, a integridade da ZP é um importante fator para assegurar o estado sanitário dos embriões.

Certos vírus podem aderir-se tão firmemente à ZP após a exposição *in vitro* que mesmo a lavagem pode falhar em removê-los, como o que ocorre no caso de vírus envolvidos por uma membrana externa com dupla camada de lipoproteína, como o herpesvírus BHV-1 e o vírus da estomatite vesicular (Singh et al., 1982; Singh, 1987), e também bactérias como *Brucella ovis* e *Brucella abortus* (Riddel et al., 1989; Riddel et al., 1990; Wolfe et al., 1988) (Quadro 4).

No entanto, o uso de tripsina em meios de lavagem dos embriões tem demonstrado ser eficiente na remoção de vírus envelopados que não são removidos pela lavagem sem a enzima (Stringfellow & Seidel, 1999), como no caso do vírus da IBR e da estomatite vesicular (Singh, 1987) além de não serem danosos para os embriões (Echternkamp et al., 1989), porém a enzima não é efetiva contra todos os vírus e

bactérias, especialmente em suínos. Da mesma forma, o uso de antibióticos será normalmente efetivo contra bactérias e alguns micoplasmas (Stringfellow & Seidel 1999), sendo que as concentrações recomendadas parecem não causar efeitos adversos aos embriões. Outras

substâncias e fatores têm sido estudados, como desinfetantes gerais, tais como a luz ultravioleta, agentes fotosensíveis e halaminas, porém estes tendem a ser adversos à sobrevivência do embrião (Bielanski et al., 1992; Bielanski & Hare, 1991).

Quadro 4. Infectividade de embriões ovinos após exposição *in vitro* ao patógeno e posterior lavagem.

Patógeno	N.º embriões expostos (n)	Embriões portando patógeno (%)	Referência
<i>Embriões ovinos com zona pelúcida intacta</i>			
Vírus da doença de Border	49	Negativo	Evermann et al., 1981
Vírus da BVD	49	0	Evermann et al., 1981
<i>Brucella abortus</i>	53	4	Riddel et al., 1989
<i>Brucella ovis</i>	-	Positiva	Riddel et al., 1990
<i>Brucella ovis</i>	20*	95	Wolfe et al., 1988
<i>Brucella ovis</i>	49**	94	Wolfe et al., 1988
<i>Campylobacter fetus</i>	164	0	Guerin et al., 1988
<i>Embriões ovinos sem zona pelúcida</i>			
Vírus da doença de Border	49	Negativo	Evermann et al., 1981
Vírus da BVD	23	Negativo	Evermann et al., 1981

* Embriões não expostos a antibiótico

** Embriões expostos a antibiótico

Estudos sobre a ligação com lecitina revelaram importantes diferenças entre espécies, em resíduos de açúcar nas glicoproteínas e na sua distribuição dentro da ZP (Skutelsky et al., 1994). Estas características provavelmente se relacionam com as propriedades de ligação espécie-específica do espermatozóide à ZP, porém pode ter também relevância com a aderência de patógenos. Desta forma, as propriedades da ZP parecem variar entre as espécies, a despeito das similaridades morfológicas e bioquímicas, sendo que na espécie suína os patógenos tendem a aderir mais firmemente na ZP e serem de mais difícil remoção que os de embriões bovinos, enquanto

os embriões ovinos parecem assumir uma posição intermediária. Desta forma, dados de embriões de uma espécie não podem ser extrapolados para de outra espécie (Hansen, 1992; Wrathall, 1995).

A IETS classificou as doenças em categorias de acordo com o risco de serem transmitidas por TE (Stringfellow & Seidel, 1999). No entanto, as pesquisas realizadas são escassas, principalmente em pequenos ruminantes, e tem amostragem de poucos animais para serem suficientemente seguras. Vários embriões obtidos *in vivo* de doadoras infectadas têm sido transferidos para receptoras com sucesso, ou

seja, sem que haja transmissão da enfermidade (Singh, 1987).

Chemineau et al. (1986) transferiram embriões de cabras soropositivas para fêmeas soronegativas frente ao vírus da LA e observaram que todas permaneceram livres da

doença. Gilbert et al. (1987) realizando o mesmo trabalho com ovinos observaram que duas das 15 receptoras se tornaram soropositivas e somente uma produziu um cordeiro que não adquiriu a doença (Quadro 5).

Quadro 5. Transmissão de enfermidades através da transferência de embriões de doadoras infectadas para receptoras sadias.

Agente	Nº lavagens Dos embriões	Transmissão Receptoras	Transmissão Crias	Referência
<i>Embriões caprinos</i>				
CAEV	03	Negativo	Negativo	Wolfe et al., 1987
CAEV	10	Negativo	Negativo	Andrioli et al., 1996
Língua Azul	10	Negativo	Negativo	Chemineau et al., 1986
<i>Embriões ovinos</i>				
Scrapie	00	Negativo	Positivo	Foster et al., 1992
Scrapie	03	nr	Negativo	Foote et al., 1993
Língua Azul	4	Positivo	Negativo	Gilbert et al., 1987
Língua Azul	nr	Negativo	Negativo	Hare et al., 1988
Maedi Visna	nr	Negativo	Negativo	Dawson et al., 1988
Adenomatose pulmonar ovina	nr	Negativo	Negativo	Parker et al., 1991

nr – dado não relatado na referência citada

Wolfe et al. (1987) transferiram embriões de três cabras soropositivas para o CAEV para oito cabras soronegativas, resultando em um cabrito e um natimorto. Todas as receptoras permaneceram livres da doença, nenhum vírus foi isolado do feto natimorto e o cabrito permaneceu livre da enfermidade até quatro meses de idade quando foi feita a última avaliação pelo teste sorológico de imunodifusão em gel de ágar (IDGA). O mesmo foi observado por Andrioli-Pinheiro et al. (1996), realizando experimento semelhante, porém com a obtenção de cinco crias acompanhadas sorologicamente até os 12 meses de idade.

Com relação a *Scrapie*, a encefalopatia espongiiforme ovina, os resultados de pesquisas são contraditórios sobre a sua transmissibilidade

por TE. Foote et al. (1993) transferiram 56 embriões de doadoras soropositivas para a “Scrapie” para receptoras soronegativas e 19 embriões de doadoras soronegativas para receptoras soropositivas para verificar a transmissão por via embrião e via uterina, respectivamente. Todos os embriões antes da transferência foram lavados três vezes. Os resultados indicaram que sob as condições deste experimento, a “Scrapie” não foi transmitida para as crias por nenhuma das vias. No entanto, Foster et al. (1992) investigando a transmissão natural da *Scrapie* em ovinos inseminaram artificialmente seis doadoras soropositivas para “Scrapie” e 37 embriões foram colhidos e transferidos por laparoscopia para 16 receptoras soronegativas. Os embriões não foram submetidos a nenhum processo de lavagem,

sendo que doze dos 26 cordeiros nascidos apresentaram sinais clínicos da doença, podendo ser cogitado que a lavagem dos embriões seria necessária para a não transmissão da doença. Todavia estudos posteriores indicaram que alguns embriões lavados também resultaram em descendentes que sucumbiram a "Scrapie" (Foster et al., 1996).

O meio de lavagem uterina colhido de doadoras infectadas pode conter patógenos, como o vírus da leucose bovina, da LA, da IBR e a *Brucella abortus* (Bouillant et al., 1981; Thomas et al., 1983; Singh et al., 1983; Voelkel et al., 1983). No entanto, Wolfe et al. (1987) não isolaram o CAEV de 12 lavados uterinos de cabras submetidas a TE.

A infecção de embriões *in vitro*, ou seja, no processo da biotecnologia de fecundação *in vitro* (FIV) foi também hipotetizado, pois Lamara et al. (2000) observaram que células da granulosa de caprinos são susceptíveis a infecção e replicação do CAEV em cultura, e como os ovócitos, geralmente, obtidos de ovários de cabras de abatedouros e a ZP de embriões produzidos *in vitro* diferem das produzidas *in vivo*, é importante verificar se a presença do Lentivírus pode influenciar a FIV e o desenvolvimento de embriões *in vitro* e se os tecidos derivados destas fontes podem contribuir para a disseminação da CAE.

2.2.3 – DIAGNÓSTICO LABORATORIAL

2.2.3.1 - Isolamento em cultivo de células

O isolamento viral em cultivo de células tem sido um dos métodos laboratoriais de diagnóstico mais utilizados em virologia, sendo considerado um teste padrão. O isolamento tem também a vantagem de discriminar entre microrganismos vivos e mortos. No entanto, a técnica apesar de sensível, apresenta algumas restrições, pois é trabalhosa, cara e lenta e necessita da implantação de cultivos celulares especiais, além de não detectar vírus que não causam efeito citopático (Knowles, 1997).

Para o isolamento do lentivírus caprino de amostras clínicas, utiliza-se cultivo primário de células de membrana sinovial de caprinos (MSC), sendo que o efeito citopático (ECP)

característico é a presença de células multinucleadas típicas (sincício).

ECP característico de infecção por CAEV foi observado em cultivo celular de MSC a partir de um caprino sorologicamente positivo e que apresentava artrite (Hötzel et al., 1993). Sincícios foram detectados 14 dias após a implantação dos cultivos primários e os sobrenadantes foram inoculados em cultivos celulares de membrana sinovial de feto caprino e de músculo de feto caprino, observando-se ECP de oito a 90 dias pós-inoculação.

No caso de detecção viral em amostras diversas como o sêmen, pode haver toxicidade das células por substâncias presentes nestas amostras (Kahrs et al., 1977). O sêmen pode também apresentar forte carga de contaminação bacteriana (Rocha et al., 1995), sendo necessário o tratamento prévio do sêmen com antibióticos e diluição com o intuito de diminuir os efeitos tóxicos das substâncias presentes no plasma seminal, porém, a diluição do sêmen pode diminuir a carga viral a valores abaixo do detectável em cultura, levando a resultados falso-negativos. Há também relatos que algumas espécies de sêmen contêm substâncias antivirais (Darcell & Coulter, 1976) que dificultam ainda mais os processos de detecção em cultura.

O caráter intermitente de eliminação do vírus no sêmen, os processos de congelamento, além da diluição do ejaculado com diluentes a base de leite em pó, dificultam o isolamento viral em cultivos celulares, sendo necessárias sucessivas passagens em células para confirmação dos resultados. No entanto, Concha-Bermejillo et al. (1996) isolaram o lentivírus ovino do sêmen de ovinos experimentalmente infectados, porém somente após a inoculação com a *Brucella ovis* no epidídimo.

Wolfe et al. (1987) tentaram isolar o CAEV de fluido uterino coletado juntamente com os embriões de cabras portadoras de CAE, sendo que nenhum ECP foi observado. Os autores também não conseguiram isolar o vírus em colostro e placenta.

Padrão restritivo de replicação do CAEV foi observado por Chebloune et al. (1996), em cultivo celular de plexo coróide de ovino, sendo que os autores relataram a presença de DNA

proviral nos cultivos infectados por CAEV, mas nenhum ECP foi observado e tampouco partículas virais foram encontradas à microscopia eletrônica.

2.2.3.2 - Reação em cadeia da polimerase (PCR)

A amplificação *in vitro* dos ácidos nucleicos permite a obtenção de milhares de cópias de uma seqüência específica de DNA. Desta forma, a PCR vem sendo adotada em todo o mundo na pesquisa de microrganismos devido à especificidade, sensibilidade e rapidez de seus resultados (Belak & Ballagi-Pordany, 1993).

Os primeiros trabalhos sobre o uso da PCR no diagnóstico veterinário apareceram no final dos anos 80, e tem sido de grande importância para o diagnóstico de doenças virais, em várias amostras de animais, visto que os métodos de diagnóstico tradicionais requerem longos e complexos procedimentos, como cultivo de células e microscopia eletrônica. Outra vantagem da PCR é que esta técnica pode detectar pequenas quantidades de DNA e RNA viral presentes no material, amplificando-o em quantidades identificáveis. Até mesmo patógenos de difícil crescimento em cultivo ou que se encontrem sob estado de latência ou integrados ao genoma do hospedeiro, ou microrganismos mortos, podem ser detectados pelo método.

Dentre as várias doenças virais de importância em veterinária já detectadas por PCR, estão as lentiviruses, como a imunodeficiência bovina (Nash et al., 1995ab) e os LVPR (Zanoni et al., 1990).

A PCR tem sido utilizada para a pesquisa do DNA-proviral do lentivírus de caprinos em diferentes amostras como: sangue, líquido sinovial, leite e soro do leite, tecidos (Reddy et al., 1993, Rimstad et al., 1994, Barlough et al., 1994, Clavijo et al., 1996, Russo et al., 1997).

Quanto à detecção dos lentivírus no sêmen, tem sido descrita a presença de fatores inibidores da síntese de ácidos nucleicos presentes no plasma seminal (Lugaro et al., 1988). Esses fatores interferem no uso do DNA como *template*, pois parece que esses oligopeptídeos se ligam ao DNA (Lugaro et al., 1988).

Porém vários trabalhos têm sido realizados com o objetivo de utilizar a PCR na detecção de patógenos no sêmen, como o vírus da IBR (Silva, 1995). Da mesma forma a detecção dos lentivírus em sêmen através da PCR foi obtida em humanos e em diferentes espécies animais, incluindo os pequenos ruminantes (Travassos et al. 1998, 1999, Andrioli et al., 1999, Concha-Bermejillo et al., 1996, Mermin et al., 1991, Nash et al., 1995a, Jordan, et al. 1995).

Pesquisas visando a detecção de patógenos em embriões e soluções de lavagem das colheitas de embrião têm utilizado com sucesso a técnica de PCR (Wrathall, 1995). Foi demonstrado por PCR que embriões e fluidos uterinos coletados de ovelhas portadoras do MVV estavam livres do vírus, sendo que a sensibilidade da prova foi de 10 PFU de vírus (Woodall et al., 1994).

No caso dos LVPR esta técnica é particularmente importante para a identificação de animais que apresentam soroconversão tardia ou de resultado sorológico duvidoso (Rimstad et al., 1993). Porém, parece não haver relação entre o título de anticorpos e o aparecimento de bandas positivas à PCR (Barlough et al., 1994) e nem todas as amostras de sangue positivas aos testes sorológicos são também positivas na PCR (Reddy et al., 1993).

Zanoni et al. (1990) demonstraram que detecção do DNA - proviral do LVPR em cultivo celular, pode ser obtida um dia após inoculação e que apenas uma célula infectada dentre 10^6 células foi capaz de ser identificada por PCR. Barlough et al. (1994), observaram que a presença de 3000 monócitos contendo de 30 a 240 células infectadas foram suficientes para gerar resultados positivos na PCR. Os autores avaliaram a quantidade de monócitos de amostras de sangue de cinco animais, diluíram estas amostras e realizaram PCR de cada uma delas para determinar por cálculos o número de monócitos necessários para obter sinal positivo no PCR e os dados revelaram uma quantitativa diferença no nível de células associadas ao vírus entre os cinco animais testados os quais variaram de 10^3 a 10^5 monócitos para a detecção. Desta forma, parece que a taxa de infecção dos monócitos varia entre indivíduos portadores da CAE provavelmente devido ao nível de restrição da expressão viral (Narayan et al., 1983).

Segundo Barlough et al. (1994), a seqüência da região *gag* foi capaz de amplificar a maioria dos resultados positivos (69,4%), comparada às regiões *pol* e isto pode estar relacionado à região *gag* ser a mais conservada. Baixa eficiência na amplificação da região *pol* foi reportada por outros autores (Zanoni et al., 1992).

A PCR *Nested* aumenta a sensibilidade quando comparada à PCR simples e a combinação do uso de PCR múltiplos reduz o número de falsos negativos (Suarez & Whetstone, 1997). Já Barlough et al. (1994), consideram que o uso de PCR duplo *Nested* é mais adequado para identificar animais falso-negativos às provas sorológicas.

A dificuldade em amplificar o DNA proviral dos lentivírus pode estar na sua característica de alta taxa de mutação (Suarez & Whetstone, 1997). A variação das seqüências de bases no genoma dos lentivírus afetam a eficiência da PCR, pois esta é intimamente dependente da complementaridade entre os *primers* e *template* (Pasick, 1998). Os vírus RNA de forma geral e particularmente os lentivírus apresentam grande variedade de quasispécies o que se atribui ao fato da RNA polimerase ter intrinsecamente altas taxas de erro, desta forma, os lentivírus se reproduzem imperfeitamente, este mecanismo é útil aos vírus na sua habilidade de escape das defesas do hospedeiro e de produzir infecção persistente (Pasick, 1998). Os LVPR apresentam grande variação antigênica (Ellis et al., 1987). Existem também variações fenotípicas que refletem o potencial patogênico do vírus (Pasick, 1998).

3. ESTUDOS EXPERIMENTAIS

3.1 FATORES QUE INFLUENCIAM A PRESENÇA DO LENTIVÍRUS CAPRINO NO SÊMEN

3.1.1 INTRODUÇÃO

O agente etiológico da artrite encefalite caprina viral (CAE) pertencente à família Retroviridae e subfamília Lentivirinae. A enfermidade possui caráter crônico e apresenta alta prevalência nos rebanhos leiteiros brasileiros, e é responsável por grandes perdas econômicas. Desta forma, a demanda pela pesquisa das vias de transmissão, para o delineamento de medidas de controle e futura erradicação, são altamente solicitadas pelos produtores.

Os avanços das técnicas de conservação de germoplasma, aliado ao aumento da importância econômica da caprinocultura e da ausência de um programa nacional de melhoramento genético na espécie caprina, favorecem ainda mais o intercâmbio de sêmen. No entanto, muito pouco tem sido estudado sobre a possibilidade de transmissão de enfermidades via sêmen e embrião, havendo o risco da entrada de novas enfermidades no País.

O sêmen pode infectar-se por microrganismos que afetam diretamente o órgão reprodutor ou através do sangue e líquidos tissulares extravasados para o sistema reprodutor que carregam o microrganismo ou, ainda, o sêmen pode contaminar-se no meio externo (Hare, 1985; Thibier & Guerin, 2000b).

Em pequenos ruminantes, vários patógenos foram detectados no sêmen, com transmissão potencial ou comprovada, como a Febre Aftosa, *Rinderpest*, Peste dos Pequenos Ruminantes, Micoplasmose, Língua Azul, Leptospirose, Febre Q, Campilobacteriose, Brucelose, Clamidiose e Salmonelose (Hare, 1985; Thibier & Guerin, 2000b). E dentre os patógenos que podem ser transmitidos pelo sêmen, atenção especial deve ser dada às doenças cujos sinais clínicos são raramente evidentes (Philpott, 1993).

A transmissão dos lentivírus de pequenos ruminantes (LVPR) pelo sêmen deve ser considerada, uma vez que nem todos os casos de transmissão se explicam pela sua principal via, ou seja a via digestiva, ou pelo contato prolongado com animais infectados (Adams et al., 1983; Rowe et al., 1992), além disso, a presença do lentivírus foi demonstrada no sêmen de machos da espécie caprina (Travassos et al. 1999) e de ovinos naturalmente infectados e portadores de orquite brucélica (Concha Bermejillo et al. 1996). Rowe et al. (1992) observaram maiores taxas de soroconversão em fêmeas fertilizadas com machos soropositivos do que naquelas cobertas com machos negativos. A presença de células inflamatórias infectadas pelo vírus foi reportada em células aspiradas do epidídimo de um bode infectado (Rowe & East, 1997), e em *swabs* prepuciais de vários bodes infectados. No entanto, Asso (1989) reportou que o lentivírus caprino (CAEV) não foi isolado do sêmen de 20 machos soropositivos, em cinco coletas, por um período de dois anos.

Desta forma, ainda não foi definitivamente comprovado se ocorre ou não a transmissão do CAEV via sêmen em caprinos (Russo, 1983), sendo recomendado que os reprodutores infectados sejam retirados da reprodução, o que representa grande perda deste potencial genético e pouco se sabe se há fatores que podem interferir na presença dos LVPR no sêmen.

Lesões ou inflamações/infecções no órgão reprodutor podem desencadear o maior fluxo de células sanguíneas, e como, as células alvo dos lentivírus são monócitos e macrófagos, a presença destas células inflamatórias no sêmen ou prepúcio poderia aumentar a chance da presença do lentivírus no sêmen. Concha-Bermejillo et al. (1996) detectaram o lentivírus ovino no sêmen, somente após a infecção experimental por *Brucella ovis*, e a presença de leucócitos foi constatada nos ejaculados de todos os animais após a inoculação da bactéria. Em humanos outros fatores parecem influenciar a transmissão dos lentivírus pelo sêmen como o estágio da doença, estado imunológico ou nutricional e a associação com outras enfermidades (Alexander, 1990).

Dentre as técnicas de detecção direta de vírus no sêmen destaca-se o isolamento viral e a reação

em cadeia da polimerase (PCR). Concha-Bermejillo et al. (1996) isolaram o LVPR no sêmen de ovinos experimentalmente infectados, porém o sêmen pode apresentar substâncias tóxicas às células de cultura (Kahrs et al., 1977), além de apresentar forte carga de contaminação bacteriana (Rocha et al., 1995), sendo necessário o tratamento prévio do sêmen com antibióticos e diluição com o intuito de diminuir os efeitos tóxicos das substâncias presentes no plasma seminal, porém, a diluição do sêmen pode diminuir a carga viral a valores abaixo do detectável em cultura, levando a resultados falso-negativos. Há também relatos que algumas espécies de sêmen contém substâncias antivirais (Darcell & Coulter, 1976) que dificultam ainda mais os processos de detecção em cultura.

Oligopeptídeos presentes no plasma seminal podem interferir na detecção dos LVPR pela PCR, inibindo a síntese de ácidos nucleicos (Lugaro et al., 1988), ou no uso do DNA como molde para as ampliações, pois parece que essas substâncias se ligam ao DNA (Lugaro et al., 1988).

Vários trabalhos têm sido realizados com o objetivo de utilizar a PCR na detecção de patógenos no sêmen. Silva (1995) detectou o vírus da rinotraqueíte infecciosa bovina no sêmen em título de até 10^{-1} TCID₅₀/mL e Rocha (1998) que obteve sensibilidade de 10^5 a 10^{-3} (0,001) TCDI₅₀/50µL para o HVB-1 em sêmen por PCR *Nested*. Da mesma forma, a detecção dos lentivírus em sêmen através da PCR foi obtida em humanos e em diferentes espécies animais, incluindo os pequenos ruminantes (Travassos et al. 1998, 1999, Concha-Bermejillo et al., 1996, Mermin et al., 1991, Nash et al., 1995a, Jordan, et al. 1995).

A presença do lentivírus no sêmen parece ter um caráter intermitente, não sendo constatado em todos os ejaculados do mesmo animal (Concha-Bermejillo et al., 1996), desta forma os métodos de diagnóstico com alta sensibilidade para comprovação do agente no sêmen são importantes.

Para a comprovação da presença do CAEV no sêmen de bodes naturalmente infectados elegeu-se a técnica de reação em cadeia da polimerase *Nested* (PCR-*Nested*) por possuir alta sensibilidade e especificidade para o

diagnóstico de vários agentes etiológicos, inclusive o CAEV em diversos tipos de amostras clínicas (Barlough et al., 1994), e a técnica clássica de isolamento viral.

O objetivo do trabalho foi detectar a presença do DNA pró-viral do CAEV em ejaculados de bodes naturalmente infectados e com sintomas clínicos da CAE, e avaliar a influência da lavagem do sêmen, bem como da presença de inflamação testicular causada por uma lesão traumática local, concomitante, sobre a maior ou menor presença do CAEV no sêmen.

3.1.2 MATERIAL E MÉTODOS

Animais

Foram utilizados sete machos caprinos, com dois anos de idade, das raças Parda Alpina, Anglo Nubiana, Saanen e mestiços (Pardo Alpino e Moxotó) infectados naturalmente com o CAEV, com manifestações clínicas da enfermidade, sendo a infecção comprovada sorologicamente por imunodifusão em gel de ágar (IDGA).

Os reprodutores pertenciam ao rebanho da EMBRAPA - CNPC (Sobral, CE), onde em 1994, em conjunto com o Grupo de Pesquisas em Pequenos Ruminantes da Escola de Veterinária da UFMG, foi implantado o Programa de Controle da CAE (PCAEV), avaliando medidas sanitárias e de manejo (EMBRAPA, 1994, 1996; Gouveia et al., 1996), estabelecidas de acordo com a prevalência sorológica inicial do plantel (14,3%), e com a prevalência encontrada nas distintas modalidades epidemiológicas definidas: rebanho negativo, rebanho com baixa prevalência (até 2%), rebanho mestiço em semiconfinamento com média a alta prevalência, rebanho com média a alta prevalência (acima de 10%) de animais de raças leiteiras importados da França e utilizados como reprodutores e matrizes, e de crias mestiças leiteiras. No início do programa PCAEV os bodes positivos (53,9%), foram retirados da reprodução e utilizados no presente trabalho.

Coletas de sêmen e processamento

As coletas de sêmen foram realizadas por eletro-ejaculação, visto que os animais apresentavam avançado estado de artrite que os impossibilitava de realizar a monta.

Foram realizadas oito coletas de sêmen, quatro antes e quatro após os machos sofrerem injúria testicular, sob anestesia regional, visando maior afluxo de leucócitos, células de eleição do CAEV. A injúria testicular foi realizada com um trocáter de 3mm de diâmetro a uma profundidade de 1cm, no testículo esquerdo de cada animal. Nas coletas realizadas na mesma semana, com dois dias de intervalo, numa o ejaculado era lavado e na outra não.

Foi coletado sangue dos machos, antes e até dez dias após a injúria testicular para avaliação do quadro leucocitário.

As amostras de sêmen foram lavadas em Solução Krebs-Ringer-Fosfato na proporção de nove partes da solução para uma parte de sêmen com centrifugação a 2.000 g durante 10 minutos, sendo este um processo usual da Central de Tecnologia de Sêmen da EMBRAPA-CNPC, tendo em vista a presença de substâncias tóxicas aos espermatozoides no plasma seminal caprino. Ao sêmen lavado foi adicionado diluente à base de leite desnatado, glicose e glicerol. As amostras foram envasadas, submetidas aos vapores de nitrogênio líquido e em seguida imersas no nitrogênio para proceder-se a congelamento. Após essa etapa os *pailletes* foram transferidos para o botijão criobiológico e posteriormente para freezer à temperatura de -70°C.

Isolamento viral

Para o isolamento do CAEV, as amostras de sêmen e controles positivo e negativo foram inoculadas em monocamadas de células de membrana sinovial caprina (MSC) obtidas a partir de *explant* de cabrito comprovadamente negativo para o CAEV e sub-cultivada em número limitado a 18 passagens. As amostras (200µL) e os controles foram previamente tratados com 4µL de gamicina (80µg/mL), 2µL de penicilina/estreptomicina (200UI/mL) e

1µL de anfotericina B² (100UI/mL sob refrigeração - 4-8°C) por 12 horas. Para os controles positivo e negativo foram utilizados, respectivamente, sobrenadante de células de MSC inoculadas ou não com o CAEV (amostra padrão CAEV-CORK). As amostras e os controles foram diluídos 1/5 em MEM, sendo então inoculados 100 µL de cada amostra, em duplicata em placas de 24 poços, assim como os controles positivo e negativo, em monocamada semiconfluente de MSC e mantidos em meio MEM, com 5% de soro fetal bovino, 1% de anfotericina e 2% de penicilina e estreptomicina. Os cultivos foram mantidos por 63 dias em estufa com 5% de CO₂, com trocas de meio a cada sete dias e passagem de células a cada 21 dias, sendo a monocamada examinada diariamente em microscópio invertido para verificação de efeito citopático (ECP) característico (presença de células multinucleadas ou sincícios). Após a última passagem de células, foi realizada a coloração da monocamada com solução de cristal violeta a 0,1% para melhor visualização do ECP.

Reação em cadeia da polimerase

Para a prova de PCR foram preparados os controles positivo e negativo a partir de monocamadas de células de MSC sendo ou não respectivamente, inoculadas com amostra do CAEV de referência. As suspensões celulares foram obtidas por tripsinização das monocamadas. Depois de centrifugadas (6500g / 5 minutos) e submetidas a duas lavagens com 10 mL de PBS, as células foram ressuspensas em tampão hipertônico (0,32M sacarose; 10mM Trizma hydrochloride, pH 7,5; 5,0mM MgCl₂; 1,0% Triton X 100), para lise do citoplasma (Higuchi, 1989) durante alguns minutos na temperatura ambiente. Em seguida, o material foi centrifugado (2.500 rpm/10 minutos; Centrifugador Excelsa 2 FANEN, rotor 8X15 mL), sendo o sedimento lavado com PBS e ressuspense em 250 µL de tampão de PCR (10mM Tris.HCl, pH 8,0; 50mM KCl; 1,0mM MgCl₂; 5% glicerol; 0,05% Tween20) e tratado com 100µg de proteinase K/mL, durante 60 minutos a 56°C. Finalmente a proteinase K foi inativada termicamente (cerca de 100°C durante 10 minutos) e as amostras

² Fungizon®

acondicionadas em geladeira e, posteriormente em freezer a -20°C.

Para extração do DNA viral as amostras de sêmen foram filtradas, individualmente, em coluna de Sephacryl S-400³, segundo Santurde et al. (1996) e em seguida as amostras foram incubadas a 56°C por 45 minutos em solução contendo 200µL de Chelex 100⁴ a 5%, 2µL de proteinase K⁵ (10 mg/mL) e 7µL de DTT 1M. Após centrifugação por 10 segundos a 13.000g, os tubos foram colocados em banho de água fervente por 8 minutos e a seguir centrifugados por três minutos a 13.000g (Walsh et al., 1991). O material foi acondicionado em geladeira até sua utilização na prova de PCR.

Foram utilizados dois pares de iniciadores derivados a partir das seqüências das regiões *gag* da amostra padrão CAEV-Cork (Saltarelli et al., 1990), sendo os iniciadores 1 (5' CAAGC AGCAGGAGGGAGAAGCTG-3', nucleotídeos 953 à 975) e 2 (5'TCCTACCCCC ATAATTTGATCCAC -3', nucleotídeos 1249 à 1226) descritos por Barlough et al. (1994) resultando na amplificação de um fragmento de DNA de 297pb. Os iniciadores 3 (5'GTTCCAGCAACTGCAAACAGTAGCAA TG-3' nucleotídeos 997-1024) e 4 (5' ACCTTTCTGCTTCTTCATTTAATTTCCC 3' - nucleotídeos 1181 à 1154) foram utilizados na segunda amplificação, resultando num fragmento final de 185 pb (Rimstad et al. 1993).

A reação de PCR *Nested* foi realizada segundo metodologia de Barlough et al. (1994), com algumas modificações, para a região *gag*, num volume total por reação de 50µL, os quais continham: tampão Tris HCl (pH 8,3) - 10mM; KCl - 50mM; MgCl₂ 1,5mM; Gelatina- 0,001% (p/v); dNTP - 100µM de cada; TMAC- 5µM ; iniciadores 20pmol de cada (Ciclo 1 - iniciadores 1 e 2; Ciclo 2 - iniciadores 3 e 4); Taq DNA polimerase 2 UI; *Target* DNA: Ciclo 1 - 3µL e Ciclo 2 - 1µL produto do Ciclo 1 e água ultra pura 18 Ω (Milli-Q) livre de DNase, autoclavada 50µLq.s.p.

As reações de amplificação foram realizadas em

termociclador⁶, constituindo num ciclo inicial para desnaturar as fitas de DNA, de 94°C por 5 minutos; 35 ciclos: 94°C - 1 minuto, 56°C - 1 minuto, 72°C - 45 segundos; extensão final a 72°C por 7 minutos; 4°C - até a coleta da amostra.

Normas de segurança necessárias para obtenção de um teste confiável foram seguidas rigorosamente. Para prevenir contaminações, os procedimentos de preparo das amostras de sêmen, infecção das células, extração do DNA proviral, montagem da PCR e manipulação do material amplificado foram realizados em ambientes distintos. Luvas de procedimentos, ponteiros com barreira para aerossóis, microtubos e outros recipientes utilizados eram novos, estéreis e descartáveis. As reações de PCR foram montadas em unidade de fluxo laminar classe II exclusivo para manipulação. Reagentes estoques (iniciadores, enzimas e tampões) foram preparados em água ultra pura 18Ω (Milli-Q) livre de DNase, manipulados em cabine de fluxo laminar livre de contaminação externa.

Análise dos produtos da PCR

Eletroforese

As amostras amplificadas e os controles positivo e negativo, juntamente com o marcador molecular⁷, foram submetidos à eletroforese em gel de agarose 1% em TBE (Tris, borato e EDTA 0,1X), corado com brometo de etídio adicionado ao gel (0,5µg/mL). Cada amostra (15µL) juntamente com 3µL de tampão da amostra foram submetidas a eletroforese em cuba horizontal, com TBE (0,5X), por 60 minutos (2amp e 90volts). A visualização das bandas de DNA foram observadas ao transiluminador de luz ultra violeta, e registradas fotograficamente.

Restrição enzimática

Verificou-se o perfil de restrição enzimática dos produtos amplificados frente à enzima Bal I⁸.

³ Pharmacia, Uppsala, Sweden

⁴ Sigma, EUA C- 7901

⁵ Gibco / BRL, EUA

⁶ Programmable Thermal Controller, PTC-100, MJ Research, Inc. EUA

⁷ 100bp DNA Ladder, Gibco /BRL, EUA

⁸ Promega, EUA

A enzima foi diluída nos respectivos tampões que acompanham o kit seguindo as recomendações do fabricante. As amostras e os controles foram incubados a 37°C, por uma noite e os produtos da restrição foram submetidos a eletroforese em gel de agarose como descrito acima. A enzima Bal I reconhece e corta as seqüência 5'...TGC↓CCA....3' e a cópia correspondente - 3'...ACC↓GGT...5', desta forma os fragmentos amplificados no experimento de 185 pb resultariam em dois fragmentos de 116 e 69 pb.

Os dados foram analisados pelo teste Qui-quadrado (χ^2), utilizando o programa EPI-INFO (Dean et al., 1992).

3.1.3 RESULTADO E DISCUSSÃO

Até recentemente, a detecção do CAEV em amostras de sêmen não havia sido descrita, provavelmente em função da menor sensibilidade das técnicas disponíveis até então, na detecção de pequenas quantidades de partículas virais. Utilizando a PCR *Nested*, foram detectadas bandas de 185pb (Fig. 1) que correspondem ao DNA proviral de CAEV em 20 amostras de sêmen criopreservado (35,7%), a partir do total de 56 amostras analisadas. Este resultado demonstra o risco da transmissão do CAEV pela via sexual, tornando-se relevante maior controle nas importações e comercialização de bodes e sêmen caprino. O resultado obtido está em acordo com Concha Bermejillo et al. (1996) os quais detectaram o

lentivírus ovino em carneiros naturalmente infectados e com Travassos et al. (1998, 1999), que demonstraram a presença do CAEV em sêmen de caprinos experimentalmente e naturalmente infectados. Também nas espécies bovina (Nash et al., 1995a), em gatos (Jordan et al., 1995), e em humanos (Mermin et al., 1991) foi detectada a presença do lentivírus no sêmen.

Quanto à sensibilidade relativa do teste a PCR identificou as bandas esperadas entre $10^{4,5}$ a $10^{0,5}$ TCDI₅₀/50µL em sobrenadante de cultivo celular inoculado, quando se utilizaram os iniciadores externos. Com a realização da segunda etapa - PCR *Nested*, utilizando os iniciadores internos, as bandas esperadas foram obtidas entre $10^{4,5}$ a $10^{-4,5}$ TCDI₅₀/50µL. Os dados indicam que a PCR *Nested* possui boa sensibilidade para identificação do DNA-proviral do CAEV, quando comparado com Rocha (1998) que obteve sensibilidade de 10^5 a 10^{-3} (0,001) TCDI₅₀/50µL. para o HVB-1 por PCR *Nested*.

A especificidade das amplificações foi confirmada pela obtenção dos fragmentos esperados após a restrição enzimática (enzima Bal I) dos produtos amplificados pelo PCR-*Nested* das amostras de sêmen e do controle positivo.

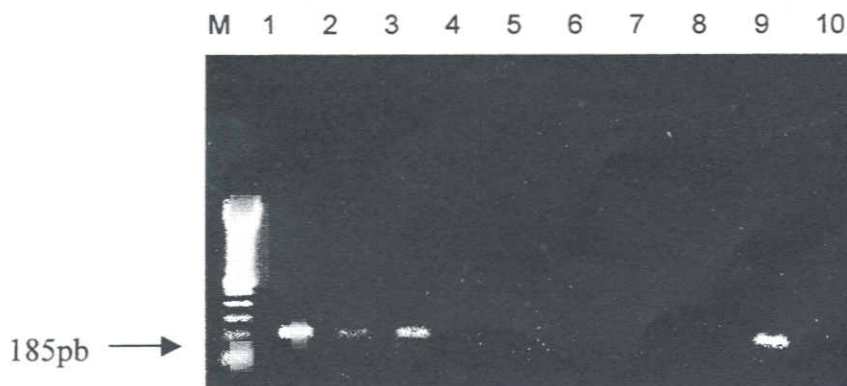


Figura 1. Gel de agarose 1% corado com brometo de etídio. Reação em cadeia da polimerase - PCR *Nested* de amostras de sêmen de bodes infectados naturalmente com o CAEV, bandas de 185pb. Sendo M - marcador DNA Ladder; 1, 2 e 3 - amostras positivas; 4, 5, 6, 7, 8 - amostras negativas; 9 - controle positivo e 10 - controle negativo.

A lavagem do sêmen e a injúria testicular foram fatores que influenciaram significativamente ($p < 0,05$) a presença do CAEV (Tab. 1 e 2). A conjunção da injúria testicular em animais infectados com o CAEV demonstrou ser um fator de agrave para a presença do CAEV no sêmen visto que 50,0% das amostras de sêmen coletadas após a injúria foram positivas enquanto que 21,4% das coletadas antes da injúria acusaram a presença do CAEV ($p < 0,05$) (Tab. 1). O mesmo foi observado por Concha Bermejillo et al. (1996) os quais detectaram, por

isolamento viral, o lentivírus ovino em sêmen de dois carneiros somente após a infecção experimental com *Brucella ovis*. A infecção local causada pela injúria testicular ficou evidente pelo exame de sangue, visto que existiu um pequeno aumento do número de leucócitos, principalmente neutrófilos com tendência a um desvio à esquerda, retornando 10 dias após a injúria a valores próximos aos anteriores, o que indica uma leve infecção, característica de infecção local.

Tabela 1. Resultados da PCR *Nested* para o Lentivírus caprino, pré e pós injúria testicular, de machos caprinos infectados naturalmente com CAEV e submetidos a lavagem ou não do sêmen.

	Amostras testadas (n)	Amostras positivas (n)	Amostras positivas (%)	Amostras testadas (n)	Amostras positivas (n)	Amostras positivas (%)
	PRÉ-INJÚRIA			PÓS-INJÚRIA		
Lavado	14	1	7,1% a*	14	4	28,6% a
Não lavado	14	5	35,7% a	14	10	71,4% b
Total	28	6	21,4% A**	28	14	50,0% B

* Dados com letras minúsculas diferentes na mesma coluna diferem estatisticamente ($p < 0,05$)

** Dados com letras maiúsculas diferentes na mesma linha diferem estatisticamente ($p < 0,05$)

Tabela 2. Resultados da PCR *Nested* para o Lentivírus caprino, em sêmen lavado ou não lavado, de machos caprinos infectados naturalmente com CAEV e submetidos a injúria testicular.

	Amostras testadas (n)	Amostras positivas (n)	Amostras positivas (%)	Amostras testadas (n)	Amostras positivas (n)	Amostras positivas (%)
	SÊMEN LAVADO			SÊMEN NÃO LAVADO		
Pré-injúria	14	1	7,1% a*	14	5	35,7% a
Pós-injúria	14	4	28,6% a	14	10	71,4% a
Total	28	5	17,9% A**	28	15	53,6% B

* Dados com letras minúsculas diferentes na mesma coluna diferem estatisticamente ($p < 0,05$)

** Dados com letras maiúsculas diferentes na mesma linha diferem estatisticamente ($p < 0,05$)

Nas amostras totais de sêmen não lavado 53,6% foram positivos enquanto que no sêmen lavado 17,9% das amostras apresentaram resultados positivos ($p < 0,05$) (Tab. 2), desta forma, observa-se que a lavagem do sêmen pode reduzir a presença do vírus, não sendo, porém, suficiente para eliminá-lo. E a presença maior do CAEV no sêmen integral, ou seja, não lavado, torna a monta natural de maior risco de transmissão do CAEV, aliado ao fato do comportamento normal do bode durante a monta representar um risco de transmissão da enfermidade, pois o macho frente à fêmea em estro bufa e urina com frequência.

Porém, mesmo antes da injúria testicular, 7,1% das amostras lavadas foram positivas indicando a presença do DNA proviral mesmo em sêmen processado para inseminação artificial (IA), ou seja, lavado e criopreservado e de um animal que não tenha nenhuma outra enfermidade concomitante a CAE. Embora tenha sido demonstrado que o CAEV está presente nas células não espermáticas do sêmen (leucócitos) e não nos espermatozoides (Travassos et al., 1998, 1999), o processo de lavagem do sêmen não remove essas outras células e sim o plasma seminal, que é o propósito da lavagem.

Os lentivírus têm sido relacionados aos leucócitos e não aos espermatozoides, também em outras espécies (Quayle et al., 1997, Nash et al., 1995a) e alguns métodos têm sido relatados visando a separação entre os espermatozoides e as demais células presentes no sêmen de homens contaminados com o vírus HIV, como a centrifugação por gradiente de densidade seguida de *swin-up*, com resultados satisfatórios (Semprini et al., 1992), indicando a possibilidade de se obter material genético livre do vírus a partir de reprodutores infectados. No entanto, Bielanski et al. (1992b), relataram que os métodos físicos que são usados para separar os espermatozoides do fluido seminal antes do seu uso para fecundação *in vitro* não foram confiáveis para a remoção do vírus da Diarréia Bovina a Vírus (BVD).

O CAEV foi detectado por isolamento viral, sendo observado a formação de sincícios na monocamada de MSC (Fig.2). Este resultado evidencia a viabilidade do CAEV nas amostras de sêmen criopreservado o que confirma que a congelamento do sêmen possibilita sua sobrevivência assim como de outros microrganismos (Philpott, 1993).

A PCR demonstrou-se superior ao isolamento viral (Tab.3), visto que das 56 amostras submetidas ao isolamento somente quatro foram positivas (7,1%) enquanto a PCR detectou 20 amostras positivas (35,7%), o que está em acordo com Smits et al. (2000) que encontraram maior positividade nas provas de PCR do que no isolamento viral do herpesvírus bovino em sêmen. Uma amostra positiva no isolamento também foi positiva na PCR e três não, e das quatro amostras positivas ao isolamento, três eram de amostras de sêmen não lavado, isto se justifica, pois o isolamento detecta a presença do vírus na sua forma livre o que seria muito mais provável sua detecção no plasma seminal. A PCR detecta o DNA pró-viral, existente dentro das células não espermáticas, desta forma, é provável que nas amostras positivas ao isolamento e não à PCR existissem apenas CAEV na forma livre que seria apenas detectável por RT-PCR, visto ser o CAEV um RNA vírus.

A variação na detecção do CAEV, em ejaculados do mesmo animal, sugere que a presença do DNA proviral no sêmen de caprino não é constante, o que está em acordo com Jordan et al. (1999) que observaram que a presença do lentivírus no ejaculado de gatos varia tanto entre animais quanto nos vários ejaculados do mesmo animal e com Concha-Bermejillo et al. (1996) que observaram que a presença do MVV em sêmen de ovinos é intermitente. Como a presença do CAEV no sêmen não é constante, o material genético de excelentes reprodutores poderia ser utilizado desde que uma alíquota de sêmen de cada coleta seja analisada por PCR.

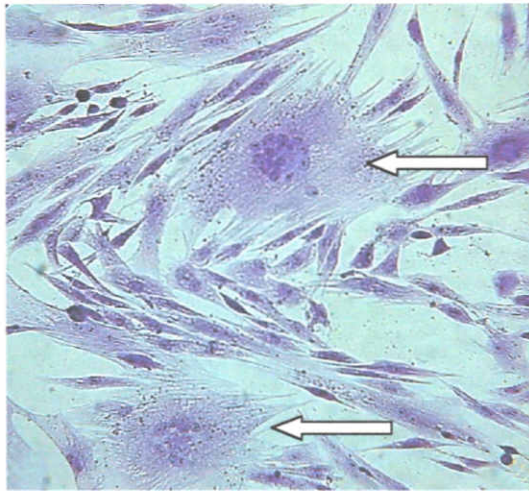


Figura 2. Sincício (setas) em cultura primária de MSC inoculada com sêmen de bodes infectados naturalmente com o CAEV, coloração cristal violeta 0,1%, aumento 200X.

Tabela 3. Comparação entre isolamento viral e PCR *Nested* na detecção do CAEV no sêmen.

	Isolamento positivo	Isolamento negativo	Total
PCR positivo	1	19	20
PCR negativo	3	33	36
Total	4	52	56

3.2 TRANSFERÊNCIA DE EMBRIÕES COMO MÉTODO DE CONTROLE DA ARTRITE ENCEFALITE CAPRINA VIRAL

3.2.1 INTRODUÇÃO

A criação de caprinos leiteiros no Brasil tem crescido nos últimos anos como uma atividade econômica rentável. No entanto, a ausência de um programa nacional de melhoramento genético tem levado os caprinocultores a importar animais sem adequada supervisão, acarretando em graves problemas sanitários como foi o caso da entrada e disseminação da artrite encefalite caprina – CAE no Brasil (Assis & Gouveia, 1994). Em adição, os avanços das técnicas de criopreservação de germoplasma favorecem ainda mais o intercâmbio internacional de material genético, apesar das pesquisas sobre a transmissão de doenças pelo sêmen e embrião ainda serem pouco conclusivas (Kahrs et al., 1980; Wrathall, 1995).

O desenvolvimento de legislações visando o controle de enfermidades, nem sempre acompanham os avanços científicos e tecnológicos. Questionamentos sobre o potencial para transmissão de patógenos através da transferência de embrião (TE) iniciaram-se quando se tornou evidente que a comercialização de embriões poderia se expandir mundialmente. Desta forma, as implicações epidemiológicas desta tecnologia foram definidas, e medidas de prevenção foram implantadas (Stringfellow & Seidel, 1999).

A CAE é uma enfermidade crônica, multisistêmica causada por um lentivírus da família Retroviridae, tendo sido primeiramente descrita nos Estados Unidos da América, sob a forma de leucoencefalomielite em cabritos (Cork et al., 1974). A enfermidade apresenta sinais clínicos de evolução lenta, incluindo artrite, pneumonia e mastite em animais adultos (Adams & Crawford, 1980), sendo os animais jovens de dois a quatro meses de idade mais susceptíveis à doença na forma nervosa (Norman & Smith, 1983). As perdas

econômicas são decorrentes da morte de animais jovens, diminuição da produção láctea e perda de peso dos animais devido à dificuldade de locomoção.

A manutenção de animais infectados no rebanho representa sérias perdas econômicas, porém a eliminação de todos os animais infectados é, muitas vezes, inviável, pois grande parte do rebanho pode estar acometida, além de representar grande perda de material genético. Desta forma, têm sido implantados programas de controle desta enfermidade, visando a obtenção de crias destes animais infectados antes de sacrificá-los (EMBRAPA, 1994).

Com distribuição cosmopolita a CAE ocorre de forma endêmica, com alta prevalência em vários países com produção leiteira intensiva (Péretz et al, 1994), sendo seu controle complexo devido ao seu caráter permanente, crônico e ao longo período de incubação (Zink et al., 1990). Como a principal via de transmissão é através da ingestão colostro ou leite de cabras infectadas (Adams et al., 1983; Rowe et al., 1992), o controle da enfermidade nos rebanhos tem se baseado, principalmente, em separar as crias logo após o parto, evitando o contato com a saliva da mãe e ingestão do colostro e leite. Porém este método, mesmo associado às técnicas de sincronização do estro e consequentemente dos partos, e à indução de parto, impõe a necessidade de controle rigoroso do manejo, sendo, portanto passível de falhas. Outra medida de controle consiste na separação entre os animais sadios e os portadores do CAEV, visto que pode ocorrer a transmissão horizontal pelo contato entre os animais, através de secreções e excreções como fezes, saliva, secreções urogenitais e respiratórias. Apesar da adoção destas medidas nos programas sanitários de controle da CAE, casos de animais positivos continuam ocorrendo, indicando a possibilidade de transmissão do CAEV por outras vias.

A transmissão através da monta natural foi sugerida por Russo (1983), como também por Andrioli et al. (1999) e Travassos et al. (1999), os quais comprovaram por PCR, a presença do CAEV no sêmen de animais naturalmente infectados.

A transmissão vertical do CAEV foi também apontada por Ali (1987), que verificou lesões

histopatológicas com grande infiltrado de células mononucleares, similares às descritas para CAE no útero de cabras infectadas, que sugerem que este órgão possa ser um foco de replicação viral, e desta forma represente uma fonte de infecção perinatal. East et al., 1993, observaram taxa de soroconversão em seis cabritos (15%) de 40 gerados de cabras positivas, com partos assistidos, privados de qualquer contato materno e posteriormente de qualquer animal positivo e que receberam leite e colostro de vaca.

O uso de animais ou germoplasma contaminados pode reduzir as respostas reprodutivas a estas técnicas, acarretando perda do investimento, como foi observado por Guerin et al. (1992), que verificaram redução significativa dos resultados de FIV, quando se utilizou sêmen de touros portadores de diarréia viral bovina (BVD). Portanto o custo-benefício do uso de animais doentes em programas reprodutivos deve ser criteriosamente analisado.

Como método de controle da transmissão de diversas doenças infecciosas a TE tem sido estudada em ruminantes, com resultados satisfatórios em bovinos (Bowen et al. 1983; Thomas et al. 1983; Del Campo et al. 1987; Digiacoimo et al. 1990), em ovinos (Hare et al., 1988; Foote et al., 1993) e em caprinos (Chemineau et al., 1986; Wolfe et al., 1987).

A TE torna possível a obtenção de grande número de crias em curto intervalo de tempo e tem sido considerada a mais segura técnica para o trânsito internacional de material genético (Castro et al., 1992, Philpott, 1993). Desta forma, pode suprir a necessidade de rápida reposição dos animais puros infectados, com obtenção de crias sadias e manutenção da qualidade genética do plantel, e possibilitaria importação de material genético com segurança, mesmo utilizando as fêmeas infectadas, obtendo ao mesmo tempo resultados positivos na esfera econômica, sanitária, reprodutiva e de melhoramento genético. Assim o objetivo deste experimento foi avaliar se embriões coletados de cabras positivas e lavados podem veicular ou não o LVPR para as receptoras e crias, de forma a assegurar se a técnica de TE pode ser utilizada como instrumento de controle da transmissão do CAEV.

3.2.2 MATERIAL E MÉTODOS

Animais

Como doadoras de embriões foram utilizadas dez cabras, sendo cinco da raça Saanen e cinco mestiças das raças Pardas Alpina e Moxotó, todas soropositivas para o CAEV, e 18 cabras SRD soronegativas como receptoras. As doadoras foram cobertas com reprodutor soropositivo para o CAEV. Após o parto, as crias foram mantidas junto à mãe (receptoras) até o desmame, tendo livre acesso ao colostro e leite. Durante toda a fase experimental, receptoras e crias foram mantidas em local isolado de outros animais, sobre controle constante para não ocorrer nenhum contato com animais infectados.

Sincronização do estro, superovulação e transferência de embriões

Doadoras e receptoras tiveram o estro sincronizado com esponjas vaginais (11 dias) impregnadas com 60 mg de acetato de medroxiprogesterona⁹, sendo aplicados 50µg de cloprostenol¹⁰ no nono dia da sincronização. No mesmo dia iniciou-se a superovulação das doadoras com 9 mg de hormônio foliculo estimulante suíno (FSHp)¹¹, fracionados em seis aplicações, em doses decrescentes, com intervalo de 12 horas. No terceiro dia após a retirada das esponjas foi administrado, durante quatro dias, Flunixin Meglumine¹² na dosagem de 1,1mg/Kg de peso vivo, a cada 12 horas (oito aplicações), visando diminuir a regressão prematura de corpos lúteos após a superovulação (Soares, et al. 1998).

As colheitas dos embriões foram realizadas entre o quinto e sexto dia após a primeira fertilização pelo método de laparotomia, segundo metodologia descrita por Andrioli-Pinheiro (1993), utilizando solução salina tampão de Dulbecco's (PBS) acrescida de gamicina e 1% de soro fetal bovino (SFB). Os animais foram submetidos a jejum de 24 horas e anestesia epidural cranial com cloridrato de

⁹ Promone E - Upjohn

¹⁰ Ciosin - Coopers

¹¹ Folltropin V - Vetrepharm

¹² Banamine - Shering-Plough

lignocaína a 2%¹³ (1mL para cada 5 kg de peso vivo) associado a cloridrato de xilazina¹⁴ - 0,1 mg/kg via intramuscular e sulfato de atropina - 0,1 mg/kg., sendo que todas as drogas foram administradas com intervalos de 10 minutos.

Após a colheita os embriões foram avaliados, sendo os embriões de grau I a III, com ZP íntegra, submetidos à lavagem, segundo normas da IETS (Stringfellow & Seidel, 1999), a qual consistiu da passagem dos embriões por cinco banhos em solução de PBS, acrescido de antibiótico e 0,4% de albumina sérica bovina (BSA) e depois, através de dois banhos de tripsina, pH 7,6-7,8 por 60 a 90 segundos. Foi utilizada tripsina estéril (Trypsin 1:250 com atividade tal que 1g hidrolisa 250g de caseína a 25°C, pH 7,6 em 10 minutos) em solução balanceada de Hank, sem cálcio e magnésio, na concentração de 0,25%. Após tratamento com tripsina, os embriões foram passados através de cinco banhos em PBS contendo antibiótico e 2% de SFB. Na passagem de cada banho foi utilizada micropipeta nova (estéril). Somente os embriões de uma mesma doadora foram lavados em conjunto, até o máximo de dez embriões.

Os embriões foram inovulados, a fresco ou após congelamento e descongelamento através do método clássico utilizando etilenoglicol como crioprotetor. As inovulações foram realizadas pela técnica de semi-laparoscopia (Salles et al. 1996), sendo depositados dois embriões em cada receptora, no corno uterino adjacente ao ovário que apresentou maior número de corpos lúteos. O diagnóstico de prenhez foi realizado aos 30 dias após inovulação, por ultrasonografia.

Monitoramento sorológico

O monitoramento sorológico dos animais foi obtido através do teste de microimunodifusão em gel de agarose (MIDGA) utilizando antígeno comercial¹⁵. Antes do experimento, a soronegatividade das receptoras foi determinada pela obtenção de três resultados negativos consecutivos em repetições do teste sorológico com intervalo de seis meses. As coletas do

sangue das receptoras e de suas crias foram realizadas uma semana após o parto, e repetida nas crias um, três, seis, doze e dezesesseis meses após o nascimento e nas receptoras a cada seis meses, para realização do MIDGA.

Reação em cadeia da polimerase - PCR

Foi realizada a prova de PCR *Nested*, no sangue das crias aos dezesesseis meses de idade, segundo metodologia de Barlough et al. (1994), para a região *gag*, com algumas modificações. A extração do DNA viral foi realizada segundo metodologia descrita por Walsh et al. (1991). O volume total por reação de PCR foi 50µL, contendo: tampão Tris HCl (pH 83) - 10mM; KCl - 50mM; MgCl₂ 1,5mM; Gelatina- 0,001% (w/v); dNTP - 100µM de cada; TMAC- 5µM; Iniciadores 20pmol de cada (Ciclo 1 - iniciadores 1 e 2; Ciclo 2 - iniciadores 3 e 4); Taq DNA polimerase 2 U; Target DNA: Ciclo 1 - 3µL e Ciclo 2 - 1µL produto do ciclo 1 e água livre de DNase, autoclavada 50µL q.s.p.

Foram utilizados dois pares de iniciadores derivados a partir das seqüências das regiões *gag* CAEV Cork (Saltarelli et al., 1990), sendo os iniciadores 1 (5' CAAGCAGCAGGA GGGAGAAGCTG - 3', nucleotídeos 953 à 975) e 2 (5'TCCTACCCCCATAATTTGATCCAC - 3', nucleotídeos 1249 à 1226), resultando na amplificação de um fragmento de DNA de 297pb. Os iniciadores 3 (5GTTCCAGCAACTGCAAACAGTAGCAAT G-3' nucleotídeos 997-1024) e o 4 (5ACCTTTCTGCTTCTTCATTTAATTTCCC 3' - nucleotídeos 1181 à 1154) foram utilizados na segunda amplificação, resultando um fragmento final de 185 pb (Barlough et al., 1994).

As reações de amplificação foram realizadas em equipamento PTC-100¹⁶, sendo realizados um ciclo inicial para desnaturar todas as fitas de DNA, de 94°C por 5 minutos; 35 ciclos: 94°C - 1 minuto, 56°C - 1 minuto, 72°C - 45 segundos; extensão final a 72°C por 7 minutos; 4°C - até a coleta da amostra. As amostras e os controles positivo e negativo (células de membrana sinovial de caprinos infectadas e não infectadas

¹³ Anestésico Bravet - Bravet

¹⁴ Rompum - Bayer

¹⁵ Vet Diag Tech.

¹⁶ Programmable Thermal Controller, PTC-100, MJ Research, Inc.

pelo CAEV) foram submetidos, juntamente com o marcador molecular (100bp DNA Ladder¹⁷), à eletroforese em gel de agarose 1% corado com brometo de etídio adicionado ao gel (0,5µg/mL) e o resultado observado ao transiluminador de luz ultravioleta.

3.2.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

As doadoras apresentaram ovulação média de 18,20, com taxa de recuperação de estruturas de 64,29%. No entanto, 36,75% das estruturas eram ovócitos e 63,25% eram embriões o que correspondeu a 74 embriões, sendo que destes, 43 (58,11%) eram viáveis para transferência (graus I a III). Os embriões apresentavam-se no estágio de mórula, mórula compacta, blastocisto inicial e blastocisto. Vinte e sete embriões foram inovulados a fresco em 14 receptoras, sendo que quatro ficaram prenhes (taxa de prenhez de 28,57%) dos quais nasceram cinco cabritos, sendo quatro fêmeas e um macho (taxa de natalidade de 18,56%). Dezesesseis embriões foram congelados (grau I e II), sendo que oito foram viáveis após o descongelamento e foram inovulados em quatro receptoras. Uma receptora tornou-se prenhe (taxa de prenhez de 25,0%) resultando no nascimento de um cabrito macho (taxa de natalidade de 12,50%).

O resultado de superovulação apresentado pelas fêmeas, neste experimento, está de acordo com o observado na literatura para cabras sadias superovuladas com FSH-p (Baril et al., 1992) como também a porcentagem de colheita de embriões viáveis, contrapondo-se aos resultados de Wolfe et al. (1987) que conseguiram baixas taxas de ovulação e de embriões viáveis com cabras infectadas pelo CAEV. No entanto, as taxas de prenhez e de natalidade obtidas, tanto de embriões transferidos a fresco como congelados estão abaixo das descritas para a espécie caprina (Ishwar & Memon, 1996), e semelhantes às descritas por Wolfe et al. (1987) que obtiveram taxas de prenhez (12,5%) e de natalidade (6,25%), para cabras infectadas. Porém, faz-se necessário um estudo concomitante, com cabras sadias e infectadas com o CAEV, utilizando os mesmos tratamentos hormonais e de colheita de embriões, bem como com os mesmo fatores climáticos e de nutrição, para determinar se a

infecção pelo CAEV influencia negativamente nas taxas reprodutivas num programa de TE.

A infecção pelos lentivírus é persistente, havendo expressão recorrente dos genes virais estimulando o sistema imune (Cheevers et al 1988), com conseqüente presença de níveis variáveis de anticorpos circulantes. O teste de imunodifusão para detecção de anticorpos precipitantes permanece sendo o mais utilizado no diagnóstico da infecção pelos LVPR em função de seu baixo custo e alta especificidade, entretanto a ocorrência de falsos negativos é possível, estando dependente do nível de anticorpos, estado fisiológico, via de infecção, tempo pós-infecção, tipo de antígeno e sensibilidade da técnica de MIDGA, que é inferior à dos testes imunoenzimáticos (ELISA).

Wolfe et al. (1987) transferiram embriões de três cabras soropositivas para oito cabras soronegativas, resultando em um cabrito e um natimorto. Todas as receptoras permaneceram livres da doença, nenhum vírus foi isolado do feto natimorto e o cabrito permaneceu livre da infecção até quatro meses de idade quando foi feita a última avaliação por imunodifusão em gel de ágar.

No presente trabalho, por considerarmos que a soroconversão tardia, ou seja, sete meses após a infecção, tem sido descrita em cabritos (Rowe et al., 1992), o monitoramento sorológico foi mais prolongado, não tendo sido observada soroconversão das crias até os 16 meses de idade, e nem das receptoras durante todo o experimento. Não foi detectado no sangue das crias aos 16 meses de idade o DNA proviral do CAEV pela técnica de PCR *Nested*.

Resultados satisfatórios com a TE no controle de doenças infecciosas, também tem sido obtidos por outros autores, sendo que todos realizaram, assim com neste experimento, a lavagem dos embriões (Bowen et al., 1983; Thomas et al., 1983; Digiacomo et al., 1990; Foote et al., 1993; Chemineau et al., 1986; Wolfe et al., 1987). Ao contrário, Gilbert et al. (1987) realizaram a TE sem efetuar a lavagem dos embriões, com ovelhas positivas para Língua Azul, e observaram soroconversão em duas receptoras. Foster et al. (1992) observaram a infecção de 12 crias com *Scrapie* após transferir embriões de seis ovelhas infectadas,

¹⁷ Life Technologies™

sem realizar a lavagem dos mesmos, para 16 receptoras sadias. Desta forma, reforçado pelo fato do CAEV estar presente no fluido uterino (Andrioli et al., 2000) ressaltamos a importância da lavagem dos embriões logo após a colheita, para obtenção de crias sadias com a TE.

3.3 DETECÇÃO *IN VITRO* DO VÍRUS DA ARTRITE ENCEFALITE CAPRINA EM EMBRIÕES DE CABRAS NATURALMENTE INFECTADAS

3.3.1 INTRODUÇÃO

O desenvolvimento de tecnologias reprodutivas tem contribuído para o aumento da produção e difusão do material genético de animais de alta produtividade. Além das tecnologias de inseminação artificial (IA), da sincronização do estro e da transferência de embriões (TE), que já são bem difundidas, outras tecnologias reprodutivas têm despontado como a fecundação *in vitro* (FIV), a clonagem e a sexagem de gametas. No entanto, grande cuidado deve ser mantido para que estas técnicas não disseminem também patógenos, o que causaria resultados desastrosos em grande número de rebanhos, tanto ao nível nacional como internacional.

A transmissão de patógenos pelo embrião poderá ocorrer nas seguintes circunstâncias: se o agente estiver presente dentro do embrião (infecção embrionária), em associação à zona pelúcida (ZP) ou que esteja presente nos fluidos no qual os embriões são recolhidos, manipulados, criopreservados ou transferidos (Singh, 1987; Wrathall, 1995).

Ao contrário do sêmen, poucos patógenos têm sido demonstrados em ovócitos (Eaglesome et al., 1980). No entanto, alguns autores observaram, através de microscopia eletrônica, partículas tipo retrovírus nos ovócitos e embriões com ZP intacta em camundongos, gatos e primatas (Bowen, 1980; Calarco et al., 1973; Kalter et al., 1974; Larsson et al., 1981), porém parece que estas partículas são retrovírus endógenos e que sua expressão em ovócitos e embriões durante o desenvolvimento possa ser um evento comum, especialmente em camundongo, que tem sido mais estudado. A presença destes provírus no embrião é geralmente relacionada a efeitos carcinogênicos, como a leucemia em murinos e felinos e

tumores mamários em camundongos (Zeilmaker, 1969).

A penetração de patógenos através da ZP após a fecundação (infecção transzonal) tem sido relatada muito raramente e apenas em embriões de camundongo expostos experimentalmente a vírus, como a cepa Mengo do vírus da encefalomiocardite e Coxsackie B (família *Picornaviridae*) (Gwatkin et al. 1966; Heggie et al., 1979). Todavia se a ZP estiver danificada ou ausente, a infecção por vírus pode ocorrer (Carthew et al., 1985; Eaglesome et al., 1980). Outra possibilidade de infecção transzonal ocorre na espécie suína, onde embriões viáveis foram observados portando o parvovírus suíno após exposição *in vitro* (Bane et al. 1990).

A patogenia da enfermidade tem relação direta com a possibilidade da transmissão materno fetal e também por embrião, mesmo que estes permaneçam por pouco tempo em contato com os fluidos uterinos. Microrganismos com predileção pelo trato genital feminino e presentes nas suas secreções, podem ficar aderidos à ZP do embrião. Agentes patogênicos carreados pelo sangue podem prontamente ganhar acesso ao trato genital, aumentando o risco no caso de qualquer sangramento uterino, o que ocorre, normalmente, durante a colheita de embriões.

No caso das Lentivirose, exames microscópicos demonstraram alterações patológicas similares às descritas para artrite encefalite caprina (CAE) no endométrio de cabras infectadas (Ali, 1987). A presença de células infectadas pelo vírus da CAE foi demonstrada no muco vaginal de fêmeas em estro (Rowe & East, dados não publicados apud Rowe & East, 1997). Loussert-Ajaka et al. (1997) trabalhando com o HIV, detectaram o vírus pela reação em cadeia da polimerase (PCR) em secreções cérvico-vaginais.

A ZP tem sido considerada uma barreira aos patógenos (Singh, 1987; Wrathall, 1987) e, desta forma, a Sociedade Internacional de Transferência de Embriões (IETS) tem recomendado a lavagem dos embriões após a colheita, visando a remoção dos possíveis patógenos aderidos à ZP (Stringfellow & Seidel, 1999). No entanto, a integridade da ZP é crítica na determinação do estado de sanidade dos

embriões, pois pesquisas realizadas com embriões sem ZP expostos aos vírus da Língua Azul (LA), Febre Aftosa e IBR, demonstraram que a lavagem não foi eficiente para a remoção do vírus (Bowen, et al., 1982; Singh et al., 1986; Bowen et al., 1985) o que não ocorreu com embriões com a ZP íntegra e lavada (Bowen, et al., 1982; Singh et al., 1986; Singh et al., 1982).

Certos vírus podem aderir firmemente à ZP após a exposição *in vitro* e mesmo a lavagem pode falhar em removê-los (Singh, 1987). Desta forma, o uso de tripsina em meios de lavagem dos embriões tem demonstrado ser eficiente na remoção de vírus envelopados que não são removidos pela lavagem sem a enzima (Stringfellow & Seidel 1999), como no caso do herpesvírus BHV-1 e o vírus da estomatite vesicular (Singh, 1987) e também certas bactérias como *Brucella ovis*, além de não ser danoso para os embriões (Echternkamp et al., 1989). Da mesma forma, o uso de antibióticos será normalmente efetivo contra bactérias e alguns micoplasmas (Stringfellow & Seidel 1999), sendo que as concentrações recomendadas parecem não causar efeitos adversos aos embriões. Outras substâncias e fatores têm sido estudadas, como desinfetantes gerais como a luz ultravioleta, agente fotossensíveis e halaminas, porém estes tendem a ser adversos à sobrevivência do embrião (Bielanski et al., 1992a, Bielanski et al., 1991).

As propriedades da ZP parecem variar entre as espécies animais, a despeito das similaridades morfológicas e bioquímicas (Hansen, et al., 1992; Wrathall, 1995), o que implica na impossibilidade de se inferir entre pesquisas de diferentes espécies animais. Além disso, a ZP de embriões produzidos *in vitro* difere das produzidas *in vivo*, e somado ao fato do CAEV poder infectar e replicar bem em células da granulosa - *in vitro* (Lamara et al., 2000), é importante verificar se a presença do Lentivirus pode influenciar o desenvolvimento dos embriões *in vitro* e, principalmente, contribuir para infecção dos embriões.

O uso da TE visando o aproveitamento máximo de fêmeas de alto padrão genético, porém soropositivas para a lentivirose caprina foi sugerido, pois significaria uma importante ferramenta de controle desta enfermidade (Embrapa, 1994). Desta forma, estudos com TE

de doadoras soropositivas para o CAEV e transferidos para cabras soronegativas foram realizados com resultados satisfatórios, ou seja, nem as receptoras nem as crias soroconverteram até meses após a transferência (Wolfe et al., 1987; Andrioli-Pinheiro et al., 1996). Porém para maior segurança na TE como método de controle da enfermidade estudos mais aprofundados precisam ser realizados.

Segundo Singh (1987), a pesquisa sobre o risco da transmissão de agentes infecciosos por TE pode ser abordada por quatro formas principais: "*in vitro in vitro*", "*in vitro in vivo*", "*in vivo in vivo*" e "*in vivo in vitro*". As pesquisas que visam a detecção de patógenos *in vitro* ou seja, em embrião e soluções de lavagem das colheitas, têm recorrido às técnicas de isolamento viral em cultura de células, microscopia eletrônica e à PCR, sendo que esta tem sido utilizada com sucesso (Wrathall, 1995).

Gradil et al. (1994) obtiveram resultado positivo com o uso da PCR em embrião infectado *in vitro* e lavado e em fluido uterino para a detecção do parvovírus suíno. Foi demonstrado por PCR que embriões de ovelhas portadoras de Maedi-Visna estavam livres do lentivírus, sendo que a sensibilidade da prova foi de 10 PFU de vírus.

Wolfe et al. (1987) tentaram isolar o lentivírus caprino (CAEV) de fluido uterino coletado juntamente com os embriões de cabras portadoras de CAE, sendo que nenhum efeito citopático (ECP) foi observado. Os autores também não conseguiram isolar o vírus de colostro e placenta.

O presente experimento visa a detecção do CAEV em amostras de embrião, fluido uterino e meio de lavagem dos embriões, utilizando a forma de pesquisa, "*in vivo in vitro*", onde os embriões são coletados de doadoras infectadas - *in vivo* e analisados quanto à presença do agente *in vitro*, por isolamento viral em cultura primária de células de membrana sinovial de caprino (MSC) e por PCR *Nested*.

3.3.2 MATERIAL E MÉTODOS

Animais

Como doadoras de embriões foram utilizadas doze cabras soropositivas para o CAEV e com sintomas clínicos da doença. As cabras da raça Saanen, pluríparas, com idade entre quatro e seis anos foram cobertas com reprodutor soropositivo para o CAEV. Os animais foram mantidos em sistema intensivo.

Sincronização do estro e superovulação

As cabras tiveram o estro sincronizado com esponjas vaginais (11 dias) impregnadas com 50 mg de acetato de medroxiprogesterona¹⁸, sendo aplicados 50µg de cloprostenol¹⁹ no nono dia da sincronização. No mesmo dia iniciou-se a superovulação das doadoras com 160 mg de hormônio folículo estimulante suíno (FSHp)²⁰, fracionados em oito aplicações, em doses decrescentes, com intervalo de 12 horas. No terceiro dia após a retirada das esponjas foi administrado, durante quatro dias, Flunixin Meglumine²¹ na dosagem de 1,1mg/Kg de peso vivo, a cada 12 horas (oito aplicações), visando diminuir a regressão prematura de corpos lúteos após a superovulação (Soares, et al. 1998).

Colheita de embriões

As colheitas dos embriões foram realizadas entre o sexto e sétimo dia após a primeira fertilização pelo método semi-transcervical, segundo metodologia descrita por Andrade et al., (2000) buscando desenvolver uma técnica menos traumática para a doadora. Foi utilizada para a colheita dos embriões solução salina tampão de Dulbecco's (PBS) acrescida de gamicina e 1% de soro fetal bovino (SFB). Os animais foram submetidos a jejum de 12 horas antes das colheitas.

Após a tricotomia da fossa para lombar esquerda, da junção sacrococcígea e da cauda, seguida da higiene da região vulvar, os animais foram contidos, pelo pescoço, em canzil

instalado em cima de uma mesa própria, onde permaneciam em estação. Em seguida foram feitas as anestésias epidural caudal, regional em "L" invertido e local na linha da incisão, localizada obliquamente à coluna vertebral e paralela ao músculo tensor da fascia lata (Fig. 3).

Os músculos oblíquo externo, oblíquo interno e transversos do abdome foram divulsionados nesta ordem. A incisão permitiu exteriorizar os ovários para visualização e contagem dos corpos lúteos existentes (Fig. 4). Com ajuda de um espécúlo, foi introduzida na vagina, uma sonda tipo Foley nº oito sustentada por um mandril de aço inox. Com a mão introduzida na cavidade abdominal, foi possível conduzir a sonda, penetrando a cérvix e posicionando-a no terço caudal do corno uterino a ser lavado. Após fixação da sonda com o balão de ar, cada corno separadamente com 60 mL de PBS, dividido em seis injeções de 10 mL cada. Um registro de três vias foi adaptado na saída da sonda permitindo a injeção e o recolhimento alternado da solução de lavagem, a qual era recolhida diretamente em placas de Petri (Fig. 5).

¹⁸ Promone E - Upjohn

¹⁹ Ciosin - Coopers

²⁰ Folltropin V - Vetrepharm

²¹ Banamine - Shering-Plough



Figura 3. Local da incisão para colheita de embriões pela técnica semi-transcervical.



Figura 4. Ovário com a presença de vários corpos lúteos.



Figura 5. Colheita de embriões pela técnica semi transcervical.

Lavagem dos embriões e amostragem

Após a colheita os embriões foram avaliados, sendo que metade dos embriões, com ZP íntegra, foram submetidos a lavagem segundo normas da IETS (Stringfellow & Seidel, 1999), a qual consistiu da passagem dos embriões por cinco banhos em solução de PBS, acrescido de gentamicina (50µg/mL) e 0,4% de albumina sérica bovina (BSA) e depois, dois banhos de tripsina, pH 7,6-7,8 por 60 a 90 segundos. Foi utilizada tripsina estéril (Trypsin 1:250 com atividade tal que 1g hidrolisa 250g de caseína a 25°C, pH 7,6 em 10 minutos) em solução balanceada de Hank, sem cálcio e magnésio, na concentração de 0,25%. Após tratamento com tripsina, os embriões foram passados por cinco banhos em PBS contendo antibiótico e 2% de SFB e por fim armazenados em solução de PBS e BSA a 0,4%. Na passagem de cada banho foi utilizada micropipeta nova (estéril). Somente os embriões de uma mesma doadora foram lavados em conjunto, até o máximo de dez embriões.

Metade das estruturas coletadas (embriões de grau I a IV e ovócitos) foram lavados como descrito, enquanto que a outra metade não foram lavados, mas sim transferidos do meio nos quais foram coletados para um meio novo com PBS e BSA a 0,4%.

As estruturas, o fluido uterino (PBS recuperado juntamente com as estruturas) e o meio de lavagem correspondente ao último banho de lavagem dos embriões foram armazenados, sob refrigeração, para transporte até o Laboratório de Virologia Animal da Escola de Veterinária da UFMG, onde as amostras foram processadas.

Isolamento viral

As amostras refrigeradas foram inoculadas 24 horas depois, em monocamadas semiconfluentes de células de cultura primária de MSC, em placas de 24 poços e mantidas em solução de MEM, com SFB (5%), anfotericina B (1%) e penicilina e estreptomicina (2%), que corresponde ao meio de manutenção de cultura de células.

Para a inoculação das amostras foi retirado o meio das placas e a monocamada foi lavada duas vezes com PBS. As amostras de fluido uterino e o meio do último banho dos embriões

foram inoculadas (200µL), sendo que, cada amostra foi inoculada em dois poços de forma a termos duas repetições por amostra. Quanto à inoculação das estruturas, foram colocadas duas a três estruturas por poço das placas juntamente com 200µL do meio no qual eles foram armazenados. O controle positivo correspondeu aos poços inoculados com a amostra padrão CAEV-CORK (título $10^{5,73}$ TCID₅₀/mL) e o controle negativo aos poços inoculados somente com MEM, ambos processados nas mesmas condições das amostras de campo.

Para adsorção do vírus, as culturas inoculadas foram incubadas por uma hora, em estufa a 5% de CO₂ em temperatura de 37°C, após o que foi adicionado novo meio de manutenção e retornaram à estufa.

As culturas foram mantidas durante 63 dias em estufa com 5% de CO₂ em temperatura de 37°C, com troca de meio a cada sete dias e passagem de células a cada 21 dias. As monocamadas foram examinadas, diariamente, para observação de ECP característico (formação de sincícios). Parte da suspensão de células das monocamadas tripsinizadas para as sucessivas passagens de células, e os sobrenadantes foram armazenados a -20°C e utilizados para PCR. Na última passagem as células, foram repicadas em placas de seis poços contendo lamínula de vidro (5x5mm). Após 21 dias, as lamínulas foram retiradas e coradas com cristal de violeta (0,1%) para melhor visualização dos sincícios, e a monocamada de células das placas foram tripsinizadas para PCR.

Extração do DNA proviral

As amostras de DNA para PCR foram preparadas a partir de suspensões celulares obtidas pôr tripsinização das monocamadas de MSC.

Para a tripsinização da monocamada, as placas foram lavadas três vezes com PBS para retirada total do soro fetal, e foi adicionada a tripsina por cinco minutos, para a liberação das células. Foi adicionado PBS e em seguida o material foi recolhido em microtubos de Eppendorf.

As amostras foram centrifugadas (14000rpm/1 minuto; microcentrífuga Eppendorf), o sobrenadante foi descartado e o *pellet* de células

foi ressuspensionado em PBS. As células foram lavadas duas vezes em PBS e então, foram ressuspensas em tampão hipertônico (0,32M sacarose; 10mM Trizma hydrochloride, pH 7,5;

Quadro 6: Iniciadores de oligonucleotídeos utilizados na PCR *Nested* para a identificação do DNA proviral do CAEV.

Iniciadores	5' → 3' Sequência de nucleotídeos ^a	Localização ^a
1 ^b	CAAGCAGCAGGAGGGAGAAGCTG	953-975
2 ^b	TCCTACCCCCATAATTTGATCCAC	1249-1226
3 ^c	GTTCCAGCAACTGCAAACAGTAGCAATG	997-1024
4 ^c	ACCTTTCTGCTTCTTCATTTAATTTCCC	1181-1154

^a Baseado no CAEV-Cork (Saltarelli et al., 1990)

^b Descrito por Barlough et al. (1994)

^c Descrito por Rimstad et al. (1993)

5,0mM MgCl₂; 1,0% Triton X 100), para lise do citoplasma (Higuchi, 1989) durante alguns minutos na temperatura ambiente. Em seguida, o material foi centrifugado (14000rpm/5 minutos) e o sedimento lavado com PBS e ressuspensionado em 250µL de tampão de PCR (10mM Tris.HCl, pH 8,0; 50mM KCl; 1,0mM MgCl₂; 5% glicerol; 0,05% Tween20). O material foi então, tratado com 2,5µL de proteinase K (0,1µg/µL), durante 60 minutos, em banho-maria à 56°C. A proteinase K foi finalmente, inativada termicamente (cerca de 100°C durante 10 minutos) e as amostras foram acondicionadas em geladeira e, posteriormente em freezer -20°C.

Reação em cadeia da polimerase (PCR)

Iniciadores

Foram utilizados dois pares de iniciadores²² derivados a partir das seqüências das regiões *gag* da amostra padrão CAEV Cork (Saltarelli et al., 1990), sendo um par de iniciadores descrito por Barlough et al. (1994) resultando na amplificação de um fragmento de DNA de 297pb e um segundo par de iniciadores utilizados na segunda amplificação descritos por Rimstad et al. (1993), resultando num fragmento final de 185 pb (Quadro 6).

²² Gibco BRL

Amplificação do DNA proviral

A reação de PCR *Nested* foi realizada segundo metodologia de Barlough et al. (1994), com algumas modificações, para a região *gag*, num volume total por reação de 50µL, os quais contém: tampão Tris HCl (pH 8,3) - 10mM; KCl - 50mM; MgCl₂ 1,5mM; Gelatina- 0,001% (w/v); dNTP - 100µM de cada; TMAC- 5µM; Iniciadores 20pmol de cada (Ciclo 1 - iniciadores 1 e 2; Ciclo 2 - iniciadores 3 e 4); Taq DNA polimerase 2 U; *Target* DNA: Ciclo 1 - 3µL e Round 2 - 1µL produto do Ciclo 1 e água livre de DNase, autoclavada 50µL q.s.p.

As reações de amplificação foram realizadas em equipamento PTC-100²³, sendo realizados um ciclo inicial para desnaturar as fitas de DNA, de 94°C por 5 minutos; 35 ciclos: 94°C, por 1 minuto, 56°C por 1 minuto, 72°C por 45 segundos; extensão final a 72°C por 7 minutos mantidos a 4°C até a coleta da amostra.

Análise dos produtos da PCR

Eletroforese

As amostras amplificadas e os controles positivo e negativo, juntamente com o marcador molecular (100bp DNA Ladder²⁴) foram

²³ Programmable Thermal Controller, PTC-100, MJ Research, Inc.

²⁴ Gibco BRL

submetidos à eletroforese em gel de agarose 1% em TBE (Tris, borato e EDTA 0,1X), corado com brometo de etídio adicionado ao gel (0,5µg/mL). Cada amostra (15µL) juntamente com 3µL de tampão da amostras foram submetidas a eletroforese em cuba horizontal, com TBE (0,5X), por 60 minutos (2A e 90volts). As bandas de DNA foram observadas ao transiluminador de luz ultravioleta, e registradas fotograficamente.

Restrição enzimática

Verificou-se o perfil de restrição enzimática dos produtos amplificados frente à enzima Bal I²⁵. A enzima foi diluída nos respectivos tampões que acompanham o kit seguindo as recomendações do fabricante. As amostras e os controles foram incubados a 37°C, por uma noite e os produtos da restrição foram submetidos a eletroforese em gel de agarose como descrito acima. A enzima Bal I reconhece e corta as seqüência 5'...TGC↓CCA...3' e a cópia correspondente - 3'...ACC↓GGT...5', desta forma os fragmentos amplificados no experimento de 185 pb resultariam em dois fragmentos de 116 e 69 pb.

3.3.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Das 12 doadoras submetidas ao tratamento de superovulação, dez responderam apresentando ovulação média de 12,3 e recuperação de 61 estruturas - taxa de recuperação de estruturas de 49,6%. No entanto, 49,2% das estruturas eram ovócitos e 50,8% eram embriões. O resultado de superovulação apresentado pelas fêmeas, neste experimento, está de acordo com o observado na literatura para cabras sadias superovuladas com FSH-p (Baril et al., 1992), porém a porcentagem de ovócitos foi elevada.

Das 61 estruturas coletadas, 51 foram inoculadas em MSC, sendo que das 10 restantes oito apresentaram a ZP rompida e duas foram inovuladas. Foram coletados os fluidos uterinos de dez cabras e como os embriões de sete cabras foram submetidos a lavagem, sete amostras da solução do último banho dos embriões foram inoculados em cultura de MSC.

O CAEV não foi detectado por isolamento viral como também o seu DNA proviral por PCR *Nested* nas amostras de embrião lavado, embrião não lavado e na solução do último banho. Também Bouillant et al. (1981), tentaram isolar o vírus da leucose bovina a partir de embriões e ovócitos oriundos de vacas infectadas, obtendo resultados negativos. Do mesmo modo Hare et al. (1985), cultivaram 12 embriões bovinos com células infectadas com o vírus da leucose bovina e não detectaram efeito negativo no desenvolvimento dos embriões e nenhum embrião foi encontrado portando o patógeno. No entanto, foi demonstrada por RT-PCR a infecção de embriões de vacas infectadas com o vírus da Diarréia Viral Bovina (Tsuboi & Imada, 1998) e Riddell, et al., (1989), ao expor 53 embriões ovinos a *Brucella abortus* - 10⁸CFU/mL, seguida por lavagens dos embriões detectaram quatro embriões portando o patógeno, assim como Gradil et al. (1994) obtiveram resultado positivo com o uso da PCR em embrião infectado *in vitro* e lavado para a detecção do parvovírus suíno, porém não detectaram o vírus em embriões colhidos de porcas com Parvovirose.

A infecção *in vitro* dos embriões, por não ser uma condição natural, pode aumentar a possibilidade de infectividade do embrião, visto que a quantidade do agente utilizado é grande e o ambiente que propicia o encontro entre o agente e o embrião é mais restrito que o trato reprodutivo do animal. Mas há também grande dificuldade de aplicar a técnica de extração de DNA em amostras de embrião devido ao pequeno número de células, sendo que Woodall et al. (1994) desenvolveram uma técnica de extração e PCR utilizando embriões de ovelhas infectadas com o vírus Maedi-Visna (MVV), e embriões controle de ovelhas sadias com adição de 10 a 100 TCID₅₀/embrião do vírus, sendo positivos nos testes apenas os controles, com a sensibilidade da prova de 10 TCID₅₀/embrião.

Das amostras de fluido uterino 37,5% foram positivas ao isolamento viral, apresentando sincício característico (Fig. 6 e 7), o que contrapõe a Wolfe et al. (1987) que não isolaram o lentivírus caprino de doze fluidos uterinos coletados juntamente com os embriões de cabras portadoras de CAE, cultivados em MSC, porém os autores acompanharam a

²⁵ Promega

cultura por apenas duas semanas sem realizar passagens de células, enquanto que no presente experimento realizamos três passagens de células, acompanhando as culturas por 63 dias. No entanto, poucos sincícios foram observados nas amostras inoculadas (um a três), comparado com os controles positivos, o que demonstra que

o vírus presente neste material apresenta pouca capacidade de infectar células de MSC ou seu efeito é pouco expressivo, ou ainda, que exista algum componente do fluido uterino que dificulte a manifestação do vírus em cultura. Duas amostras submetidas ao isolamento foram perdidas por contaminação com fungos.



Figura 6: Sincício (seta) em cultura primária de MSC inoculada com fluido uterino de cabras infectadas naturalmente com o CAEV, coloração cristal violeta 0,1%, aumento 320X

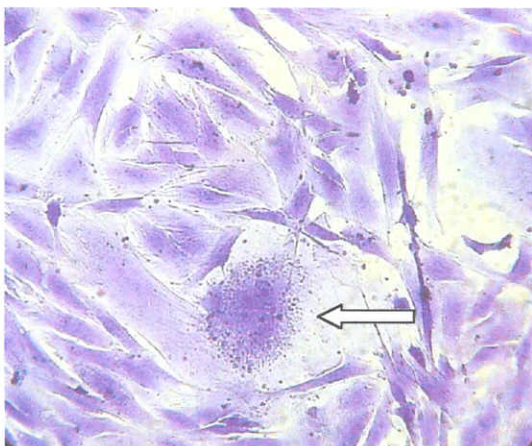


Figura 7: Sincício (seta) de cultura primária de MSC inoculada com fluido uterino de cabras infectadas naturalmente com o CAEV, coloração cristal violeta 0,1%, aumento 200X.

Outros autores isolaram patógenos no trato genital feminino, Bouillant et al. (1981)

tentaram isolar o vírus da leucose bovina a partir fluido uterino de vacas infectadas, obtendo resultados positivos em quatro de 25

amostras. Gradil et al. (1994) obtiveram resultado positivo com o uso da PCR em fluido uterino de porcas portadoras do parvovírus suíno.

A técnica de PCR *Nested* foi capaz de detectar o DNA proviral CAEV em 70% de amostras de fluido uterino, sendo que destas três também foram positivas no isolamento viral (Tab.4). Da

mesma forma, Zanoni et al. (1990) demonstraram que a detecção do DNA proviral do CAEV em cultivo celular, pode ser obtida um dia após inoculação em cultivo celular e que apenas uma célula infectada dentre 10^6 células foi capaz de ser identificada por PCR.

Tabela 4: Resultados das provas de isolamento viral e PCR *Nested* de amostras de 10 cabras infectadas naturalmente com CAEV, para a detecção do DNA proviral.

Cabra	Fluido uterino			Embrião não lavado			Embrião lavado			Último banho		
	n	Isol.	PCR	n	Isol.	PCR	n	Isol.	PCR	n	Isol.	PCR
1	1	+	+	5	-	-	5	-	-	1	-	-
2	1	pp	+	2	pp	-						
3	1	-	+	2	-	-						
4	1	+	+	5	-	-	7	-	-	1	-	-
5	1	pp	-									
6	1	+	+	3	-	-	4	-	-	1	-	-
7	1	-	+	2	-	-	3	-	-	1	-	-
8	1	-	-	2	-	-	2	-	-	1	-	-
9	1	-	-	2	-	-	2	-	-	1	-	-
10	1	-	+	2	-	-	3	-	-	1	-	-
	10	37,5%	70%	25	0	0	26	0	0	7	0	0

Isol. – Isolamento viral em cultura primária de MSC

pp – Parcela perdida

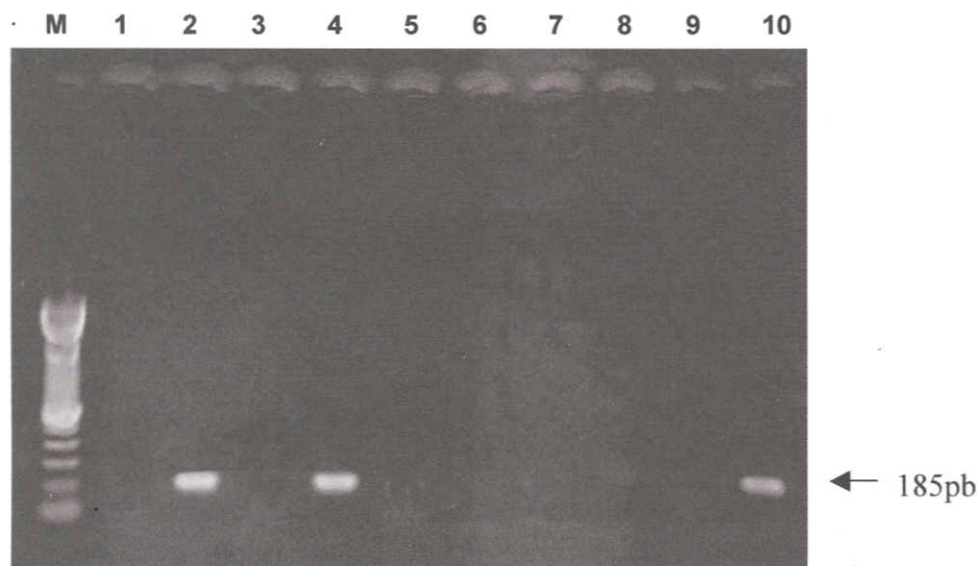


Figura 8: Gel de agarose 1% corado com brometo de etídio. Reação em cadeia da polimerase – PCR *Nested* de amostras de fluido uterino de cabras infectadas com o CAEV, bandas de 185pb. Sendo M – marcador DNA Ladder; 2 e 4 - amostras positivas; 1, 3, 5, 6, 7 e 8 – amostras negativas; 9 – controle negativo; 10 - controle positivo.

A PCR identificou as bandas (Fig. 8) esperadas entre $10^{4.5}$ a $10^{0.5}$ TCDI₅₀/50 μ L em sobrenadante de cultivo celular inoculado, quando utilizou-se os iniciadores externos. Com a realização da segunda etapa - PCR *Nested*, utilizando os iniciadores internos, as bandas esperadas foram obtidas entre $10^{4.5}$ a $10^{-4.5}$ TCDI₅₀/50 μ L.

A especificidade das amplificações foi confirmada pela obtenção dos fragmentos esperados após a restrição enzimática dos produtos amplificados pelo PCR *Nested* das amostras de fluido uterino e o controle positivo.

Laamenen et al. (1997) não observaram diferença entre isolamento viral e o RT-PCR na detecção do vírus da diarreia viral bovina em amostras de sangue. Padrão restritivo de replicação do lentivírus caprino em cultivo celular de plexo coróide de ovino foi observado por Chebloune et al. (1996), sendo que os autores relataram a presença de DNA proviral nos cultivos infectados por CAEV, mas nenhum efeito citopático foi observado e tampouco partículas virais foram encontradas à microscopia eletrônica.

As técnicas de PCR e RT-PCR apresentam vantagens em relação ao isolamento viral por ser técnicas mais rápidas e práticas, além de possibilitar a identificação de vírus inativos ou mortos devido a presença de anticorpos neutralizantes ou aos métodos de armazenamento durante o transporte (Laamanen et al., 1997).

4. CONSIDERAÇÕES FINAIS E PERSPECTIVAS

A ocorrência da CAE em reprodutores e matrizes caprinas de alto valor genético tem sido de grande preocupação para os caprinocultores, visto ser uma enfermidade crônica, incurável, de alta transmissibilidade e que causa grandes perdas econômicas. Desta forma, os criadores têm buscado alternativas seguras para obter o máximo de crias destes animais, antes de sacrificá-los, como a IA e a TE, porém e durante muito tempo permaneceu a dúvida se o sêmen poderia veicular o vírus e se a TE é realmente segura.

A detecção do DNA pró-viral do CAEV em amostras de sêmen utilizando técnicas com alta sensibilidade e especificidade como a PCR *Nested*, demonstra o risco da transmissão do CAEV pela via sexual, o que repercute diretamente nos programas de controle da CAE, tornando-se relevante maior controle nas importações e comercialização de bodes e sêmen caprino.

A injúria testicular em animais infectados com o CAEV demonstrou ser um fator de agrave para a presença do CAEV no sêmen e observou-se que a lavagem do sêmen pode reduzir a presença do vírus, porém não é suficiente para eliminá-los. Em adição a presença maior do CAEV no sêmen integral, torna a monta natural de maior risco de transmissão do CAEV, aliado ao fato do comportamento normal do bode durante a monta representar um risco de transmissão da enfermidade, pois, o macho frente à fêmea em estro bufá e urina com frequência.

Embora o risco de transmissão do CAEV seja maior na monta natural, a IA apresenta grande potencial de disseminação da CAE, pois, amostras de sêmen lavadas e coletadas antes da injúria também acusaram a presença do provírus do CAEV o que demonstra o risco da transmissão mesmo que se utilize sêmen lavado, criopreservado e de um animal que não tenha nenhuma outra enfermidade concomitante à CAE.

Como o lentivírus tem sido relacionado aos leucócitos e não aos espermatozoides, alguns métodos têm sido relatados visando a separação entre os espermatozoides e as demais células presentes no sêmen indicando a possibilidade de se obter material genético livre do vírus a partir de reprodutores infectados. Neste caso o uso do sêmen destes reprodutores na fecundação *in vitro*, surge como uma alternativa e reforça a importância do aprimoramento da FIV na espécie caprina.

A intermitência da presença do CAEV no sêmen sugere que o material genético de excelentes reprodutores de alto valor poderia ser utilizado em IA, desde que uma alíquota de sêmen de cada coleta, seja analisada por PCR *Nested*, que demonstrou ser uma técnica sensível e rápida e com alta especificidade.

Outra alternativa de se obter crias destes reprodutores infectados é utilizá-los para fertilizar matrizes também infectadas em programas de TE, sendo esta técnica considerada segura para obtenção de crias sadias, visto que os resultados alcançados neste experimento quanto ao uso da TE como método de controle da CAE são promissores, indicando sua potencialidade para obtenção de crias negativas procedentes de cabras soropositivas para o lentivírus caprino, desde que seguidas as normas sanitárias da IETS, tornando possível o melhor aproveitamento do potencial genético dos rebanhos caprinos.

A constatação, no presente trabalho, da presença do CAEV no fluido uterino tem grande implicação nos programas de controle visto que, reforça a possibilidade da transmissão materno fetal, ou seja, que as matrizes podem transmitir o CAEV para suas crias durante a prenhez ou no peri-parto e que desta forma, a separação das crias logo após o parto ou mesmo a realização de cesariana e o uso dos métodos de controle restringindo leite e colostro para as crias podem não ser 100% efetivos, o que explicaria a persistência no aparecimento de casos de animais positivos em rebanhos onde foi implantados rigorosos programas de controle da CAE. Além disto, há probabilidade de contaminação de outros animais no momento do parto com as secreções uterinas, caso estas fêmeas não estejam adequadamente isoladas dos demais animais do rebanho.

5. CONCLUSÕES

No caso da TE comprovou-se que a ausência da infectividade dos embriões não se deve a ausência destes patógenos no trato reprodutivo. A constatação da presença do CAEV no fluido uterino reforça a obrigatoriedade da lavagem dos embriões após a colheita como recomenda a IETS. Como o vírus não foi detectado pelas técnicas de isolamento viral e PCR *Nested*, em amostras de embrião lavado e não lavado e nem no meio do último banho dos embriões, nos fornece maior segurança no uso da TE como ferramenta no controle da lentivirose caprina, de forma a aproveitar o alto padrão genético de cabras infectadas e concomitantemente de machos de alto valor genético e também infectados.

Ressaltando-se a necessidade de adoção de técnicas adequadas e assépticas de colheita, manipulação e transferências de embriões, sendo que na manipulação dos embriões a lavagem dos mesmos é de suma importância pois fatores como diluição, lavagem por meios mecânicos com agentes microbianos e tratamento com enzimas, propiciam a eliminação de grande parte dos patógenos. Além disso, a IETS recomenda que os técnicos sigam os procedimentos uniformes para identificação dos embriões e anotações de informações para assegurar que o certificado sanitário corresponde aos embriões apropriados. Desta forma a segurança no uso de embriões demanda obrigações éticas significativas e requer amplo entendimento de várias considerações práticas, no sentido de assegurar o sucesso da técnica sem incorrer em riscos inaceitáveis para a sanidade animal.

Para maior segurança no uso da TE poderiam ser realizadas provas de PCR ou RT-PCR no meio dos últimos banhos de lavagens dos embriões ou mesmo de ovócito e embriões de grau IV ou degenerados.

A despeito das alternativas visando a utilização de reprodutores e matrizes infectadas com o CAEV, devemos ter em mente a necessidade de se obter e manter animais sanitariamente adequados para a reprodução, pois a forma mais segura econômica de se ter certeza que o sêmen e embrião são isentos de determinados patógenos é que o reprodutor e a matriz sejam isentos destes.

- A técnica de PCR *Nested* para a detecção do DNA proviral do CAEV em amostras de sêmen e embrião demonstrou-se efetiva com sensibilidade satisfatória.
- A detecção do DNA pró-viral do CAEV no sêmen é de relevante importância para os programas de controle da CAE, considerando-se o risco de transmissão através de reprodutores infectados, sejam estes utilizados em monta natural ou em IA.
- Embora o risco de transmissão do CAEV seja maior na monta natural, a IA apresenta, também, potencial de disseminação da enfermidade, visto que o vírus está presente no sêmen lavado e criopreservado o que requer grande atenção na comercialização e importação de sêmen. E como se observou a intermitência da presença do CAEV em diferentes coletas, sugere-se que cada partida de sêmen deva ser avaliada por testes sensíveis e rápidos como a PCR *Nested*.
- Devido à constatação da injúria testicular como um fator de agrave para a presença do CAEV no sêmen, destacamos a importância do exame andrológico dos reprodutores, principalmente considerando que a CAE é uma enfermidade que pode ser assintomática e apresentar longo período de incubação.
- A presença do CAEV no fluido uterino tem grande implicação nos programas de controle visto que a transmissão materno fetal é possível, além de reforçar a necessidade da lavagem dos embriões após a colheita como recomenda a IETS nos programas de TE.
- A ausência do CAEV nos embriões e no meio de lavagem e a obtenção de crias negativas procedentes de cabras

soropositivas para o lentivírus caprino, indica a potencialidade da TE como ferramenta no controle da lentivirose caprina, de forma a aproveitar o alto padrão genético de cabras infectadas e, concomitantemente, de machos de alto valor genético e também infectados.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ADAMS, D.S., KLEVJER-ANDERSON, P.R., CARLSON, J. L. et al. Transmission and control of caprine arthritis-encephalitis virus. *Am. J. Vet. Res.*, v.44, n.9, p.1670-1675, 1983.
- ADAMS, D.S., OLIVER, R.E., AMEGHINO, E., et al. Global survey of serological evidence of caprine arthritis-encephalitis virus infection. *Vet. Rec.*, v. 115, p. 493-495, 1984.
- ADAMS, D.S., CRAWFORD, T. B. LVC- a viral arthritis encephalitis syndrome in goats. *Internat. Goat Sheep Res.*, v.1, n.2, p.168-172, 1980.
- AFSHAR, A., EAGLESOME, M.D. Viruses associated with bovine semen. *Vet. Bull.*, v.60, p.93-109, 1990.
- AL-ANI, F. K., VESTWEBER, J. G. E. Caprine arthritis-encephalitis syndrome (CAE): a review. *Vet. Res. Commun.*, v. 8, n. 4, p.53, 1984.
- ALEXANDER, N.J. Sexual transmission of human immunodeficiency virus: virus entry into the male and female genital tract. *Fertil. Steril.*, v.54, p.1-18, 1990.
- ALI, O.A. Caprine arthritis-encephalitis related changes in the uterus of goat. *Vet. Rec.*, v.121, n.6, p.131-132, 1987.
- ALVES, F.S.F, PINHEIRO, R. R. Presença da Artrite Encefalite Caprina a Vírus (CAEV) no Estado do Maranhão. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE MEDICINA VETERINÁRIA, 25, 1997, Gramado-RS. *Anais... Gramado: 1997, MVP 008.*
- ANDRADE, J. S., ANDRIOLI A., YORINORI, E.H et al. Semi-transcervical: uma opção para colheita de embriões em caprinos. *Arq. Fac. Vet. UFRGS*, v.28, n.1, p.206, 2000.
- ANDRIOLI, A., GOUVEIA, A.M.G., PINHEIRO, R.R. et al. Detecção do DNA pró-viral do lentivírus caprino em sêmen de bodes naturalmente infectados. *Rev. Bras. Reprod. Anim.*, v.23, n.3, p.420-421, 1999.
- ANDRIOLI, A., GOUVEIA, A.M.G., ANDRADE, J.S. et al. Isolamento do lentivírus caprino em estruturas embrionárias e solução de lavagem uterina : resultados preliminares. *Arq. Fac. Vet. UFRGS*, v.28, n.1, p.208, 2000.
- ANDRIOLI-PINHEIRO, A. Métodos de colheita e de inovulação de embriões caprinos (*Capra hircus*, LINNAEUS, 1758) e os efeitos de repetidas colheitas na vida reprodutiva de doadoras. São Paulo: Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, 1993. 100p. Dissertação (Mestrado em Reprodução Animal).
- ANDRIOLI-PINHEIRO, A., SALLES, H.O., PINHEIRO, R.R. et al. Controle da artrite encefalite caprina a vírus (CAEV) através da transferência de embriões (TE). In: CONGRESSO PANAMERICANO DE CIÊNCIAS VETERINÁRIAS, 15, 1996, Campo Grande. *Anais. Campo Grande: Sociedade Matogrossense do Sul de Medicina Veterinária, 1996. p. 391.*
- ASSIS, A.P.M., GOUVEIA, A.M.G. Evidência sorológica de lentivírus (Maedi Visna / Artrite Encefalite Caprina) em rebanhos nos estados de Minas Gerais, Rio de Janeiro, Bahia, Ceará. In CONGRESSO BRASILEIRO DE MEDICINA VETERINÁRIA, 23, 1994, Recife. *Anais...Recife, 1994. p.104. Resumo.*
- ASSO, J. Le CAEV est-il transmissible par le sperme de bouc? *La Chèvre*, v.173, p. 18, 1989.

- BACCETTI, B., BENEDETTO, A., BURRINI, A.G. et al. HIV-particles in spermatozoa of patients with AIDS and their transfer into the oocyte. *J Cell Biol*, v.127, p.903-914, 1994.
- BANE, D.P., JAMES, J.E., GRADIL, C.M. et al. *In vitro* exposure of preimplantation porcine embryos to porcine parvovirus. *Theriogenology*, v.33, p.553-561, 1990.
- BARIL, G., REMY, B., LEBOEUF, B. et al. Comparison of porcine FSH, caprine FSH and ovine FSH to induce repeated superovulation in goats. In: SCIENTIFIC MEETING OF EUROPEAN EMBRYO TRANSFER ASSOCIATION, 8, 1992, France. Anais...France, 1992, p.126, abstract.
- BARLOUGH, J., EAST, N., ROWE, J.D. et al. Double-nested polymerase chain reaction for detection of caprine arthritis-encephalitis virus proviral DNA in blood, milk, and tissues of infected goats. *Journal of virology methods*, v.50, p.101-114, 1994.
- BELÁK, S., BALLAGI-PORDÁNY, A. Application of the polymerase chain reaction (PCR) in veterinary diagnostic virology. *Vet. Research Comm.*, v.17, n.1, p.55-72, 1993.
- BIELANSKI, A., DUBUC, C., HARE, W.C.D. et al. Inactivation of bovine herpesvirus-1 and bovine virus diarrhoea virus in association with preim-plantation bovine embryos using photosensitive agents. *Theriogenology*, v.38 p.663 -664, 1992.
- BIELANSKI, A., DUBUC, C., HARE, W.C.D. Failure to remove bovine diarrhoea virus (BVDV) from bull semen by swim-up and other separatory sperm techniques associated with *in vitro* fertilization. *Reprod. Dom. Anim.*, v.27, p.303-306, 1992.
- BIELANSKI, A., HARE, W.C.D. Investigation of some antimicrobial procedures on the *in vitro* development of early murine embryos aimed towards developing methods for the disinfection of mammalian embryos prior to transfer. *J. In vitro Fert. Emb. Trans.*, v.8, p.24-32, 1991.
- BOLETIM DE DEFESA SANITÁRIA. Brasília: Ministério da Agricultura e do Abastecimento - Secretaria Nacional de Defesa Sanitária Animal - SDSA, v.14 - 27, 1980 - 1994.
- BOOTH, P.J., STEVENS, D.A., COLLINS, M.E. et al. Detection of bovine viral diarrhoea virus antigen and RNA in oviduct and granulosa cells of persistently infected cattle. *J. Reprod. Fert.*, v.105, p.17-24, 1995.
- BOUILLANT, A.M.P., RUCKERBAUER, G.M., EAGLESOME, M.D. et al. Attempts to isolate bovine leukemia and bovine syncytial viruses from blood, uterine flush fluid, unfertilized ova and embryos from infected donor cattle. *Ann. Rech. Vet.*, v.12, n.4, p.385-395, 1981.
- BOWEN, R. A, HOWARD, T. H. , ELSDEN, R. P. et al. Embryo transfer from cattle injected with bluetongue virus. *Am. J. Vet. Res.*, v. 44, n. 9, p.1625-27, 1983.
- BOWEN, R.A. Expression of virus-like particles in feline preimplantation embryos. *J. Nail. Cancer Inst.*, v.65, p.1317-1320, 1980.
- BOWEN, R.A., ELSDEN, R.P., SEIDEL, G.E. Infection of early bovine embryos with bovine herpesvirus-1. *Am. J. Vet. Res.* v.46, p.1095-1097, 1985.
- BOWEN, R.W., HOWARD, T.H., PICKETT, B.W. Interaction of bluetongue virus with preimplantation embryos from mice and cattle. *Am. J. Vet. Res.* v.43, p.1907-1911, 1982.
- BRODIE, S., PEARSON, L., ZINK, M., et al. Ovine lentivirus expression and disease. Virus replication, but not entry, is restricted to macrophages of specific tissues. *Am. J. Pathol.*, v.146, p.250-263, 1995.
- BRUGERE-PICOUX, J. The caprine arthritis encephalitis complex. *Rec. Méd. Vét.*, v.160, n. 4, p. 319-327, 1984.

- CALARCO, P.G., SZOLLOSI, D. Intracisternal A particles in ova and preimplantation stages of the mouse. *Nature*, v.243, p.91-93, 1973.
- CARTHEW, P., WOOD, M.J., KIRBY, C. Pathogenicity of mouse hepatitis virus for preimplantation mouse embryos. *J. Reprod. Fert.*, v.73, p.207-213, 1985.
- CASTRO, R.S., LEITE, R.C., ABREU, J.J. Prevalence of antibodies to selected viruses in bovine embryo donors and recipients from Brazil, and its implications in international embryo trade. *Trop. Anim. Health Prod.*, v.24, p.173-176, 1992.
- CHEBLOUNE, Y., SHEFFER, D., KARR, B.M. et al. Restrictive type of replication of ovine caprine lentivirus in ovine fibroblast cell culture. *Virology*, v.222, p.21-30, 1996.
- CHEEVERS, W. P., KNOWLES, D. P., MCGUIRE, T. C. et al. Chronic disease in goats orally infected with two isolates of the caprine arthritis encephalitis lentivirus. *Lab. Inv.*, v. 58, n. 5, p. 510-517, 1988.
- CHEEVERS, W.P., MCGUIRE, T.C. The lentiviruses: Maedi/Visna, caprine arthritis-encephalitis, and equine infectious anemia. *Adv. Virus Res.*, v.34, p.189, 1988.
- CHEMINEAU, P., PROCUREUR, R., COGNIE, Y. et al. Production, freezing and transfer of embryos from a bluetongue infected goat herd without bluetongue transmission. *Theriogenology*, v.26, n.3, p. 279-290, 1986.
- CLAVIJO, A., THORSEN, J. Application of polymerase chain reaction for the diagnosis of caprine arthritis-encephalitis. *Small Rumin. Res.*, v.22, p.69-77, 1996.
- CLEMENTS, J.E., NARAYAN, O., CORK, L.C. Biochemical characterization of the virus causing leucoencephalitis and arthritis in goats. *J. Gen. Virol.*, v. 50, p. 423-427, 1980.
- CLEMENTS, J.E., ZINK, M.C. Molecular biology and pathogenesis of animal lentivirus infections. *Clinic. Microbiol. Rev.*, v.9, n.1, p. 100-117, 1996.
- COFFIN, J.M. Retroviridae and the replication. In: FIELDS, M. D. & KNIPE, D.M. *Fields Virology*. 3rd ed. New York: Raven Press, 1996. p. 1910-1976.
- CONCHA-BERMEJILLO, A, MAGNUS-CORRAL, S., BRODIE, S.J. et al. Vemeral shedding of ovine lentivirus in infected rams. *Am. J. Vet. Res.*, v.57, p.684-688, 1996.
- CORK, L.C., HADLOW, W.J., CRAWFORD, T.B. et al. Infectious leucoencephalomyelitis of young goats. *J. Infec. Dis.*, v. 129, p. 134-141, 1974.
- CRAWFORD, T. B., ADAMS, D. S., CHEEVERS, W. P. et al. Chronic arthritis in goats caused by a retrovirus. *Science*, v.207, p.997-999, 1980.
- DARCELL, C. LeQ., COULTER, G.H. IBR Neutralizing substance in bull seminal fluid and its removal prior to attempts at virus isolation from semen. *Can. Vet. J.*, v.17, p.318-320, 1976.
- DAWSON, M. Lentivirus disease of domesticated animals. *J. Comp. Pathol.*, v.99, p.401-419, 1988.
- DAWSON, M., WILESMITH J. W. Serological survey of lentivirus (Maedi-visna \ caprine arthritis-encephalitis) infection in British goat herds. *Vet. Rec.*, v. 117, n. 4, p. 86-9, 1985.
- DEAN, A. G., DEAN, J. A., BURTON, A. H., DICKER, R. C. *Epi info, version 6: a word processing, database and statistic program for epidemiology on micro-computers*. Atlanta, Georgia, Center for Disease Control, 1992. 302p.
- DEL CAMPO, M.R., TAMAYO, R., DEL CAMPO, C.H. Embryo transfer from brucellosis-positive donors: a field trial. *Theriogenology*, v.27, n.1, p221, 1987.
- DIGIACOMO, R. F., MCGINNIS, L. K., STUDER, E. et al. Failure of embryo

- transfer to transmit BLV in a dairy herd. *Vet. Rec.*, v. 127, n.18, p.496, 1990.
- DOOLITTLE, R.F., FENG, D.F., JOHNSON, M.S. et al. Origins and evolutionary relationships of retroviruses. *Quart. Rev. Biol.*, v.64, p.1-30, 1989.
- EAGLESOME, M.D., HARĚ, W.C.D., SINGH, E.L. Embryo transfer: A discussion on its potential for infectious disease control based on a review of studies on infection of gametes and early embryos by various agents. *Can. Vet. J.*, v.21, p.106-112, 1980.
- EAST, N.E., ROWE, J.D., DAHLBERG, J.E. et al. Modes of transmission of caprine arthritis-encephalitis virus infection. *Small Rumin. Res.*, v.10, p.251-262, 1993.
- EAST, N.E., ROWE, J.D., MADEWELL, B.R. et al. Serologic prevalence of caprine arthritis-encephalitis virus in California goat dairies. *J.Am. Vet. Med. Ass.*, v.190, n. 2, p. 182-186, 1987.
- ECHTERNKAMP, S.E., KAPPES, S.M., MAURER, R.R. Exposure of bovine embryos to trypsin during washing does not decrease embryonic survival. *Theriogenology*, v.32, p.131-137, 1989.
- ELLIS, T.M., CARMAN, H., ROBINSON, W. F. et al. The effect of colostrum-derived antibody on neo-natal transmission of caprine arthritis-encephalitis virus infection. *Australian Vet. J.*, v.63, n.8, p.242-245, 1986.
- ELLIS, T.M., ROBINSON, W., WILCOX, G. Effect of colostrum deprivation of goat kids on the natural transmission of caprine retrovirus infection. *Aust. Vet. J.*, v.60, p.326-329, 1983.
- ELLIS, T.M., ROBINSON, W., WILCOX, G. The pathology and aetiology of lung lesions in goats infected with caprine arthritis-encephalitis virus. *Aust. Vet. J.*, v.65, n.3, p.69-73, 1988.
- EMBRAPA *Relatório de Consultoria - Programa de Controle da Artrite Encefalite Caprina a Virus (PCAEV)* (subprojeto N° 06.0.94.102-01). Centro Nacional de Pesquisa de Caprinos. 1994, 125p.
- EMBRAPA *Relatório de Consultoria - Programa de Controle da Artrite Encefalite Caprina a Virus (PCAEV-II)* (subprojeto N° 06.0.94.102-01). Centro Nacional de Pesquisa de Caprinos. 1996, 110p.
- FITERMAN I. R. Constatação do complexo artrite-encefalite em um plantel de caprinos no estado da Bahia. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE MED. VETERINÁRIA, 21, Salvador-BA. *Anais...* Salvador: 1988. p. 33.
- FOOTE, W.C., CLARK, W., MACIULIS, A. et al. Prevention of scrapie transmission in sheep using embryo transfer. *Am. J. Vet. Res.*, v.54, p.1863-1868, 1993.
- FOSTER, J.D., HUNTER, N., WILLIAMS, A. et al. Observations on the transmission of scrapie in experiments using embryo transfer. *Vet. Rec.*, v.138, p.559-562, 1996.
- FOSTER, J.D., MCKELVEY, W.A.C., MYLNE, M.J.A. et al. Studies on maternal transmission of scrapie in sheep by embryo transfer. *Vet. Rec.*, v. 130, p.341-343, 1992.
- FOSTER, N.M., ALDERS, M.A., LUEDKE, A.J. et al. Abnormalities and virus-like particles in spermatozoa from bulls latently infected with bluetongue virus. *Am. J. Vet. Res.*, v.41, p.1045-1048, 1980.
- GARCIA, M., GALHARDO, M., ARAÚJO, W.P. et al. Caprine arthritis-encephalitis (CAE). Occurrence of positive sera in goats raised in Brazil. *Trop. An. Health Prod.*, v.24, p.164, 1992.
- GARNER, M.G., LACK, M.B. Modelling the potential impact of exotic diseases on regional Australia. *Aust. Vet. J.*, v.72, p.81-87, 1995.
- GILBERT, R.O., COUBROUGH, R.J., WEISS, K.E. The transmission of bluetongue virus by embryo transfer in sheep.

- Theriogenology*, v.27, n.3, p.527-540, 1987.
- GONDA, M. A. Molecular biology and virus-host interactions of lentiviruses. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, v. 724, p.22-42, 1994.
- GONZALES, L., GELABERT, J.L., MARCO, J.C. et al. Caprine arthritis-encephalitis in the Basque country, Spain. *Vet. Res.*, v. 120, n. 5, p. 102-109, 1987.
- GOUVEIA, A.M.G., COURA, M.A., BRANDÃO, H.M. et al. Distribuição sorológica do lentivírus caprino em amostragem por demanda. In: ENCONTRO DE PESQUISA DA ESCOLA DE VETERINÁRIA - UFMG, 16, Belo Horizonte. *Anais...* Belo Horizonte: UFMG, 1998. p. 116. Resumo.
- GRADIL, C.M., HARDING, D.V.M., LEWIS K. Use of polymerase chain reaction to detect porcine parvovirus associated with swine embryos. *Am. J. Vet. Res.*, v.55, n.3, p.344-347, 1994.
- GREENWOOD, P.L. Effects of caprine arthritis-encephalitis virus on productivity and health of dairy goats in New South Wales, Australia. *Prev. Vet. Med.*, n. 22, v. 1-2, p. 71-87, 1995.
- GUEDES, M.I.M.C. Infecção experimental pelo vírus da artrite encefalite caprina em cabritos de nove a vinte e sete dias de idade. Belo Horizonte: UFMG - Escola Veterinária, 1999. 59p. Dissertação (Mestrado).
- GUÉRIN, B., CHAFFAUX, S., ALLIETTA, M. et al. IVF and IV culture os bovine embryos using semen from a bull persistently infected with BVD. *Theriogenology*, v.31, p.217, 1992.
- GWATKIN, R.B.L., AUERBACH, S. Synthesis of a ribonucleic acid virus by the mammalian ovum. *Nature*, v.209, p.993-994, 1966.
- HAASE, A.T. Pathogenesis of lentivirus infections. *Nature*, v.322, n. 10, p.130-136, 1986.
- HANSEN, H. Regulatory concerns regarding risk management in embryo transfer. *Bull. Office Int. Epizooties*, v.104, p.42, 1992.
- HANSEN, P. J. Interactions between the immune system and the bovine conceptus. *Theriogenology*, v. 47, p. 121-130, 1997.
- HARE, W. C. D. , LUEDRE, A. J., THOMAS, F. C. et al. Nontransmission of bluetongue virus by embryos from blyuetongue virus-infected sheep. *Vet. Bull.*, v. 58, n.9, p. 695, 1988.
- HARE, W.C.D. Enfermedades transmissibles por el semen y las tecnicas de transferencia de embriones. France: Office International des Epizooties, 1985. 83p. (serie técnica nº4).
- HARE, W.C.D., MITCHELL, D., SINGH, E.L. et al. Embryo transfer in relation to bovine leukemia virus (BLV) control and eradication. *Can. Vet.J.*, v.26, p.231-234, 1985.
- HARMACHE, A., BOUYAC, M., AUDOLY, G., et al. The *vif* gene is essential for efficient replication of caprine arthritis encephalitis virus in goat synovial membrane cells and affects the late steps of the virus replication cycle. *J. Virol.*, v.69, p.3247-3257, 1995.
- HEGGIE, A.D., GADDIS, L. Effects of viral exposure of the two-cell mouse embryo on cleavage and blastocyst formation *in vitro*. *Pediat. Res.*, v.3, p.937-941, 1979.
- HIGUCHI, R. Rapid, efficient DNA extraction for PCR from cells or blood. *Amplificarions*, v.1, p.1-3, 1989.
- HÖTZEL, I., BASTOS, E.S., RAVAZZOLO, A.P. et al. Caprine arthritis-encephalitis virus: isolation and identification in Rio Grande do Sul, Brazil. *Braz. J. Med. Biol. Res.*, v.23, p.1175-1179, 1993.
- HUSO, D.L., NARAYAN, O. HART, G.W. Sialic acids on the surface of caprine arthritis-encephalitis virus define the biological properties of the virus. *J. Virol.*, v. 62, p.1974-1980, 1988.

- IMAGAWA, D.T., LEE, M.H., WOLINSKY, S.M. et al. Human immunodeficiency virus type I infection in homosexual men who remain seronegative for prolonged periods. *New Engl. J. Med.*, v.320, p.1458-1462, 1989.
- ISHWAR, A K., MEMON, M.A, Embryo transfer in sheep and goat: a review. *Small Rum.Res.*, v.19, p.35-43, 1996.
- JOAG, S. V., STEPHENS, E. B., NARAYAN, O. Lentiviruses. In: FIELDS, M. D. & KNIPE, D.M. *Fields Virology*. 3^a ed. New York: Raven Press, 1996. p. 1977-1996.
- JORDAN, H. L., LIANG, Y., HUDSON, L.C. et al. Shedding of feline immunodeficiency virus in semen of domestic cats during acute infection. *Amer. J. Vet. Res.*, v.60, n.2, p.211-215, 1999.
- JORDAN, H.L., HOWARD, J., TOMPKINS, W.A. et al. Detection of Feline immunodeficiency virus in semen from seropositive domestic cats (*Felis catus*). *J. Virol.*, v.69, n.11, 1995.
- KAHRS, R.F., JOHNSON, M.E., BENDER, G.M. Studies on the detection of infections Bovine Rhinotracheitis Virus in bovine semen. *Proc. Amer. Assoc. Vet. Laboratory Diagnosticians*, v.20, p.187-208, 1977.
- KAHRS, R.F., GIBBS, E.P.J., LARSEN, R.E. The search for viruses in bovine semen, a review. *Theriogenology*, v.14, p.151-165, 1980.
- KALTER, S.S., HEBERLING, R.L., SMITH, G.C. et al. Vertical transmission of C-type viruses: Their presence in balloon follicular oocytes and tubal ova. *J. Natl. Cancer Inst.*, v.54, p.1173-1176, 1974.
- KNOWLES, D.P. Laboratory diagnostic tests for Retrovirus infections of small ruminants. *Vet. Clin. North Am.: Food Anim. Pract.*, v. 13, p.1-11, 1997.
- KRIEG, A., PETERHANS, E. Caprine arthritis-encephalitis in Switzerland: epidemiologic and clinical studies. *Schweiz Arch Tierheilkd*, v.132, p.345-352, 1990.
- LAAMANEN, U.I., NEUVONEN, E.P., YLIVTUHKOLA, E.M. et al. Comparison of RT-PCR assay and virus isolation in cell cultures for the detection of bovine viral diarrhoea virus (BVDV) in field samples. *Res. Vet. Sci.*, v.63, n.3, p.199-203, 1997.
- LAMARA, A., FIENE, F., CHEBLOUNE, T. et al. *In vitro* susceptibility of goat granulosa cells to caprine arthritis encephalitis virus: preliminary results. *Theriogenology*, v.53, n.1, p. 320, 2000.
- LARSSON, E., NILSSON, B.O., SUNDSTROM, P. et al. Morphological and microbiological signs of endogenous C-virus in human oocytes. *Int. J. Cancer*, v.28, n.551-558, 1981.
- LERONDELLE, C., FLEURY, C., VIALARD, J. La glande mammaire: organe cible de l'infection par le virus de l'arthrite et de encéphalite caprine. *Ann. Rech. Vet.*, v.20, p.57-64, 1989.
- LERONDELLE, C., GREENLAND, T., JANE, M. et al. Infection of lactating goats by mammary instillation of cell-borne caprine arthritis-encephalitis virus. *J. Dairy Sci.*, v.78, p.850-855, 1995.
- LOUSSERT-AJAKA, I., MANDELBROT, L., DELMAS, M.C. et al. HIV-1 detection in cervicovaginal secretions during pregnancy. *AIDS*, v.11, n.3, p.1575-1581, 1997.
- LUGARO, G., CAMPAGNARI, F., MORETTI, R. et al. Inhibition of DNA transcription to RNA by seminal plasma peptides. *Biochimica et Biophysica Acta*, v. 950, p.420-428, 1988.
- MAAR, T.W., BLUMER, E.S., SHERMAN, D.M. Failure of horizontal transmission of caprine arthritis encephalitis virus to non-dairy breeds of goats. *Small Rum. Research*, v.17, p.197-198, 1995.
- MERMIN, J. H., HOLODNIITY, M., KATZENSTEIN, D.A. et al. Detection of human immunodeficiency virus DNA and RNA in semen by the polymerase chain reaction. *The Journal of Infectious Diseases*, v.164, p.769-772, 1991.

- MOOJEN, V., SOARES, H.C., RAVAZZOLO, A.P. et al. Evidência de infecção pelo lentivirus (maedi-visna/artrite encefalite caprina) em caprinos no Rio Grande do Sul, Brasil. *Arq. Fac. Med. Vet. UFRGS*, v. 14, p.77-78, 1986.
- NARAYAN, O., CLEMENTS, J.E. Biology and pathogenesis of lentiviruses: review article. *J. Gen. Virol.*, v. 70, p. 1617-1639, 1989.
- NARAYAN, O., CORK, L.C. Lentiviral diseases of sheep and goats: chronic pneumonia leukoencephalomyelitis and arthritis. *Rev. Infect. Dis.*, v.7, p. 89-98, 1985.
- NARAYAN, O., KENNEDY-STOSKOPF, S., SHEFFER, D. et al. Activation of caprine arthritis-encephalitis virus expression during maturation of monocytes to macrophages. *Infection and Immunity*, v. 41, p. 67-73, 1983.
- NARAYAN, O., JOAG, S.V., CHEBLOUNE, Y. et al. *Visna-Maedi*: the prototype lentiviral disease. In: *Viral Pathogenesis*. Nathanson, N. (Coord). p.657-668, 1997. Lippincott-Raven Publishers, Philadelphia.
- NASH, J.W., HANSON, L.A., COATS, K.S.T.C. Bovine immunodeficiency virus in stud bull semen. *Am. J. Vet. Res.*, v.56, p.760-763, 1995a.
- NASH, J.W., HANSON, L.A., COATS, K.S.T.C. Detection of Bovine immunodeficiency virus in blood and milk-derived leukocytes by use of polymerase chain reaction. *Am. J. Vet. Res.*, v.56, p.445-449, 1995b.
- NEWTON, G. R., OTT, T. L., WOLDESENBET, S. et al. Biochemical and immunological properties of related small ruminant trophoblast interferons. *Theriogenology*, v. 46, p. 703-716, 1996.
- NORMAN, S., SMITH, M.C. Caprine arthritis-encephalitis review of the neurologic form in 30 cases. *J. Am. Vet. Med. Ass.*, v.182, n. 12, p.1342-1345, 1983.
- PASICK, J. Maedi-Visna virus and Caprine Arthritis-Encephalitis Virus: Distinct species or quasispecies and its implications for laboratory diagnosis. *Can. J. Vet. Res.*, v. 62, p. 241-244, 1998.
- PÉRETZ, G., BUGNARD, F., CALAVAS, D. Study of a prevention programme for caprine arthritis-encephalitis. *Vet. Res.*, v. 25, p. 322-326, 1994.
- PETURSSON, G., ANDRÉSDÓTTIR, Ó.S., ANDRÉSSON, G. et al. Lentivirus disease of sheep and goats: Maedi-Visna and Caprine Arthritis-Encephalitis. In: *Progress in Sheep and Goat Research*. Keldur: A.W. Speedy, 1992. p. 107-129.
- PHILLIPS, R.M., CARNAHAN, D.L., RADEMACHER, D.J. Virus isolation from semen of bulls serologically positive for bluetongue. *Am. J. Vet. Res.*, v.47, p.84-95, 1986.
- PHILPOTT, M. The dangers of disease transmission by artificial insemination and embryo transfer. *Br. Vet. J.*, v.149, p.339-369, 1993.
- PINHEIRO, R. R., ALVES, F. S. F., GIRÃO, E. S. et al. Presença da Artrite-Encefalite Caprina a Vírus (CAEV), em Teresina-Piauí. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE MEDICINA VETERINÁRIA, 24, 1996, Goiânia-GO. *Anais...* Goiânia: 1996. p.161. Resumo.
- PINHEIRO, R. R., EGITO, A. S., SANTA ROSA, J. et al. *Artrite Encefalite Caprina Viral (CAEV)*. Sobral- CE, EMBRAPA-CNPC, 1989, 5p. (EMBRAPA-CNPC. Comunicado Técnico, 19).
- PINHEIRO R.R., GOUVEIA, A.M.G., ALVES, F.S.F. Prevalência da infecção pelo vírus da artrite encefalite caprina no Estado do Ceará-Brasil. *Ciência Rural*, v.31, n.3 p. , 2001.
- PINHEIRO, R.R., GOUVEIA, A.M.G., ANDRIOLI, A. Prevalência da Artrite Encefalite Caprina em reprodutores caprinos nas principais regiões leiteiras do Estado do Ceará. *Rev. Bras. Repr. Animal*. v. 23, n.3, p. 421-423, 1999.

- PIZZO, P.A. Pediatric AIDS: problems within problems. *J.Infect. Dis.*, v.161, p.316-325, 1990.
- POLITCH, J.A., MAYER, K.H., ABBOTT, A.F. et al. The effect of disease progression and zidovudine therapy on semen quality in human immunodeficiency virus type 1 seropositive men. *Fertil. Steril.*, v. 61, p.922-928, 1994.
- QUAYLE, A.J., XU, C., MAYER, K.H. et al. T lymphocytes and macrophages, but not motile spermatozoa, are a significant source of human immunodeficiency virus in semen. *J.Infect. Dis.*, v.176, p.960-968, 1997.
- RAMOS, O. de S., SILVA, A.C. dos S., MONTENEGRO, A.J.D. et al. Anticorpos para o vírus da artrite encefálica no município de Castanhal-Pará. *Bol. PCAP*, Belém, v. 25, p. 107-111, jan/jun, 1996.
- REDDY, P.G., SAPP, W.J., HENEINE, W. Detection of caprine arthritis-encephalitis virus by polymerase chain reaction. *J. Clin Microb.*, v.31, n.11, p.3042-3043, 1993.
- RIDDELL, M.G., STRINGFELLOW, D.A., WOLFE, D.F. et al. *In vitro* exposure of ovine ova to *Brucella abortus*. *Theriogenology*, v.31, p.895-901, 1989.
- RIMSTAD, E. EAST, N.E., TORTEN, M. et al. Delayed seroconversion following naturally acquired caprine arthritis-encephalitis virus infection in goats. *American Journal Veterinary Research*, v.54, n.11, p.1858-1862, 1993.
- RIMSTAD, E., EAST, N., DeROCK, E., HIGGINS, J. et al. Detection of antibodies to caprine arthritis-encephalitis virus using recombinant gag proteins. *Arch. Virol.*, v.134, p.345-356, 1994.
- ROBERSON, S.M., McGUIRE, T.C., KLEVJER-ANDERSON, P. et al. Caprine arthritis-encephalitis virus is distinct from visna and progressive pneumonia viruses as measured by genome sequence homology. *J. Virol.*, v. 44, n. 2, p. 755-758, 1982.
- ROCHA, M.A. Desenvolvimento de um sistema de PCR *Nested* para a detecção do Herpesvírus Bovino-1 em sêmen e feto abortado. Belo Horizonte: UFMG - Escola Veterinária, 1998. 94p. Tese (Doutorado).
- ROCHA, M.A., GOUVEIA, A.M.G., LEITE, R.C. La técnica del cultivo celular em microplacas en el aislamiento del virus herpes tipo 1 en semen bovino. *Avances en Ciencias Veterinarias*, v.10, n.2, p.134-135, 1995.
- ROSATI, S., PITTAU, M., TOLARI, F. et al. Genetic and antigenic characterization of CAEV (caprine arthritis-encephalitis virus) recombinant transmembrane protein. *Vet. Microbiol.*, v. 45, v. 4, p. 363-370, 1995.
- ROSENBERG, Z.F., FAUCI, A.S. Immunology of HIV infection. In: PAUL, W.E. *Fundamental Immunology*. 3.ed. New York: Raven Press, 1993. p.1375-1397.
- ROWE, J.D., EAST, N.E. Risk factors for transmission and methods for control of Caprine Arthritis-Encephalitis Virus infection. *Vet. Clin. North Am.: Food Anim. Pract.*, v.13, n.1, p.35-53, 1997.
- ROWE, J.D., EAST, N.E., THURMOND, M.C. et al. Risk factors associated with caprine arthritis encephalitis virus infection in goats on California dairies. *Am. J. Vet. Res.*, v. 52, p. 510-514, 1991.
- ROWE, J.D., EAST, N.E., THURMOND, M.C. Cohort study of natural transmission and two methods for control of caprine arthritis-encephalitis virus infection in goats on a California dairy. *Am. J. Vet. Res.*, v.53, n.12, p.2386-2395, 1992.
- RUSSO, P. Isolation of a virus in an outbreak of polyarthritis in goat. Preliminary serological survey. *Bulletin de l'Academie Veterinaire de France*, v.56, n.1 p.31-38, 1983.
- RUSSO, P., VITU, C., BOURGOGNE, A. et al. Caprine arthritis-encephalitis virus: detection of proviral DNA in lactoserum cells. *Vet. Rec.*, v. 140, n.18, p.483-484, 1997.

- SALLES, H.O., ANDRIOLI, A., SOARES, A.T. et al. Utilização da semi-laparoscopia na transferência de embriões em caprinos. *Arq. Fac. Vet.*, v.24, p.215, 1996.
- SALTARELLI, M., QUERAT, G., KONINGS, D.A.M. et al. Nucleotide sequence and transcription analysis of molecular clones of CAEV which generate infectious virus. *Virology*, v.179, p. 347-364, 1990.
- SANTURGE, G., DA SILVA, N., VILLARES, R. et al. Rapid and high sensitivity test for direct detection of bovine herpesvirus-1 genome in clinical samples. *Vet Microb.*, v.49, n.1-2, p.81-92, 1996.
- SARAIVA NETO, A. O., BIRGEL, E. H., CASTRO, R. S. AEC: Soroprevalência em Pernambuco. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE MED. VETERINÁRIA, 23, Recife-PE. *Anais...* Recife, 1994. p. 100.
- SEAMARK, R.F., HADJISAVAS, M., ROBERTSON, S.A. Influence of immune system on reproductive function. *An. Reprod. Scie.*, v.28, p.171-178, 1992.
- SEMPRINE, A. E., LEVI-SETTI, P., BOZZO, M. et al. Insemination of HIV-negative women with processed semen of HIV-positive partners. *Lancet*, v.340, p.1317-1319, 1992.
- SIGURDSSON, B. Maedi, a slow progressive pneumonia of sheep: an epizootiological and pathological study. *Br. Vet. J.*, v.110, p.225-270, 1954.
- SILVA, D.N. Detección e inactivación de vírus em sêmen bovino destinado a la inseminación artificial. Madrid: Universidad Complutense de Madrid, Facultad de Veterinaria, 1995. 194p. Tese (Doutorado).
- SILVA, R. R. Sistema agroindustrial da caprinocultura leiteira no Brasil. Campina Grande: Universidade Federal da Paraíba, 1996. 38p. (Monografia, Especialização em Agribusiness).
- SINGH, E.L. Determining the disease transmission potencial of embryos and semen. In: WORLD CONFERENCE ON SHEEP AND BEEF CATTLE BREEDING, 3, 1988, Paris. Proceedings... Paris, 1988. p.659-72.
- SINGH, E.L. The disease control potential of embryos. *Theriogenology*, v.27, p.9-20, 1987.
- SINGH, E.L., HARE, W.C.D., THOMAS, F.C. et al. Embryo transfer as a means of controlling the transmission of viral infections. IV. Non-transmission of infectious bovine rhinotracheitis/ infectious pustular vulvovaginitis virus from donors shedding virus. *Theriogenology*, v.20, p.169-176, 1983.
- SINGH, E.L., McVICAR, J.W., HARE, W.C.D. et al. Embryo transfer as a means of controlling the transmission of viral infections. VII The *in vitro* exposure of bovine and porcine embryos to foot-and-mouth disease virus. *Theriogenology*, v.26, p.587-593, 1986.
- SINGH, E.L., THOMAS, F.C., EAGLESOME, M.D. et al. Embryo transfer as a means of controlling the transmission of viral infections. II The *in vitro* exposure of preimplantation bovine embryos to infectious bovine rhinotracheitis virus. *Theriogenology*, v.18, p.133-140, 1982.
- SKUTELSKY, E., RANEN, E., SHALGI, R. Variations in the distribution of sugar residues in the zona pellucida as possible species-specific determinants of mammalian oocytes. *J. Reprod. Fert.*, 1994,100:35-41.
- SMITH, M.C., SHERMAN, D.M. *Goat Medicine*. Philadelphia: Lea & Febiger, 1994. 620 p.
- SMITS, C.B, VAN MAANEM, C., GLAS, R.D. et al. Comparison of three polymerase chain reaction methods for routine detection of bovine herpesvirus 1 DNA in fresh bull semen. *J. Virological Methods*, v.85, n.1-2, p.65-73, 2000.

- SOARES, A.T., SIMPLÍCIO, A. A., ANDRIOLI, A, et al. Eficiência do flunixin meglumine no controle da regressão lútea prematura em cabras superovuladas. *Arq. Bras. Med. Vet. Zoot.*, v.50, n.1, p.35-39, 1998.
- SOUZA, G.J.G., ALVES, F.S.F., BEZERRA, M.D. Ocorrência da artrite encefalite caprina (CAEV) no estado da Paraíba – inquérito sorológico. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE MEDICINA VETERINÁRIA, 24, 1999, Campo Grande-MS. *Anais...* Campo Grande: 1999.
- STRINGFELLOW, D.A., RIDDELL, K.P., ZUROVAC, O. The potential of embryo transfer for infectious disease control in livestock. *NZ Vet. J.*, v.39, p.8-17, 1991.
- STRINGFELLOW, D.A., SEIDEL, S.M. Manual da Sociedade Internacional de Transferência de Embriões. 3. ed. Illinois: International Embryo Transfer Society, 1999. Ed. SBTE, 180p.
- SUAREZ, D.L., WHETSTONE, C.A. Comparison of different PCR tests to detect bovine lentivirus in cell culture and experimentally and naturally infected cattle. *J. Vet. Diagn. Invest.*, v.9, n.4, p.421-424, 1997.
- THATCHER, W. W., MEYER, M. D., DANET-DESNOYERS, G. Maternal recognition of pregnancy. *J. Reprod. Fert.*, v. 49, 15-28, 1995.
- THIBIER, M., GUÉRIN, B. Embryo transfer in small ruminants: the method of choice for health control in germplasm exchanges. *Livestock Prod. Sci.*, v. 61, n.3, p.253-270, 2000a.
- THIBIER, M., GUÉRIN, B. Hygienic aspects of storage and use of semen for artificial insemination. *An. Reprod. Scie.*, v. 62, p.233-251, 2000b.
- THIBIER, M.L. Originalité de la surveillance sanitaire et vétérinaire du transfert embryonnaire bovin. *Bull. Mens. Soci. Vét. Pract.*, v.78, p.193-204, 1994.
- THOMAS, F.C., SINGH, E.L., HARE, W.C.D. Embryo transfer as a 'means of controlling viral infections. III. Non-transmission n bluetongue virus from viremic cattle. *Theriogenology*, v.19, p.425-31, 1983.
- TRAVASSOS, C., BENOÎT, C., VALAS, S. et al. Caprine arthritis-encephalitis virus in sêmen of naturally infected bucks. *Small Ruminant Research*, v.32, p.101-106, 1999.
- TRAVASSOS, C., BENOÎT, C., VALAS, S. et al. Détection du virus de l'arthrite encéphalite caprine dans le sperme de boucs infectés expérimentalement. *Vet. Res.*, v.29, p.579-585, 1998.
- TSUBOI, T., IMADA, T. Detection of BVDV in bovine embryos derived from persistently infected heifers by PCR. *Vet. Rec.*, v.142, p.114-115, 1998.
- VOELKEL, S.A., STUCKEY, K.W., LOONEY, C.R. et al. An attempt to isolate *Brucella abortus* from uterine flushings of superovulated donor cattle. *Theriogenology*, v.19, p.355-365, 1983.
- WALSH, P.S., METZGER, D.A., HIGUCHI, R. Chelex 100 as a medium for simple extraction DNA for PCR-based typing from forensic material. *Biotechniques*, v.10, p.506-513, 1991.
- WHATHALL, A.E. Disease transmission by semen and embryo transfer techniques and applications for international trade. *State Vet. J.*, v.41, p.19-30, 1987.
- WHATHALL, A.E. Embryo transfer and disease transmission in livestock a review of recent research. *Theriogenology*, v.43, p. 81-88, 1995.
- WOLFE, D.F., NUSBAUM, E.E., LAUERMAN, L.H. et al. Embryo transfer from goats seropositive for caprine arthritis-encephalitis virus. *Theriogenology*, v. 28, n. 3, p. 307-316, 1987.
- WOODALL, C.J., MYLNE, J., McKELVIE, W.A.C. et al. A technique for the sequential isolation of RNA and DNA from embryos

developed for screening for viruses. *J. Virol. Methods*, v.46, p.263-274, 1994.

WOODARD, J.C., GASKIN, D.V.M., MACKAY, R.J. et al. Caprine arthritis-encephalitis clinicopathologic study. *Am. J. Vet. Res.*, v.43, n.12, p.2085-2096, 1982.

WORKING GROUP ON MOTHER-to-CHILD TRANSMISSION OF HIV. Rates of mother-to-child transmission of HIV in Africa, America and Europe: results from 13 perinatal studies. *J. Acq. Immune Defic. Syndr.*, v.8, p-506-510, 1995.

ZANONI, R., NAUTA, I.M, KUHNERT, P. et al. Genomic heterogeneity of small ruminant lentiviruses detected by PCR. *Vet. Microb.*, v.33, p.341-351, 1992.

ZANONI, R., PAULI, U., PETERHANS, E. Detection fo caprine arthritis-encephalitis (LVC) and Maedi-Visna viruses using the polymerase chain reaction. *Experientia*, v.46, p.360-318, 1990.

ZEILMAKER, G.H. Transmission of mammary tumor virus by female GR mice: results of egg transplantation. *Int. J. Cancer*, v.4, p.261-266, 1969.

ZINK, M.C., YAGER, J.A., MYERS, J.P. Pathogenesis of caprine arthritis encephalitis virus. Celular localization of viral transcripts in tissues of infected goats. *Am. J. Pathol.*, v.136, n.4, p.843-854, 1990.

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

ZINK, M.C., NARAYAN, O., KENNEDY, P.G.E. et al. Pathogenesis of visna-maedi and caprine arthritis-encephalitis: new leads on the mechanism of restricted virus replication and persistent inflammation. *Vet. Immun. Immunopathol.*, v.15, p.1671 80, 1987.

ZINK, M.C., YAGER, J.A., MYERS, J.D. Pathogenesis of Caprine Arthritis Encephalitis Virus. *Am. J. Pathol.*, v. 136, n.4, p. 843-854, 1990.