

UNIVERSIDADE ESTADUAL DO CEARÁ - UECE  
FACULDADE DE VETERINÁRIA - FAVET  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS - PPGCV

Jean Berg Alves da Silva

**Vírus da Artrite Encefalite Caprina (CAEV) em  
folículos pré-antrais de cabras naturalmente  
infectadas**

Fortaleza - Ceará

2006

UNIVERSIDADE ESTADUAL DO CEARÁ - UECE

Jean Berg Alves da Silva

**Vírus da Artrite Encefalite Caprina (CAEV) em folículos pré-antrais de cabras naturalmente infectadas**

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

Área de Concentração: Reprodução e Sanidade Animal.

Orientadora: Profa. Dra. Maria Fátima da Silva Teixeira

**Fortaleza - Ceará**

**2006**

S586\_\_ Silva, Jean Berg Alves da

Vírus da Artrite Encefalite Caprina (CAEV) em folículos pré-antrais de cabras naturalmente infectadas/Jean Berg Alves da Silva \_\_Fortaleza, 2006.

148p. – il.

Orientadora: Prfa. Dra. Maria Fátima da Silva Teixeira  
Tese (Doutorado em Ciências Veterinárias)  
Universidade Estadual do Ceará, Faculdade de Veterinária.

1. Lentivírus. 2 – Caprino. 3. Folículo Pré-Antral. I.  
Universidade Estadual do Ceará, Faculdade de Veterinária

CDD: 636.39

JEAN BERG ALVES DA SILVA

Vírus da Artrite Encefalite Caprina (CAEV) em folículos pré-antrais de cabras naturalmente infectadas.

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

Área de Concentração: Reprodução e Sanidade Animal

Aprovada em: 01/09/2006

**Banca Examinadora**

---

Maria Fátima da Silva Teixeira Profa. Dra.  
Orientadora

---

José Ricardo Figueiredo, Prof. Dr.  
Co-orientador/examinador (UECE)

---

Roberto Soares de Castro, Prof. Dr.  
Examinador (UFRPE)

---

Alice Andrioli, Dra.  
Co-orientadora/examinadora (EMBRAPA-  
CAPRINOS)

---

Francisco Marlon Carneiro Feijó, Prof. Dr.  
Examinador (UFERSA)

### **Dedicatória**

*Dedico à minha Esposa Luzia  
Lidiane de Oliveira Moura e ao meu*

*filho Jean Berg Alves da Silva Filho,  
fontes de alegria, amor e inspiração  
nos momentos de dificuldade.*

*Deus abençoe nossa família.*

## **AGRADECIMENTOS INSTITUCIONAIS**

À Fundação Cearense de Apoio à Pesquisa – FUNCAP, pelo apoio financeiro concedido na forma de bolsa de estudo, que sem dúvida foi imprescindível para a realização desta pesquisa.

À EMBRAPA – Caprinos pela concessão dos animais e as equipes dos laboratórios de virologia e de tecnologia de embriões que contribuíram de forma incondicional para a realização deste trabalho.

Ao Laboratório de Manipulação de Oócitos e Folículos Pré-Antrais (LAMOFOPA) pelo auxílio no processamento com os folículos pré-antrais.

Ao Laboratório de Fisiologia e Controle da Reprodução (LFCR) pela contribuição para a realização da análise histológica.

## **AGRADECIMENTOS PESSOAIS**

Agradeço a Deus, que iluminou e indicou o melhor caminho nos momentos de dificuldade.

Agradeço à minha família, em especial à minha mãe (Francisca Alves da Silva) e ao meu pai (Sizenaldo da Silva) por terem servido como fonte inspiradora e por todo incentivo, sacrifício e dedicação. Aos meus irmãos (Juan Berto Alves da Silva, Sizenaldo da Silva Júnior e Allan Bueno Alves da Silva) pelo apoio e preocupação. A minha maior felicidade é saber que posso contar com vocês em todos os momentos da minha vida.

Agradeço àquela que esteve do meu lado em todos os momentos, sempre apoiando e incentivando, me erguendo quando eu teimava em fraquejar. Àquela que sempre me apoio de forma incondicional abdicando muitas vezes dos seus sonhos e desejos para estar ao meu lado. Lidiane (esposa) te amo muito.

Muito obrigado às minhas tias, tios e avós queridos, pelo apoio psicológico e financeiro para a concretização desse trabalho. À toda minha família pelo incentivo e o amor sincero, sei que para sempre terei vocês para festejarem junto comigo as nossas conquistas.

Meus sinceros agradecimentos à Dr<sup>a</sup>. Maria Fátima da Silva Teixeira, por ter acreditado em mim e me concedido a oportunidade de trabalhar junto com a sua “família”. Deus coloca em nossas vidas verdadeiros anjos que iluminam nossos caminhos, e você com certeza é um desses anjos. Faltam-me palavras para expressar todo sentimento de agradecimento e admiração que tenho por você. MUITO OBRIGADO.

Aos amigos integrantes do LABOVIR, Aracely R. F. Ricarte, pelo auxílio e dedicação, a Suzana A. C. Araújo, pelos conselhos e amizade, à Tânia V. M.



Dantas, pela amizade e ainda aos alunos de iniciação científica D'Ávila, Juliana, Esmaille, Cynthia, Mariana, Adriana e Aline pelo auxílio e convivência agradável.

Aos amigos Raimundo Alves Barreto Júnior, Carlos Henrique de Souza e Regina Veras pelo auxílio na coleta dos soros para a detecção de animais naturalmente infectados com o CAEV na micro-região de Angicos. E aos Médicos Veterinários João Ciro F. Neto e Maria Isabela Carlos pela ajuda.

Agradeço ao Dr. José Ricardo de Figueiredo, pela confiança, orientação e por ter disponibilizado o seu laboratório e sua equipe para a realização deste trabalho. A todos integrantes do LAMOFOPA, em especial a Cláudio A. P. Lopes, pela amizade e dedicação, Ana Kelen F. Lima pela amizade e contribuição fundamental para a realização desta pesquisa, Regiane R. Santos pela contribuição imprescindível para conclusão desta pesquisa, a Maria Helena T. Matos, José Roberto V. Silva, Ana Paula R. Rodrigues, Fabrício S. Martins, pelos ensinamentos, auxílio e atenção.

À Dr<sup>a</sup>. Ana P. Ravazzolo, pela realização da PCR semi-nested.

À Dr<sup>a</sup> Alice Andrioli (EMBRAPA - Caprinos), pela concessão dos animais e mais do que isso pela atenção e dedicação, muito obrigado.

Ao prof. Dr. Francisco Marlon Carneiro Feijó e ao Prof. Dr. Roberto S. de Castro pela participação na banca de defesa da tese e pela contribuição na escrita deste trabalho.

Ao Dr. Vicente José de Figueiredo Freitas, pela gentileza de ter cedido o seu laboratório de histologia para realização de parte deste trabalho.

A todos os professores do Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias (PPGCV) da UECE, que contribuíram para o meu crescimento

profissional com os seus ensinamentos e dedicação. E às secretárias do PPGCV, Alzenira, Adriana e Cristina pela presteza, atenção e carinho.

Ao pesquisador Dr. Raymundo Rizaldo Pinheiro, aos técnicos de laboratório Nóbrega e Osmarilda pela ajuda e atenção, muito obrigado.

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

**Epígrafe**

Direi do SENHOR: Ele é o meu Deus, o meu refúgio, a minha fortaleza, e nele confiarei.

Salmo 91

## Resumo

O vírus da artrite encefalite caprina (CAEV) é lentivírus que causa infecção persistente em caprinos de todas as idades. *In Vivo*, o CAEV infecta preferencialmente células do sistema monocítico-fagocitário, porém já foi identificado em outros tipos celulares, como por exemplo, células epiteliais, endoteliais e nervosas. No trato reprodutivo este vírus já foi identificado no útero, oviduto e ovários de cabras naturalmente infectadas. No ovário o CAEV já foi descrito em células do *cumulus oophorus*, no entanto ainda não existem pesquisas sobre a presença do agente em folículos pré-antrais. Desta forma o objetivo desta tese foi verificar se o CAEV está presente em FOPA de cabras naturalmente infectadas, além de analisar a viabilidade do uso da criopreservação dos FOPA destes animais para a preservação do seu material genético. Para a identificação do vírus nos FOPA foram coletados 18 ovários sendo oito de cabras soronegativas e dez de soropositivas, foi empregada a técnica de imunohistoquímica e a PCR semi-nested, objetivando verificar a presença de proteínas virais e do DNA proviral, respectivamente. Para a criopreservação foram utilizados os ovários de oito cabras (quatro soropositivas e quatro soronegativas) empregou-se o DMSO 1,5M, como crioprotetor. Após a criopreservação os fragmentos foram fixados e analisados pela técnica de histologia clássica. O DNA proviral do CAEV foi identificado em quatro amostras, sendo duas de córtex e duas de FOPA isolados, porém na imunohistoquímica nenhuma reação positiva foi observada. Nos ovários frescos os animais soropositivos mostraram uma maior ( $p < 0,05$ ) porcentagem de FP

degenerados (30,2%) quando comparados aos animais soronegativos (12,5%). Após a criopreservação a porcentagem de folículos degenerados aumentou em todos os grupos e não foi observada diferença significativa ( $p < 0,05$ ,  $\chi^2$ ) na taxa de degeneração entre animais soropositivos e soronegativos. Ficou evidente que o DNA proviral do CAEV pode estar presente em FOPA de cabras naturalmente infectadas e que oócitos inclusos em FP de cabras naturalmente infectadas com o CAEV podem ser criopreservados com uso do DMSO 1,5M como crioprotetor.

## ABSTRACT

The Caprine Arthritis Encephalitis Virus (CAEV) cause a persistent infection in goat of all the ages. *In vivo* the CAEV infect mainly cells of the monocytes-macrophages lineage, however already were identified in other cellular types, as for example, epithelial, endothelium and nervous cells. In reproductive tract this virus already was identified in the uterus, oviduct and ovaries of goats naturally infected. In the ovary the CAEV was described in cells of *cumulus oophorus*, however still does not exist research on the presence of the agent in preantral follicles (PF). Of this form the objective of this thesis was to verify if the CAEV is present in PF of goats naturally infected, besides analyzing the viability of the use of the cryopreservation of the PF of these animals for the preservation of its genetic material. For the identification of the virus in the PF 18 ovaries were collected, being eight of seronegatives goats and ten of seropositives, it was used the technique of immunohistochemical and hemi-nested PCR, to verify the presence of proteins and the proviral DNA, respectively. For the cryopreservation the ovaries of eight goats had been used (four seronegatives and four seropositives), was used the DMSO 1,5M, as cryoprotectants. After cryopreservation the fragments were fixed and analyzed for the technique of histological examination. To compare difference in the ratio of normal and degenerated preantral follicles between the seropositives and seronegatives animals the test of the  $\chi^2$  was used, and values were considered statistically significant when  $P < 0,05$  5%. The DNA proviral for CAEV was identified in four samples, being two of cortex and two of isolated PF, however in the immunohistochemical no positive reaction was observed. In the fresh ovaries the seropositives animals had shown a greater ( $p < 0,05$ ), percentage of degenerated PF when compared with the seronegatives animals. After the cryopreservation the percentage of degenerated follicles increased in all the groups and significant difference was not observed ( $p < 0,05$ ) in the ratio of degeneration between seropositives and seronegatives animals. In conclusion, it was evident that the pro-viral DNA of the CAEV can be present in the PF of naturally infected goats and que is possible use the cryopreservation to conserve PF of naturally infected goats, with DMSO 1,5M.

## LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

:aproxim :Porcentagem

adamente  $\mu\text{g}$

:Microgramas%

$\mu\text{L}$  ~

:Microlitro

$\mu\text{m}$

:Micrômetro

Bp

:Pares de base

BSA

:Albumina sérica bovina

$\text{Ca}^{2+}$

:Íon Cálcio

$\text{CaCl}_2$

:Cloreto de Cálcio

CAE

:Artrite encefalite caprina

CAEV

: Vírus da artrite encefalite caprina

cDNA

:Ácido desoxirribonucléico complementar

CG

:Células da granulosa

$\text{CO}_2$

:Dióxido de carbono

DAB

:Diaminobenzidina

DNA

:Ácido desoxirribonucléico

DNAse

:Enzima desoxirribonuclease

dNTP

:Nucleotídeos

ELISA

:Enzyme-linked immunosorbent assay

Fig.

:Figura

FSH

:Hormônio folículo estimulante

GC

:Células da granulosa

h

:Horas

$\text{H}_2\text{O}_2$

:Peróxido de hidrogênio

$\text{HCl}$

:Cloreto de hidrogênio

IDGA

:Imunodifusão em gel de agarose

IgG

:Imunoglobulina

$\text{K}^+$

:Íon Potássio

kDa

:Quilodaltons

LTR

:Repetições terminais longas

LVPR

:Lentivírus de pequenos ruminantes

M

:Molar

M

:Mitocôndria

MEM

:Meio essencial mínimo

mg

:Miligrama

min.

:Minutos

mL

:Mililitro

Mm

:Milímetro

mM

:Milimolar

mRNA

:Ácido ribonucléico mensageiro

N

:Número

Na <sup>+</sup>	:Íon Sódio
NaCl	:Cloreto de Sódio
Ng	:Nanograma
Nm	:Nanômetro
°C	:Graus Celsius
P<0.05	:Probabilidade menor do que 5%
P>0.05	:Probabilidade maior do que 5%
PAS	:Ácido periódico de Schiff
PBS	:Tampão fosfato salino
PCR	:Reação em cadeia da polimerase
pFSH	:Hormônio folículo estimulante de origem porcina
pH	:Potencial hidrogeniônico
PO <sub>4</sub> <sup>-</sup>	:Fosfato
RNA	:Ácido ribonucléico
RNAse	:Enzima ribonuclease
RT	:Transcriptase reversa
RT-PCR	:Transcriptase reversa da reação em cadeia da polimerase
sec.	:Segundos
SO <sub>4</sub> <sup>-</sup>	:Sulfato
VIP	:Peptídeo intestinal vasoativo
x <sup>2</sup>	:Qui-quadrado
ZP	:Zona pelucida



## SUMÁRIO

1.	<b>Introdução</b>	<b>19</b>
2.	<b>Revisão de Literatura</b>	<b>21</b>
2.1.	<b>Vírus da Artrite Encefalite Caprina – CAEV</b>	<b>21</b>
2.1.1.	<b>Classificação</b>	<b>21</b>
2.1.2.	<b>Morfologia</b>	<b>21</b>
2.1.3.	<b>Replicação</b>	<b>22</b>
2.1.4.	<b>Epidemiologia</b>	<b>23</b>
2.1.5.	<b>Transmissão</b>	<b>23</b>
2.1.6.	<b>Patogênese</b>	<b>24</b>
2.1.7.	<b>Resposta Imune</b>	<b>25</b>
2.1.8.	<b>Sinais Clínicos e Diagnóstico</b>	<b>26</b>
2.1.9.	<b>Prevenção e Controle</b>	<b>28</b>
2.2.	<b>Ovário Mamífero e os processos de Oogênese e Foliculogênese</b>	<b>29</b>
2.2.1.	<b>Ovário</b>	<b>29</b>
2.2.2.	<b>Oogênese</b>	<b>29</b>
2.2.3.	<b>Foliculogênese</b>	<b>30</b>
2.2.4.	<b>População e Classificação Folicular</b>	<b>31</b>
2.2.5.	<b>Atresia folicular</b>	<b>32</b>
2.2.6.	<b>Biotécnica Manipulação de Oócitos em Folículos Pré-Antrais (MOIFOPA)</b>	<b>34</b>
	a) <b>Isolamento de FOPA</b>	<b>34</b>
	b) <b>Cultivo <i>in vitro</i> de FOPA</b>	<b>35</b>
	c) <b>Criopreservação de FOPA</b>	<b>36</b>
3.	<b>Justificativa</b>	<b>41</b>
4.	<b>Hipótese Científica</b>	<b>42</b>
5.	<b>Objetivos</b>	<b>43</b>
5.1.1.	<b>Objetivo Geral</b>	<b>43</b>
5.1.2.	<b>Objetivos Específicos</b>	<b>43</b>

6.	<b>CAPÍTULO I:</b> Artrite Encefalite Caprina em reprodutores da micro-região de Angicos no Estado do Rio Grande do Norte. ....	<b>44</b>
7.	<b>CAPÍTULO II:</b> Criopreservação de oócitos inclusos em folículos pré-antrais de cabras naturalmente infectadas com o Vírus da Artrite Encefalite Caprina (CAEV). ....	<b>48</b>
8.	<b>Capítulo III:</b> Identificação do Vírus da Artrite Encefalite Caprina (CAEV) no tecido ovariano de cabras naturalmente infectadas .....	<b>58</b>
9.	<b>CAPÍTULO IV:</b> Identificação molecular do provírus da Artrite Encefalite Caprina (CAEV) em folículos ovarianos pré-antrais de cabras naturalmente infectadas .....	<b>65</b>
10.	<b>Conclusões Gerais</b> .....	<b>71</b>
11.	<b>Perspectivas</b> .....	<b>72</b>
12.	<b>Referências Bibliográficas</b> .....	<b>73</b>
13.	<b>Anexos</b> .....	<b>95</b>

## 1. Introdução

---

A Artrite Encefalite Caprina (CAE) é uma enfermidade infecto-contagiosa, provocada por um Lentivírus denominado Vírus da Artrite Encefalite Caprina (CAEV) o qual acomete caprinos de todas as idades, independente do sexo ou da raça. A CAE tem como principais sinais clínicos artrite, encefalite, mamite e com menor freqüência problemas respiratórios (FRANKE, 1998). De uma forma geral o animal infectado apresenta queda acentuada na produção comprometendo economicamente produtividade do rebanho (JOAG *et al*, 1996).

A CAE foi detectada pela primeira vez por CORK *et al* (1974) e o isolamento do vírus foi realizado nos Estados Unidos da América (EUA), a partir da membrana sinovial e do líquido cefalorraquidiano de caprinos infectados (CRAWFORD *et al*. 1980). No Brasil, a primeira descrição sorológica da CAE foi feita por MOOJEN (1986), no Rio Grande do Sul, em seguida a enfermidade foi descrita por outros autores em diversos estados como: FITTERMAN (1988) na Bahia e PINHEIRO (1989) no Ceará.

A principal via de entrada do Lentivírus caprino no organismo do animal é através da ingestão de colostro e leite de fêmeas infectadas, uma vez que o vírus encontra-se nas células monocíticas que estão presentes nestas secreções. Porém acredita-se que outras rotas de infecção vertical estejam envolvidas na transmissão do CAEV (MSELLI-LAKHAL *et al*, 1999), visto que o mesmo já foi isolado e cultivado em diferentes tipos celulares, que poderiam ter papel importante na transmissão.

Atualmente sabe-se que várias biotécnicas são utilizadas na reprodução animal, visando a preservação de material genético como espermatozóides, folículos ovarianos, oócitos e embriões de animais geneticamente superiores e/ou espécies ameaçadas de extinção. Estes produtos se não convenientemente analisados podem ser fonte de contaminação por vírus, tais como o CAEV. Por outro lado, o uso de biotécnicas reprodutivas pode ser uma alternativa para o aproveitamento do potencial reprodutivo de animais

persistentemente infectados, como o caso das infecções por CAEV, onde a forma de controle mais indicada é o sacrifício dos animais portadores.

A biotécnica de Manipulação de Oócitos Inclusos em Folículos Ovarianos Pré-Antrais (MOIFOPA), por exemplo, tem como princípio básico, a recuperação ou o isolamento de folículos pré-antrais do ovário, antes que estes sofram atresia (FIGUEIREDO *et al*, 1999). Admitindo-se que o CAEV possa de alguma forma atingir o ambiente ovariano, a MOIFOPA também poderia ser empregada na tentativa de salvaguardar o material genético das fêmeas acometidas por esta enfermidade.

Os folículos ovarianos pré-antrais (FOPA) são constituídos basicamente pelo oócito circundado por uma ou mais camadas de células da granulosa (CG) demarcadas por uma membrana basal. Recentemente foi verificado que as células da células da granulosa são susceptíveis à infecção pelo CAEV *in vitro* (LAMARA *et al*, 2001), porém ainda não se sabe se as CG de FOPA oriundos de animais naturalmente infectados podem estar infectados pelo CAEV.

## 2. Revisão de Literatura

---

### 2.1. Vírus da Artrite Encefalite Caprina – CAEV

#### 2.1.1. Classificação

O Vírus da Artrite Encefalite Caprina (CAEV) é um vírus RNA pertencentes à família Retroviridae. Esta família é dividida em três subfamílias que diferem em suas propriedades biológicas: Lentivirinae, Oncornavirinae e Spumavirinae. Os lentivirus causam doença inflamatória progressiva crônica *in vivo* e morte celular *in vitro*. A subfamília Lentivirinae alberga o gênero *Lentivirus*, do qual fazem parte, além do CAEV, os vírus das imunodeficiências felina (FIV), bovina (BIV), símia (SIV) e humana (HIV-1, HIV-2), além dos vírus da anemia infecciosa equina (AIEV), da doença de Jembrana e do Maedi-Visna (MVV) (HAASE, 1986; CLEMENTS & PAYNE, 1994, JOAG, 1996).

#### 2.1.2. Morfologia

A morfologia do CAEV é muito similar a de outros Lentivírus. O vírion (partícula viral completa) mede entre 80 e 100 nm de diâmetro, possui capsídio cúbico e envelope ligeiramente esférico constituído por lipídios e glicoproteínas. O genoma viral é formado por duas fitas simples de RNA sense + (CHEEVRES et al., 1981), contendo os genes *gag*, *env* e *pol*, típicos da família Retroviridae, e os genes regulatórios *tat*, *rev* e *vif*. O gene *gag* codifica as proteínas estruturais que constituem o vírion (MA-matriz e CA-capsídio), o gene *pol* codifica as várias enzimas responsáveis pelo processo de transcrição reversa e integração pró-viral (RT-transcriptase reversa, PR-protease e IN-integrase) e o gene *env* codifica glicoproteínas presentes na superfície do vírion (SU-superfície e TM-transmembranar) com a capacidade de se ligar e fundir com as células alvo. A proteína Vif está associada com a infectividade viral e com o controle da produção das partículas virais infecciosas, enquanto que as proteínas Tat e Env estão envolvidas com a regulação da expressão viral (CLEMENTS & PAYNE, 1994; JOAG, 1996).

### **2.1.3. Replicação**

Uma importante característica dos retrovírus é a presença da enzima RT que permite que o RNA viral dê origem à dupla fita de DNA pró-viral que se incorpora ao genoma celular. Os lentivírus são capazes de se replicar em células diferenciadas que não estão se replicando, ou seja, não dependem da síntese de DNA celular para sua replicação, o que os difere de outros grupos de retrovírus. Entretanto, estas células precisam ser ativadas para produzir a progênie viral (CLEMENTS & PAYNE, 1994).

A replicação dos lentivírus ocorre em várias etapas, sendo que a primeira consiste na ligação do virion aos receptores de superfície das células alvo (adsorção). A seguir, ocorre fusão do envelope viral à membrana celular e o nucleocapsídeo é liberado intracelularmente (desnudamento). A enzima viral RT transcreve o RNA genômico viral em uma dupla fita de DNA (transcrição reversa) que é transportado para o núcleo celular e integrado, como um pró-vírus, ao genoma da célula por ação de uma enzima integrase (integração). O DNA pró-viral é transcrito em RNA genômico e RNA mensageiro (RNAm) que é transportado para o citoplasma, onde é traduzido em proteínas virais. Seguem, então, as etapas de montagem dos virions e sua liberação da célula, por brotamento (BROOKS *et al.*, 1998), onde os vírus recebem seu envelope que consiste de partes da membrana celular e glicoproteínas virais (HARTMANN, 1998).

Os lentivírus são espécie-específicos e se replicam apenas em uma limitada população de células de seus hospedeiros (CLEMENTS & PAYNE, 1994). O CAEV *in vivo* replica-se em células do sistema monocítico-fagocitário, sendo os macrófagos os preferencialmente infectados (BRODIE *et al.*, 1992). 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).

LAMARA *et al.* (2001) demonstraram que as células da granulosa são permissíveis a infecção pelo CAEV *in vitro*, reproduzindo altos títulos virais quando infectadas com duas diferentes cepas virais, sendo que o vírus induziu a formação de células gigantes multinucleadas. A origem epitelial das células da granulosa é um fator determinante para que estas sejam permissivas ao

vírus, visto que células epiteliais de outros tecidos, como o oviduto caprino, também se mostraram permissivas à infecção pelo vírus da artrite encefalite caprina (LAMARA *et al.*, 2002a).

Cabras naturalmente infectadas com o CAEV expressam o DNA pró-viral em diversos tecidos do trato genital como útero, ovidutos e glândula mamária. A presença do lentivírus nestes tecidos pode contribuir para uma transmissão vertical da enfermidade (FIENI *et al.*, 2002).

#### **2.1.4 Epidemiologia**

O CAEV foi isolado pela primeira vez, em 1980, embora a artrite-encefalite caprina (CAE), embora tenha sua descrição sorológica tenha sido feita pela primeira vez na década de setenta, nos EUA (CORK, 1974). Esta enfermidade hoje já se encontra distribuída mundialmente. No Brasil, estudos sorológicos têm revelado a ocorrência de lentivírus (MVV e CAEV) nos estados do Rio Grande do Sul (MOOJEN, 1986), Bahia (FITERMAN, 1988; ASSIS & GOUVEIA, 1994), Ceará (PINHEIRO *et al.*, 1989; ASSIS & GOUVEIA, 1994), Minas Gerais (ASSIS & GOUVEIA, 1994), Pernambuco (CASTRO *et al.*, 1994) e Rio de Janeiro (ASSIS & GOUVEIA, 1994). Em Fortaleza, onde se concentra a maior parte do rebanho caprino leiteiro do estado do Ceará, encontrou-se uma soroprevalência de 40,7% de CAEV leiteira (MELO & FRANK, 1997).

#### **2.1.5. Transmissão**

O reservatório e a fonte de infecção do CAEV são os próprios animais infectados, os quais transmitem os vírus através de secreções, como o colostro e o leite, especialmente no período pós-natal. Apesar de ter um significado menor, a transmissão horizontal, através da saliva e das secreções respiratórias e urogenitais devem ser consideradas, dependendo da situação particular da criação (CALLADO *et al.*, 2001). Também já foi detectada a presença do vírus no sêmen, em células não espermáticas presentes no ejaculado de animais infectados, podendo assim a monta natural e a inseminação artificial representarem um risco potencial para a transmissão do vírus (TRAVASSOS *et al.*, 1998, ANDRIOLI, *et al.*, 1999). Pode ainda haver transmissão dos vírus através de fômites contaminados com sangue ou

secreções de animais infectados, como seringas, tatuadores, material cirúrgico etc (AL-ANI & VESTWEBER, 1984).

### **2.1.6. Patogênese**

O CAEV, assim como os demais Lentivírus, não são oncogênicos e causam doença de caráter crônico com grande período de latência (CLEMENTS & PAYNE, 1994). Após atingir o organismo, ocorre uma viremia e o vírus irá infectar as células mononucleares do sangue periférico (CORK & NARAYAN, 1980). A infecção das células do sistema imune, em especial macrófagos, são a base para a doença multissistêmica vista em todas as infecções lentivirais. A disseminação do vírus aos múltiplos órgãos envolvidos na doença ocorre via monócitos infectados que não expressam o vírus. Os Monócitos infectados chegam ao cérebro, pulmões, articulações e outros órgãos, onde maturam para macrófagos. A diferenciação em macrófagos ativa a expressão do gene viral e os vírus são então produzidos nestes órgãos (CLEMENTS & PAYNE, 1994). As principais alterações patológicas causadas pelo CAEV encontram-se no sistema nervoso central (SNC), articulações, pulmões e glândula mamária (AL-ANI & VESTWEBER, 1984 ; HAASE, 1986).

No SNC as lesões estão limitadas, de um modo geral, à substância branca. As alterações microscópicas são caracterizadas por acúmulo perivenoso disseminado de células mononucleares e variável destruição de mielina. Estudos com microscopia eletrônica demonstraram edema perivascular, espaço extracelular aumentado e infiltrados de células inflamatórias (AL-ANI & VESTWEBER, 1984).

O grau das lesões pulmonares variam de uma leve congestão e pneumonia intersticial a uma severa pneumonia intersticial acompanhada por pronunciada hiperplasia linfóide. Fibrose unilateral e pleurites podem ser observadas em animais jovens. Histologicamente, a pneumonia intersticial pode ser caracterizada por infiltração de células mononucleares, hiperemia do septo interalveolar e hiperplasia do tecido linfóide pulmonar. Os infiltrados septais são compostos de macrófagos, linfócitos e células plasmáticas. Os alvéolos e brônquios são usualmente livres de exsudatos (AL-ANI & VESTWEBER, 1984).



As lesões histológicas observadas na glândula mamária dos animais clinicamente afetados, consistem em extensiva infiltração intralobular de linfócitos e marcada hiperplasia linfóide adjacente aos ductos lactíferos (AL-ANI & VESTWEBER, 1984). Pode-se observar um infiltrado moderado de linfócitos e macrófagos, abundância de tecido conjuntivo e linfadenopatia subaguda ou crônica (LERONDELLE, FLEURY & , VILARD, 1989).

Têm sido descritas algumas alterações no timo e linfonodos. O córtex do timo é desprovido de células enquanto que os linfonodos são frequentemente hiperplásicos (CORK & NARAYAN, 1980). Necrose focal e mineralização do músculo esquelético também estão presentes em alguns caprinos, assim como depósito amilóide no baço e sinusóides hepáticos e extensiva glomerulonefrite (AL-ANI & VESTWEBER, 1984).

### **2.1.7 Resposta Imune**

Entre as várias proteínas dos CAEV, duas estão mais diretamente envolvidas com a produção de anticorpos pelo hospedeiro: uma glicoproteína do envelope, de peso molecular de 135 kD (gp135), e uma nucleoproteína de peso molecular de 28 kDaltons (p28) (JOHNSON *et al.*, 1983 ; GOGOLEWSKI *et al.*, 1985 ; KNOWLES *et al.*, 1991).

Tem-se observado que alguns animais infectados apresentam anticorpos detectáveis por testes sorológicos tardiamente (RIMSTAD *et al.*, 1993). A produção de anticorpos e sua concentração no sangue de um animal infectado são influenciadas por situações de estresse, pela presença de outras doenças, condição alimentar e idade (FRANKE, 1998). Em relação à produção de anticorpos neutralizantes o CAEV não induz à formação deste tipo de anticorpos em infecções naturais ou experimentais (TEIXEIRA, 1996). Embora ocorra produção de anticorpos, o sistema imune do hospedeiro não é efetivo em eliminar os lentivírus (BRODIE *et al.*, 1992).

Vários fatores contribuem para a persistência viral, entre eles está o alto grau de variabilidade genética do vírus, como evidenciado pela geração de uma população altamente divergente de genoma viral nos indivíduos infectados (CLEMENTS *et al.*, 1988). Estas variantes escapam da ação do sistema de defesa do hospedeiro (KNOWLES *et al.*, 1990). Além disso, o vírus é capaz de

replicar-se independentemente da síntese de DNA celular, fazendo com que a célula o hospede por longos períodos (KLEVJER-ANDERSON & CHEEVRES, 1981). Outros fatores que favorecem a persistência viral é a não eliminação de todas as células infectadas (KNOWLES *et al.*, 1990). Uma propriedade comum do CAEV é a persistência no animal mesmo na presença de resposta imunológica, devido à restrição da replicação viral (GENDELMAN *et al.*, 1986).

### **2.1.8 Sinais Clínicos e Diagnóstico**

O período de incubação do CAEV é variável, podendo se estender por vários anos (TEIXEIRA, 1997) o aparecimento de doença clínica e a produção de significativa patologia induzida pelo vírus podem ocorrer meses ou anos após a infecção (NARAYAN & CLEMENTS, 1989). A manifestação sintomatológica do CAEV pode ser dividida em quatro quadros clínicos principais, que podem ocorrer de forma isolada ou simultânea: artrite, encefalite, mamite e pneumonia (FRANKE, 1998).

A forma artrítica é o quadro clínico mais freqüente da CAE caracteriza-se por uma artrite degenerativa crônica envolvendo principalmente o carpo e o tarso (PERK, 1988). Na maioria dos casos os animais atingidos têm mais de um ano de idade. O aumento das articulações é freqüentemente visível, às vezes, apresentado manifestações de dor. Os animais em fase avançada da artrite emagrecem, apesar do apetite inalterado, levando à diminuição da produção de leite, podendo apresentar também claudicação e locomoverem-se apoiados nos joelhos. Os problemas de locomoção e a diminuição da produtividade geralmente levam ao abate precoce dos animais (FRANKE, 1998).

No tocante à forma encefalítica, caprinos de todas as faixas etárias podem manifestar esta forma clínica, sendo observada com maior freqüência em animais de dois a quatro meses de idade. Os animais apresentam inicialmente fraqueza e andar inseguro. O quadro evolui para uma paralisia progressiva da musculatura dos membros posteriores, que estende-se aos membros anteriores, levando o animal a permanecer em decúbito. No estágio final, os cabritos apresentam opstótomo e movimentos de pedalagem (FRANKE, 1998).

A pneumonia crônica é mais comum em ovinos infectados com MVV, ocorrendo com maior frequência em animais acima de um ano de idade, sendo algumas vezes observada também nos jovens. Em caprinos a sua ocorrência é esporádica. Quando ocorre pode se apresentar com uma evolução aguda após estresse ou no estágio avançado da gestação. Além da dificuldade respiratória e emagrecimento, pode-se observar pneumonia purulenta acompanhada de febre, causada pela infecção secundária por bactérias (CORK & NARAYAN, 1980).

A forma mamítica causada pelo CAEV, foi o principal problema encontrado, por exemplo, na Suíça, levando as associações de caprinocultores a desenvolverem um programa nacional de saneamento da CAE. Esta forma caracteriza-se por uma mamite intersticial, provocando o endurecimento e a atrofia da glândula mamária. Em algumas propriedades chega a atingir mais de 60% das cabras, provocando uma grave perda econômica pela redução ou mesmo supressão da produção de leite (FRANKE, 1998).

O CAEV também compromete o estado geral dos animais infectados. Normalmente a infecção tem longa incubação e a doença evolução crônica, com instalação progressiva das lesões, sendo na maioria dos casos observados em animais adultos. No caso da forma nervosa, embora alguns animais possam apresentar sintomas durante meses, a evolução via de regra é aguda (JOAG *et al.*, 1996).

Em virtude da variação do quadro clínico e pelo freqüente desenvolvimento subclínico da doença, o diagnóstico clínico não é suficiente para sustentar um parecer definitivo. Existe uma série de técnicas empregadas no diagnóstico do CAEV (FRANKE, 1998). Elas dividem-se em técnicas imunológicas (indiretas) e de detecção do vírus ou seu isolamento (diretas). Dentre as mais conhecidas destacam-se: imunodifusão em gel de agarose (IDGA), *enzime-linked immunosorbent assay* (ELISA), imunofluorescência indireta, microscopia eletrônica, cultivo do vírus, hibridização *in situ* e o teste da imunoperoxidase (CALLADO *et al.*, 2001).

### **2.1.9 Prevenção e Controle**

O controle do CAEV é muito difícil, devendo-se evitar a entrada de animais infectados no plantel e fazer exames periódicos do rebanho, para que os animais doentes possam ser identificados e separados dos sadios ou mesmo eliminados do rebanho. Quando a prevalência de CAE em um rebanho for de até 30%, sugere-se que os animais positivos sejam encaminhados para abate (CASTRO *et al*, 1998)

Quando a prevalência for maior que 30%, sugere-se a formação de um rebanho de animais negativos separados dos positivos, de forma a buscar o saneamento da propriedade através de um rigoroso manejo sanitário de ambos os grupos e da gradativa eliminação do grupo dos animais infectados (FRANKE, 1998). Nos planteis suspeitos ou sabidamente positivos, deve-se separar os cabritos imediatamente após o nascimento, evitando ao máximo seu contato com as secreções da mãe; administrar colostro de cabras soronegativas por IDGA, tratado a 56<sup>o</sup>C por 60 min, ou mesmo de vaca; alimentar os cabritos com leite de vaca ou leite de cabras pasteurizado; testar os cabritos a cada seis meses e separar os positivos (CALLADO *et al*, 2001).

O descarte de animais positivos constitui uma barreira no controle da enfermidade tendo em vista a perda de material genético proporcionada pelo sacrifício dos soropositivos. A busca de alternativas a esta forma de controle é constante, neste contexto tem merecido destaque as biotécnicas da reprodução, com especial ênfase na transferência de embriões e na Fertilização *in vitro* (ANDRIOLI *et al*, 2002). A biotécnica de MOIFOPA vem merecendo destaque por ser uma técnica promissora e que apresenta um grande potencial, já que o oócitos incluso nos folículos pré-antrais representam mais de 90% da população oocitária do ovário mamífero. Apesar de todo este potencial a sua utilização como uma alternativa no controle de enfermidades infecciosas, como CAE, ainda não foi avaliado.

## **2.2. Ovário Mamífero e os processos de Oogênese e Foliculogênese**

### **2.2.1. Ovário**

O ovário é o órgão reprodutivo primário da fêmea, sendo o responsável pela produção da célula germinativa feminina e dos hormônios sexuais. É formado por duas regiões: a medular e a cortical. A região medular contém

nervos, vasos sangüíneos, vasos linfáticos e tecido conjuntivo de conformação rígida. A matriz extracelular apresenta vários constituintes, entre os quais podemos citar a elastina, a laminina, a fibronectina e o colágeno, sendo este largamente distribuído nesse tecido. O colágeno é metabolicamente inerte tendo uma vida média longa, mas, sob determinadas condições fisiológicas e patológicas, é degradado enzimaticamente, como, por exemplo, no útero pós-parto ou em processos de cicatrização (KARLSON *et al.*, 1982). A região cortical contém as células germinativas também denominadas oócitos que estão inclusos nos folículos ovarianos. Na superfície do ovário existe uma fina camada de tecido epitelial, originalmente chamada de epitélio germinativo (BEARDEN & FUQUAY, 1997).

O folículo ovariano é a unidade morfofuncional do ovário, sendo constituído por um oócito circundado por células somáticas (granulosa e tecais). A função do folículo é proporcionar um ambiente ideal para a manutenção da viabilidade, crescimento e maturação do oócito (FIGUEIREDO *et al.*, 1999).

### **2.2.2 Oogênese**

A oogênese pode ser definida como o processo de desenvolvimento e diferenciação das células germinativas primordiais das fêmeas, culminando com a formação do oócito haplóide fecundado (RUSSE, 1983). Nos mamíferos a oogênese tem início durante a vida fetal e desenvolve-se por meses a anos nos animais adultos (WASSARMAN, 1988).

### **2.2.3 Foliculogênese**

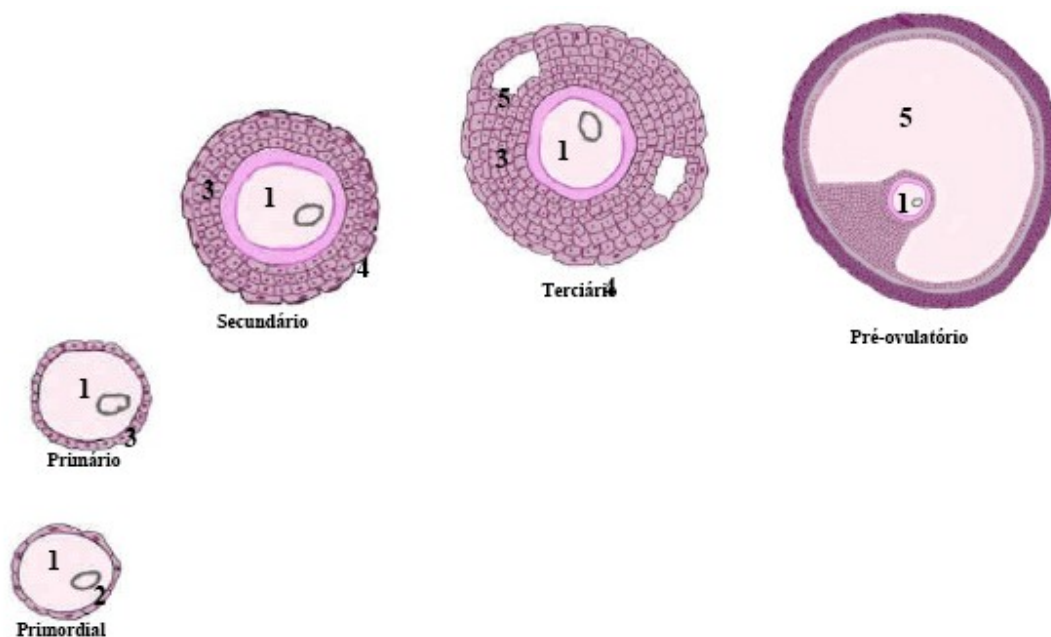
A foliculogênese é o processo de formação, crescimento e maturação folicular, iniciando com a formação do folículo primordial e culminando com o estágio de folículo maduro ou pré-ovulatório. Esse processo é contínuo, com saída diária de folículos do *pool* de reserva, os quais crescem, regredem em sua maioria, similarmente às mudanças que ocorrem no corpo lúteo, estando desse modo o conteúdo ovariano em constante modificação (HAFEZ, 1995).

Os folículos estão localizados no estroma do córtex, podendo distinguir-se, em um corte histológico de ovário os diferentes tipos foliculares (GEORGE

et al., 1998). De acordo com o grau de evolução pode se dividir os diferentes tipos foliculares em: pré-antrais ou não cavitários e antrais ou cavitários (GONÇALVES et al., 2001).

No fim da multiplicação meiótica do oócito, uma camada de células somáticas circunda o oócito primário, formando o folículo primordial. Esses folículos precisam ser ativados para ter início a fase de crescimento (RÜSSE, 1983). O folículo primordial adquire gradualmente uma camada de células cúbicas, tornando-se um folículo intermediário (BEZERRA *et al.*, 1998) e, posteriormente um folículo primário (VAN DEN HURCK *et al.*, 1997), quando passa a ser circundado apenas por células cúbicas dispostas em uma única camada. A partir desse momento, ocorre o aumento contínuo do oócito e a proliferação das células da granulosa, que passam a se dispor em camadas concêntricas ao redor do oócito, formando o folículo secundário. Durante o crescimento dos folículos pré-antrais, observa-se a diferenciação das células tecais e o espessamento da ZP, principalmente nos folículos secundários (HIRSHFIELD, 1988). A expressão de receptores específicos para estrógeno, progesterona e testosterona ocorre entre o estágio de desenvolvimento do folículo secundário terminal e terciário inicial. A fase antral da foliculogênese tem início com a formação de uma cavidade nos folículos terciários e culmina com a formação do folículo maduro ou de De Graaf. Os folículos terciários podem ser classificados quanto ao seu grau de crescimento em iniciais e terminais (BEARDEN & FUQUAY, 1997).

FIGURA 01 - Representação esquemática do desenvolvimento dos folículos ovarianos. 1. Oócito; 2. Células da Pré-granulosa; 3. Células da Granulosa; 4. Células da teca e 5. Cavidade antral. Fonte: Arquivos de Anatomia da Escola de Medicina da Universidade Central da Venezuela



#### 2.2.4 População e Classificação Folicular

A população folicular ovariana apresenta uma acentuada variação individual. Além desta variação diversos fatores como nível hormonal (PETERS, 1976), idade, estado reprodutivo (ERICKSON, 1966), raça e espécie (CAHIL & MAULÉON, 1981) influenciam a população folicular. Em mamíferos, a população folicular total do ovário consiste de um grande número de folículos primordiais em estado de quiescência e um número muito menor de folículos em fase de crescimento (CAHILL & MAULÉON, 1981), tendo sido estimada em aproximadamente 180.000 folículos em ovinos (CAHILL *et al.*, 1979) e 35.000 em caprinos (LUCCI *et al.*, 1999). Em ruminantes, cerca de 90% da população ovariana é constituída por folículos pré-antrais (SAUMANDE, 1991), sendo estes os responsáveis pela renovação contínua dos folículos antrais no ovário (GUILBAULT *et al.*, 1986).

Segundo ERICKSON (1966), há três tipos básicos de folículos: (1) primordial, constituído por um oócito circundado por uma camada de células da granulosa; (2) em crescimento, constituído por um oócito circundado por duas ou mais camadas de células da granulosa, mas sem vesícula formada e (3)



vesicular, onde há presença de antro. Os folículos primordiais e em crescimento compõem a categoria dos folículos pré-antrais e os folículos vesiculares estão na categoria dos folículos antrais ou cavitários. HULSHOF *et al.* (1994) fazem distinção entre folículos primordiais e primários, e afirmam que embora não se possa distinguí-los pelo seu diâmetro, é possível diferenciá-los por outras características morfológicas. Assim, nos folículos primordiais, o oócito é circundado por uma camada de células da granulosa de forma pavimentosa, enquanto que nos folículos primários, as células da granulosa são cúbicas. Quanto aos folículos secundários, estes podem ser caracterizados por possuírem várias camadas de células da granulosa cúbicas em torno do oócito (HULSHOF *et al.*, 1994)(FIGURA 01). Os folículos terciários e o folículo maduro ou de De Graaf caracterizam-se pela presença do antro folicular, surgimento das camadas tecais e ZP desenvolvida. O grau de maturação e a capacidade de resposta ao ambiente hormonal em que se encontra são os fatores determinantes da categoria a que pertence o folículo em questão.

#### **2.2.5. Atresia folicular**

Uma vez iniciado o crescimento folicular, este pode tomar dois caminhos distintos: o desenvolvimento até a ovulação, evento bastante raro (IRELAND, 1987), ou a morte folicular por atresia (ERICKSON, 1986), podendo esta ocorrer com maior frequência, em qualquer fase do crescimento folicular, em todas as espécies domésticas (IRELAND, 1987; FORTUNE, 1994). Entretanto, acredita-se que os folículos antrais sejam os mais frequentemente afetados (LUSSIEUR *et al.*, 1987).

A atresia ou morte folicular é um fenômeno fisiológico que pode ocorrer por degeneração celular (SAUMANDE, 1991) ou por apoptose (IRELAND, 1987).

A degeneração é uma morte celular passiva, que ocorre após uma agressão com dano severo das membranas, induzida por fatores externos, como a ação degradativa progressiva de enzimas sobre a célula letalmente lesada, de maneira que ocorre um "envelhecimento" celular progressivo, com ativação da resposta imunológica. As alterações nucleares aparecem sob três padrões distintos. Primeiro ocorre diminuição da basofilia da cromatina,

denominada cariólise, uma alteração que supostamente se reflete na atividade da DNase. Um segundo padrão é a picnose, caracterizada pela retração nuclear e aumento da basofilia, quando o DNA aparentemente se condensa em uma massa sólida, basofílica. No terceiro padrão, conhecido como cariorrexe, o núcleo picnótico ou parcialmente picnótico sofre fragmentação. Após um ou dois dias o núcleo na célula necrótica desaparece totalmente (BRASILEIRO FILHO *et al.*, 1993). Já a apoptose é um processo ativo que ocorre em resposta a uma variedade de estímulos fisiológicos ou patológicos, nos quais a célula participa de sua própria destruição, seguindo passos pré-determinados. Esse processo é controlado geneticamente e remove células danificadas, que expressam modificações no seu DNA código genético, evitando assim a transmissão de erros, culminando com a fragmentação e fagocitose dos restos celulares, sem ocasionar uma resposta inflamatória (KERR *et al.*, 1972). Os macrófagos reconhecem a célula apoptótica pelo aparecimento de modificações na superfície externa da bicamada lipídica da membrana, como por exemplo, alterações em sua simetria ou a exposição da fosfatidilserina (HOORNAERT *et al.*, 1997) e por modificações nos carboidratos da superfície celular, que seriam reconhecidos a partir de moléculas similares à lecitina, presentes na superfície externa dos macrófagos (DUVALL *et al.*, 1985).

A atresia é o destino da maioria dos folículos. Em humanos, a atresia de folículos menores que 1 mm de diâmetro é caracterizada pela ruptura inicial do oócito, seguida por retração das células da granulosa e hipertrofia das células tecais (GOUGEON & LEFEVRE, 1983). Em grandes folículos, a atresia pode ser visualizada pela presença de corpos picnóticos (material nuclear condensado), cujo número determina o estágio de atresia. Com o aumento do número de corpos picnóticos, as células da granulosa desaparecem e as células tecais mudam seu tecido intersticial. O último estágio da atresia é a invasão da cavidade folicular por fibroblastos e o desaparecimento do tecido intersticial. O oócito degenerado e a zona pelúcida são as últimas estruturas que podem ser visualizadas num folículo em estágio avançado de atresia. Vários fatores podem influenciar no processo de atresia, como idade da fêmea, ciclo reprodutivo, gestação, lactação, hipofisectomia, ovariectomia unilateral, ambiente hormonal, nutrição e isquemia do ovário (IRELAND, 1987). A

influência de agentes infecciosos na atresia ainda não está bem esclarecida, apesar de alguns vírus, como o CAEV, terem capacidade de infectar células da granulosa *in vitro* (LAMARA *et al.*, 2001).

### **2.2.6 Biotécnica Manipulação de Oócitos em Folículos Pré-Antrais (MOIFOPA)**

A biotécnica de MOIFOPA engloba o resgate de folículos pré-antrais do ambiente ovariano, seguido das etapas de conservação (resfriamento e/ou criopreservação) e/ou cultivo *in vitro* até o estágio de maturação folicular. Esta biotécnica fundamenta-se em dois objetivos básicos, a saber: a) resgatar ou isolar os FOPA a partir de ovários antes que eles se tornem atrésicos e b) cultivar os FOPA e conseqüentemente os oócitos imaturos neles inclusos, até o estágio de maturação prevenindo a atresia (FIGUEIREDO *et al.*, 1999).

#### **a) Isolamento de Folículos Pré-Antrais**

O isolamento de folículos pré-antrais pode ser necessário antes da sua manipulação para diferentes finalidades. Estes folículos podem ser isolados do ovário utilizando-se tanto métodos mecânicos quanto enzimáticos.

No tocante aos métodos mecânicos os FOPA têm sido isolados a partir da fragmentação de ovários oriundos de fetos no terço final da gestação pela utilização de fórceps (HUSHOLF *et al.*, 1994) ou de *tissue chopper* (FIGUEIREDO *et al.*, 1993), em bovinos. A fragmentação do tecido ovariano com o *tissue chopper* também foi realizada em ovinos e caprinos adultos por AMORIM (1998) e LUCCI *et al.* (1999), respectivamente. Ainda em bovinos adultos, utilizou-se *mixer* juntamente com filtros (NUTTINCK *et al.*, 1993), perfuração com agulhas ou fatiamento (WANI *et al.*, 2000).

A recuperação de folículos também pode ser realizada *post mortem* ou depois de ovariectomia, onde os oócitos podem ser recuperados até depois de 36 h a partir de ovários armazenados *ex situ* em meio fisiológico (JOHNSTON *et al.*, 1991), e ainda por punção folicular via laparoscopia.

O estroma ovariano é constituído por uma matriz extracelular rica em proteínas estruturais. Assim, foram desenvolvidas metodologias

fundamentadas na hidrólise de tais proteínas, empregando a ação de enzimas como a tripsina, a pronase e a colagenase as quais podem ser utilizadas isoladamente ou em associação. A ação dessas enzimas facilita a liberação dos folículos ovarianos, tornando-as importantes ferramentas nas técnicas de MOIFOPA. Quando se trabalha com enzimas, é importante observar a especificidade de cada uma delas. Por exemplo, a tripsina apresenta uma especificidade no que diz respeito à presença de certos aminoácidos (lisina e arginina) envolvidos na ligação peptídica. A pronase é uma enzima proteolítica que não apresenta uma especificidade nítida. Já a colagenase tem uma atividade proteolítica específica sobre o colágeno (KARLSON *et al.*, 1982)

Dependendo do estado fisiológico e da idade da doadora do ovário, a associação de tratamentos enzimáticos aos tratamentos mecânicos pode aumentar significativamente o número de folículos pré-antrais isolados (FIGUEIREDO *et al.*, 1993).

#### b) **Cultivo *in vitro* de FOPA**

O cultivo de FOPA vem sendo alvo de várias pesquisas na última década, o que é traduzido em avanços consideráveis desta biotécnica. Com oócitos oriundos de FOPA cultivados e fecundados *in vitro* já foi possível obter embriões de ratas (DANIEL *et al.*, 1989). Os resultados mais significativos nesta área foram obtidos por CARROL *et al.* (1990), os quais obtiveram o nascimento de camundongos a partir de FOPA congelados, descongelados e cultivados *in vitro* até a ovulação, quando então seus oócitos foram maturados e fecundados *in vitro*. Em ovinos FOPA já foram cultivados até a formação de antro (CECCONI *et al.*, 1999).

A ativação do oócito ocorre com o desenvolvimento do folículo, no interior do ovário com um preciso controle físico e hormonal. No cultivo *in vitro* o oócito é submetido a uma série de injúrias que podem interferir neste processo prejudicando assim o seu desenvolvimento bem como a sua utilização para a fertilização *in vitro* no futuro (POLLARD *et al.*, 1996). Para o desenvolvimento de um sistema de cultivo de FOPA eficiente é essencial o controle de variáveis que possam afetar o crescimento folicular (temperatura,

CO<sub>2</sub>, nutrientes, fatores de crescimento, contaminações fúngicas e bacterianas) (SILVA *et al.*, 2004a).

### **c) Criopreservação de FOPA**

A criopreservação de FOPA, ou seja, a conservação por meio de baixas temperaturas, atualmente tem ganhado grande valor na biotécnica de MOIFOPA, uma vez que permite a manutenção da viabilidade folicular por um período indeterminado, quando estes folículos são estocados em nitrogênio líquido, visando a sua utilização futura.

O objetivo da criopreservação é garantir que as células permaneçam com uma baixa taxa metabólica durante o período de estocagem. Entretanto, para que isso seja possível mesmo após longos períodos de conservação, alguns fatores essenciais para a sobrevivência das células devem ser levados em consideração, tais como escolha do tipo e da concentração de agentes crioprotetores, taxa de redução da temperatura de congelação, manutenção da temperatura de estocagem, escolha do procedimento de descongelação e técnicas utilizadas para assegurar a remoção do crioprotetor (GORDON, 1994).

A criopreservação visa a desidratação da célula a fim de prevenir a formação de cristais de gelo intracelular ou minimizar os danos que eles podem causar (SHAW *et al.*, 2000), enquanto mantêm o citoplasma super resfriado até a congelação celular (FAHNING & GARCIA, 1992). Os métodos de criopreservação são classificados em congelação lenta, rápida, e vitrificação. Dentre estes métodos, a congelação lenta tem sido largamente utilizada para a conservação de oócitos bovinos (SCHELLANDER *et al.*, 1994), de camundongos (CANDY *et al.*, 1994) e humanos (OKTAY *et al.*, 1998).

Para a criopreservação faz-se necessário o uso de soluções crioprotetoras, cuja função é proteger a célula durante o período de estocagem em baixas temperaturas. Estas soluções são compostas geralmente de um ou mais crioprotetores permeáveis, aos quais se pode adicionar compostos não permeáveis que agem desidratando e moderando as mudanças osmóticas celulares (de la VEGA & WILDE, 1991). Os crioprotetores podem ser classificados em dois tipos, a saber: a) Crioprotetores permeáveis ou intracelulares; e b) Não permeáveis ou extracelulares. Os crioprotetores

permeáveis mais comumente utilizados são glicerol (GLI), dimetilsulfóxido (DMSO), propilenoglicol (PROH) e etilenoglicol (EG). Já no que diz respeito aos crioprotetores impermeáveis açúcares, como frutose e glicose são os mais freqüentemente utilizados.

Além da importância na escolha do crioprotetor mais adequado para cada criopreservação deve ser considerada também a concentração do mesmo a ser utilizada. A escolha do crioprotetor e da sua melhor concentração dependem do procedimento de criopreservação utilizado, da estrutura a ser criopreservada, bem como da espécie animal. Os crioprotetores permeáveis são substâncias de baixo peso molecular e agem penetrando intracelularmente a fim de interagir e influenciar a dinâmica dos microfilamentos e microtúbulos (DOBRINSKY, 1996). Entretanto, apesar da sua conhecida ação benéfica, deve-se considerar a toxicidade destas substâncias, que é um dos fatores limitantes para o sucesso de um protocolo de conservação, principalmente quando altas concentrações são empregadas (OKTAY et al., 1998).

O procedimento de descongelação, por sua vez, pode ser dividido em lento ou rápido. A descongelação rápida, onde a amostra é retirada do nitrogênio líquido e exposta imediatamente à temperatura ambiente ou mergulhada em banho-maria, é o procedimento mais correntemente utilizado (CARROLL *et al.*, 1991; ASADA *et al.*, 2000). Entretanto, a descongelação lenta, que geralmente utiliza equipamentos que fazem um aumento gradual da temperatura, também tem sido empregada com êxito. A escolha do procedimento de descongelação geralmente depende do protocolo de criopreservação e do crioprotetor empregado. Uma vez que a descongelação lenta utiliza mais tempo, ela seria mais prejudicial às células criopreservadas, pois permitiria que a recristalização ocorresse (MAZUR, 1984).

Os oócitos utilizados para a criopreservação podem ser imaturos (originários de folículos pré-antrais ou terciários) e maduros, oriundos de punção de folículos pré-ovulatórios ou obtidos após maturação *in vitro*. O uso da criopreservação de oócitos maduros tem sido muito limitado (PARKS & RUFFINGS, 1992). Os oócitos maduros têm sido criopreservados utilizando-se os protocolos de congelamento lento ou rápido, bem como de vitrificação. Entretanto, as taxas de fecundação e desenvolvimento *in vitro* são muito

inferiores às de oócitos não criopreservados. Apesar dos oócitos maduros serem particularmente sensíveis aos procedimentos de criopreservação, alguns progressos têm sido obtidos inicialmente com a adaptação de protocolos empregados em embriões (PARKS & RUFFINGS, 1992). Especificamente em ruminantes, a maioria dos trabalhos sobre criopreservação de oócitos maduros tem sido realizada em bovinos (FUKU *et al.*, 1992; 1995), utilizando-se, principalmente, o DMSO e o PROH, como crioprotetores em procedimentos de congelação lenta (LIM *et al.*, 1999) e rápida (SCHELLANDER *et al.*, 1994).

A criopreservação de folículos pré-antrais vem sendo considerada como uma grande alternativa para a estocagem de um grande número de oócitos imaturos obtidos a partir de um único animal. Os oócitos inclusos em folículos pré-antrais possuem várias características que os tornam menos suscetíveis a crioinjúria do que os oócitos maduros (GOSDEN *et al.*, 1994; SHAW *et al.*, 2000). Dentre elas, as mais importantes são: o menor tamanho do oócito, bem como das suas células de suporte (células da granulosa), sua baixa taxa metabólica, estágio do ciclo celular (núcleo no estado de prófase da primeira divisão meiótica), número restrito de células da granulosa, ausência de zona pelúcida e de grânulos corticais periféricos e a pequena quantidade de lipídios intracitoplasmáticos sensíveis às baixas temperaturas. Todas estas características são potencialmente benéficas para a criopreservação. Uma vez que a grande maioria dos oócitos encontra-se inclusa em folículos pré-antrais e que estes oócitos não possuem um fuso meiótico, os riscos citogenéticos são menores nas divisões subseqüentes (OKTAY *et al.*, 1998). Portanto, eles são pouco suscetíveis às aberrações cromossômicas (CANDY *et al.*, 1994) e, conseqüentemente, mais resistentes aos procedimentos de congelação. Além disso, diferentemente dos oócitos maduros, os folículos primordiais possuem tempo para reparar danos subletais nas organelas e em outras estruturas durante a sua prolongada fase de crescimento, que ocorreria durante o cultivo *in vitro*. Entretanto, ainda não há um número suficiente de experimentos nesta área para comprovar esta suposição (OKTAY *et al.*, 1998).

Os oócitos inclusos em folículos pré-antrais podem ser congelados *in situ*, isto é, no interior do próprio tecido ovariano (BAHADUR & STEELE, 1996; CANDY *et al.*, 1997) ou após isolamento (CORTVRINDT *et al.*, 1996;

JEWGENOW *et al.*, 1998). Pesquisadores têm concentrado seus esforços para a criopreservação de folículos pré-antrais *in situ*. Estes estudos têm demonstrado por análise histológica, que folículos pré-antrais presentes no tecido ovariano após a congelação e descongelação apresentam-se morfolologicamente normais (HOVATTA *et al.*, 1996; CANDY *et al.*, 1997). Rodrigue *et al.* (2004) obtiveram sucesso na criopreservação de oócitos inclusos em FOPA *in situ*, utilizando como crioprotetor o DMSO 1,5M. Desta forma, o tecido ovariano congelado contendo os folículos pré-antrais, pode ser utilizado posteriormente em transplantes.



### 3. Justificativa

---

O Vírus da Artrite Encefalite Caprina tem distribuição mundial e dissemina-se rapidamente entre os rebanhos caprinos, especialmente entre os de aptidão leiteira, ocorrendo de forma endêmica em muitas regiões. O controle da CAE é baseado na detecção e sacrifício dos animais infectados, levando a perda do seu material genético. A busca por alternativas que reduzam estas perdas tem sido uma constante. Neste contexto destaca-se o uso das biotécnicas reprodutivas como forma de maximizar o aproveitamento de animais infectados.

A biotécnica de manipulação de MOIFOPA tem como objetivo o desenvolvimento *in vitro* de milhares FOPA a partir de um ovário. Estes folículos cultivados *in vitro* e maturados, poderiam ser utilizados posteriormente em programas de Fertilização *in vitro* ou de clonagem visando posteriormente a Transferência de Embriões, contribuindo assim para multiplicação de animais de alto valor zootécnico e/ou em vias de extinção. Apesar de apresentar-se como uma biotécnica promissora, ainda não existem relatos do uso da biotécnica de MOIFOPA como mecanismo para preservar o material genético de animais persistentemente infectados e/ou que padeçam de enfermidades crônicas como a CAE. Tendo em vista a importância da caprinocultura, especialmente para o nordeste brasileiro, e o impacto causado pela infecção com o CAEV, o desenvolvimento de biotécnicas reprodutivas alternativas que visem preservar e maximizar o aproveitamento do material genético de animais infectados seria bastante útil para o controle da enfermidade. Por outro lado para que esta biotécnica possa ser utilizada com sucesso para a conservação do material genético de animais infectados é importante que seja investigada a possibilidade de infecção dos FOPA pelo CAEV.

#### 4. **Hipótese Científica**

---

Para a elaboração deste projeto foram formuladas as seguintes hipóteses científicas:

- 1) Folículos pré-antrais podem ser infectados pelo CAEV *in vivo*;
- 2) Folículos Pré-Antrais de animais naturalmente infectados com CAEV podem ser criopreservados com sucesso.

## 5. Objetivos

---

### 5.1 **Objetivo Geral:**

- Identificar o vírus da artrite encefalite caprina (CAEV) em folículos pré-antrais de cabras naturalmente infectadas.

### **.5.2 Objetivos Específicos:**

- Identificar através de sorologia cabras naturalmente infectadas com o CAEV;
- Verificar a viabilidade de uso da biotécnica de criopreservação de FOPA para a conservação do material genético de animais naturalmente infectados;
- Identificar o CAEV em tecido ovariano de cabras naturalmente infectadas.;

6. **CAPÍTULO I:**

**Artrite Encefalite Caprina em reprodutores da micro-região  
de Angicos no Estado do Rio Grande do Norte.**

### **6.1. Material e Métodos**

A área investigada compreendeu o perímetro rural produtivo dos municípios de Afonso Bezerra, Angicos e Lajes, distribuídos na Microrregião de Angicos, localizada na Mesorregião Central Potiguar no Estado do Rio Grande do Norte.

Foram pesquisadas 20 propriedades sendo coletadas amostras de 184 animais, sendo 160 fêmeas e 24 machos caprinos, todos utilizados na reprodução. A coleta de sangue foi realizada por venopunção jugular, com posterior obtenção do soro e acondicionamento a  $-20^{\circ}\text{C}$  até a realização do teste sorológico. Para a detecção de anticorpos anti-CAEV foi utilizada a técnica de Imunodifusão em Gel de Agarose (IDGA), que consiste na detecção de anticorpos pela observação de linhas de precipitação nos animais soropositivos, sendo este teste o recomendado pela Organização Internacional de Epizootias – OIE (1997). Para a realização do IDGA foi utilizado o kit comercial da BIOVETECH® (REcife-PE).

Os resultados foram apresentados em frequência absoluta e percentual das classes estudadas, conforme a característica considerada.

### **6.2. Resultados e Discussão**

Das 184 amostras, cinco (2,71%) apresentaram resultados positivos, das quais duas eram fêmeas e três machos. Os resultados superaram os obtidos por PINHEIRO *et al* (2001) no estado do Ceará, que observou uma prevalência de 1% de animais infectados. Já nos estados de Pernambuco, 17,6% (SARAIVA NETO, 1993), Minas Gerais, 33,3%, Rio de Janeiro, 29,7%, Bahia, 12,8% (ASSIS e GOUVEIA, 1994) e Goiás, 34,5% (SANTIN *et al*, 2002), a prevalência foi maior que a obtida no presente estudo.

Dos cinco animais soropositivos apenas dois apresentavam artrite e emaciação pronunciada, sintomas condizentes com os da enfermidade, sendo que os demais se apresentavam clinicamente normais. KNOWLES (1997) relata que, apesar da soroprevalência da CAE em um rebanho poder atingir 90%, a maioria dos animais infectados não desenvolve sintomatologia clínica, tendo em vista as características do próprio agente que, assim como os demais

lentivírus, produz uma enfermidade crônica e pode apresentar, ainda, um longo período de incubação.

Todas as propriedades pesquisadas visavam a produção de leite. Esses resultados diferem dos encontrados por TINÔCO (1983) no sertão da Bahia onde a maioria das propriedades tinha como objetivo a exploração de subsistência com a exploração de carne e pele. Já MAGALHÃES (1985) encontrou resultados semelhantes, aos do presente estudo, no Rio de Janeiro e em Minas Gerais, os quais verificaram que 91,7% dos criadores exploravam a venda de leite, 62,5% de reprodutores, 20,8% de animais para abate e 4,2% eram rebanhos de subsistência. A caprinocultura na Microrregião de Angicos se caracteriza por explorar em larga escala a produção de leite, encontrando na região amostrada maior parte do efetivo leiteiro. Esta situação difere de muitas áreas do Nordeste, onde a caprinocultura está mais relacionada com a subsistência, com baixa adoção de tecnologia e pouco incremento da renda, assemelhando-se mais com os criatórios das regiões Sul e Sudeste onde existe maior tecnificação na produção (SEBRAE/SINTEC, 2001).

Verificou-se ainda que na grande maioria das propriedades, adotava-se o regime de criação semi-intensivo (95%), apenas uma adotava a criação intensiva (5%) e nenhuma o extensivo, o que pode ser explicado pela dificuldade de se obter produção leiteira extensivamente no semi-árido nordestino, devido à má qualidade das pastagens. Esses dados são divergentes dos encontrados em três municípios no interior da Bahia (TINÔCO, 1983) e os de MAGALHÃES (1985), em levantamento realizado em criatórios caprinos localizados nos estados do Rio de Janeiro e Minas, onde encontrou 54,2% dos criatórios de caprinos em regime intensivo e 45,8% em regime semi-intensivo.

A exploração semi-intensiva e a finalidade dos animais amostrados são fatores preocupantes, já que podem facilitar a disseminação da enfermidade (PINHEIRO *et al*, 2004). Isto porque a transmissão horizontal pode ser potencializada em rebanhos infectados quando se aumenta a concentração de animais, uma vez que o contato íntimo aumenta também a probabilidade de transmissão do agente (NARAYAN *et al*, 1982; ZINK *et al*, 1990). Por outro lado, o fato de reprodutores apresentarem a infecção também é preocupante

porque apesar da transmissão via sêmen ainda não ter sido definitivamente comprovada o fato do CAEV já ter sido isolado no sêmen de bodes, naturalmente infectados (TRAVASSOS *et al.*, 1999; ANDRIOLI *et al.*, 1999), sendo recomendado que os reprodutores infectados sejam retirados da reprodução o que representa perda do seu potencial genético (RUSSO, 1983).

### **6.3. Conclusão**

No presente estudo ficou demonstrado que a infecção pelo CAEV está presente em reprodutores e matrizes da microrregião de Angicos o que é motivo de alerta, tendo em vista a dificuldade de controle da infecção e os prejuízos que ela pode causar. Portanto é importante que medidas, visando o controle e erradicação da enfermidade, sejam adotadas.

## **7. CAPÍTULO II:**

Criopreservação de oócitos inclusos em folículos pré-antrais de cabras naturalmente infectadas com o Vírus da Artrite Encefalite Caprina (CAEV).



## **7.1. Material e Métodos**

### **7.1.1. Origem, coleta, transporte e fragmentação dos Ovários.**

Neste experimento, foram utilizadas oito cabras mestiças, com idade de quatro a seis anos, sendo quatro soropositivas e quatro soronegativas para a infecção pelo CAEV. Os animais pertenciam ao rebanho da Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (EMBRAPA), que possui um programa de controle da CAE há mais de dez anos, com realização a cada seis meses do teste de Imunodifusão em Gel de Agarose (IDGA). Em seguida foi realizado o abate dos animais soropositivos e controles soronegativos.

A coleta dos ovários foi realizada após o abate dos animais. Em seguida, os ovários foram lavados com álcool 70% e colocados em recipientes estéreis contendo solução salina 0,9%, estreptomicina e penicilina, sendo então resfriados a 4°C, e transportados ao laboratório, em aproximadamente seis horas.

No laboratório, com o auxílio de uma lâmina de bisturi estéril os ovários foram divididos em fragmentos de aproximadamente 5 mm, quando um destes foi escolhido ao acaso e imediatamente fixado para avaliação histológica em formol (10%) por até 24h seguido de álcool 70%. Os demais fragmentos foram destinados a criopreservação ou congelados até a realização da PCR semi-nested, para identificação do DNA proviral do CAEV.

### **7.1.2. Congelamento e Descongelamento**

O congelamento foi realizado de acordo com o procedimento adotado por Rodrigues *et al* (2004), representado na figura 02. Os fragmentos ovarianos foram colocados em criotubos contendo 1,8 ml de MEM com DMSO 1,5 M a 20°C, onde foram mantidos por 20 minutos (período de equilíbrio). Em seguida estes foram transferidos para um freezer programável (Freezer control, CryoLogic Pty Ltd., Waverley, Austrália), a 20°C e resfriados a uma velocidade de 2°C/min até atingirem -7°C, quando foi realizada a indução manual da formação de cristais de gelo (*seeding*), utilizando-se uma pinça pré-resfriada em nitrogênio líquido. A temperatura foi então reduzida progressivamente numa taxa de -0,3°C/min até atingir -30°C, posteriormente a uma taxa de -0,15°C/min

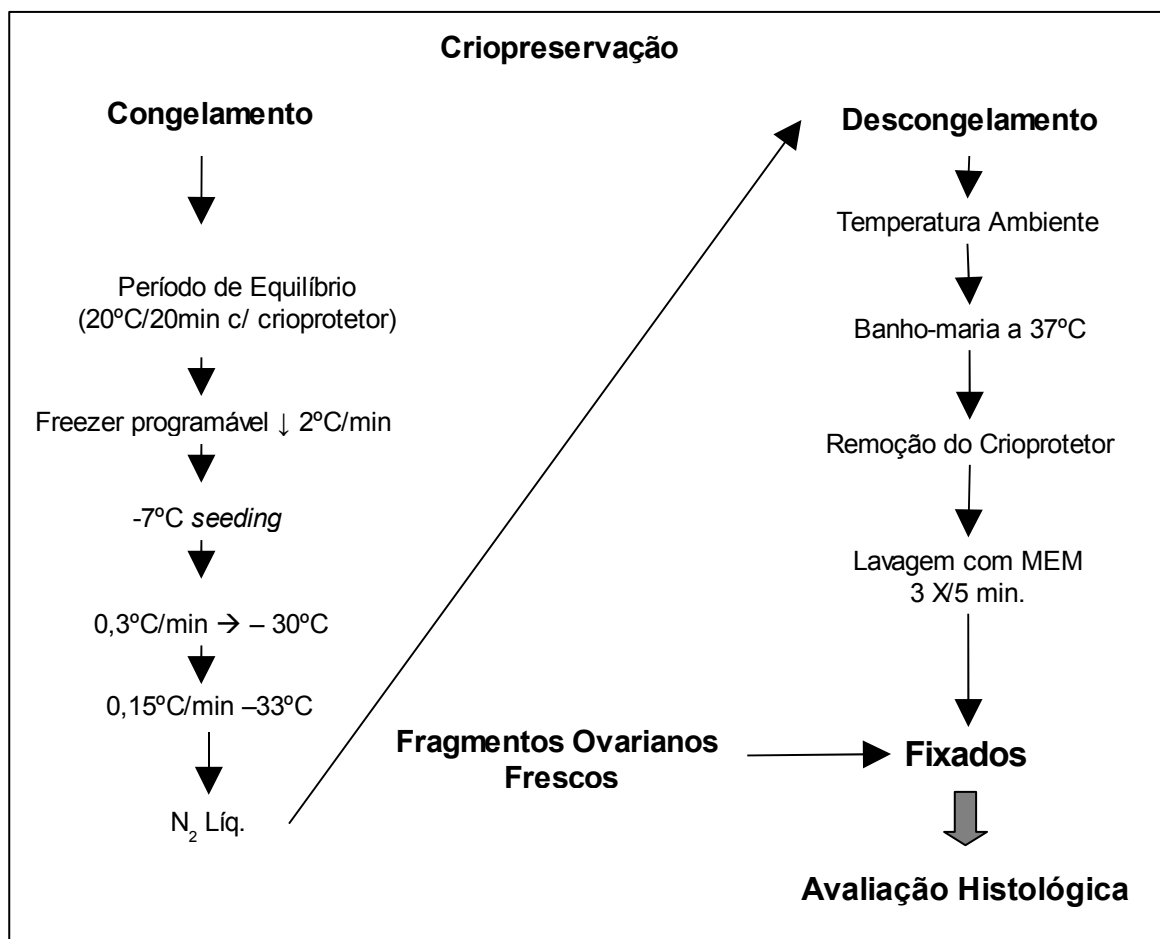
até atingir  $-33^{\circ}\text{C}$ . Os fragmentos foram então removidos do freezer e mergulhados em nitrogênio líquido a  $-196^{\circ}\text{C}$  e estocados por aproximadamente 60 dias até o descongelamento.

Para o descongelamento, os fragmentos ovarianos foram rapidamente expostos à temperatura de  $28^{\circ}\text{C}$  por um minuto e imersos em banho-maria a  $37^{\circ}\text{C}$  por três a cinco minutos, para ocorrer a sua descongelação total. Para a remoção do crioprotetor, cada fragmento foi submetido, separadamente, a três lavagens sucessivas com Meio Essencial Mínimo (MEM), realizadas a intervalos de cinco minutos. Após a remoção do crioprotetor, os fragmentos foram fixados para avaliação histológica.

### **7.1.3. Avaliação Histológica**

Para avaliação da integridade estrutural dos folículos antes e após a criopreservação, os fragmentos foram fixados em formol a 10% por pelo menos 12 horas, sendo em seguida colocados em solução de álcool a 70%. Posteriormente, os fragmentos foram desidratados, diafanizados e incluídos em blocos de parafina. Foram realizadas secções seriadas de  $7\mu\text{m}$  e cada quinta secção foi montada em lâmina e corada pelo método do ácido periódico de Schiff (PAS)-hematoxilina. Os fragmentos foram observados usando microscópio óptico com aumento de 200x ou de 400x. Trinta folículos, cujos oócitos apresentavam o núcleo evidente, de cada animal foram avaliados. Quanto ao estágio de desenvolvimento os folículos foram classificados em primordiais (com apenas uma camada de células da granulosa de formato pavimentoso), primários (uma camada de células da granulosa cúbicas) e secundários (duas ou mais camadas de células da granulosa cúbicas) (HULSHOF et al., 1994).

De acordo com a morfologia, os folículos pré-antrais foram classificados como morfologicamente normais (oócito e células da granulosa intactos sem presença de corpos picnóticos) ou degenerados. Os degenerados foram



classificados como: grau I (quando apresentavam alterações oocitárias com a presença de corpos picnóticos) e grau II (quando apresentavam núcleo do oócito picnótico e retraído e acompanhado ou não do desprendimento das células da granulosa da membrana basal) (Rodrigues *et al*, 2004a).

#### **7.1.4. Procedimento de PCR semi-nested**

A PCR semi-nested foi utilizada para selecionar ovário livres da infecção pelo CAEV. Antes da extração do DNA, para a realização da PCR semi-nested foi obtida uma suspensão celular do córtex ovariano (SCCO), seguindo o procedimento descrito por Amorim (1998). O DNA celular foi extraído mediante o uso do DNAzol (GIBCO). As células foram lisadas e centrifugadas a 14000 rpm por 10 minutos utilizando 1mL de TE (10 mM tris e 1mM EDTA) para 200  $\mu$

Figura 02 - Esquema Representativo da biotécnica de criopreservação de folículos ovarianos pré-antrais *in situ*, realizado com ovários de cabras naturalmente infectadas como o CAEV e em cabras livres da infecção.

L da SCCO. Após a centrifugação o Pellet formado foi solubilizado em 300µL de DNAzol. O sedimento de DNA obtido foi lavado com 1mL de etanol 95% por duas vezes, sendo centrifugado a cada lavagem e ressuspenso em 8 mM NaOH e estocado a -4°C, posteriormente utilizado na PCR semi-nested.

A PCR foi realizada conforme descrito anteriormente por Marchesin et al. (1998), modificada por Rutkoski et al. (2001), sendo utilizados primers degenerados específicos para um fragmento conservado do gene *gag*, situado entre as posições 962 e 1582 do clone CAEV- Co (Saltarelli *et al*, 1990). Os primers utilizados foram L3 situado entre a posição 962 a 978 com seqüência 5'-GG(A/G)GGGAGAAG(C/T)TGGAA-3'e L4 localizado entre a posição 1109-1125 de seqüência 5'-T(A/G)GC(C/T)ATGATGCCTGG-3', ambos como primers "sense" e LRT3 situado entre a posição 1566 a 1582 de seqüência 5'-ACATCCTCCAT(C/T)TT(C/T)T-3' como primer "antisense". O produto amplificado correspondeu a um fragmento de 467 pb.

Realizadas as reações de amplificação, as amostras foram analisadas por eletroforese horizontal em gel de agarose 1,5% com tampão TAE 1X, coradas com brometo de etídeo e visualizadas em luz ultravioleta.

### **7.1.5 Análise Estatística**

Para verificar possíveis variações nas porcentagens de folículos degenerados e normais, bem como entre os tipos de degeneração nos folículos pré-antrais dos animais soropositivos e soronegativos, após congelamento/descongelamento e com os respectivos controles frescos foi realizado o teste do Quiquadrado com nível de significância de 5%.

## **7.2. Resultados**

### **7.2.1. Porcentagem de folículos pré-antrais normais em ovários frescos e criopreservados em animais soropositivos e soronegativos para CAEV.**

Um total de 480 folículos ovarianos pré-antrais foram avaliados. A porcentagem de FOPA normais nos ovários frescos dos animais soronegativos e soropositivos foi de 87,5% e de 69,8%, respectivamente, estatisticamente

significante ( $p < 0,05$ ). Já com relação à porcentagem de folículos normais após a criopreservação não foi observada diferença significativa entre os animais soronegativos e soropositivos, sendo que as porcentagens de folículos normais foram de 10 e 14,2%, respectivamente.

### **7.2.2. Distribuição do grau de degeneração folicular em ovários frescos e criopreservados de animais soropositivos e soronegativos para o CAEV.**

A tabela 1 mostra a distribuição das porcentagens das degenerações de grau I e II nos diferentes grupos analisados. A porcentagem de folículos degenerados grau I e II foram menores nos ovários frescos do que nos ovários criopreservados, tanto em animais infectados quanto em não infectados ( $p < 0,05$ ). Antes da criopreservação não houve diferença entre as porcentagens das degenerações de grau I e II dentro de cada grupo sorológico ( $p < 0,05$ ). Após a criopreservação a porcentagem de degenerados grau II foi maior que de os de grau I, nos dois grupos sorológicos ( $p < 0,05$ ).

Quando comparados os animais soropositivos e soronegativos, observou-se que a porcentagem de degenerados de grau II, após a criopreservação, foi maior nos animais soronegativos. Nas demais categorias a porcentagem de folículos degenerados foi sempre maior nos animais soropositivos ( $p < 0,05$ ).

### **7.2.3. PCR semi-nested para a detecção do DNA proviral do CAEV no córtex ovariano**

Todos os ovários submetidos ao processo de criopreservação foram submetidos à PCR semi-nested para amplificação do DNA proviral do CAEV, porém não foi observado qualquer sinal de amplificação, indicando a ausência de infecção viral nos ovários pesquisados.

Tabela 1 – Porcentagem de folículos degenerados e normais antes e após a criopreservação em cabras naturalmente infectadas com o vírus da artrite encefalite caprina (CAEV+) e em cabras livres da infecção (CAEV-).

	Frescos		Criopreservados	
	CAEV -	CAEV +	CAEV -	CAEV +
Normal	87,5 <sup>ae</sup> (105)	69,8 <sup>be</sup> (84)	10 <sup>ce</sup> (12)	14,2 <sup>ce</sup> (17)
Degenerado I	7,5 <sup>af</sup> (09)	15,1 <sup>bf</sup> (18)	11,7 <sup>ae</sup> (14)	25 <sup>ce</sup> (30)
Degenerado II	5 <sup>af</sup> (06)	15,1 <sup>bf</sup> (18)	78,3 <sup>cf</sup> (94)	60,8 <sup>df</sup> (73)
Total	100	100	100	100

Diferentes letras (a, b, c, d) sobrescritas diferem significativamente dentro da mesma linha.  
Diferentes letras (e, f) sobrescritas diferem significativamente dentro da mesma coluna.

### **7.3. Discussão**

No presente estudo foi realizada pela primeira vez a criopreservação de oócitos inclusos em folículos pré-antrais de cabras naturalmente infectadas com o CAEV. Na análise histológica, os folículos pré-antrais dos animais infectados apresentaram morfologia similar à dos animais livres da infecção antes e após o congelamento. A taxa de degeneração dos FOPA foi superior nos animais infectados antes da criopreservação ( $p < 0,05$ ). Em contraste, após o processo de congelamento/descongelamento, não foi verificada diferença entre as taxas de degeneração dos FOPA de animais infectados e não-infectados.

A taxa de degeneração observada em animais infectados (30,2%) foi superior às observadas em estudos anteriores (Silva et al., 2002; Carvalho et al., 2001; Costa et al., 2005), diferentemente dos animais livres da infecção que apresentaram valores similares. Isto pode ter sido provocado pelas próprias características da infecção, uma vez que o CAEV causa uma infecção crônica que pode afetar o metabolismo normal do animal, levando a perda de peso e desequilíbrio no balanço energético (Greenwood, 1995). Apesar do DNA proviral não ter sido detectado no córtex ovariano as mudanças sistêmicas provocadas pela enfermidade podem reduzir o aporte nutricional ao tecido ovariano com conseqüente aumento da degeneração dos FOPA.

As porcentagens de folículos normais após a criopreservação obtidos no presente estudo 10 e 14,2%, para animais soropositivos e soronegativos, respectivamente, foram inferiores às porcentagens obtidas por Rodrigues et al. (2004a), que utilizando como crioprotetor o DMSO 1,5M e a mesma curva de congelação, obtiveram uma porcentagem de folículos normais de 26%. No presente trabalho, os ovários foram conservados a 4°C por seis horas, período de transporte do local de abate ao laboratório, o que pode ter influenciado a qualidade dos folículos aumentando a sua susceptibilidade aos danos causados pelo crioprotetor e pelo próprio processo de criopreservação. Apesar de trabalhos anteriores indicarem que folículos pré-antrais caprinos podem manter sua integridade estrutural e ultra-estrutural por até 24 h quando conservados em solução salina a 4°C (Carvalho et al, 2001; Costa et al, 2005), ainda não existem pesquisas sobre o comportamento destes folículos quando submetidos ao processo de criopreservação.

A porcentagem de folículos normais após a criopreservação foi similar nos animais soropositivos e soronegativos (14,2 e 10%, respectivamente), o que indica a viabilidade da criopreservação de oócitos inclusos em FOPA de animais naturalmente infectados pelo CAEV.

Quando comparados com os ovários frescos, a porcentagem de folículos degenerados foi maior após a criopreservação, o que também foi observado em estudos anteriores tanto na espécie caprina quanto em outras espécies animais (Rodrigues et al, 2004; Santos et al 2005; Lima et al, 2006). O aumento na degeneração dos folículos pré-antrais pode ter sido provocada tanto por crioinjúrias durante o processo de criopreservação ou no descongelamento, quanto pelo efeito tóxico do crioprotetor que pode provocar desequilíbrio osmótico podendo causar danos no oócito e nas células da granulosa (Sugimoto et al, 1996; Rodrigues et al, 2004b).

Com relação às degenerações de grau I e II, estas aumentaram após a criopreservação, não tendo sido observada diferença significativa ( $p < 0,05$ ) entre estes dois graus de degeneração nos ovários frescos dentro de cada grupo sorológico (soropositivos ou soronegativos). Em contraste a porcentagem de folículos degenerados de grau II foi maior após o descongelamento, indicando que durante a criopreservação tanto células da granulosa quanto o oócito sofreram danos estruturais,

o que já havia sido observado em trabalhos anteriores tanto com caprinos (Rodrigues et al, 2004a; Rodrigues et al, 2004b) quanto em ovinos (Santos et al, 2005), felinos (Lima et al, 2006) e bovinos (Paynter et al, 1999).

O DNA proviral do CAEV não foi detectado nos ovários utilizados no presente estudo. *In vivo* o CAEV tem como células alvo monócitos e macrófagos (Narayan & Clements, 1989), porém o vírus já foi identificado em outros tecidos. No trato reprodutivo, o seu DNA proviral foi identificado no útero, oviduto e no meio de lavagem uterina de animais naturalmente infectados (Andrioli, 2001, Fieni et al., 2002). O CAEV é capaz de infectar células ovarianas *in vivo*, porém esta infecção não é observada em todos os animais acometidos pela enfermidade (Fieni et al, 2003; Ali Al Ahmad et al, 2005).

Ali Al Ahmad et al (2005) descreveram a infecção pelo CAEV em células do *cumulus oophorus* de cabras naturalmente infectadas, porém não identificaram o CAEV nos oócitos destes animais, o que demonstra uma possível resistência do oócito à infecção pelo CAEV. Em ovinos, Cortez Romero et al (2006) também observaram que células do *cumulus oophorus* de animais naturalmente infectados com o Maedi Visna Vírus (MVV), que apresenta uma estreita correlação genética com o CAEV, são susceptíveis à infecção *in vivo*, porém o vírus não foi identificado no oócito nem no fluido folicular destes animais. A resistência dos oócitos à infecção indica a possibilidade do uso de técnicas reprodutivas, como a maturação e fertilização *in vitro* dos oócitos e implantação dos embriões em animais livres da infecção, para a obtenção de crias livres do vírus a partir de mães infectadas. Isto poderia propiciar uma alternativa de controle para as lentiviroses de pequenos ruminantes e de conservação do material genético das fêmeas portadoras da infecção (Ali Al ahmad et al, 2005; Cortez Romero et al, 2006).

A criopreservação de oócitos inclusos em FOPA constitui uma alternativa promissora para a conservação do material genético de cabras infectadas com o CAEV, uma vez que pesquisas já demonstraram que FOPA criopreservados apresentam-se viáveis conservando a sua capacidade de crescimento *in vitro* em caprinos (Rodrigues et al, 2005) e ovinos (Cecconi et al., 2004). O que no futuro permitiria a maturação destes oócitos e o seu conseqüente uso em outras técnicas reprodutivas como a



fertilização *in vitro* poderia permitir a obtenção de crias livres da infecção. No entanto em se tratando de animais portadores de infecção persistente é fundamental a comprovação de que o agente viral não esteja presente no tecido criopreservado, o que pode ser feito pelo uso de técnicas moleculares para detecção do material genético do CAEV no tecido ovariano.

#### **7.4. Conclusão**

No presente estudo foi demonstrado pela primeira vez a viabilidade de criopreservação de oócitos inclusos em folículos pré-antrais de cabras naturalmente infectadas com o CAEV, indicando que esta biotécnica constitui-se numa potencial alternativa para a conservação do material genético de animais portadores de infecções persistentes.

**Capítulo III:**

Identificação do Vírus da Artrite Encefalite Caprina (CAEV) no tecido ovariano de cabras naturalmente infectadas

## **8.1. MATERIAL E MÉTODOS**

### **8.1.1. Origem dos animais**

Foram utilizadas no experimento 18 ovários de nove cabras das raças saanen (03), pardo alpina (03) e anglo-nubiana (03), com idade de quatro a seis anos, sendo cinco soropositivas e quatro soronegativas para a infecção pelo CAEV. Os animais pertenciam ao rebanho da Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (EMBRAPA-CAPRINOS), que possui um programa de controle voluntário da CAE há mais de dez anos, com realização de sorologia semestral e descarte dos animais soropositivos.

### **8.1.2. Coleta e transporte dos ovários**

Os ovários foram coletados após o abate dos animais. Em seguida foram lavados com álcool 70% (10s). Após a lavagem, foram colocados em tubos Falcon (50 mL) contendo solução salina (0,9%) adicionada dos antibióticos penicilina (100µg/mL) e estreptomicina (100µg/mL), e transportados ao laboratório resfriados a 4°C, em aproximadamente seis horas. No laboratório foi retirado um fragmento que foi imediatamente fixado para avaliação histológica e realização da imunohistoquímica.

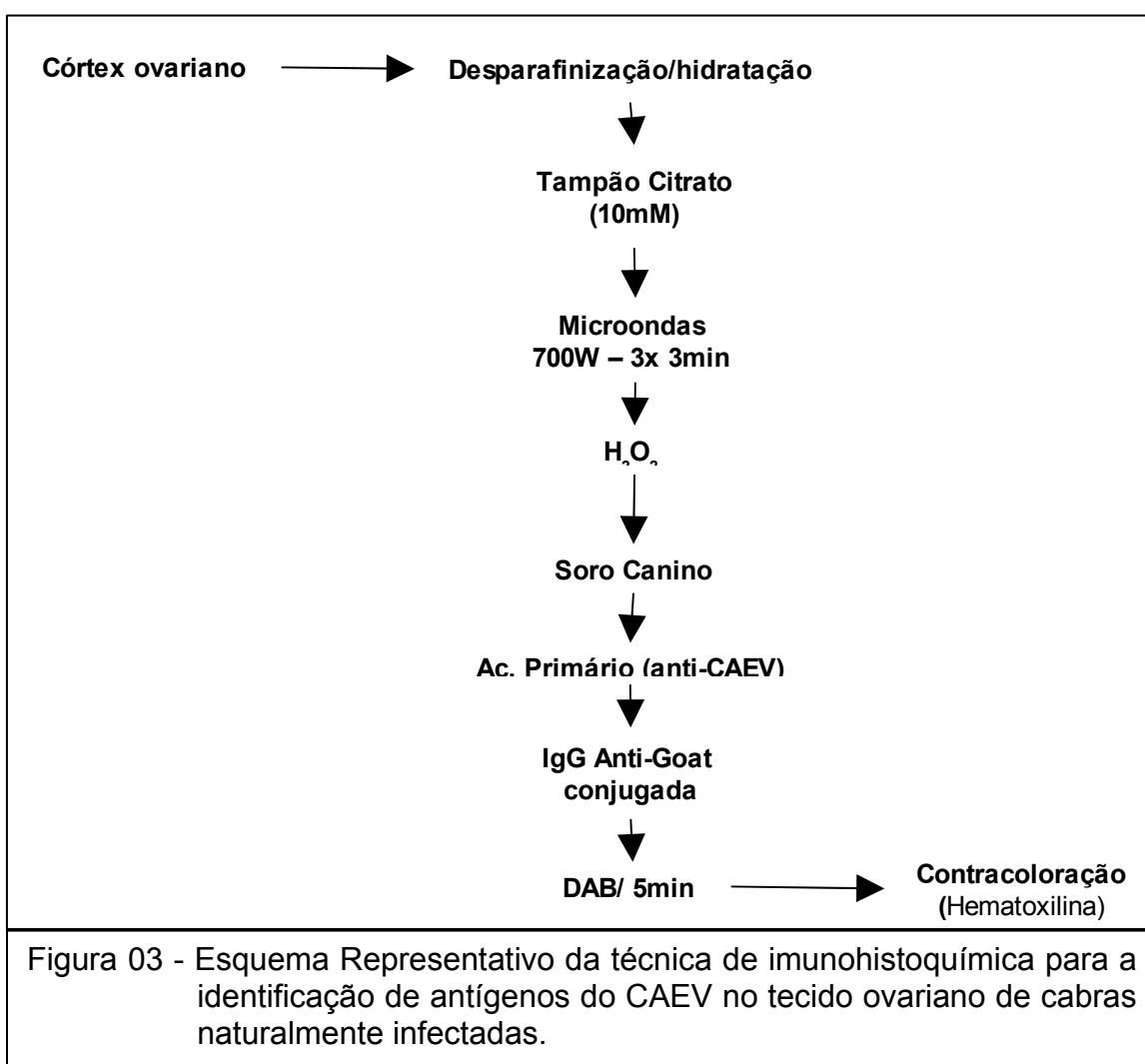
### **8.1.3. Avaliação Histológica**

Para a análise histológica, os fragmentos ovarianos foram fixados em formol a 10% por no mínimo 12 horas, e posteriormente colocados em solução de etanol a 70%. Os fragmentos foram em seguida desidratados em diferentes concentrações de etanol, tratados com xilol e emblocados em parafina. O tecido ovariano foi seccionado a uma espessura de 7µm e corado com Ácido Periódico de Schiff-hematoxilina (PAS-hematoxilina) (Lucci *et al*, 1999), para posteriormente ser observado em microscópio óptico.

### **8.1.4. Imunohistoquímica**

Para a imunohistoquímica foi utilizada a metodologia descrita por Araújo *et al*. (2004) modificada (Figura 03), onde secções (7µm) foram desparafinizadas, rehidratadas e incubadas em tampão citrato 10mM (pH 6,0) no microondas, potência máxima (700 watts), por três ciclos de três minutos para recuperação de antígenos. A

atividade da peroxidase endógena foi bloqueada com peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ) 3% em metanol com duas trocas de cinco minutos cada. As ligações inespecíficas foram bloqueadas pela incubação das amostras por 20 minutos em soro canino. As secções foram tratadas com soro positivo específico para CAEV (IgG anti-CAEV) por 18h a 4°C, lavadas em PBS e incubadas com IgG anti-IgG caprina conjugada a peroxidase (Sigma Chemical Co) por 30 minutos a 37°C a uma diluição de 1:500. A reação foi revelada pela adição do diaminobenzidine (DAB) (Sigma Chemical Co) por 5 minutos. As lâminas foram contracoloradas com Hematoxilina de Harris por 1 minuto, montadas e analisadas em microscópio óptico.



### **8.1.5. Procedimento de PCR semi-nested**

Antes da extração do DNA, para a realização da PCR semi-nested foi obtida uma suspensão celular do córtex ovariano (SCCO), seguindo o procedimento descrito por Amorim (1998). O DNA celular foi extraído mediante o uso do DNAzol (GIBCO). As células foram lisadas e centrifugadas a 14000rpm por 10 minutos utilizando 1mL de TE (10mM tris e 1mM EDTA) para 200µL da SCCO. Após a centrifugação o Pellet formado foi solubilizado em 300µL de DNAzol. O sedimento de DNA obtido foi lavado com 1mL de etanol 95% por duas vezes, sendo centrifugado a cada lavagem e ressuspenso em 8mM NaOH e estocado a -4°C, posteriormente utilizado na PCR semi-nested.

A PCR foi realizada conforme descrito anteriormente por Marchesin et al., 1998, modificada por Rutkoski et al., (2001), sendo utilizados primers degenerados específicos para um fragmento conservado do gene *gag*, situado entre as posições 962 e 1582 do clone CAEV- Co (Saltarelli *et al*, 1990), que codifica parte da proteína p28 do capsídeo. Os primers utilizados foram L3 situado entre a posição 962 a 978 com seqüência 5'-GG(A/G)GGGAGAAG(C/T)TGGAA-3'e L4 localizado entre a posição 1109-1125 de seqüência 5'-T(A/G)GC(C/T)ATGATGCCTGG-3' , ambos como primers "sense" e LRT3 situado entre a posição 1566 a 1582 de seqüência 5'-ACATCCTTCAT(C/T)TT(C/T)T-3' como primer "antisense". O produto amplificado correspondeu a um fragmento de 467 pb.

Realizadas as reações de amplificação, as amostras foram analisadas por eletroforese horizontal em gel de agarose 1.5% com tampão TAE 1X, coradas com brometo de etídeo e visualizadas em luz ultravioleta.

### **8.2. Resultados e Discussão**

O presente estudo teve por objetivo identificar o CAEV no tecido ovariano de cabras naturalmente infectadas. Para tanto foi utilizada a técnica de imunohistoquímica, para a identificação de antígenos do vírus no tecido ovariano e a técnica de PCR semi-nested, para verificar a presença do DNA proviral do CAEV no genoma das células ovarianas.

Na técnica da PCR semi-nested foram consideradas positivas aquelas amostras onde foi observada a amplificação do DNA proviral com formação de um fragmento com 467 pb, correspondente ao resultado esperado pelos primers utilizados. Quando esta técnica foi empregada o DNA proviral foi identificado em 4/18 amostras de córtex avaliadas (Tab. 1), todas de animais sorologicamente positivos para o CAEV. Nenhum dos animais soronegativos resultaram em reação positiva pela PCR-Nested.

O uso da técnica de PCR para a detecção de DNA-proviral do CAEV em células de animais naturalmente infectados foi relatada pela primeira vez por Reddy et al. (1993), em células mononucleares do sangue periférico, células do leite e no líquido sinovial. Desde então modificações da técnica vêm sendo utilizadas na detecção do DNA em diferentes tecidos de animais naturalmente infectados. No trato reprodutivo, o DNA proviral já foi detectado em ovidutos, útero e meios de lavagem para coleta de embriões (Andrioli, 2001; Fieni et al., 2002). Recentemente o DNA proviral também foi detectado em 47,1% dos ovários de cabras de abatedouro na França, sendo o DNA proviral encontrado especialmente em células do *cumulus oophorus* (Ali Al Ahmad et al., 2005). No presente estudo foram utilizados ovários de cabras com sorologia conhecida pertencentes a um rebanho que pratica um programa de controle da CAE, através da sorologia semestral e eliminação dos animais positivos, há mais de dez anos e que mesmo assim ainda apresenta soroconversão. Diante disso levanta-se a hipótese de que outras vias de transmissão, bem como de manutenção do vírus no rebanho estejam presentes, podendo este tecido ovariano infectado funcionar como reservatório do agente.

Por outro lado, Frota et al. (2005) identificaram que 76,08% dos cabritos no primeiro ano de vida, filhos ou netos de animais soropositivos para o CAEV, possuíam o DNA-proviral em células mononucleares do sangue periférico, porém foram negativos ao teste de imunodifusão em gel de agarose (IDGA). Este fato indica a possibilidade de outras formas de transmissão vertical do agente. Neste contexto, a infecção de gametas ainda no ovário poderia levar ao nascimento de crias tolerantes aos antígenos do vírus, embora os estudos de Ali Al Ahmad et al., (2005) tenham indicado que apenas células da granulosa são infectadas, permanecendo os oócitos livres da infecção. É importante ressaltar que estes autores pesquisaram apenas folículos pré-ovulatórios,

que possuem a zona pelúcida completamente formada, sendo que esta é capaz de proteger contra a infecção pelo CAEV (Lamara et al., 2002). Em folículos pré-antrais a zona pelúcida não está completamente formada, portanto estes poderiam ter seus oócitos infectados pelo agente.

Esta infecção do tecido ovariano pelo CAEV pode ter importante papel na etiopatogenia da enfermidade. Uma vez que este tecido pode atuar como uma reserva de partículas virais em animais com infecção subclínica, além de existir a possibilidade de infecção dos gametas femininos antes da fecundação.

Na imunohistoquímica não foram observadas reações positivas para a presença do agente em nenhum dos ovários analisados. Isto pode ter sido provocado pela capacidade dos lentivírus de integrarem o seu DNA proviral ao genoma da célula sem que haja expressão de suas proteínas (Chebloune et al., 1996). Este fato pode diminuir a sensibilidade da técnica, uma vez que esta detecta a presença de antígenos virais nos tecidos infectados. Estudos *in vitro* demonstraram que o CAEV não se replica de forma produtiva em fibroblastos apesar de ser possível isolá-lo destas células em co-cultivos com células da membrana sinovial caprina (Chebloune et al., 1996). Tendo em vista o fato do tecido ovariano apresentar-se rico em fibroblastos, esta não expressão protéica do CAEV pode ter ocorrido *in vivo* levando aos resultados negativos observados.

De acordo com Storset et al. (1997), a técnica de imunohistoquímica pode ser utilizada como a auxiliar no estudo da etiopatogenia da infecção pelo CAEV, porém resultados negativos, especialmente em animais assintomáticos, devem ser avaliados com cuidado, uma vez que este agente é mais comumente encontrado em macrófagos presentes em tecidos com reação inflamatória evidente.

O CAEV já foi identificado pela imunohistoquímica em outros órgãos como pulmão, cérebro, medula espinhal e medula óssea (Storset et al., 1997; Grossi et al., 2005), de animais naturalmente infectados. De acordo com estes autores esta detecção se deve a replicação de forma ativa do vírus nestes tecidos ou em células inflamatórias, especialmente macrófagos, presentes nos mesmos. No presente estudo não foram observadas alterações histopatológicas nos ovários analisados, o que pode ter contribuído para não detecção de antígenos virais nos mesmos.

Tabela 1 - Presença do DNA-proviral do vírus da artrite encefalite caprina (CAEV) em ovários de cabras naturalmente infectadas, pertencentes a rebanho com programa de controle da infecção.

	<i>Ovários de cabras Soropositivas (%)</i>	<i>Ovários de Cabras Soronegativas (%)</i>	<i>Total</i>
PCR positivo	04 (40)	00 (0)	04 (22,2)
PCR negativo	06 (60)	08 (100)	14 (87,2)
Total	10	08	18

### **8.3. Conclusão**

Neste trabalho ficou evidente que o CAEV infecta células do córtex ovariano *in vivo*, embora esta infecção pareça ocorrer de forma improdutiva, uma vez que, apesar do DNA proviral estar presente neste tecido, não foi possível a identificação de antígenos virais nas células do córtex.



## 9. CAPÍTULO IV

Identificação molecular do provírus da Artrite Encefalite Caprina (CAEV) em folículos ovarianos pré-antrais de cabras naturalmente infectadas.

## **9.1 MATERIAL E MÉTODOS**

### **9.1.1. Seleção de animais**

Foram selecionadas nove cabras das raças saanen, pardo alpina e anglo-nubiana com idade entre quatro e seis anos, sendo cinco naturalmente infectadas e quatro livres da infecção pelo CAEV. Para detecção de anticorpos contra o CAEV foi utilizada a técnica de imunodifusão em gel de ágar (IDGA) utilizando antígeno comercial (Kit - Veterinary Diagnostic Technology, Inc®,USA). Os animais soronegativos apresentavam pelo menos os três últimos testes de IDGA negativos, intervalados de seis meses. Os animais pertenciam ao rebanho da Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (EMBRAPA), que possui um programa de controle da CAE há mais de dez anos, com sorologia semestral e separação dos animais positivos.

### **9.1.2. Coleta, Transporte dos Ovários.**

Os ovários foram coletados após o abate dos animais. Os tecidos adjacentes foram imediatamente retirados, o ovário lavado em álcool 70% (10s) e duas vezes em solução salina (0,9%). Os ovários foram então colocados separadamente em tubos estéreis contendo 20 ml solução salina 0,9%, acrescida de penicilina (100µg/mL) e estreptomicina (100µg/mL) e resfriados a 4°C.

### **9.1.3. Preparo de Tecidos para a PCR semi-nested**

No laboratório, os ovários tiveram os tecidos circundantes e ligamentos retirados, foram cortados ao meio e em seguida tiveram a medula, os grandes folículos antrais e corpos lúteos removidos. O córtex ovariano foi então seccionado para a obtenção dos FOPA isolados e de uma suspensão de células do córtex (SCC) que foram destinadas à realização da PCR semi-nested.

O isolamento dos folículos ovarianos foi realizado utilizando a técnica descrita por Amorim et al. (2000), com modificações. Foi realizada a fragmentação do córtex ovariano utilizando o Tissue Chopper (The Mickle Laboratory Engineering Co., Gomshal, Surrey, UK) ajustado para a realização de secções seriadas a intervalos de 50 µm. Os fragmentos ovarianos foram então colocados em Meio Essencial Mínimo (MEM) com 10% de soro fetal bovino (SFB). Em seguida foi realizada a dissociação

mecânica utilizando pipetas pasteur de 600 µm de diâmetro, e filtração utilizando malhas de 500 e 100 µm, respectivamente, sendo obtida uma suspensão de células do córtex ovariano (SCCO).

Um total de 26 amostras foram submetidas à PCR semi-nested para a identificação do DNA proviral do CAEV, sendo 17 de SCCO e nove de FOPA.

#### **9.1.4. Procedimento de PCR semi-nested**

O DNA celular foi extraído mediante o uso do DNAzol (GIBCO). As células foram lisadas e centrifugadas a 14000rpm por 10 minutos utilizando 1mL de TE (10mM tris e 1mM EDTA) para 200µL da SCCO, para o pool de FOPA isolados estes folículos foram sedimentados por centrifugação e o pellet formado foi diluído em 200µL de MEM. Após a centrifugação o pellet formado foi solubilizado em 300µL de DNAzol. O sedimento de DNA obtido foi lavado com 1mL de etanol 95% por duas vezes, sendo centrifugado a cada lavagem e ressuspenso em 8mM NaOH e estocado a -4°C, para posterior utilização na PCR semi-nested.

Foram utilizados primers degenerados específicos para um fragmento conservado do gene *gag*, situado entre as posições 962 e 1582 do clone CAEV-Co.(Saltarelli *et al*, 1990), que codifica parte da proteína p27 do capsídeo. Os primers foram L3 situado entre a posição 962 a 978 com seqüência 5'-GG (A/G)GGGAGAAG(C/T)TGGAA-3'e L4 localizado entre a posição 1109-1125 de seqüência 5'-T(A/G)GC(C/T)ATGATGCCTGG-3' , ambos como primers "sense" e LRT3 situado entre a posição 1566 a 1582 de seqüência 5'-ACATCCTTCAT(C/T)TT(C/T)T-3' como primer "antisense" (Rutkoski *et al*, 2001).

Foi realizada a PCR-nested com o produto amplificado correspondendo a um fragmento de 467 pb. A PCR foi realizada conforme descrito anteriormente por Rutkoski *et al*, (2001).

Realizadas as reações de amplificação, as amostras foram analisadas por eletroforese horizontal em gel de agarose 1.5% com tampão TAE 1X, coradas com brometo de etídeo e visualizadas em luz ultravioleta.

## **9.2. Resultados**

Foram consideradas positivas aquelas amostras onde foi observada a amplificação do DNA proviral com formação de um fragmento com 467 pb, correspondente ao resultado esperado pelos primers utilizados.

Um total de 26 amostras foram submetidas à PCR semi-nested para detecção de DNA proviral do CAEV, sendo 17 de córtex ovariano e nove de pool de FOPA. Das 17 amostras de córtex ovariano duas apresentaram reação positiva para a PCR semi-nested. Ambas as amostras positivas eram de animais sorologicamente positivos.

Com a técnica de isolamento folicular empregada foi obtida uma média de 100 FOPA por ovário, num total de aproximadamente 900 folículos analisados. Estes foram agrupados num pool por ovário, totalizando nove amostras do pool de FOPA submetidas à PCR semi-nested. Em duas foi detectado o DNA proviral, as duas eram de animais com sorologia positiva, porém que tinham apresentado resultado negativo na PCR semi-nested do córtex ovariano. Nenhum animal soronegativo apresentou qualquer sinal de amplificação de DNA proviral na PCR-Nested (Tabela-1).

## **9.3. Discussão**

O principal objetivo deste estudo foi identificar o DNA proviral do CAEV em folículos ovarianos pré-antrais de cabras naturalmente infectadas através do uso da PCR semi-nested, demonstrando pela primeira vez que FOPA de cabras naturalmente infectadas podem ser infectados pelo CAEV.

A discordância entre os resultados das amostras de córtex e de folículos pré-antrais, pode ser explicada pelo grande número de células presente na SCCO, o que pode diminuir a sensibilidade da reação pelo reduzido número de cópias de DNA proviral presente na amostra (Kuzmak et al. 2003).

Com os resultados obtidos ficou evidente que células de folículos pré-antrais de cabras naturalmente infectadas podem apresentar o DNA proviral do CAEV em seu genoma, porém este trabalho não foi capaz de determinar quais células são infectadas pelo vírus. O ovário mamífero é um órgão complexo composto de vários tipos celulares que incluem oócitos, células da granulosa, da teca, do estroma e do epitélio da superfície ovariana (Hirshifield, 1991). Por outro lado células epiteliais e fibroblastos que

estão presentes em grande quantidade no córtex ovariano são susceptíveis *in vitro* e *in vivo* à infecção pelo CAEV (Chebloune et al., 1996; Mselli-Lakhal et al., 1999; Lamara et al., 2001), podendo estas células ser as responsáveis pelos resultados obtidos.

*In vivo* o CAEV tem como células alvo monócitos e macrófagos (Narayan & Clements, 1989), porém o vírus já foi identificado em outros tecidos. No trato reprodutivo o seu DNA proviral foi identificado no útero, oviduto e no meio de lavagem uterina de animais naturalmente infectados (Andrioli, 2001; Fieni et al., 2002). Recentemente, Ali Al Ahamad et al. (2005) descreveram que o CAEV infecta células do *cumulus oophorus* de folículos pré-ovulatórios, porém os ócitos deste estágio folicular parecem resistentes à infecção. Oócitos inclusos em Folículos pré-ovulatórios apresentam a zona pelúcida (zp) completamente formada ao redor do oócito, o que pode protegê-los da infecção pelo CAEV, já que o vírus não é capaz de ultrapassar a barreira da zp (Lamara et al., 2002), mas é capaz de infectar células da granulosa (Lamara et al., 2001). Por outro lado folículos em estágio iniciais de desenvolvimento ainda não possuem a zp completamente formada. Desta forma o oócito estaria susceptível à infecção pelo CAEV.

A presença de vírus infectando oócitos já foi descrita em outras espécies (Kattstrom et al., 1989; Fray et al., 1998). Em bovinos, Fray et al. (1998) demonstraram que o vírus da diarréia viral bovina (BVDV) infecta oócitos inclusos em folículos pré-antrais de forma ativa, podendo este fato apresentar relação com o nascimento de animais persistentemente infectados com o BVDV. Em bovinos já foi demonstrado que os lentivírus têm capacidade de expressar suas proteínas em oócitos, inclusive com produção de crias transgênicas a partir de oócitos infectados com injeções subzonais de lentivírus geneticamente modificados (Hofmann et al., 2004). O metabolismo ativo dos oócitos, a ausência da zona pelúcida e o contato direto com as células da granulosa e os elementos do estroma ovariano, tornam os oócitos inclusos em FOPA potencialmente susceptíveis à infecção por patógenos virais. Sendo assim uma vez infectados estes oócitos poderiam carrear este material genético até o momento da fecundação com conseqüente produção de crias infectadas.

#### **9.4. Conclusão**

Cabras naturalmente infectadas com o CAEV apresentam o DNA proviral do vírus em folículos pré-antrais. A presença do CAEV em FOPA pode representar um risco para a infecção do oócito já que neste estágio folicular a zp ainda não está completamente formada podendo o vírus ter contato direto com a membrana oocitária.

8. **Conclusões Gerais**

- ✓ A artrite encefalite caprina está presente na região de angicos maior bacia leiteira do Rio Grande do Norte infectando;
- ✓ O CAEV pode infectar o córtex ovariano de cabras naturalmente infectadas, inclusive folículos pré-antrais de cabras naturalmente infectadas;
- ✓ Oócitos inclusos em Folículos pré-antrais de cabras naturalmente infectadas com o CAEV podem ser criopreservados com sucesso.

## **9. Perspectivas**

Com os resultados obtidos no presente trabalho é possível formular as seguintes perspectivas:

- a) Verificar quais células dos folículos pré-antrais (oócitos ou células da granulosa) são susceptíveis à infecção pelo CAEV;
- b) Verificar se a ausência da ZP torna os oócitos caprinos susceptíveis à ação do CAEV;
- c) Verificar a possibilidade de utilização da biotécnica de MOIFOPA como uma alternativa para a conservação e utilização do material genético de cabras naturalmente infectadas com o CAEV.



## 12. Referências Bibliográficas

---

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

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

AMORIM, C. A. Estudo da população de folículos ovarianos pré-antrais ovinos: desenvolvimento de uma nova biotécnica para o isolamento e caracterização folicular. Universidade Estadual do Ceará, Fortaleza.74 p (Dissertação de Mestrado) 1998.

AMORIM, C. A., RODRIGUES, A. P. R., Lucci, C. M., FIGUEIREDO, J. R., GONÇALVES, P. B. D. Effect of sectioning on the number of isolated ovine preantral follicles. *Small Ruminant Research* v. 37, p. 269-277, 2000.

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

ASADA M, HORRI M, MOGO T, FUKUI Y, ISHIKAWA H, OHSUMI S. In vitro maturation and ultrastructural observation of cryopreserved minke whale (*Balaenoptera acutorostrata*). *Biol. Reprod.*, v. 62, p.253-259, 2000.

ASSIS, A. P. M. V.; GOUVEIA, A. M. Evidências sorológicas de lentivírus (*maedi-visna*/artrite encefalite caprina) em rebanhos nos estados de Minas Gerais, Rio de

Janeiro, Bahia e Ceará. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE MEDICINA VETERINÁRIA, 23., Olinda: Spemve, 1994. **Anais...** Olinda, 1994. p. 104.

BAHADUR G, STTELE SJ. Ovarian tissue cryopreservation for patients. *Hum. Reprod.*, v. 11, p. 2215-2216, 1996.

BAIRD, D.T.,WEBB, R., CAMPBEL, B.K., HARKNEWS, L.M., GOSDEN, R.G. Long-term ovarian function in sheep after ovariectomy and transplantation of autografts stored at  $-196^{\circ}\text{C}$ . **Endocrinology**, v.140, p.462–471, 1999.

BARROS-FILHO, I. R et al. Hemograma de cabras soropositivas e soronegativas para o vírus da artrite-encefalite caprina. **Arq. Ciên. Vet. Zool. UNIPAR**, v. 6, n. 1, p. 67-70, 2003.

BEARDEN, H. J. & FUQUAY, J. W. Applied Animal Reproduction.4<sup>a</sup> ed. Prentice Hall. 351p. 1997

BECKERS, J. F., DRION, P. V., FIGUEIREDO, J. R., GOFFIN, L., PIROTTIN, D., ECTORS, F. J. The ovarian follicles in cow: *In vivo* growth and *in vitro* culture. *Reprod. Dom. Anim.*, v.31, p.543-548, 1996.

BEZERRA, M. B., RONDINA, D., OLIVEIRA, L. C., LIMA, A. K. F., CECCHI, R., LUCCI, C. M., GIOGERTTI, A., FIGUEIREDO, J. R. Aspectos quantitativos e qualitativos da foliculogênese na fase pré-natal na espécie caprina. *Ciência Animal* v. 8 p. 47-56. 1998.

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

BRASILEIRO FILHO, G., PEREIRA, F.E.L., PITTELLA, J.E.H., BAMBIRRA, E.A., BARBOSA, A.J.A. *Bogliolo Patologia Geral*. Guanabara-Koogan, Rio de Janeiro, 220p., 1993.

BRODIE, S. J.; PEARSON, L. D.; SNOWDER, G. D.; DeMARTINI, J. C. Host-virus interation as defined by amplification of viral DNA and serology in lentivirus-infected sheep. **Archives of Virology**, Austria, v.130, p.413-428, 1992.

BRODIE, S., PEARSON, L., ZINK, M. et al. Ovine lentivirus expression and disease. Virus replication, bu no entry, is restricted to macrophages of especific tissues. **Amer. Journal of Pathology**, v.146, p. 250-263, 1995.

BROOKS, G. F.; BUTEL, J. S.; ORNSTON, L. N.; JAWETZ, E.; MELNICK, J. L.; ADELBERG, E. A. **Microbiologia médica**. 20 ed, Guanabara Koogan, Rio de Janeiro, 525p., 1998.

BUREAU, M., DEA, S., SIRARD, M. A. Evaluation of virus decontamination techniques for porcine embryos produced in vitro. **Theriogenology**, v. 63, p. 2343–2355, 2005.

CAHILL, L. P., MARIANA, J. C., MAULÉON, P. Total follicular populations in ewes of high and low ovulation rates. **Journal of Reproduction and Fertility** v. 55 p. 27-36. 1979.

CAHILL, L. P., MAULÉON, P. A study of the population of primordial and small follicles in the sheep. **Journal of Reproduction and Fertility**. v. 61 p. 201-206. 1981.

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

CANDY CJ, WOOD MJ, WHITTINGHAM DG, MERRIMAN JA, CHOUDHURY NC. Cryopreservation of immature mouse oocytes. **Hum. Reprod.**, v.9, p. 1738-1742, 1994.

CANDY CJ, WOOD MJ, WHITTINGHAM DG. Effect of cryoprotectants on the survival of follicles in frozen mouse ovaries. *J. Reprod Fert.*, v. 110, p. 11-19, 1997.

CAPUCCHIO, M. T.; SANNA, E.; SANNA, M. P.; FARIGU, S.; MINELLI, R.; GUARDA, F. Maedi-Visna Virus detection in ovine third eyelids. **Journal Comparative Pathology.** v. 129, p. 37-43, 2003.

CARROL J, WHITTINGHAM DG, WOOD MJ. Growth in vitro and acquisition of meiotic competence after the cryopreservation of isolated mouse primary ovarian follicles. **Reprod. Fertil. Dev.**, v.3, p.593-599, 1991.

CARROL, J., WHITTINGHAM, D. G., WOOD, M. J., TELFER, E. & GOSDEN, R. G., Extra-ovarian production of mature viable mouse oocytes from frozen primary follicles. **Journal of Reproduction and Fertility**, v.90, p. 321-327, 1999.

CARVALHO, F.C.A., LUCCI, C.M., SILVA, J.R.V., BÁO, S.N., FIGUEIREDO, J.R. Effect of Braun-Collins and Saline solutions at different temperatures and incubation times on the quality of goat preantral follicles preserved in situ. **Animal Reproduction Science**, v.66, p.195-208, 2001.

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

CECCONI, S., BARBONI, B., COCCIA, M. & MATTIOLI, M I vitro development of sheep preantral follicles. **Biol. Reprod.**, v. 60, p. 594-601, 1999

CECCONI, S., CAPACCHIETTI, G., RUSSO, V., LLI, P.B., MATTIOLI, M., BARBONI, B. In vitro growth of preantral follicles isolated from cryopreserved ovine ovarian tissue. **Biol. Reprod.** v.70, p.12–17, 2004.

CHEBLOUNE, Y., KARR, B., SHEFFER, D., LEUNG, K., NARAYAN, O. Variations in lentiviral gene expression in monocyte-derived macrophages from naturally infected sheep. **J. Gen. Virol.** v. 77, p. 2037–2051, 1996.

CHEEVERS WP, KNOWLES DP, MCGUIRE TC, CUNNINGHAM D.R., ADAMS DS, Gorham JR. Chronic disease in goats orally infected with two isolates of the caprine arthritis-encephalitis lentivirus. **Lab Invest** v.59, n.5, p.510–517, 1988.

CHEEVRES, W. P.; ROBERSON, S. M.; KLEVJER-ANDERSON, P. et al. Characterization of caprine arthritis-encephalitis virus; a retrovirus of goats. **Archives of Virology**, v.67, p.111-117, 1981.

CLEMENTS , J. E.; GDOVIN, S. L.; MONTELARO, R. C.; NARAYAN, O. Antigenic variation in lentiviral diseases. **Annu. Rev. Immunology**, v.6, p.139-159, 1988.

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

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

CORK, L. C.; HADLOW, W.J.; CRAWFORD, T. B.; GORHAM, J. R.; PIPER, R. C. infectious leukoencephalomyelitis of young goats. **Journal Infectious Disease.** v.129, p. 134-141. 1974.

CORTEZ ROMERO, FIENI, C., F., ROUX, C., RUSSO P., GUIBERT J.M., GUIGUEN, F., CHEBLOUNE, Y., PÉPIN, M., PELLERIN J.L. Detection of ovine

lentivirus in the cumulus cells, but not in the oocytes or follicular fluid, of naturally infected sheep. *Theriogenology*. **ARTICLE IN PRESS**

CORTVRINDT R, SMITZ J, van STEIRTEGHEM AC. A morphological and functional study of the effect of slow freezing followed by complete in vitro maturation of primary mouse ovarian follicles. **Hum. Reprod.**, v.11, p.2648-2655, 1996.

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

DANIEL, A. J., ARMSTRONG, D. T. & GORE-LANGTON, R. E. Growth and development of rat oocyte in vitro. **Gam. Res.**, v. 24, p. 109-121, 1989

DE LA VEGA AC, WILDE OR. Fundamentos biológicos de la criopreservación. **Ver. Arg. Prod. Anim.**, v.11, p.151-165, 1991.

DOBRINSKY RJ. Cellular approach to cryopreservation of embryos. **Theriogenology**, v.45, p.17-26, 1996.

DUVALL, E., WYLLIE A H., MORRIS, R. G. Macrophage recognition of cells undergoing programmed cell death (apoptosis). **Immunology** v. 56, p. 351-358. 1985.

ERICKSON, B. H. Development and senescence of the postnatal bovine ovary. **Journal Animal Science** v. 25, p. 800-805. 1966.

FAHNING, M.L.; GARCIA, M.A. Status of cryopreservation of embryos from domestic animals. **Cryobiology**, v.29, p.1-18, 1992.

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

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

FIGUEIREDO JR, AMORIM CA, LUCCI CM, GONÇALVES PBD. Isolation and *in vitro* culture of ruminant preantral follicles. **Arq. Fac. Vet. UFRGS**, v.27, n.2, p.11-31, 1999.

FIGUEIREDO, J. R., HULSHOF, S. C. J., VAN DEN HURK, R., ECTORS, F.J., FONTES, R. S., NUSGENS, B., BEVER, M. M, BECKERS, J. F. Development of a combined new mechanical and enzymatic method for the isolation of intact preantral follicles from fetal, calf and adult bovine ovaries. **Theriogenology**, v.40, p.789-799, 1993.

FITTERMAN, I.R. Constatação do complexo artrite-encefalite em um plantel de caprinos no Estado da Bahia. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE MEDICINA VETERINÁRIA, 21, 1988, Salvador, BA. **Anais**. Salvador. Sociedade Brasileira de Medicina Veterinária, 1988. p.93.

FORTUNE, J. E. Ovarian follicular growth and development in mammals. **Biology of Reproduction** v. 50 p. 225-232. 1994.

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

FRAY, M. D., PRENTICE, H., CLARKE, M. C., CHARLESTON, B. Immunohistochemical evidence for the localization of bovine diarrhea virus, a single-

stranded RNA virus, in ovarian oocytes in the cow. **Vet. Pathol.**, v.35, p. 253-259, 1998.

FREITAS, V.J.F., CAVALCANTE, T.V., SALLES, H.O. TEIXEIRA M. F. S., 1999 Embryo transfer from seropositive goats for caprine arthritis-encephalitis vírus (CAEV) with birth of senegative kid. **Ciência Animal**, v.9, n. 1, p. 5-9.

FUKU, E., XIA, L., DOWNEY, B.R. Ultrastructural changes in bovine oocytes cryopreserved by vitrification. **Cryobiology**, v. 32, p.139–156, 1995.

FUKU, E.; KOJIMA, T.; SHIOYA, Y.; MARCUS, G.J.; DOWNEY, BR. In vitro fertilization and development of frozen-thawed bovine oocytes. **Cryobiology**, v. 29, p. 485-492, 1992.

GENDELMAN, K. E., NARAYAN, O., KENNEDY-STOSKOPF, S. et al. Tropism of shep lentivirus for monocytes: susceptibility to infection and virus gene expression increase during maturation of monocytes to macrophages. **Journal of Virology**, v.58, n.1, p.67-74, 1986.

GEORGE, L.L.; ALVES, C.E.R.; CASTRO, R.R.L.; **Histologia Comparada**. 2<sup>a</sup> Ed. São Paulo: Roca, 1998. 286p.

GOGOLEWSKI, R. P. ; ADAMS, D. S.; McGUIRE, T. C. et al. Antigenic cross reactivity between caprine arthritis-encephalitis, visna and progressive pneumonia viruses involves all virion-associated proteins and glycoproteins. **Journal of General Virology**, v.66, p.1233-1240, 1985.

GONÇALVES, P.B.D.; FIGUEIREDO, J.R.; FREITAS, V.J.F. **Biotécnicas Aplicadas à Reprodução Animal**. 1<sup>a</sup> Ed. São Paulo: Livraria Varela, 2001.



GOOK, D.A., EDGAR, D.H., STERN, C. The effects of cryopreservation regimens on the morphology of human ovarian tissue. **Mol. Cell. End.** 2000;169:99–103.

GORDON, I. Prenatal development of bovine ovary. IN: Gordon, I. Laboratory production of cattle embryos. Cambridge:CAB, Internacional: Ravon Press, 43-49. 1994.

GOSDEN, R.G., 2000. Low temperature storage and grafting of human ovarian tissue. **Mol. Cell. End.** v.63, p.125–129, 2000.

GOSDEN, R.G.; BAIRD, D.T.; WADE, J.C.; WEBB, R. Restoration of fertility to oophorectomized sheep by ovarian autografts stored at – 196° C. **Hum. Reprod.**, v.9, p.597-603, 1994.

GOUGEON, A. & LEFREVE, B. Evolution of the diameters of the largest healthy and atretic follicles during the human menstrual cycle. **Journal of Reproduction and Fertility**. v. 69 n. 2 p. 497-502. 1983.

GREENWOOD PL. Effects of arthritis-encephalitis virus on productivity and health of dairy goats in New South Wales. **Aust Prevent Vet Med** v.22, n.1–2, p.71–87, 1995.

GREENWOOD, P.L., NORTH, R.N., KIRKLAND, P.D. Prevalence spread and control of caprine arthritis–encephalitis virus in dairy goat heeds in New South Wales. **Aust. Vet. J.** v. 72, p. 341–345, 1995.

GUIBAULT, L. A., DUFOUR, J. J., THATCHER, W. W., DROST, M., HAIBEL, G. K. Ovarian follicular development during early pregnancy in cattle. **Journal of Reproduction and Fertility**. v. 78 p. 127-135, 1986.

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

- HAFEZ, E.S.E., 1995. **Reprodução Animal**, 6<sup>a</sup> ed, São Paulo, Manole, p. 134, 159-156, 191-214. 582p.
- HARP, R., LEIBACH, J., BLACK, J., KELDAHL, C., KAROW, A. Cryopreservation of murine ovarian tissue. **Cryobiology**, v.31, p.336–343, 1994.
- HARTMANN, K. Feline immunodeficiency virus infection: an Overview. **The Veterinary Journal**, v.155, p.123-137, 1998.
- HIRSHFIELD, A.N. Development of follicles in mammalian ovary. **Int. Rev. Cytol.**, v.124, p. 43-101, 1991.
- HIRSHFIELD, A.N. Size-frequency analysis of atresia in cycling rats. **Biol. Reprod.**, v.38, p.1181-1188, 1988.
- HOFMANN, A., ZKHARTCHENKO V., WEPPERT M., SEBALD H., WENIGERKIND, H., BREM, G., WOLF, E., PFEIFER A. Generation of Transgenic Cattle by Lentiviral Gene Transfer into Oocytes **Biol. Rep.**, v.71, p. 405–409, 2004.
- HOORNAERT, S., HANON, J., LYAKU, J., PASTORET, P. P. The Use of Annexin for Concomitant Detection of Apoptosis and Cellular Phenotype. **Biochemica**, v. 3 p. 19-20. 1997.
- HOVATTA, O.; SILYE, R.; KRAUSZ, T.; ABIR, R.; MARGARA, R.; TREW, G.; LASS, A.; WINSTON, R.M.L. Cryopreservation of human ovarian tissue using dimethylsulphoxide and propanediol-sucrose as cryoprotectants; **Hum. Reprod.**, v.11, p.1268-1272, 1996.
- HUANMIN, Z. & YONG, Z. In vitro development of caprine ovarian preantral follicles, **Theriogenology**, v. 54, p.641-650, 2000.

HULSHOF, S. C. J., FIGUEIREDO, J. R., BECKERS, J. F., BEVERS, M. M., VAN DEN HURK, R. Isolation and Characterization of preantral follicles from foetal bovine ovaries. **The Veterinary Quarterly** v. 16 n. 2 p. 78-80. 1994.

IBGE. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. **Efetivo dos Rebanhos – Cabeças**. Disponível em: <http://www.ibge.gov.br> . Acesso em 24 novembro 2004.

IRELAND, J. J. Control of follicular growth and development. *Journal of Reproduction and Fertility*. v. 24 p. 39-54. 1987.

JEWGENOW K, PENFOLD LM, MEYER HHD, WILDT DE. Viability of small preantral ovarian follicles from domestic cats after cryoprotectant exposure and cryopreservation. **J. Reprod Fert.**, v.112, p.39-47, 1998.

JOAG, S. V., STEPHENS, E. B, NARAYAN, O. Lentiviroses. In: FIELDS, M. D. & KNIPE, D. M. **Fields Virology**, 3ª Ed. New York: Raven Press, 1996. p.1977-1996.

JOHNSON, C. G.; BARBET, A. F.; KLEVJER-ANDERSON, P. et al. Preferencial immune response to virion surface glicoproteins by caprine arthritis-encephalitis virus-infected goats. **Infection and immunity**, v.41, n.2, p.657-665, 1983.

JOHNSTON, L.A., DONOGHUE, A.M., O'BRIEN, S.J., WILDT, D.E. Culture medium and protein supplementation influence in vitro fertilization and embryo development in the domestic cat. **J. Exp. Zool.**, v. 257, p. 350–359, 1991.

KARLSON, P., GEROK, W., GROSS, W., HOXTER, G. **Patobioquímica**, 1ª ed., Editora Guanabara Koogan S.A., Rio de Janeiro, 321p. 1982.

KATTSTROM, P. O., BJERNEROTH, G., NILSSON, B. O., HOLMDAHL R., LARSSON, E. A retroviral gp-70-related protein is expressed at specific stages during mouse oocyte maturation and in preimplantation embryos. **Cell. Diff. Dev.**, v.28, p. 517-521, 1989.

KERR, J. R. F., WYLLIE, A. H., CURRIE, A. R. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. **British Journal of Cancer**, v. 26 p. 239-257. 1972.

KLEVJER-ANDERSON, P.; CHEEVRES, W. P. Characterization of the infection of caprine synovial membrane cells by the retrovirus caprine arthritis-encephalitis virus. **Virology**, v.110, p.113-119, 1981.

KNOWLES, D. Jr.; CHEEVRES, W. P.; McGUIRE, T. C. et al. Structure and variability of envelope glycoproteins of two antigenic variants of caprine arthritis-encephalitis lentivirus. **Journal of Virology**, Washington, v.65, n.11, p.5744-5750, 1991.

KNOWLES, D. P. Jr.; CHEEVRES, W.; McGUIRE, T. et al. Severity of arthritis is predicted by antibody response to gp135 in chronic infection with caprine arthritis-encephalitis virus. **Journal of Virology**, Washington, v.64, n.5, p.2396-2398, 1990.

KNOWLES, JR D. P., Laboratory diagnostic tests for retrovirus infections of small ruminants. **Veterinary Clinics of North America**, v.13, n.1, p. 1-11, 1997.

KUZMAK , J., KEDZIORA, A., ROLA, M., KOZACZYNSKA, B., CHEBLOUNE, Y., GALLAY, K. Evaluation of PCR and PCR/hybridization method for the detection of caprine arthritis-encephalitis virus infection in goats. **Bull. Vet. Inst. Pulawy**, v.47, p. 293-300, 2003.

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

LAMARA, A., FIENI, F., MSELLI-LAKHAL, L., et al. Epithelial cells from goat oviduct are highly permissive for productive infection with Caprine arthritis encephalitis virus (CAEV). *Virus Research*, v. 87, p. 69-77, 2002.

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

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

LEROXIDELLE, C.; FLEURY, C.; VILARD, J. La glande mammaire: organe cible de l'infection par le virus de l'arthrite et de l'encéphalite caprine. ***Ann. Rech. Vét.***, v.20, p.57-64, 1989.

LIM, J.M.; KO, J.J.; HWANG, W.S.; CHUNG, H.M.; NIWA, K. Development of in vitro matured bovine oocytes after cryopreservation with different cryoprotectants. ***Theriogenology***, v.51, n.1303-1310, 1999.

LIU, J., VAN DER ELST, J., VAN DEN BROECKE, R., DUMORTIER, F., DHONT, M. Maturation of mouse primordial follicles by combination of grafting and in vitro culture. ***Biol. Reprod.*** 2000;62:1218–1223.

LUCCI, C. M., AMORIM, C. A., BAO, S. N., FIGUEIREDO, J. R., RODRIGUES, A. P., SILVA, J. R., GONCALVES, P. B. Effect of the interval of serial sections of ovarian tissue in the tissue chopper on the number of isolated caprine preantral follicles. ***Animal Reproduction Science*** 17; v. 56 n. 1 p. 39-49. 1999.

MAGALHÃES, H. H. Diagnóstico de situação da caprinocultura em algumas microrregiões dos estados de Minas Gerais e Rio de Janeiro – Resultados Preliminares. **Revista Cabras e Bodes**, v. 01, p.05-07, 1985.

MARCHESIN, D. M.; MOOJEN, V.; RAVAZZOLO, A. P. 1998. Caracterização molecular parcial do gene *gag* de amostras do vírus da artrite-encefalite caprina (CAEV) isolados de animais naturalmente infectados No Rio Grande do Sul, Brasil. **Pesq. Vet. Bras.**, v.18, n.314, p.119-126, 1998.

MATOS, M. H. T.; ANDRADE, E. R.; LUCCI, C. M.; BÃO, S.N.; SILVA, J. R. V.; SANTOS, R. R.; FERREIRA, M. A. L.; COSTA, S. H. F.; CELESTINO, J. J. H.; FIGUEIREDO, J. R. Morphological and ultrastructural analysis of sheep primordial follicles preserved in 0.9% saline solution and TCM 199. **Theriogenology**. v.62, p. 65-80, 2004.

MAZUR, P. Freezing of living cells: mechanisms and implications. **American Physiological Society**, C125-C142, 1984.

MELO, A. C. M. & FRANKE, R. F. Soroprevalência da artrite-encefalite caprina em caprinos leiteiros da região da Grande Fortaleza, Ceará, Brasil. **Ciência Rural**, v.27, n.1, p.113-117, 1997.

MOOJEN, V. Evidência de infecção pelo *Lentivírus* (maedi/visna e artrite encefalite caprina) em caprinos no Rio Grande do Sul, Brasil. **Arquivos da Faculdade de Medicina Veterinária da UFRGS**, 1986, v.14, p.77-78.

MSELLI-LAKHAL, L., GUIGUEN, F., FORNAZERO, C., DU, J., FAVIER, C., DURAND, J., GREZEL, D., BALLEYDIER, S., MORNEX, J.F., CHEBLOUNE, Y.

Goat milk epithelial cells are highly permissive to CAEV infection in vitro. **Virology**, v. 259, p. 67–73, 1999.

NARAYAN, O. Slow virus replication: the role of macrophages in the persistence and expression of visna virus of sheep and goats. **Journal of General Virology**, v. 59, n. 2, p. 345-56, 1982.

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

NUGENT, D., MEIROW, D., BROOCK, P.F., AUBARD, Y., GOSDEN, R.G. Transplantation in reproductive medicine: previous experience, present knowledge and future prospects. **Hum. Reprod. Update**, v. 3, p. 267–280, 1997.

NUTTINCK, F., MERMILLOD, P., MASSIP, A., DESSY, F. Characterization of in vitro growth of bovine preantral follicles: A preliminary study. **Theriogenology** v. 39 n.4 p. 811- 82. 1993.

Organização internacional de Epizootia (OIE/FAO). 1997. Animal Health Yearbook, 36 FAO.

OKTAY, K., NUGENT, D., SALHA, O., CHATTERJEE, P., GOSDEN, R.G. Isolation and characterization of primordial follicles from fresh and cryopreserved human ovarian tissue. **Fertil. Steril.** v.67, p. 481–486, 1997.

OKTAY, K.; NEWTON, H.; AUSBARD, Y.; SALHA, O.; GOSDEN, R.G. Cryopreservation of immature human oocytes and ovarian tissue: an emerging thecnology? **Fertility and Sterility**, v.354, p.1-7, 1998.

PARKS, J.E.; RUFFINS, N.A. Factors affecting low temperature survival of mammalian oocytes. **Theriogenology**, v. 37, n.1, p.59-73, 1992.

PAYNTER, S.J., COOPER, A., FULLER, B., SHAW, R.W., 1999. Cryopreservation of bovine ovarian tissue: structural normality of follicles after thawing and culture in vitro. **Cryobiology**, v.38, p.301–309, 1999.

PERK, K.; YANIV, A.; GAZIT, A.; DEMARTINE, J. C. Evaluacion of vaccines for ovine lentivirus infection. **AIDS Research and Human Retroviruses**, v.12, n.5, p.425-426, 1996.

PETERS, H. The development and maturation of the ovary. *Ann. Biology Animal Biochemical Biophys.*, v. 16, p. 271-278, 1976

PINHEIRO, R. R. Artrite-encefalite caprina viral (CAEV). Sobral, Comunicado Técnico. EMBRAPA-CNPC, n.19, p.1-5, 1989.

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

PINHEIRO, R. R.; GOUVEIA, A. M. G.; ALVES, F. S. F.; ANDRIOLI, A. Perfil das propriedades no Estado do Ceará relacionado à presença do lentivírus caprino. **Ciência Animal**, v.14, n. 1, p. 19-37, 2004

POLLARD, J. W., MARTINO, N. D., RUMPH, N. & LEIBO, S. P.. Effect of ambient temperatures during oocyte recovery on in vitro production of bovine embryos. **Theriogenology**, v. 46, p. 849-858, 1996.

RIMSTAD,E.; EAST, N. E.; TORTEN, M. et al. Delayed seroconversion following naturally acquired caprine arthritis-encephalitis virus infection goats. **American Journal of Veterinary Research**, v.54, n.11, p.1858-1862, 1993.



RODRIGUES, A.P.R., AMORIM C.A., COSTA, S.H.F., SANTOS, R.R., LUCCI, C.M., NUNES J.F., FIGUEIREDO, J.R. Cryopreservation and short-term culture of isolated caprine primordial follicles. **Small Ruminant Research**, v.56, p.103–111, 2005.

RODRIGUES, A.P.R., AMORIM, C.A., COSTA, S.H.F., MATOS, M.H.T., SANTOS, R.R.; LUCCI, A, C.M.; BÁO, S.N. OHASHI, O.M.; FIGUEIREDO, J.R. Cryopreservation of caprine ovarian tissue using glycerol and ethylene glycol. **Theriogenology**. v. 61, p.1009–1024, 2004.

RODRIGUES, A.P.R.; AMORIM, C.A.; COSTA, S.H.F.; MATOS, M.H.T.; SANTOS, R.R.; LUCCI, A.C.M. ; BÁO, S.N., OHASHI, O.M. ; FIGUEIREDO, J.R. Cryopreservation of caprine ovarian tissue using dimethylsulphoxide and propanediol. **Animal Reproduction Science**. v. 84, p.211–227, 2004.

RÜSSE, I. Oogenesis in cattle and sheep. *Bibliotheca Anatomic* v. 24 p.77-92. 1983.

RUSSO, P. Isolation of a caprine arthritis encephalitis virus (CAEV) strain identification – serological diagnosis in field practice. In: **Proceedings of the International Symposium**, 3, 1983, Ames, USA. *Anais, Ames*: v. 2, p.733-737, 1983.

RUTKOSKI, J.K., WERENICZ, R., REISCHAK, et al. Detection of caprine arthritis-encephalitis virus infection: agar gel immunodiffusion and polymerase chain reaction with degenerated primers. **Arq. Bras. Méd. Vet. Zootec.**, v.53, n. 6, p. 635-640, 2001.

RUTKOSKI, J.K., WERENICZ, R., REISCHAK, WENDELSTEIN, D. C., MOOJEN, V., RAVAZZOLO, A. P. Detection of caprine arthritis-encephalitis virus infection: agar

gel immunodiffusion and polymerase chain reaction with degenerated primers. **Arq. Bras. Méd. Vet. Zootec.**, v.53, n. 6, p. 635-640, 2001.

SALLE, B., DEMIRCI, B., FRANCK, M., RUDIGOZ, R.C., GUERIN, J.F., LORNAGE, J. Normal pregnancies and live births after autograft of frozen–thawed hemi-ovaries into ewes. *Fertil. Steril.* v.77, p. 403–408, 2002.

SALLE, B., LORNAGE, J.A., DEMIRCI, B., VAUDOYER, F., POIREL, M.T., FRANCK, M., RUDIGOZ, R.C., GUERIN, J.F., Restoration of ovarian steroid secretion and histologic assessment after freezing, thawing and autograft of a hemi-ovary in sheep. *Fertil. Steril.*, v.72, p. 366–370, 1999.

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

SANTIN, A. P. et al. Artrite-encefalite caprina: identificação de animais soropositivos no estado de Goiás. **Ciência Animal Brasileira**, v. 3, n. 1, p. 67-71, 2002.

SANTOS, R. R., RODRIGUES, A. P. R., COSTA, S. H. F., SILVA, J. R. V., MATOS, M. H. T., LUCCI, C. M., BÁO S. N., VAN DEN HURK, R., FIGUEIREDO, J. R. Histological and ultrastructural analysis of cryopreserved sheep preantral follicles. **Animal Reproduction Science**, v.91, p.249–263, 2006.

SARAIVA NETO, A. O. **Soroprevalência da artrite- encefalite caprina em plantéis leiteiros criados no estado de Pernambuco**. 1993, p. 71. Dissertação (Mestrado). Universidade Federal Rural de Pernambuco.

SAUMANDE, J. La folliculogenèse chez les ruminants. **Recueil Medicine Vétérinaire**. v. 167 p. 205-218. 1991.

SCHELLANDER, K.; PELI, J.; SCHMOLL, F.; BREM, G. Effects of different cryoprotectants and carbohydrates on freezing of matured and unmatured bovine oocytes. **Theriogenology**, v. 42, p.909-915, 1994.

SEBRAE/SINTEC. **Diagnóstico da cadeia produtiva agroindustrial da caprinocultura do Rio Grande do Norte**. Natal: SEBRAE/SINTEC, 224 p., 2001.

SHAW, J.M.; ORANRATNACHAI, J.M.; TROUNSON, A.O. Fundamental cryobiology of mammalian oocytes and ovarian tissue. *Theriogenology*, v.53, p.59-72, 2000.

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

SILVA, J. R. V.; VAN DEN HURK, R.; COSTA, S. H. F.; ANDRADE, E. R.; NUNES, A. P. A.; FERREIRA, F. V. A.; LÔBO, R. N. B.; FIGUEIREDO, J. R. Survival and growth of goat primordial follicles after in vitro culture of ovarian cortical slices in media containing coconut water. **Animal Reproduction Science**. v.81, p. 273-286, 2004.

SILVA, J. R. V.; VAN DEN HURK, R.; MATOS, M. H. T.; SANTOS, R. R.; PESSOA, C.; MORAES, M. O.; FIGUEIREDO. Influences of FSH and EGF on primordial follicles during in vitro culture of caprine ovarian cortical tissue. **Theriogenology**. v. 61, p.1691-1704, 2004.

SINGH, E.L., DULAC, G.C., HENDERSON, J.M. Embryo transfer as a means of controlling the transmission of viral infections XV. Failure to transmit bluetongue virus

through the transfer of embryos from viremic sheep donors. **Theriogenology**, v. 47, p.1205–1214, 1997.

SINGH, E.L., MCVICAR, J.W., HARE, W.C.D., MEBUS, C.A. Embryo transfer as a means of controlling the transmission 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.

SMITH MC, CUTLIP RC. Effects of infection with caprine arthritis-encephalitis virus on milk production in goats. **J. Am. Vet. Med. Assoc.**, v. 193, p.36–65, 1988.

SUGIMOTO, M., MIYAMOTO, H., KABASAWA, T., MANABE, N., Follicle survival in neonatal rat ovaries cryopreserved by vitrification. **Cryo-Letters**, v.17, p.93–98, 1996.

TEIXEIRA, M. F. S. Replication *in vitro* des lentivirus des petits ruminants dans des lignées fibroblastiques caprines immortalisées. **Thèse de Doctorat**, Université Claude Bernard-Lyon I. N° d'ordre: 157/96, 157p., 1996.

TEIXEIRA, M. F. S. Viruses of small ruminants: Lentiviruses small ruminants generality. **Virus Reviews & Research In: Journal of Brazilian Society for Virology**, v.2, n.(1-2), p.96-97, 1997.

TINÔCO, A.L.A. Diagnóstico de situação da ovino/caprinocultura em três municípios do sertão baiano – Euclides da Cunha, Quijingue, Monte Santo – Bahia, 1981/1982. Belo Horizonte: Escola de Veterinária da UFMG, 13p. (Seminário). 1983.

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

VAN DEN HUCK, R., BEVERS, M. M., BECKERS, J. F. In vivo and in vitro development of preantral follicles. **Theriogenology** v. 47 p. 73-82. 1997.

WANI, N. A., WANI, G. M., KHAN, M. Z., SALAHUDIN S. Effect of oocyte haversing techniques on in vitro maturation and in vitro fertilization in sheep. **Small Ruminant Research** v. 36 p. 63-67. 2000.

WASSARMAN, P. M. The mammalian ovum. In: KNOBIL, E. & NEIL, J. The physiology of reproduction. **Raven Press**, New York, p. 69-101, 1988.

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.

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

## **ANEXOS**

## **ANEXO I:**

### **Artrite Encefalite Caprina em reprodutores da micro-região de Angicos no estado do Rio Grande do Norte**

#### **(Caprine Arthritis Encephalitis in reproducers of the micro region of Angicos in the State of Rio Grande do Norte)**

Jean Berg Alves da Silva<sup>1\*</sup>, Ciro Fagundes Neto<sup>2</sup>, Maria Isabela Carlos Dantas<sup>2</sup>,  
Raimundo Alves Barreto Júnior<sup>2</sup>, Carlos Henrique de Souza<sup>2</sup>, Regina Valéria Cunha  
Dias<sup>2</sup>, Maria Fátima da Silva Teixeira<sup>1</sup>

<sup>1</sup> **Universidade Estadual do Ceará – UECE, Faculdade de Veterinária – FAVET.**

<sup>2</sup> **Universidade Federal Rural do Semi-Árido – UFERSA.**

**\* Autor Para Correspondência:  
Laboratório de Virologia – PPGCV – UECE  
Av. Paranjana, 1700, Itaperi,  
60740-000 Fortaleza – Ceará  
e-mail: jean\_berg2@yahoo.com.br**

Artigo Publicado:

Revista Ciência Animal, Fortaleza – CE, v. 15, n. 1, p. 53-56, 2005.

### **RESUMO**

A artrite encefalite caprina (CAE) é uma enfermidade viral que acomete caprinos leiteiros de todas as partes do mundo, levando a perdas econômicas graves. Por outro lado a caprinocultura leiteira no estado do Rio Grande do Norte assume uma importância fundamental na renda de pequenos agricultores, sendo que a Microrregião

de Angicos apresenta o maior rebanho de caprinos leiteiros do estado. Objetivou-se com este estudo verificar a prevalência da CAE em matrizes e reprodutores caprinos desta região. Para isto foram coletadas, por venopunção jugular, 160 amostras de soro sanguíneo de fêmeas e 24 machos caprinos aptos à reprodução, oriundos de 20 propriedades. Estes soros foram submetidos ao teste de Imunodifusão em Gel de Agarose (IDGA), para a detecção de anticorpos contra o vírus da Artrite Encefalite Caprina (CAEV). Dos animais testados cinco (2,71%) foram soropositivos, sendo duas (1,25%) matrizes e três (12,5%) machos. Demonstrando a ocorrência da enfermidade em reprodutores na Microrregião de Angicos o que justifica a adoção de medidas preventivas que visem impedir a expansão da enfermidade.

**Palavras-chave:** caprinocultura, imunodiagnóstico, lentivírus.

## **ABSTRACT**

Caprine Arthritis Encephalitis is a viral disease, which attacks milking goats everywhere in the world, leading to serious economic losses. By contrast, the milk caprine culture in the State of Rio Grande do Norte has a fundamental importance for minor farmer's income, where the micro region of Angicos shows one of the largest herd of goat milk of this State. The objective of this study was to verify the prevalence of CAE on matrices and caprine reproducers from this locate. It was collected 160 samples of blood serum by jugular vein puncture of females and 24 samples of serum of males, all of them able to reproduction and coming from 20 of properties. These sera were submitted to the agar gel immunodifusion test (AGID), in order to detect antibodies for caprine arthritis encephalitis virus (CAEV). In the test, five animals (2.71 %) were



seropositives, which two of them (1.25%) were females and three (12.5%) males. The study shows the occurrence of the disease on reproducers in the Micro region of Angicos, what justifies the adoption of preventive measures to stop the spreading of this disease.

KEYWORDS: caprineculture, immunodiagnosis, lentivirus .

O Estado do Rio Grande do Norte possui um rebanho caprino de cerca de 406.108 cabeças (IBGE, 2003). Na Mesorregião Central Potiguar estão localizados 22,9% dos caprinos do Estado, distribuídos em cinco Microrregiões, sendo a Microrregião de Angicos a que detém a maior número de animais (46,4%) (SEBRAE/SINTEC, 2001). Nesse contexto, é de fundamental importância, para o desenvolvimento da atividade na região, a determinação do status sanitário do rebanho. Dentre as enfermidades relevantes nesta atividade destacasse a artrite-encefalite caprina (CAE), provocada pelo vírus da artrite encefalite caprina (CAEV), que acomete caprinos de diferentes raças, idades e sexos (PINHEIRO et al., 2001). SANTIN et al. (2002) afirmam que a enfermidade tornou-se importante devido ao impacto econômico, causando perdas de 25% ou mais na produtividade do rebanho. As perdas mais significativas ocorrem pela mortalidade de animais jovens, perda de peso e pela necessidade do sacrifício de animais soropositivos.

Sendo assim, este trabalho teve por objetivo verificar a situação sorológica do rebanho caprino da Microrregião de Angicos, Rio Grande do Norte, que se caracteriza pela exploração da caprinocultura leiteira, diante da Artrite Encefalite Caprina.

A área investigada compreendeu o perímetro rural produtivo dos municípios de Afonso Bezerra, Angicos e Lajes, distribuídos na Microrregião de Angicos, localizada na Mesorregião Central Potiguar no Estado do Rio Grande do Norte.

Foram pesquisadas 20 propriedades sendo coletadas amostras de 184 animais, sendo 160 fêmeas e 24 machos caprinos, todos utilizados na reprodução. A coleta de sangue foi realizada por venopunção jugular, com posterior obtenção do soro e acondicionamento a  $-20^{\circ}\text{C}$  até a realização do teste sorológico.

Para a detecção de anticorpos anti-CAEV foi utilizada a técnica de Imunodifusão em Gel de Agarose (IDGA), que consiste na detecção de anticorpos pela observação de linhas de precipitação nos animais soropositivos, sendo este teste o recomendado pela Organização Internacional de Epizootias – OIE (1997). Os kits diagnósticos utilizados, contendo soro padrão, o antígeno e o ágar gel, eram da Universidade Federal Rural de Pernambuco (UFRPE). Sendo o teste realizado de acordo com as instruções do fabricante.

Os resultados foram apresentados em frequência absoluta e percentual das classes estudadas, conforme a característica considerada.

Das 184 amostras cinco (2,71%) apresentaram resultados positivos, das quais duas eram fêmeas e três machos. Os resultados superaram os obtidos por PINHEIRO *et al* (2001) no estado do Ceará, que observou uma prevalência de 1% de animais infectados. Enquanto que em Pernambuco a prevalência foi de 17,6% (SARAIVA NETO, 1993), em Minas Gerais foi de 33,33%, no Rio de Janeiro de 29,70%, na Bahia de 12,82% (ASSIS e GOUVEIA, 1994) e em Goiás de 34,5% (SANTIN *et al*, 2002), maiores que os obtidos no presente estudo.

Dos cinco animais soropositivos apenas dois apresentavam artrite e emaciação pronunciada, sintomas condizentes com os da enfermidade, sendo que os demais se apresentavam clinicamente normais. KNOWLES (1997) relata que, apesar da soroprevalência da CAE em um rebanho poder atingir 90%, a maioria dos animais infectados não desenvolve sintomatologia clínica, tendo em vista as características do próprio agente que, assim como os demais lentivírus, produz uma enfermidade crônica e pode apresentar, ainda, um longo período de incubação.

Todas as propriedades pesquisadas visavam à produção de leite. Esses resultados diferem dos encontrados por TINÔCO (1983) no sertão da Bahia onde a maioria das propriedades tinha como objetivo a exploração de subsistência com a exploração de carne e pele. Já MAGALHÃES (1985) encontrou resultados semelhantes, aos do presente estudo, no Rio de Janeiro e em Minas Gerais, os quais verificaram que 91,7% dos criadores exploravam a venda de leite, 62,5% de reprodutores, 20,8% de animais para abate e 4,2% eram rebanhos de subsistência. A caprinocultura na Microrregião de Angicos se caracteriza por explorar em larga escala a produção de leite, encontrando na região amostrada maior parte do efetivo leiteiro. Esta situação difere de muitas áreas do Nordeste, onde a caprinocultura está mais relacionada com a subsistência, com baixa adoção de tecnologia e pouco incremento da renda, assemelhando-se mais com os criatórios das regiões Sul e Sudeste onde existe maior tecnificação na produção (SEBRAE/SINTEC, 2001).

Verificou-se ainda que na grande maioria das propriedades, adotava-se o regime de criação semi-intensivo (95%), apenas uma adotava a criação intensiva (5%) e nenhuma o extensivo, o que pode ser explicado pela dificuldade de se obter produção leiteira extensivamente no semi-árido nordestino, devido à qualidade das pastagens.

Esses dados são divergentes dos encontrados em três municípios no interior da Bahia (TINÔCO, 1983) e os de MAGALHÃES (1985), em levantamento realizado em criatórios caprinos localizados nos estados do Rio de Janeiro e Minas, onde encontrou 54,2% dos criatórios de caprinos em regime intensivo e 45,8% em regime semi-intensivo.

A exploração semi-intensiva e a finalidade dos animais amostrados são fatores preocupantes, já que podem facilitar a disseminação da enfermidade (PINHEIRO *et al*, 2004). Isto por que a transmissão horizontal pode ser potencializada em rebanhos infectados quando se aumenta a concentração de animais, uma vez que o contato íntimo aumenta também a probabilidade de transmissão do agente (NARAYAN *et al*, 1982; ZINK *et al*, 1990). Por outro lado o fato de reprodutores apresentarem a infecção também é preocupante por que apesar da transmissão via sêmen ainda não ter sido definitivamente comprovada o fato do CAEV já ter sido isolado no sêmen de bodes, natural e artificialmente infectados (TRAVASSOS *et al.*, 1999; ANDRIOLLI *et al.*, 1999), é suficiente para que se recomende que os reprodutores infectados sejam retirados da reprodução o que representa perda do seu potencial genético (RUSSO, 1983).

No presente estudo ficou demonstrado que a infecção pelo CAEV está presente em reprodutores da microrregião de Angicos o que é motivo de alerta, tendo em vista a dificuldade de controle da infecção e os prejuízos que ela pode causar, portanto é importante que medidas profiláticas, visando o controle e erradicação da enfermidade, sejam adotadas.

#### **REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

ANDRIOLI, A.; GOUVEIA, A. M. G.; PINHEIRO, R. R.; ROCHA, M. A.; MARTINS, A.; SANTOS, D. O. Detecção do DNA pro-viral do lentivírus caprino em sêmen de bodes

naturalmente infectados. *Revista Brasileira de Reprodução Animal*, V. 32, p. 101-106, 1999.

ASSIS, A. P. M. V.; GOUVEIA, A. M. Evidências sorológicas de lentivírus (*maedi-visna*/artrite encefalite caprina) em rebanhos nos estados de Minas Gerais, Rio de Janeiro, Bahia e Ceará. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE MEDICINA VETERINÁRIA, 23., Olinda: Spemve, 1994. **Anais...** Olinda, 1994. p. 104.

BARROS-FILHO, I. R et al. Hemograma de cabras soropositivas e soronegativas para o vírus da artrite-encefalite caprina. **Arq. Ciên. Vet. Zool. UNIPAR**, v. 6, n. 1, p. 67-70, 2003.

CALLADO, A. K. C., CASTRO, R. S. de and TEIXEIRA, M. F. S.. Lentiviruses of small ruminants (CAEV and Maedi-Visna): a review and perspectives. *Pesq. Vet. Bras.*, July/Sept. 2001, vol.21, no.3, p.87-97.

IBGE. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. **Efetivo dos Rebanhos – Cabeças**. Disponível em: <http://www.ibge.gov.br> . Acesso em 24 novembro 2004.

KNOWLES, JR D. P., Laboratory diagnostic tests for retrovirus infections of small ruminants. **Veterinary Clinics of North America**, v.13, n.1, p. 1-11, 1997.

NARAYAN, O. et al. Slow virus replication: the role of macrophages in the persistence and expression of visna virus of sheep and goats. **Journal of General Virology**, v. 59, n. 2, p. 345-56, 1982.

MAGALHÃE, H. H. Diagnóstico de situação da caprinocultura em algumas microrregiões dos estados de Minas Gerais e Rio de Janeiro – Resultados Preliminares. **Revista Cabra e Bodes**, v. 01, p.05-07, 1985.

OIE/FAO. 1997. Animal Health Yearbook, 36 FAO.

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

PINHEIRO, R. R.; GOUVEIA, A. M. G.; ALVES, F. S. F.; ANDRIOLI, A. Perfil das propriedades no Estado do Ceará relacionado à presença do lentivírus caprino. **Ciência Animal**, v.14, n. 1, p. 19-37, 2004

RUSSO, P. **Isolation of a caprine arthritis encephalitis virus (CAEV) strain identification – serological diagnosis in field practice**. In: Proceedings of the International Symposium, 3, 1983, Ames, USA. Anais, Ames: v. 2, p.733-737, 1983.

SANTIN, A. P. et al. Artrite-encefalite caprina: identificação de animais soropositivos no estado de Goiás. **Ciência Animal Brasileira**, v. 3, n. 1, p. 67-71, 2002.

SARAIVA NETO, A. O. **Soroprevalência da artrite- encefalite caprina em plantéis leiteiros criados no estado de Pernambuco**. 1993, p. 71. Dissertação (Mestrado). Universidade Federal Rural de Pernambuco.

SEBRAE/SINTEC. **Diagnóstico da cadeia produtiva agroindustrial da caprinocultura do Rio Grande do Norte**. Natal: SEBRAE/SINTEC, 224 p., 2001.

TINÔCO, A.L.A. Diagnóstico de situação da ovino/caprinocultura em três municípios do sertão baiano – Euclides da Cunha, Quijingue, Monte Santo – Bahia, 1981/1982. Belo Horizonte: Escola de Veterinária da UFMG, 13p. (Seminário). 1983.

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

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

## **ANEXO II:**

### **Identificação do Vírus da Artrite Encefalite Caprina (CAEV) no tecido ovariano de cabras naturalmente infectadas**

#### **(Identification of the virus of Caprine Encephalitis Arthritis (CAEV) in the ovarian tissue in naturally infected goats)**

Jean Berg Alves da Silva<sup>1</sup>, Aracely Rafaela Fernandes Ricarte<sup>1</sup>, Alice Andriolli, Suzana Aparecida Costa de Araújo<sup>1</sup>, Tânia Valeska Medeiros Dantas<sup>1</sup>, José Ricardo Figueiredo<sup>1</sup>, Maria Fátima da Silva Teixeira<sup>1</sup>.

<sup>1</sup>Faculdade de Veterinária da Universidade Estadual do Ceará, Av. Paranjana 1700, CEP: 60740-000, Campus do Itaperi, Fortaleza, CE, Brazil.

<sup>b</sup>Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária– Centro Nacional de Pesquisa em Caprinos (EMBRAPA-Caprinos).

Artigo Submetido para publicação no periódico:

#### **ARQUIVO BRASILEIRO DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA**

#### **Resumo**

O objetivo do presente estudo foi verificar se o vírus da artrite encefalite caprina infecta células do córtex ovariano, *in vivo*, em cabras com infecção natural. Para tanto foram coletados, após o abate, ovários de nove cabras, sendo cinco sorologicamente positivas e quatro com pelo menos três resultados sorológicos negativos pelo teste de imunodifusão em gel de agarose (IDGA). Em seguida os ovários foram lavados em álcool 70% e transportados em solução salina 0,9% com antibióticos. O córtex ovariano foi dissecado e fragmentado. Um fragmento foi utilizado para a avaliação histológica e realização da imunohistoquímica objetivando verificar alterações histopatológicas e a identificação de antígenos do CAEV, respectivamente. O tecido restante foi utilizado para realização da PCR semi-nested para identificação do DNA proviral em células do córtex ovariano. Não foram observadas alterações histopatológicas em nenhum dos ovários analisados, também não foram observadas reações positivas na imunohistoquímica. Dos 18 córtex ovarianos submetidos à PCR semi-nested quatro

apresentaram reação positiva, todos de animais soropositivos. Fica demonstrado que o CAEV pode infectar ovários de cabras naturalmente infectadas, embora esta infecção seja aparentemente improdutiva uma vez que não foi observada presença de antígenos virais nos tecidos infectados.

**Palavras-chaves:** lentivírus, imunohistoquímica e PCR semi-nested

### **Abstract**

The objective of the present study was to verify if the Caprine Arthritis Encephalitis virus infect cells of the ovarian tissue in goats with natural infection. For this they was collected, after slaughter, ovaries of nine goats, being five seropositives and four with at least three negative serological results of agar gel immunodifusion test (IDGA). The ovary was washed with 70% alcohol (10s) and twice in a saline solution (0.9%).The ovarian cortex was divided in fragment. One fragment was immediately fixed to histological analysis and imunohistochemical test to identify of CAEV antigen. The others fragments were utilized in PCR semi-nested with the objective of identify proviral DNA in ovarian cortex cells. Histopatologicals alterations in none of the ovaries not were observed also positive reactions in the imunohistochemical not were observed. Of the 18 ovarian cortexes submitted to hemi-nested PCR four they had presented positive reaction, all of seropositives animals. It was demonstrated that the CAEV can infects ovaries of naturally infected goats, even so this infection is parently unproductive a time that was not observed antigen presence capsizes in ovaries tissues affected.

Key-words: lentivírus, imunohistochemical, PCR semi-nested

### **INTRODUÇÃO**

O vírus da artrite encefalite caprina (CAEV), pertencente ao gênero lentivírus da família Retroviridae, causa uma infecção crônica e multissistêmica em caprinos de diferentes idades e raças (Dawson, 1980). Em animais adultos os sintomas mais observados são artrites, mastites e pneumonia, já em indivíduos jovens a forma encefalítica da infecção é mais comum (Cork et al., 1974; Narayan, 1990). A transmissão do agente pode ocorrer tanto por contato direto entre animais susceptíveis e infectados, quanto de forma vertical através da ingestão de colostro e leite de mães



infectadas (Rowe e East, 1997), já tendo sido descrita a transmissão transplacentária (East et al., 1993).

A artrite encefalite caprina (CAE) já foi relatada em praticamente todos os países onde a criação de caprinos é praticada em larga escala, sendo mais prevalente naquelas regiões com criações mais tecnificadas (Rowe e East, 1997). No Brasil a infecção foi diagnosticada pela primeira vez no Rio Grande do Sul (Moojen et al., 1986), em seguida foi detectada em diversos estados, com maior prevalência em rebanhos destinados a produção leiteira e em animais de raças puras, geralmente utilizados como reprodutores para a melhoria genética de rebanhos nativos (Pinheiro et al., 2001).

A principal forma de controle da infecção é a detecção e eliminação de animais infectados, seguida de medidas profiláticas como a separação de crias de suas mães infectadas, utilização de alimentação artificial como colostro e leite pasteurizados ou de cabras livres da infecção, separação de animais soropositivos e soronegativos, como também realização de sorologia semestral (Callado et al., 2001). Mesmo com a aplicação destas medidas uma soroconversão de até 10% tem sido observada em rebanhos com programas de erradicação da enfermidade, o que indica a existência de outras formas de transmissão responsáveis pela manutenção do agente no rebanho (Mselli-Lakhal et al., 1999). Por outro lado a eliminação de animais soropositivos leva a perda de animais com alto valor zootécnico. Na tentativa de minimizar estas perdas, biotécnicas reprodutivas como a transferência de embriões e/ou a inseminação artificial podem ser utilizadas (Freitas et al., 1999; Travassos et al., 1999). No entanto o uso destas biotécnicas pode representar um risco para a disseminação do agente (Lamara et al., 2002), uma vez que o vírus pode estar presente no trato reprodutivo dos animais doadores ou mesmo nos seus gametas (Travassos et al., 1999; Fieni et al., 2003). Desta forma o objetivo do presente estudo foi verificar através das técnicas de imunohistoquímica e PCR semi-nested, se o CAEV está presente no tecido ovariano de cabras naturalmente infectadas.

## **MATERIAL E MÉTODOS**

Foram utilizadas no experimento 18 ovários de nove cabras das raças saanen (03), pardo alpina (03) e anglo-nubiana (03), com idade de quatro a seis anos, sendo cinco soropositivas e quatro soronegativas para a infecção pelo CAEV. Os animais pertenciam ao rebanho Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (EMBRAPA-CAPRINOS), que possui um programa de controle voluntário da CAE a mais de dez anos, com realização de sorologia semestral.

Os ovários foram coletados após o abate dos animais, em seguida foram lavados com álcool 70% (10s). Após a lavagem, foram colocados em tubos Falcon (50 mL) contendo solução salina (0,9%) adicionada dos antibióticos penicilina (100µg/mL) e estreptomicina (100µg/mL), e transportados ao laboratório resfriados a 4°C, em aproximadamente seis horas. No laboratório foi retirado um fragmento que foi imediatamente fixado para avaliação histológica e realização da imunohistoquímica.

Para a análise histológica os fragmentos ovarianos foram fixados em formol a 10% por no mínimo 12 horas, e posteriormente colocados em solução de etanol a 70%. Os fragmentos foram em seguida desidratados em diferentes concentrações de etanol, tratados com xilol e emblocados em parafina. O tecido ovariano foi seccionado a uma espessura de 7µm e corado com Ácido Periódico de Schiff-hematoxilina (PAS-hematoxilina) (Lucci *et al*, 1999), para posteriormente serem observados em microscópio óptico. O tecido ovariano foi avaliado quanto à sua integridade histológica.

Para a imunohistoquímica foi utilizada a metodologia descrita por Araújo *et al.*, (2004) modificada, onde secções (7µm) foram desparafinizadas, rehidratadas e incubadas em tampão citrato 10mM (pH 6,0) no microondas, potência máxima (700 watts), por 3 x 3 minutos para recuperação de antígenos. A atividade da peroxidase endógena foi bloqueada com peróxido de hidrogênio (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) 3% em metanol com duas trocas de 5 minutos cada. As ligações inespecíficas foram bloqueadas pela incubação das amostras por 20 minutos em soro canino. As secções foram tratadas com soro positivo específico para CAEV (IgG anti-gp 135) por 18h a 4°C, lavadas em PBS e incubadas com IgG anti-IgGcaprina conjugada a peroxidase (Sigma Chemical Co) por 30 minutos a 37°C a uma diluição de 1:500. A reação foi revelada pela adição do diaminobenzidine (DAB) (Sigma Chemical Co) por 5 minutos. As lâminas foram

contracoradas com Hematoxilina de Harris por 1 minuto, montadas e analisadas em um microscópio óptico.

Antes da extração do DNA, para a realização da PCR semi-nested foi obtida uma suspensão celular do córtex ovariano (SCCO), seguindo o procedimento descrito por Amorim (1998). O DNA celular foi extraído mediante o uso do DNAzol (GIBCO). As células foram lisadas e centrifugadas a 14000rpm por 10 minutos utilizando 1mL de TE (10mM tris e 1mM EDTA) para 200µL da SCCO. Após a centrifugação o Pellet formado foi solubilizado em 300µL de DNAzol. O sedimento de DNA obtido foi lavado com 1mL de etanol 95% por duas vezes, sendo centrifugado a cada lavagem e ressuspenso em 8mM NaOH e estocado a -4°C, posteriormente utilizado na PCR semi-nested.

A PCR foi realizada conforme descrito anteriormente por (Marchesin et al., 1998), modificada por Rutkoski et al., (2001), sendo utilizados primers degenerados específicos para um fragmento conservado do gene *gag*, situado entre as posições 962 e 1582 do clone CAEV- Co.(Saltarelli et al, 1990), que codifica parte da proteína p27 do capsídeo. Os primers utilizados foram L3 situado entre a posição 962 a 978 com seqüência 5'-GG(A/G)GGGAGAAG(C/T)TGGAA-3'e L4 localizado entre a posição 1109-1125 de seqüência 5'-T(A/G)GC(C/T)ATGATGCCTGG-3' , ambos como primers "sense" e LRT3 situado entre a posição 1566 a 1582 de seqüência 5'-ACATCCTTCCAT(C/T)TT(C/T)T-3' como primer "antisense". O produto amplificado correspondeu a um fragmento de 467 pb.

Realizadas as reações de amplificação, as amostras foram analisadas por eletroforese horizontal em gel de agarose 1.5% com tampão TAE 1X, coradas com brometo de etídeo e visualizadas em luz ultravioleta.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

O presente estudo teve por objetivo identificar o CAEV no tecido ovariano de cabras naturalmente infectadas, para tanto foi utilizada a técnica de imunohistoquímica, para a identificação de antígenos do vírus no tecido ovariano e a técnica de PCR semi-nested, para verificar a presença do DNA proviral do CAEV no genoma das células ovarianas.

Na técnica da PCR semi-nested foram consideradas positivas aquelas amostras onde foi observada a amplificação do DNA proviral com formação de um fragmento com 467 pb, correspondente ao resultado esperado pelos primers utilizados. Quando esta técnica foi empregada o DNA proviral foi identificado em 4/18 amostras de córtex avaliadas (Tab. 1), todas de animais sorologicamente positivos para o CAEV. Nenhum dos animais soronegativos resultaram em reação positiva pela PCR-Nested.

O uso da técnica de PCR para a detecção de DNA-proviral do CAEV em células de animais naturalmente infectados foi relatada pela primeira vez por Reddy et al. (1993), em células mononucleares do sangue periférico, células do leite e no líquido sinovial. Desde então modificações da técnica vêm sendo utilizadas na detecção do DNA em diferentes tecidos de animais naturalmente infectados. No trato reprodutivo o DNA proviral já foi detectado em ovidutos, útero e meios de lavagem para coleta de embriões (Fieni et al., 2002). Recentemente o DNA proviral também foi detectado em 47,1% dos ovários de cabras de abatedouro na França, sendo o DNA proviral encontrado especialmente em células do *cumulus oophorus* (Ali Al Ahmad et al., 2005). No presente estudo foram utilizados ovários de cabras com sorologia conhecida pertencentes a um rebanho que pratica um programa de controle da CAE, através da sorologia semestral e eliminação dos animais positivos, a mais de dez anos e que mesmo assim ainda apresenta soroconversão em um número significativo de animais. O que leva a hipótese de que outras vias de transmissão, bem como de manutenção do vírus no rebanho estejam presentes, podendo este tecido ovariano infectado funcionar como reservatório do agente.

Por outro lado Frota et al. (2005) identificaram que 76,08% dos cabritos no primeiro ano de vida filhos ou netos de animais soropositivos para o CAEV, possuíam o DNA-proviral em células mononucleares do sangue periférico, porém foram negativos ao teste de imunodifusão em gel de agarose (IDGA). Indicando a possibilidade de outras formas de transmissão vertical do agente, neste contexto a infecção de gametas ainda no ovário poderia levar ao nascimento de crias tolerantes aos antígenos do vírus. Embora os estudos de Ali Al Ahmad et al., (2005) indiquem que apenas células da granulosa são infectadas, permanecendo os oócitos livres da infecção. É importante ressaltar que estes autores pesquisaram apenas folículos pré-ovulatórios, que possuem

a zona pelúcida completamente formada, sendo que esta é capaz de proteger contra a infecção pelo CAEV (Lamara et al., 2002), em folículos pré-antrais a zona pelúcida não está completamente formada, portanto estes poderiam ter seus oócitos infectados pelo agente.

Esta infecção do tecido ovariano pelo CAEV pode ter importante papel na etiopatogenia da enfermidade. Uma vez que este tecido pode atuar como uma reserva de partículas virais em animais com infecção subclínica, além de existir a possibilidade de infecção dos gametas femininos antes da fecundação.

Na imunohistoquímica não foram observadas reações positivas para a presença do agente em nenhum dos ovários analisados. O que pode ter sido provocado pela capacidade dos lentivírus de integrarem o seu DNA proviral ao genoma da célula sem que haja expressão de suas proteínas (Chebloune et al., 1996). Isto pode diminuir a sensibilidade da técnica, uma vez que esta detecta a presença de antígenos virais nos tecidos infectados. Estudos *in vitro* demonstraram que o CAEV não se replica de forma produtiva em fibroblastos apesar de ser possível isolá-lo destas células em co-cultivos com células da membrana sinovial caprina (Chebloune et al., 1996). Tendo em vista o tecido ovariano apresentar-se rico em fibroblastos, esta não expressão protéica do CAEV pode ter ocorrido *in vivo* levando aos resultados negativos observados.

Além disso, Guedes et al. (2001) afirmam que a imunohistoquímica não é a técnica ideal para a detecção de antígenos do CAEV em animais que apresentam infecção recente. Nesta pesquisa os animais eram naturalmente infectados não sendo possível determinar o momento da infecção dos mesmos, porém acredita-se tratar-se de uma infecção recente já que o rebanho de origem possuía programa de controle da enfermidade com sorologia semestral dos animais. De acordo com Storset et al. (1997), a técnica de imunohistoquímica pode ser utilizada como a auxiliar no estudo da etiopatogenia da infecção pelo CAEV, porém resultados negativos, especialmente em animais assintomáticos, devem ser avaliados com cuidado, uma vez que este agente é mais comumente encontrado em macrófagos presentes em tecidos com reação inflamatória evidente.

O CAEV já foi identificado pela imunohistoquímica em outros órgãos como pulmão, cérebro, medula espinhal e medula óssea (Storset et al., 1997; Grossi et al.,

2005), de animais naturalmente infectados, de acordo com estes autores esta detecção se deve a replicação de forma ativa do vírus nestes tecidos ou em células inflamatórias, especialmente macrófagos, presentes nos mesmos. No presente estudo, não foram observadas alterações histopatológicas nos ovários analisados, o que pode ter contribuído para não detecção de antígenos virais nos mesmos.

Neste trabalho ficou evidente que o CAEV infecta células do córtex ovariano *in vivo*, embora esta infecção pareça ocorrer de forma improdutiva, uma vez que, apesar do DNA proviral estar presente neste tecido, não foi possível a identificação de antígenos virais nas células do córtex.

### **AGRADECIMENTOS**

Esta pesquisa foi suportada em parte pela Fundação Cearense de Apoio a Pesquisa (FUNCAP). Os autores agradecem a EMBRAPA-CAPRINOS pela concessão dos animais. E ao laboratório de Virologia Veterinária da Universidade Federal do Rio Grande do Sul pela realização dos procedimentos de PCR semi-nested.

### **Referências Bibliográficas**

1. ALI AL AHMAD, M.Z.; FIENI, F.; MARTIGNAT, L., et al. Proviral DNA of caprine arthritis encephalitis virus (CAEV) is detected in cumulus oophorus cells but not in oocytes from naturally infected goats. *Theriogenology*, v. 64, n. 7, p.1656-1666, 2005.
2. AMORIM, C. A. Estudo da população de folículos ovarianos pré-antrais ovinos: desenvolvimento de uma nova biotécnica para o isolamento e caracterização folicular. Fortaleza: UECE Faculdade de Veterinária, 1998. 74 p (Tese, Mestrado).

3. ARAÚJO, S. A. C., DANTAS, T. V. M., SILVA, J. B. A. et al. Identificação do Maedi-Visna vírus em pulmão de ovinos infectados naturalmente. *Arq. Inst. Biológico*, v. 71, n.4, p.431-436, 2004.
4. CALLADO, A. K. C., CASTRO, R. S.; TEIXEIRA, M. F. S. Lentivírus de Pequenos Ruminantes (CAEV e Maedi-Visna): revisão e perspectivas. *Pesq. Vet. Bras.*, v.21, n.3, p.87-97, 2001.
5. CHEBLOUNE, Y., SHEFFER, D., KARR, B. M., STEPHENS, E. et al. Restrictive Type of Replication of Ovine/Caprine Lentiviruses in Ovine Fibroblast Cell Cultures. *Virology*, v. 222, n. 1, p. 21–30, 1996.
6. CORK, L.C., HADLON, W.J., CRAWFORD, T.B. Infectious leucoencephalomyelitis of young goats. *The Journal Infectious Disease*, v.129, n 2, p134-141, 1974.
7. DAWSON, M., JEFFREY, M., CAHSEY, D. et al. Isolation of syncytium forming virus from goat with polyarthritis. *Vet. Record*, v. 112, p. 319-321, 1983
8. EAST, N. E., ROWE, J. D., DAHLBERG, J. E. et al. Modes of transmission of caprine arthritis-encephalitis virus infection. *Small Rum. Res.*, v. 10, p. 251-262, 1993.
9. FIENI, F., ROWE, J., VAN HOOSEAR, K, et al. Presence of caprine arthritis-encephalitis virus (CAEV) infected cells in flushing media following oviductal-stage embryo collection. *Theriogenology*, v. 57, p. 931-940, 2002.
10. FREITAS, V.J.F., CAVALCANTE, T.V., SALLES, H.O. et al. Embryo transfer from seropositive goats for caprine arthritis-encephalitis vírus (CAEV) with birth of senegative kid. *Ciência Animal*, 9 (1): 5-9, 1999.
11. FROTA, M. N. L., SILVA, J. B. A., ARAÚJO, S. A. C. et al. Artrite Encefalite Caprina em cabritos de rebanhos com programa de controle no Estado do Ceará. *Arq. Inst. Biológico*, v.72, n.2. p.147-152, 2005.

12. GROSSI, P., GIUDICE, C., BERTOLETTI, I. et al. Immunohistochemical Detection of the p27 Capsid Protein of Caprine Arthritis–Encephalitis Virus (CAEV) in Bone-marrow Cells of Seropositive Goats. *J. Comp. Path.*, v. 133, n. 2-3, p. 197-200., 2005.
13. GUEDES, M. I. M. C., SOUZA, J.C.A., GOUVEIA, A.M.G. Infecção experimental em cabritos pelo vírus da artrite encefalite. *Arq. Bras. Med. Vet. e Zootec.*, v.53, n.1, p.15-20, 2001.
14. LAMARA A., FIENI F., MSELLI-LAKHAL L. et al. Early embryonic cells from *in vivo*-produced goat embryos transmit the caprine arthritis–encephalitis virus (CAEV). *Theriogenology*, v. 58, n. 06, p 1153-1163, 2002.
15. LUCCI, C. M., AMORIM, C. A., RODRIGUES, A. P. R., et al. Study of preantral follicles population in situ and after mechanical isolation from caprine ovaries at different reproductive stages. *Anim. Reprod. Sci.* v.56, p.223-236, 1999.
16. MARCHESIN, D. M.; MOOJEN, V.; RAVAZZOLO, A. P. 1998. Caracterização molecular parcial do gene *gag* de amostras do Vírus Da Artrite-Encefalite Caprina (CAEV) isolados de animais naturalmente infectados no Rio Grande do Sul, Brasil. *PESQ. VET. BRAS.*, V.18, N. 314, P. 119-126.
17. MOOJEN, V., SOARES, H. C., RAVAZOLLO, A. P. et al. Evidência de infecção pelo *Lentivírus* (maedi/visna e artrite encefalite caprina) em caprinos no Rio Grande do Sul, Brasil. *Arq. Fac. Méd. Vet. UFRGS*, v.14, p.77-78, 1986.
18. MSELLI-LAKHAL, MORNEX, J. F., CHEBLOUNE, Y. et al. Goat milk epithelial cells are highly permissive to CAEV infection *in vitro*. *Virology*, v. 259, p. 67-73, 1999.
19. NARAYAN, O. Immunopathology of lentiviral infections in ungulate animals *Curr. Op. Immun.*, V. 2, n. 3, p. 399-402,1990.
20. PINHEIRO, R. R., GOUVEIA, A. M. G., ALVES, F. S. F. Prevalência da Artrite Encefalite Caprina no estado do Ceará-Brasil. *Ciência Rural*, v.31, n. 3, 2001.



21. 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.
22. ROWE, J. D., EAST, N. E. Risk factors for transmission and methods for control of caprine arthritis-encephalitis Virus infection. *Vet. Clin. North-American: Food Animal Practice*, v. 13n.1, p. 35-53, 1997.
23. RUTKOSKI, J.K., WERENICZ, R., REISCHAK, et al. Detection of caprine arthritis-encephalitis virus infection: agar gel immunodiffusion and polymerase chain reaction with degenerated primers. *Arq. Bras. Méd. Vet. Zootec.*, 53, 6, 635-640, 2001.
24. 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.
25. STORSET, A. K., EVENSEN, O., RIMSTAD, E. Arthritis-Encephalitis Virus in Paraffin-embedded Specimens from Naturally Infected Goats. *Vet. Path.*, v. 34, n.1, p.180-188, 1997.
26. TRAVASSOS, C., BERNOIT, C., VALAS, S. et al. Caprine arthritis-encephalitis virus in semen of naturally infected bucks. *Small Rum. Res.*, v. 32, p.101-106, 1999.

Tabela 1 - Presença do DNA-proviral do vírus da artrite encefalite caprina (CAEV) em ovários de cabras naturalmente infectadas, pertencentes a rebanho com programa de controle da infecção.

	<i>Ovários de cabras Soropositivas (%)</i>	<i>Ovários de Cabras Soronegativas (%)</i>	<i>Total</i>
PCR-Nesetd+	04 (40)	00 (0)	04 (22,2)
PCR-Nested -	06 (60)	08 (100)	14 (87,2)
Total	10	08	18

## **ANEXO III:**

### **Molecular Identification of the virus of Caprine Encephalitis Arthritis (CAEV) in preantral ovarian follicles in naturally infected goats.**

Jean Berg Alves da Silva<sup>a\*</sup>, Alice Andriolli-Pinheiro<sup>b</sup>, Aracely Rafaela Fernandes Ricarte<sup>a</sup>, Regiane R. Santos<sup>c</sup>, Ana Kelen F. Lima<sup>c</sup>, Ana Paula Ravazzolo<sup>c</sup>, José Ricardo Figueiredo<sup>d</sup>, Maria Fátima da Silva Teixeira<sup>a</sup>

<sup>a</sup>Virology Laboratory (LABOVIR), Faculty of Veterinary, State University of Ceara, Av. Paranjana 1700, CEP: 60740-000, Campus do Itaperi, Fortaleza, CE, Brazil.

<sup>b</sup>Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária – Centro Nacional de Pesquisa em Caprinos, Sobral, CE, Brazil.

<sup>c</sup>Virology Laboratory, Federal University of the Rio Grande do Sul, Brazil.

<sup>d</sup>LAMOFOPA, Faculty of Veterinary, State University of Ceara, Brazil.

**Corresponding author:** Tel.: +55 85 31019849; Fax: +55 85 3101 9840.

*E-mail address:* jean\_berg2@yahoo.com.br

Artigo Submetido para publicação no periódico:

**Veterinary Microbiology**

### **Abstract**

The objective of this study was to verify where the virus of Caprine Encephalitis Arthritis (CAEV) infects preantral follicles (PF) in goats which were naturally infected. Eighteen Caprine ovaries were collected for the study, 10 being from naturally infected goats and 8 from infection

free goats. Samples of the ovarian cortex (18) and isolated PF (08) were submitted to the reaction of the 8semi-nested PCR to detect pro-viral DNA of the CAEV. Four samples resulted in a positive reaction, two from the cortex and two from the isolated FP samples. In conclusion, it was evident that the pro-viral DNA of the CAEV can be present in the PF of naturally infected goats.

**Key words:** oocytes, lentivirus, hemi-nested PCR

### **Introduction**

The virus of Caprine Arthritis Encephalitis (CAEV) is a lentivirus belonging to the Retroviridae family. It causes chronic infection in Caprine of all ages. The Caprine arthritis encephalitis (CAE) can provoke significant economic losses in affected herds. This happens through the decrease in production (Greenwood et al., 1995), as well as through the need of early discarding of animals of high genetic value (Freitas et al., 1999).

The main form of CAEV transmission is through the ingestion of colostrum and milk from infected females (Blaklaws et al., 2004). However, it is believed that other means of infection are involved in the transmission of the virus (Mselli-Lakhal et al., 1999), since the control programs which isolate the litters from infected mothers, are not successful in eradicating the disease, presenting serum conversion in some litters (Adams et al., 1983). Besides this, the virus is able to infect different types of cells *in vivo*, including cells in the reproductive tract (Fieni et al., 2003; Lamara et al., 2002; Ali Al Ahmad et al., 2005), which could play an important role in the vertical transmission of the agent or of its continued presence in the herd.

Although CAEV has already been identified in ovaries and more specifically in the cells of *cumulus oophorus* of naturally infected animals (Ali Al Ahmad et al., 2005), there are no studies to date of its occurrence in ovarian follicles in initial stages of development. On the other

hand, the pre-antral follicles (PF) are classified according to the morphology and the number of layers of cells of the prominent granulosa cells, at primary and secondary stages (Hulsholf et al., 1994), with zona pellucida (zp) being detectable only from the secondary follicles (BECKERS et al., 1996). In this way, oocytes of follicles in the initial stages of growth would be susceptible to viral infections. This being the case, this study had as its aim to identify the proviral DNA of the CAEV in pre-antral ovarian follicles PF in goats which had been naturally infected.

### **Methodology**

#### **Selection of animals**

Nine goats were selected being of the breeds: Saanen, Alpine and Anglo-Nubian between four and six years of age. Five were naturally infected and four were infection free (concerning the CAEV). For the detection of anti-bodies against CAEV a technique of immune-diffusion in agar gel (IDGA) using a commercial antigen (Kit – Veterinary Diagnostic Technology Inc ®, USA). The animals considered serum negative had at least three of the most recent IDGA tests results being negative. Tests were done at six month intervals. The animals belonged to the herd which has a program of voluntary control of CAE, and has had for over 10 years. A bi-yearly test is done and animals with positive results are separated.

#### **Collection and Transport of the Ovaries**

The ovaries were collected after slaughter of the animals. The adjacent tissue was immediately removed; the ovary was washed with 70% alcohol (10s) and twice in a saline solution (0.9%). The ovaries were then separately placed in sterile tubes containing 20 ml of 0.9% saline solution, to which was added 100µg/mL of penicillin and 100µg/mL of streptomycin, cooled to 4°C.

#### **Preparation of the Tissues for the hemi-nested PCR**

In the laboratory, the tissue surrounding the ovaries and ligaments were removed. They were cut in half and then the medulla, the large antral follicles and the corpus luteum were removed. The ovarian cortex was then sectioned to obtain the isolated PF's and a suspension of ovarian cortex cells (SOCC) which were designated for the realization of the hemi-nested PCR.

The isolation of the ovarian follicles was done by using a technique described by Amorim et al. (2000), with modification. The fragmentation of the ovarian cortex was done using the Tissue Chopper (The Mickle Laboratory Engineering Co., Gomshal, Surrey, UK) adjusted to make serial sections at intervals of 50  $\mu\text{m}$ . The ovarian fragments were then placed in Minimal Essential Medium (MEM) with 10% bovine fetal serum (BFS). After which the mechanical disassociation was done using Pasteur pipettes of 600  $\mu\text{m}$  in diameter and filtration, using mesh of 500 and 100  $\mu\text{m}$  respectively, thus obtaining a SOCC.

A total of 26 samples were submitted to hemi-nested PCR for the identification of proviral DNA of the CAEV, being 18 SOCC and eight PF.

#### **Hemi-nested PCR procedure**

The cellular DNA was extracted through the use of DNAzol (GIBCO). The cells were smoothed and centrifuged at 14000rpm for 10 minutes using 1mL of TE (10mM tris and 1mM EDTA) for 200 $\mu\text{L}$  of the SCCO, for the pool of isolated PF, these follicles were sedimented by centrifuge and the formed pellet was diluted in 200 $\mu\text{L}$  of MEM. After the centrifuge, the formed pellet was made soluble in 300 $\mu\text{L}$  of DNAzol. The DNA sediment obtained was washed twice with 1mL of 95% ethanol, being centrifuged at each washing and re-suspended in 8mM NaOH and stored at  $-4^{\circ}\text{C}$ , for later use in the hemi-nested PCR.

Specific degenerated primers were used for one conserved fragment of the gene gag, situated between the positions 962 and 1582 of the clone CAEV- Co. (Saltarelli *et al*, 1990). The

primers were L3 situated between positions 962 and 978 with the sequence 5'-GG (A/G)GGGAGAAG(C/T)TGGAA-3' and L4 located between the positions 1109-1125 of the sequence 5'-T(A/G)GC(C/T)ATGATGCCTGG-3' , both used as "sense" primers and LRT3 situated between the positions 1566 to 1582 of sequence 5'-ACATCCTTCCAT(C/T)TT(C/T)T-3' as "anti-sense" primer (Rutkoski et al., 2001). The PCR hemi-nested was done with an amplified product corresponding to a fragment of 467 pb. The PCR hemi-nested procedure was done according to the description by Rutkoski et al., (2001). Once the reactions of enlargement were done, the samples were analyzed for horizontal electrophoresis in agarose gel of 1.5% with a TAE 1X lid, colored with ethidium bromide and seen under ultra-violet light.

### **Results**

The samples considered positive were those where the enlargement of the proviral DNA was observed, with formation of the fragment with 467pb, corresponding to the expected result, by the primers used. A total of 26 samples were submitted to the hemi-nested PCR for detection of proviral DNA of the CAEV, being 18 of cortex of ovum and eight of PF pool. Of the 17 cortex samples, two presented positive reactions for hemi-nested PCR. Both of the positive samples were from serum positive animals.

With the follicle isolation technique used, an average of 100 PF per ovary was obtained, for a total of approximately 900 analyzed follicles. These were grouped in a pool by ovary, totaling nine samples of PF pool submitted to PCR-nested. In two, proviral DNA was detected, both were from animals which had positive test results, which, however, had shown a negative result in the hemi-nested PCR of the ovarian cortex. Neither animal showed any sign of enlargement of proviral DNA in the hemi-nested PCR (Table 1).

### **Discussion**

The main objective of this study was to identify the proviral DNA of the CAEV, through the use of hemi-nested PCR, in preantral ovarian follicles in goats which had been naturally infected. It showed, for the first time, that PF of naturally infected goats can be infected by CAEV. The disagreement between the results of the samples of ovarian cortex and of the preantral ovarian follicles can be explained by the large number of cells present in the SOCC, which may decrease the sensitivity of the reaction by the reduction of the number of proviral DNA copies present in the sample (Kuzmak et al., 2003). With the results obtained, it is evident that the preantral ovarian follicle cells of naturally infected goats can present the proviral DNA of CAEV in its genome. However, this study was not able to determine which cells are infected by the virus. The ovary is a complex organ composed of various types of cells which include oocytes, granulosa cells, theca cells, stromal cells and epithelial cells of the surface (Hirshifield, 1991). On the other hand, epithelial and fibroblast cells which are present in large quantities in the ovarian cortex are susceptible *in vitro* and *in vivo* to infection by CAEV (Chebloune et al., 1996; Mselli-Lakhal et al., 1999; Lamara et al., 2001). These cells could be those responsible for the results which were obtained.

*In vivo* the CAEV has as its cell targets monocytes and macrophages (Narayan & Clements, 1989) however the virus has already been identified in other tissues. In the reproductive tract, its proviral DNA was identified in the uterus, oviduct and in the middle of uterine washing of naturally infected animals (Fieni et al., 2002). Recently Ali Al Ahamad et al. (2005) described that the CAEV infects cells of the *cumulus oophorus* of pre-ovulation follicles; however the oocytes of this follicular stage seem to resist infection. Oocytes included in pre-ovulatory follicles present a zp completely formed around the oocyte, which protects it from the infection of CAEV, since the virus is unable to get through the zp barrier. (Lamara et al., 2002). It is able, though, to infect granulosa cells (Lamara et al., 2001). On the other hand, follicles in



initial stages of development do not yet have a completely formed zp, so the oocyte would be susceptible to infection by the CAEV.

The presence of virus infected oocytes has already been described in other species (Kattstrom et al., 1989; Fray et al., 1998). In bovines Fray et al. (1998), it was shown that the virus of the bovine viral diarrhea (BVDB) infected oocytes included in preantral ovarian follicles, in an active form. This fact could show the link to the birth of animals persistently infected with BVDV. In cud chewers, it has been shown that the lentivirus has the capacity of expressing its proteins in oocytes, including the production of transgenic litters, coming from the infected oocytes with sub-zonal injections of genetically modified lentivirus (Hofmann et al., 2004). The active metabolism of oocytes, the absence of the zona pellucida and the direct contact with the granulosa cells and the elements of the ovarian stromal cells, make the oocytes included, vulnerable FOPA's to infection by viral pathogens. This being the case, once the oocytes are infected, they can carry this genetic material until the moment of fecundation with the consequent production of persistently infected litters.

### **Conclusion**

Goats naturally infected with CAEV present the proviral DNA of the virus in preantral ovarian follicles. The presence of CAEV in FOPA can represent a risk of infection of the oocyte since in this follicular stage the zp is not completely formed, thus the virus is able to have direct contact with the membrane of the oocyte.

### **Acknowledgments**

Jean Berg A. da Silva is a recipient of a grant from FUNCAP of Brazil. The authors thank EMBRAPA-CAPRINOS for the animals concession.

### **References**

1. Ali Al Ahmad, M.Z.; Fieni, F.; Martignat, Chatagnon, L. G., Baril, G., Bouvier, F., Chebloune, Y., 2005 Proviral DNA of caprine arthritis encephalitis virus (CAEV) is detected in cumulus oophorus cells but not in oocytes from naturally infected goats. *Theriogenology*, 64, 1656-1666.
2. Amorim, C. A., Rodrigues, A. P. R., Lucci, C. M., Figueiredo, J. R., Gonçalves, P. B. D., 2000. Effect of sectioning on the number of isolated ovine preantral follicles. *Small Ruminant Research* 37, 269-277.
3. Beckers, J. F., Drion, P. V., Figueiredo, J. R., Goffin, L., Pirottin, D., Ectors, F. J., 1996 The ovarian follicles in cow: *In vivo* growth and *in vitro* culture. *Reprod. Dom. Anim.*, 31, 543-548.
4. Blacklaws, B.A., Berriatua, E., Torsteinsdottir, Watt, S., N.J., de Andres D., Klein D., Harkiss G.D., 2004. Transmission of small ruminant lentiviruses. *Veterinary Microbiology* 101, 199–208.
5. Bureau, M., Dea, S., Sirard, M. A., 2005. Evaluation of virus decontamination techniques for porcine embryos produced in vitro. *Theriogenology*, 63, 2343–2355.
6. Chebloune, Y., Karr, B., Sheffer, D., Leung, K., Narayan, O., 1996. Variations in lentiviral gene expression in monocyte-derived macrophages from naturally infected sheep. *J. Gen. Virol.* 77, 2037–2051.
7. Fieni, F., Rowe, J., Van Hoosear, K., Burucoa, C., Oppenheim, S., Anderson, G., Murray, J., BonDurant, R., 2003. Presence of caprine arthritis–encephalitis virus (CAEV) proviral DNA in genital tract tissues of superovulated dairy goat does. *Theriogenology* 59, 1515–1523.

8. Fray, M. D., Prentice, H., Clarke, M. C., Charleston, B., 1998. Immunohistochemical evidence for the localization of bovine diarrhea virus, a single-stranded RNA virus, in ovarian oocytes in the cow. *Vet. Pathol.*, 35, 253-259.
9. Freitas, V.J.F., Cavalcante, T.V., Salles, H.O. Teixeira M. F. S., 1999 Embryo transfer from seropositive goats for caprine arthritis-encephalitis virus (CAEV) with birth of seronegative kid. *Ciência Animal*, 9 (1): 5-9.
10. Greenwood, P.L., North, R.N., Kirkland, P.D., 1995. Prevalence spread and control of caprine arthritis-encephalitis virus in dairy goat herds in New South Wales. *Aust. Vet. J.* 72, 341-345.
11. Hirshfield, A.N., 1991. Development of follicles in mammalian ovary. *Int. Rev. Cytol.*, 124, 43-101.
12. Hofmann, A., Zkhartchenko V., Weppert M., Sebald H., Wenigerkind, H., Brem, G., Wolf, E., Pfeifer A., 2004. Generation of Transgenic Cattle by Lentiviral Gene Transfer into Oocytes. *Biol. Rep.*, 71, 405-409.
13. Hulshof, S.C.J. Figueiredo, J.R., Beckers, J.F., Bevers, M.M., Van Den Hurk, R., 1994. Isolation and characterization of preantral follicles from foetal bovine ovaries. *The Veterinary Quarterly* 2, 78-80.
14. Kattstrom, P. O., Bjerneroth, g., Nilsson, B. O., Holmdahl R., Larsson, E., 1989. A retroviral gp-70-related protein is expressed at specific stages during mouse oocyte maturation and in preimplantation embryos. *Cell. Diff. Dev.*, 28, 517-521.
15. Kuzmak, J., Kedziora, A., Rola, M., Kozaczynska, B., Chebloune, Y., Gallay, K., 2003 Evaluation of PCR and PCR/hybridization method for the detection of

- caprine arthritis-encephalitis virus infection in goats. Bull. Vet. Inst. Pulawy, 47, 293-300.
16. Lamara, A., Fieni, F., Mselli-Lakhal, L., Chatagnon, G., Bruyas, J.F., Tainturier, D., Battut, I., Fornazero, C., Chebloune, Y., 2002. Early embryonic cells from in vivo-produced goat embryos transmit the caprine arthritis-encephalitis virus (CAEV). Theriogenology 58, 1153–1163.
17. Lamara, A., Fieni, F., Mselli-Lakhal, L., Tainturier, D., Chebloune, Y., 2001. Efficient replication of caprine arthritis-encephalitis virus in goat granulosa cells. Virus Res. 79, 165–172.
18. Marchesin, D. M.; Moojen, V.; Ravazzolo, A. P., 1998. Caracterização molecular parcial do gene *gag* de amostras do vírus da artrite-encefalite caprina (caev) isolados de animais naturalmente infectados no Rio Grande do Sul, Brasil. Pesq. Vet. Bras. 18(314), 119-126.
19. Mselli-Lakhal, L., Guiguen, F., Fornazero, C., Du, J., Favier, C., Durand, J., Grezel, D., Balleydier, S., Mornex, J.F., Chebloune, Y., 1999. Goat milk epithelial cells are highly permissive to CAEV infection in vitro. Virology 259, 67–73.
20. Narayan, O., Clements, J.E., 1989. Biology and pathogenesis of lentiviruses. J. Gen. Virol. 70, 1617–1639.
21. Rutkoski, J.K., Werenicz, R., Reischak, Wendelstein, D. C., Moojen, V., Ravazzolo, A. P., 2001. Detection of caprine arthritis-encephalitis virus infection: agar gel immunodiffusion and polymerase chain reaction with degenerated primers. Arq. Bras. Méd. Vet. Zootec. 53, 6, 635-640.

22. Saltarelli, M., Querat, G., Konings, D. A. M., Vigne, R., and Clements, J. E. 1990. Nucleotide sequence and transcription analysis of molecular clones of CAEV which generate infectious virus. *Virology*, 179, 347-364.
23. Singh, E.L., Dulac, G.C., Henderson, J.M., 1997. Embryo transfer as a means of controlling the transmission of viral infections XV. Failure to transmit bluetongue virus through the transfer of embryos from viremic sheep donors. *Theriogenology* 47, 1205–1214.
24. Singh, E.L., McVicar, J.W., Hare, W.C.D., Mebus, C.A., 1986. Embryo transfer as a means of controlling the transmission viral infections VII. The in vitro exposure of bovine and porcine embryos to foot and mouth disease virus. *Theriogenology* 26, 587–593.

## ANEXO IV:

Cryopreservation of oocytes enclosed in preantral follicles of goats naturally infected with the Caprine Encephalitis Arthritis Virus (CAEV).

Jean Berg Alves da Silva<sup>a\*</sup>, Aracely Rafaelle Fernandes Ricarte<sup>a</sup>, Alice Andriolli-Pinheiro<sup>b</sup>, Cláudio Afonso Pinho Lopes<sup>c</sup>, Ana Kellen F. Lima<sup>c</sup>, Ana Paula R. Rodrigues<sup>c</sup>, José Ricardo Figueiredo<sup>c</sup>, Maria Fátima da Silva Teixeira<sup>a\*</sup>

<sup>a</sup>Virology Laboratory (LABOVIR), Faculty of Veterinary, State University of Ceara, Av. Paranjana 1700, CEP: 60740-000, Campus do Itaperi, Fortaleza, CE, Brazil.

<sup>b</sup>Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária – Centro Nacional de Pesquisa em Caprinos, Sobral, CE, Brazil.

<sup>c</sup>Laboratory of Manipulation of Oocytes Enclosed in Preantral Follicles, LAMOFOPA  
Faculty  
of Veterinary, State University of Ceara', Fortaleza, CE, Brazil

\* **Corresponding authors:** Tel.: +55 85 31019849; Fax: +55 85 3101 9840.

*E-mail address:* [jean\\_berg2@yahoo.com.br](mailto:jean_berg2@yahoo.com.br) or [mfsteixeira@hotmail.com](mailto:mfsteixeira@hotmail.com)

Artigo Submetido para publicação no periódico:

**Theriogenology**

## **Abstract**

The aim of this study was to cryopreserve oocytes enclosed in preantral follicles (FP) of goats which were naturally infected with the Caprine Encephalitis Arthritis Virus (CAEV) using dimethyl sulfoxide (DMSO) 1.5M as a cryoprotectant. In order to do this, eight mixed breed goats were used, four having been naturally infected with the CAEV and four which were free from infection, coming from a flock with a control program for the illness. The ovaries were collected after the animals were slaughtered. In the laboratory they were divided into fragments with one being fixed for histological evaluation and the others being cryopreserved or submitted to semi-nested PCR for the identification of the proviral DNA in the ovarian tissue. In the cryopreservation process, the fragments were maintained for 20 minutes at 20° C with a solution of 1.5M DMSO and then frozen using a slow cryopreservation curve. After thawing, the fragments were histologically evaluated. In the fresh ovaries of animals which were seropositive, a greater percentage ( $p < 0.05$ ) of degenerated FP (30.2%) was shown, when compared to seronegative animals (12.5%). After cryopreservation, the percentage of degenerated follicles increased in all of the groups and there was no significant difference ( $p < 0.05$ ) in the rate of degeneration between seropositive and seronegative animals. The presence of proviral DNA by semi-nested PCR was not shown in any of the ovaries used in the experiment. In conclusion, it was shown that oocytes enclosed in FP of goats which were naturally infected with CAEV can be cryopreserved with the use of DMSO 1.5M as a cryoprotectant.

**Keywords:** proviral DNA, reproductive biotechnology, primordial follicles

## **1. Introduction**

The use of cryopreservation for the preservation of gametes and embryos is a common practice in human reproduction [1-3], and animal [4-6]. In veterinary medicine this technique is used in the preservation of genetic material of animals in danger of extinction, as individuals with great zootechnical potential [7].

Historically, cryopreservation has been largely used for the preservation of embryos produced *in vivo* [8]. However, recently, its use in the preservation of oocytes has gained importance. The cryopreservation of oocytes enclosed in preantral ovarian follicles (FOPA) has received special attention due to the fact that they have lower metabolic activity, a smaller number of organelles, and they do not have a zona pellucida or cortical granulosa cells which makes them more resistant in the freezing and thawing process [9-11].

The cryopreservation of oocytes enclosed in FOPA has been done with success in diverse species humans [10], felines [12], sheep [6,13,14], Caprine [7,15], as well as the birth of viable litters after autologous transplants in sheep [16-17]. In spite of the diverse studies already realized with the application of this bio-technique, its use in the preservation of animals with infectious diseases has not yet been investigated. This would be very important, as one of the major problems in the disease control programs where there is chronic infection is the need to sacrifice the infected animals, which implies the loss of their genetic potential.

Among the agents which cause chronic infections in productive animals, we can highlight the Caprine Encephalitis Arthritis Virus (CAEV) which is a lentivirus belonging to the Retroviridae family. It causes chronic, multi-systemic infection in Caprine of all ages [18, 19], provoking significant economic losses not only through the decrease in



production, but also through the need of discarding of animals of high zoo-technical value too early [20, 21].

Although CAEV has already been identified in the cells of *cumulus oophorus in vivo*, it appears not to infect oocytes [22]. This would allow for the use of these oocytes in the production of *in vitro* embryos and posterior implantation in animals which are infection free, in order to obtain healthy litters.

In view of the potential of cryopreservation of Caprine oocytes enclosed in FOPA and the need for alternatives to take advantage of genetic material of animals which were naturally infected with CAEV, this study aims to cryopreserve FOPA of goats which were naturally infected with the CAEV.

## **2. Material and Methods**

### **2.1 Selection of animals**

Eight goats were selected being of the breeds: Saanen, Alpine and Anglo-Nubian between four and six years of age. Four were naturally infected and four were infection free (concerning the CAEV). For the detection of anti-bodies against CAEV a technique of immune-diffusion in agar gel (IDGA) using a commercial antigen (Kit – Veterinary Diagnostic Technology Inc ®, USA). The animals considered serum negative had at least three of the most recent IDGA tests results being negative. Tests were done at six month intervals. The animals belonged to the herd which has a program of voluntary control of CAE, and has had for over 10 years. A bi-yearly test is done and animals with positive results are separated.

### **2.2 Collection and Transport of the Ovaries**

The ovaries were collected after slaughter of the animals. The adjacent tissue was immediately removed; the ovary was washed with 70% alcohol (10s) and twice in a saline solution (0.9%). The ovaries were then separately placed in sterile tubes containing 20 ml of 0.9% saline solution, to which was added 100µg/mL of penicillin and 100µg/mL of streptomycin, cooled to 4°C.

### **2.3. Freezing and thawing**

Fragments of feline ovary tissue were placed in 2 ml cryovials containing 1.8 ml of MEM supplemented with 10% fetal bovine serum (MEM+) with DMSO at 1.5 M. After 20 min at 20°C (equilibrium period), vials were inserted into a programmable freezer (Freeze Control, CryoLogic Pty Ltd., Waverley, Australia) and cooled from 20°C to -7°C at a rate of 2°C/min. Ice crystal formation (seeding) was then performed manually by touching the cryovials at the meniscus level of the cryoprotectant solution with a forceps previously cooled in liquid nitrogen. After 15 min at this temperature, cryovials were cooled at 0.3°C/min to -30°C, then at 0.15°C/min to -33°C and afterward plunged into liquid nitrogen (-196°C) and stored for seven days.

The cryovials were then thawed by exposing them to air at room temperature (RT, approximately 25°C) for 1 min and then to water at 37°C until the ice have melted (2-3 min). After this, cryoprotectants were immediately removed from the tissue [7, 15]. Briefly, the fragments were rinsed three times for 5 min in MEM+ at RT. The ovarian fragments were then fixed for histological analysis as described later.

### **2.4. Histological analysis**

Fragments of ovarian tissue were fixed in 10% formal fixative for 24 h, dehydrated, clarified, embedded in paraffin wax and serially cut into 7 µm-thick sections. Every fifth section was mounted on glass slides, stained with periodic eosin - hematoxylin and evaluated by light microscopy. Preantral follicles were defined as follicles with an oocyte surrounded either by one flattened and/or cuboidal layer or several layers of only cuboidal granulosa cells. To avoid counting a follicle more than once, preantral follicles were counted only in the sections where their oocyte nucleus was observed. Follicular quality was evaluated based on the morphological integrity of the oocyte, the granulosa cells and the basement membrane. Preantral follicles were classified as morphologically normal when they contain an intact oocyte and intact granulosa cells, or degenerated when their oocyte nucleus has become pyknotic, and the oocyte is shrunken and its nucleus pyknotic and, when possibly granulosa cells have detached from the basement membrane and have enlarged in volume.

The preantral follicles were classified according to their morphology, as morphologically normal (oocytes and granulosa cells intact without the presence of pyknotic bodies) or degenerated ones. The degenerated ones were divided into level one (when there were alterations in oocytes with the presence of pyknotic bodies) and level two (when there was a nucleus of pyknotic bodies and retraction being accompanied or not by the loosening of granulosa cells from the basal membrane) [7, 15].

## **2.5. Preparation of the Tissues for the hemi-nested PCR**

In the laboratory, the tissue surrounding the ovaries and ligaments were removed. They were cut in half and then the medulla, the large antral follicles and the corpus luteum were removed. The ovarian cortex was then sectioned to obtain a suspension of ovarian cortex cells (SOCC) which were designated for the realization of the hemi-nested PCR.

The fragmentation of the ovarian cortex was done using the Tissue Chopper (The Mickle Laboratory Engineering Co., Gomshal, Surrey, UK) adjusted to make serial sections at intervals of 50  $\mu\text{m}$ . The ovarian fragments were then placed in Minimal Essential Medium (MEM) with 10% bovine fetal serum (BFS). After which the mechanical disassociation was done using Pasteur pipettes of 600  $\mu\text{m}$  in diameter and filtration, using mesh of 500 and 100  $\mu\text{m}$  respectively, thus obtaining a SOCC.

All samples cryopreserved were submitted to hemi-nested PCR for the identification of proviral DNA of the CAEV.

## **2.6. Hemi-nested PCR procedure**

The cellular DNA was extracted through the use of DNAzol (GIBCO). The cells were smoothed and centrifuged at 14000rpm for 10 minutes using 1mL of TE (10mM tris and 1mM EDTA) for 200 $\mu\text{L}$  of the SCCO. After the centrifuge, the formed pellet was made soluble in 300 $\mu\text{L}$  of DNAzol. The DNA sediment obtained was washed twice with 1mL of 95% ethanol, being centrifuged at each washing and re-suspended in 8mM NaOH and stored at  $-4^{\circ}\text{C}$ , for later use in the hemi-nested PCR.

Specific degenerated primers were used for one conserved fragment of the gene gag, situated between the positions 962 and 1582 of the clone CAEV- Co [23]. The primers were L3 situated between positions 962 and 978 with the sequence 5'-GG

(A/G)GGGAGAAG(C/T)TGGAA-3' and L4 located between the positions 1109-1125 of the sequence 5'-T(A/G)GC(C/T)ATGATGCCTGG-3', both used as "sense" primers and LRT3 situated between the positions 1566 to 1582 of sequence 5'-ACATCCTTCCAT(C/T)TT(C/T)T-3' as "anti-sense" primer [24]. The PCR hemi-nested was done with an amplified product corresponding to a fragment of 467 pb. The PCR hemi-nested procedure was done according to the description by Rutkoski [24]. Once the reactions of enlargement were done, the samples were analyzed for horizontal electrophoresis in agarose gel of 1.5% with a TAE 1X lid, colored with ethidium bromide and seen under ultra-violet light.

### **2.7. Statistical Analysis**

In order to verify possible variations in the percentages of deteriorated and normal follicles, as well as between the types of degeneration in the preantral follicles of seropositive and seronegative animals, after freezing/ thawing and with the respective fresh controls, the Chi-square test was done with a level of significance of 5%.

## **3. Results**

### **3.1. Percentage of normal preantral follicles in fresh cryopreserved ovaries of CAEV seropositive and seronegative animals.**

A total of 480 preantral ovarian follicles were studied. The FOPA percentage in normal, fresh ovaries in seronegative and seropositive animals were 87.5% and 69.8%, respectively. In the fresh ovaries, the percentage of normal follicles was lower for seropositive animals than for seronegative animals ( $p < 0.05$ ).

However, after cryopreservation no significant difference was observed in the percentage of normal follicles between seronegative and seropositive animals. The percentages for normal follicles were 10% and 14.2% respectively.

### **3.2. Distribution of the level of follicular degeneration in fresh and cryopreserved ovaries seropositive and seronegative animals.**

The Table 1 shows the distribution of percentages of the level I and level II degeneration in the different groups which were analyzed. The percentage of degenerated follicles level I and II was lower in the control groups than in the cryopreserved follicles, in infected animals as well as in uninfected animals. ( $p < 0.05$ ). Before cryopreservation there was no difference between the percentages of the level I and II degenerations of each serum group ( $p < 0.05$ ). After cryopreservation, the percentage of degenerated ones in level II was greater than those in level I, in the two serum groups ( $p < 0.05$ ).

When comparing seropositive and seronegative animals, it was observed that the percentage of level II degenerated ones, after cryopreservation, was greater in seronegative animals. In the other categories, the percentage of degenerated follicles was always greater in seropositive animals ( $p < 0.05$ ).

### **3.3. PCR Semi-nested for the detection of CAEV proviral DNA in the ovarian cortex**

All the ovaries used in the cryopreservation were submitted to PCR semi-nesting for the enlargement of CAEV proviral DNA. However, no sign of enlargement was observed, indicating the absence of viral infection in the ovaries studied.

## **4. Discussion**

In this study, cryopreservation was done for the first time with oocytes enclosed in preantral follicles of goats which were naturally infected with CAEV. In the histological analysis, the preantral follicles of the infected animals showed morphology which was similar to animals which were free from infection, before and after freezing. The rate of degeneration of the FOPA was greater in infected animals before the cryopreservation ( $p < 0.05$ ). In contrast, after the freezing/thawing process, no difference was verified between the rates of degeneration of the FOPA of infected and non-infected animals.

The rate of degeneration observed in infected animals (30.25) was greater than that observed in previous studies [25-27], differently from animals, free from infection which showed similar figures. This may have been caused by the characteristics of the infection, since CAEV causes chronic infection which could affect the normal metabolism of the animal, leading to loss of weight and an imbalance in energetic equilibrium [28]. In spite of the fact that the proviral DNA was not detected in the ovarian cortex, the systematic changes provoked by the disease could reduce the nutritional contribution of the ovarian tissue with a consequent increase in the degeneration of the FOPA.

The percentages of normal follicles after cryopreservation obtained in this study (14.2%) were below those obtained by Rodrigues [7]. His study used DMSO 1.5M as a cryoprotectant and the same freezing curve, but obtained a percentage of normal follicles of 26%. In our study, the ovaries were kept at 4°C for six hours, period for transporting them from the slaughter point to the laboratory. This may have influenced the quality of the follicles, increasing their susceptibility to damage caused by the cryoprotectant and by the cryopreservation process itself. Although previous studies indicated that Caprine preantral follicles could maintain their structural and ultra-

structural integrity for at least 24 hours when kept in saline solution at 4°C [26, 27], there are still no studies on the behavior of these follicles when submitted to the process of cryopreservation.

The percentage of normal follicles after cryopreservation was similar in CAEV seropositives and seronegatives animals (14.2% and 10%, respectively). This may indicate the feasibility of cryopreservation of oocytes enclosed in FOPA of animals which were naturally infected by CAEV.

When compared with the fresh ovaries, the percentage of degenerated follicles was greater after cryopreservation, which was also observed in previous studies, studies with the Caprine species as well as other animal species (Caprine [7, 15]; ovine [14], feline [12]). The increase in the degeneration of the preantral follicles could have been caused by cryodamage during the cryopreservation process or in the thawing as well as by the toxic effect of the cryoprotectant which could cause an osmotic imbalance and thus cause damage to the oocyte and the granulosa cells [7, 15, 29].

Regarding the degeneration of level I and II, they increased after cryopreservation. No significant difference was observed ( $p < 0.05$ ) between the two levels of degeneration in fresh ovaries within each serologic group (positive and negative). In contrast, the percentage of degenerated follicles of level II was greater after thawing, indicating that during cryopreservation the granulosa cells as well as the oocyte suffered structural damage. This had already been observed in previous studies with caprine [7, 15] as well as in ovine [14], feline [12] and bovine [5].

The CAEV proviral DNA was not detected in ovaries used in this study. *In vivo*, the CAEV has monocytes and macrophages as their target cells [30], although the virus has already been identified in other tissues. In the reproductive tract, its proviral DNA was



identified in the uterus, oviduct and in the middle of uterine washing of animals which had been naturally infected [31]. The CAEV is capable of infecting ovarian cells *in vivo*, although this infection is not observed in all animals with the disease [22, 32].

Ali Al ahmad [22] described the infection of CAEV in *cumulus oophorus* cells in goats which had been naturally infected. However the authors did not identify the CAEV in the oocytes of these animals, which shows a possible resistance of the oocyte to the CAEV infection. In sheep Cortez Romero [33] also observed the *cumulus oophorus* cells in animals which had been naturally infected with the Maedi Visna Virus (MVV). This shows a strict genetic correlation to CAEV. Animals are susceptible to the infection *in vivo*; however the virus was not identified in the oocyte, or in the follicular fluid of these animals. The resistance of the oocytes to the infection indicates the possibility of the use of reproductive bio-techniques, such as the maturation and fertilization *in vitro* of the oocytes and implantation of the embryos in animals which are free from the infection, in order to obtain litters which are free of the virus from infected mothers. This could allow for an alternative control of lentivirus in small cud chewers and the preservation of the genetic material of females which carry the infection [22, 33].

The cryopreservation of oocytes enclosed in the FOPA constitutes a promising alternative for the preservation of genetic material of goats infected with CAEV, since various studies have shown that cryopreserved FOPÀ are feasible, maintaining their growth capabilities *in vitro* (Rodrigues [34] in Caprine; Cecconi [35] in ovine). In the future this could allow for the maturation of these oocytes and their consequent use in other reproductive bio-techniques with fertilization *in vitro* in order to obtain litters which are free from infection.

However, when dealing with animals carrying chronic infection, it is fundamental to prove that the viral agent is no longer present in the cryopreserved tissue, which can be done through the use of molecular techniques for the detection of CAEV genetic material in the ovarian tissue.

In conclusion, this study shows, for the first time, the viability of cryopreservation of oocytes enclosed in preantral follicles of goats which were naturally infected with CAEV. This shows that this bio-technique is an alternative for the preservation of the genetic material of animals which carry chronic infections.

### **5. Acknowledgments**

Jean Berg A. da Silva is a recipient of a grant from FUNCAP of Brazil. The authors thank EMBRAPA-CAPRINOS for the animals concession.

### **6. References**

1. Hovatta, O.; Silye, R.; Krausz, T.; Abir, R.; Margara, R.; Trew, G.; Lass, A.; Winston, R.M.L. Cryopreservation of human ovarian tissue using dimethylsulphoxide and propanediol-sucrose as cryoprotectants; Hum. Reprod. 1996;11:1268-1272.
2. Gook, D.A., Edgar, D.H., Stern, C. The effects of cryopreservation regimens on the morphology of human ovarian tissue. Mol. Cell. End. 2000;169:99–103.
3. Gosden, R.G., 2000. Low temperature storage and grafting of human ovarian tissue. Mol. Cell. End. 2000;63:125–129.
4. Fuku, E., Xia, L., Downey, B.R. Ultrastructural changes in bovine oocytes cryopreserved by vitrification. Cryobiology 1995; 32:139–156.

5. Paynter, S.J., Cooper, A., Fuller, B., Shaw, R.W., 1999. Cryopreservation of bovine ovarian tissue: structural normality of follicles after thawing and culture in vitro. *Cryobiology* 1999;38:301–309.
6. Salle, B., Lornage, J.A., Demirci, B., Vaudoyer, F., Poirel, M.T., Franck, M., Ridigoz, R.C., Guerin, J.F., Restoration of ovarian steroid secretion and histologic assessment after freezing, thawing and autograft of a hemi-ovary in sheep. *Fertil. Steril.* 1999;72: 366–370.
7. Rodrigues, A.P.R.; Amorim, C.A.; Costa, S.H.F.; Matos, M.H.T.; Santos, R.R.; Lucci, A.C.M.; Bao, S.N., Ohashi, O.M.; Figueiredo, J.R. Cryopreservation of caprine ovarian tissue using dimethylsulphoxide and propanediol. *Animal Reproduction Science.* 2004;84:211–227.
8. Shaw, J.M., Oranratnachai, A., Trounson, A.O. Fundamental cryobiology of mammalian oocytes and ovarian tissue. *Theriogenology* 2000;53:59–72.
9. Nugent, D., Meirow, D., Broock, P.F., Aubard, Y., Gosden, R.G. Transplantation in reproductive medicine: previous experience, present knowledge and future prospects. *Hum. Reprod. Update* 1997;3:267–280.
10. Oktay, K., Nugent, D., Salha, O., Chatterjee, P., Gosden, R.G. Isolation and characterization of primordial follicles from fresh and cryopreserved human ovarian tissue. *Fertil. Steril.* 1997;67:481–486.
11. Liu, J., Van der Elst, J., Van den Broecke, R., Dumortier, F., Dhont, M. Maturation of mouse primordial follicles by combination of grafting and in vitro culture. *Biol. Reprod.* 2000;62:1218–1223.

12. Lima, A. K. F., Silva, A. R., Santos, R. R., Sales, D. M., Evangelista, A. F., Figueiredo, J. R., Silva L. D. M. Cryopreservation of preantral follicles in situ from domestic cats (*Felis catus*). *Theriogenology*. **IN PRESS**.
13. Baird, D.T., Webb, R., Campbell, B.K., Harkness, L.M., Gosden, R.G. Long-term ovarian function in sheep after ovariectomy and transplantation of autografts stored at  $-196^{\circ}\text{C}$ . *Endocrinology* 1999;140:462–471.
14. Santos, R. R., Rodrigues, A. P. R., Costa, S. H. F., Silva, J. R. V., Matos, M. H. T., Lucci, C. M., Bao S. N., Van Den Hurk, R., Figueiredo, J. R. Histological and ultrastructural analysis of cryopreserved sheep preantral follicles. *Animal Reproduction Science* 2006;91:249–263.
15. Rodrigues, A.P.R., Amorim, C.A., Costa, S.H.F., Matos, M.H.T., Santos, R.R.; Lucci, A.C.M.; Bao, S.N., Ohashi, O.M.; Figueiredo, J.R. Cryopreservation of caprine ovarian tissue using glycerol and ethylene glycol. *Theriogenology* 2004;61:1009–1024.
16. Gosden, R.G., Baird, D.T., Wade, J.C., Webb, R. Restoration of fertility to oophorectomized sheep by ovarian autografts stored at  $-196^{\circ}\text{C}$ . *Hum. Reprod.* 1994;9: 597–603.
17. Salle, B., Demirci, B., Franck, M., Rudigoz, R.C., Guerin, J.F., Lornage, J. Normal pregnancies and live births after autograft of frozen–thawed hemiovaries into ewes. *Fertil. Steril.* 2002;77: 403–408.
18. Cork, L. C.; Hadlow, W.J.; Crawford, T. B.; Gorham, J. R.; Piper, R. C. Infectious leukoencephalomyelitis of young goats. *Journal Infectious Disease* 1974;129:134-141.

19. Cheevers WP, Knowles DP, McGuire TC, Cunningham DR, Adams DS, Gorham JR. Chronic disease in goats orally infected with two isolates of the caprine arthritis-encephalitis lentivirus. *Lab Invest* 1988;59(5):510–517.
20. Smith MC, Cutlip RC. Effects of infection with caprine arthritis-encephalitis virus on milk production in goats. *J Am Vet Med Assoc* 1988;193:36–65.
21. Greenwood PL. Effects of arthritis-encephalitis virus on productivity and health of dairy goats in New South Wales. *Aust Prevent Vet Med* 1995;22(1–2):71–87.
22. Ali Al Ahmad, M.Z.; Fieni, F.; Martignat, L., et al. Proviral DNA of caprine arthritis encephalitis virus (CAEV) is detected in cumulus oophorus cells but not in oocytes from naturally infected goats. *Theriogenology* 2005;64(7):1656-1666.
23. 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*, 1990;179:347-364.
24. Rutkoski, J.K., Werenicz, R., Reischak, et al. Detection of caprine arthritis-encephalitis virus infection: agar gel immunodiffusion and polymerase chain reaction with degenerated primers. *Arq. Bras. Méd. Vet. Zootec.* 2001;53(6): 635-640.
25. Silva J.R.V., Ferreira, M.A.L., Costa, S.H.F. *et al.* Degeneration rate of preantral follicles in the ovaries of goats. *Small Ruminant Research*, 2002;43:203-209.

26. Carvalho, F.C.A., Lucci, C.M., Silva, J.R.V., Bao, S.N., Figueiredo, J.R.  
Effect of Braun-Collins and Saline solutions at different temperatures and incubation times on the quality of goat preantral follicles preserved in situ. *Animal Reproduction Science*, 2001;66:195-208.
27. Costa, S. H. F., Andrade, E. R., Silva, J. R. V., Rodrigues, A. P. R., Amorim, C. A., Lobo, R. N. B., Ohashi, O. M., Figueiredo, J. R. *Small Ruminant Research*, 2005;58:189-193.
28. Greenwood, P. L. Effects of caprine arthritis-encephalitis virus on productivity and health of dairy goats in New South Wales, Australia. *Preventive Veterinary Medicine*, 1995;22:71-87.
29. Sugimoto, M., Miyamoto, H., Kabasawa, T., Manabe, N., Follicle survival in neonatal rat ovaries cryopreserved by vitrification. *Cryo-Letters* 1996;17:93–98.
30. Narayan, O., Clements, J.E. Biology and pathogenesis of lentiviruses. *J. Gen. Virol.* 1989;70:1617–1639.
31. Fieni, F., Rowe, J., Van Hoosear, K, et al. Presence of caprine arthritis-encephalitis virus (CAEV) infected cells in flushing media following oviductal-stage embryo collection. *Theriogenology* 2002;57:931-940.
32. Fieni, F., Rowe, J., Van Hoosear, K., Burucoa, C., Oppenheim, S., Anderson, G., Murray, J., BonDurant, R. Presence of caprine arthritis-encephalitis virus (CAEV) proviral DNA in genital tract tissues of superovulated dairy goat does. *Theriogenology* 2003;59:1515–1523.

33. Cortez Romero, Fieni, C., F., Roux, C., Russo P., Guibert J.M., Guiguen, F., Chebloune, Y., Pépin, M., Pellerin J.L. Detection of ovine lentivirus in the cumulus cells, but not in the oocytes or follicular fluid, of naturally infected sheep. *Theriogenology*. **ARTICLE IN PRESS**
34. Rodrigues, A.P.R., Amorim C.A., Costa, S.H.F., Santos, R.R., Lucci, C.M., Nunes J.F., Figueiredo, J.R. Cryopreservation and short-term culture of isolated caprine primordial follicles. *Small Ruminant Research*, 2005;56:103–111.
35. Cecconi, S., Capacchietti, G., Russo, V., Lli, P.B., Mattioli, M., Barboni, B., 2004. In vitro growth of preantral follicles isolated from cryopreserved ovine ovarian tissue. *Biol. Reprod.* 2004;70:12–17.

Table 1 – Percentage of normal, degenerating I and II preantral follicles (%) degenerated after frozen/thawed in ovaries from goats naturally infected with the Caprine Encephalitis Arthritis Virus (CAEV +) and I goat infection free (CAEV-).

	Frescos		Criopreservados	
	CAEV -	CAEV +	CAEV -	CAEV +
87,5 <sup>ae</sup> (105)	69,8 <sup>be</sup>			
(84)	10 <sup>ce</sup>			
(12)	14,2 <sup>ce</sup>	(17)		
5 <sup>af</sup> (06)	15,1 <sup>bf</sup>			
(18)	78,3 <sup>cf</sup>			
(94)	60,8 <sup>df</sup>	7,5 <sup>af</sup> (09)	15,1 <sup>bf</sup> (18)	11,7 <sup>ae</sup> (14)
(73)	Total	100	100	100
100	Degenerado			
	I			
	Normal			

Degenerado II

a, b, c, d Values within rows are significantly different ( P< 0,05).

e, f Values within rows are significantly different (P<0.05).