



**UNIVERSIDADE ESTADUAL DO CEARÁ
PRÓ-REITORIA DE PÓS-GRADUAÇÃO E PESQUISA
FACULDADE DE VETERINÁRIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS
VETERINÁRIAS**

KELMA COSTA DE SOUZA

**ANÁLISE DO CAEV EM SALIVA E DINÂMICA VIRAL EM
SÊMEN DE REPRODUTORES NAS FASES AGUDA E CRÔNICA
DA INFECÇÃO**

**FORTALEZA-CE
2015**

KELMA COSTA DE SOUZA

ANÁLISE DO CAEV EM SALIVA E DINÂMICA VIRAL EM SÊMEN
DE REPRODUTORES NAS FASES AGUDA E CRÔNICA DA
INFECCÃO

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

Área de Concentração: Reprodução e Sanidade Animal.

Linha de Pesquisa: Reprodução e Sanidade de Pequenos Ruminantes.

Orientador(a): Profa. Dra. Maria Fátima da Silva Teixeira.

FORTALEZA-CE
2015

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação

Universidade Estadual do Ceará

Sistema de Bibliotecas

Souza, Kelma Costa de.

Análise do CAEV em saliva e dinâmica viral em sêmen de reprodutores nas fases aguda e crônica da infecção [recurso eletrônico] / Kelma Costa de Souza. 2015.

1 CD-ROM: il.; 4 ¼ pol.

CD-ROM contendo o arquivo no formato PDF do trabalho acadêmico com 93 folhas, acondicionado em caixa de DVD Slim (19 x 14 cm x 7 mm).

Tese (doutorado) - Universidade Estadual do Ceará, Faculdade de Veterinária, Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, Fortaleza, 2015.

Área de concentração: Reprodução e Sanidade Animal.

Orientação: Prof.^a Dra. Maria Fátima da Silva Teixeira.

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

1. CAEV. 2. infecção aguda. 3. infecção crônica. 4. saliva. 5. sêmen. I. Título.

KELMA COSTA DE SOUZA

ANÁLISE DO CAEV EM SALIVA E DINÂMICA VIRAL EM SÊMEN DE
REPRODUTORES NAS FASES AGUDA E CRÔNICA DA INFECÇÃO

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

Aprovada em: 21 / 07 / 2015

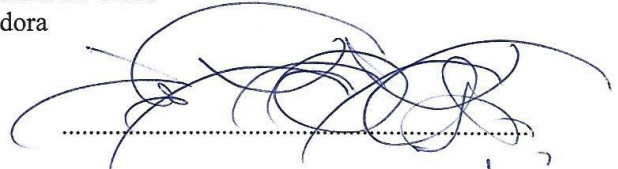
BANCA EXAMINADORA


.....


Profa. Dra. Maria Fátima da Silva Teixeira
Universidade Estadual do Ceará
Orientadora


.....

Dra. Alice Andrioli
EMBRAPA Caprinos e Ovinos
Examinadora
Co-orientadora


.....

Prof. Dr. Ney Rômulo de Oliveira Paula
Universidade Federal do Piauí
Examinador


.....

Dr. Raymundo Rizaldo Pinheiro
EMBRAPA Caprinos e Ovinos
Examinador


.....

Dra. Lucia Helena Sider
EMBRAPA Caprinos e Ovinos
Examinadora

“Proponha-se a atingir o sol e você poderá não o alcançar, mas sua seta voará muito mais alto do que se fosse apontada para um objeto ao mesmo nível de você”.

(Joel Hawes)

Dedicatória

Dedico esse trabalho à minha família com muito amor

Aos animais envolvidos no estudo com muita gratidão

E a todos que de alguma maneira acreditaram e ajudaram na sua realização

AGRADECIMENTOS

Deus “A força e a honra são seu vestido, e se alegrará no dia futuro” Pr 31:25.

À Universidade Estadual do Ceará (UECE) e ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias (PPGCV) pela oportunidade de fazer o curso. E ao corpo docente não somente por ter me ensinado, mas por ter me feito aprender.

À Fundação Cearense de Apoio à Pesquisa (FUNCAP) pelo apoio financeiro ao projeto e pela bolsa de estudos concedida.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) também fonte financiadora do projeto.

À Embrapa Caprinos e Ovinos pelo uso das instalações e dos animais experimentais para a realização desse trabalho. E a cada um dos funcionários e colegas bolsistas que contribuíram nas atividades pertinentes ao projeto, bem como pelos bons momentos de descontração.

Ao Laboratório de Virologia (LABOVIR) por ser minha referência no PPGCV. E a todos os colegas que o compõem.

A coordenação do PPGCV, em especial a secretária Adriana Maria Sales Albuquerque sempre pronta a ajudar.

À minha orientadora Prof^a Dr^a Maria Fátima da Silva Teixeira, excelente educadora. Que confiou no meu trabalho e deu-me a oportunidade de tê-la como orientadora.

À Dr^a Alice Andrioli Pinheiro minha co-orientadora e ao Dr Raymundo Rizaldo Pinheiro, excelentes profissionais que me orientaram desde o início da vida acadêmica. Os considero as pessoas que mais ajudaram em minha ascensão como profissional.

Aos Drs. Ney Rômulo de Oliveira Paula e Lucia Helena Sider, por aceitarem prontamente o convite de participar da banca examinadora. Igualmente a Dr^a Ângela Xavier Eloy, membro suplente.

À Dr^a Marta Fonseca Martins, pelo uso do laboratório na Embrapa Gado de Leite onde realizei uma etapa do experimento.

Aos reprodutores caprinos, fundamentais para os resultados obtidos nesse trabalho. E aos animais de maneira geral por ter me incentivado a pesquisa como forma de melhoria para vida animal.

À minha família, que me apoia em todos os passos da minha vida, sempre acreditando em meu crescimento como pessoa e como profissional. Especialmente minha Mãe Ruth e minha irmã Keila, que me deram suporte nos momentos de dificuldade, e palavras de força e otimismo. Muito obrigada - amo vocês!!!

Enfim para a realização dessa pós-graduação, muitas pessoas colaboraram de diferentes formas, seja com uma palavra amiga, com algum conhecimento repassado, com alguma ajuda no experimento, mas, sem dúvida a união de tudo me impulsionou para mais essa etapa vencida.

A todos vocês meu **MUITO OBRIGADA!!!**

Resumo

A detecção do material genético do vírus da artrite encefalite caprina (CAEV) em sêmen de machos recentemente infectados, pode ocorrer antes mesmo da resposta sorológica. Adicionalmente, a transmissão do vírus por inseminação artificial com sêmen infectado foi recentemente comprovada. Contudo, há necessidade de buscar maior conhecimento do que acontece neste fluido em todas as fases da infecção. Além do sêmen, deve-se atentar a presença do vírus em outras amostras como em saliva, que tem permitido o diagnóstico de doenças infecciosas em humanos e animais.

Dessa forma, o primeiro objetivo deste estudo foi investigar a presença do DNA proviral do CAEV em amostras de saliva de reprodutores infectados. Para tanto dez machos caprinos divididos em dois grupos, G1 ($n = 8$) composto por animais positivos e G2 ($n = 2$) com animais negativos como controle, tiveram a saliva coletada em jejum de 12h, e obtida através de sucção do fluido da cavidade oral na região lateral dos dentes molares inferiores. A técnica de detecção utilizada foi a reação em cadeia da polimerase *nested* (nPCR) para amplificar um fragmento final de 187 pb do DNA proviral do CAEV. Como resultado, constatou-se que 100% dos animais do grupo positivo amplificaram o fragmento do DNA proviral na saliva, contudo houve resultados positivos e negativos para o mesmo animal em momentos diferentes. Com relação ao grupo controle nenhum animal apresentou resultado positivo. Desse modo, ficou comprovando que caprinos infectados eliminam o vírus na saliva, e possivelmente as células da saliva que o albergam podem produzir vírus infeccioso.

O segundo objetivo do estudo foi demonstrar a eliminação do CAEV no sêmen de reprodutores nas fases aguda e crônica da infecção. Foram utilizados onze machos caprinos divididos em dois grupos, G1 ($n = 5$) composto por machos experimentalmente infectados para representar a fase aguda da artrite encefalite caprina (CAE), e G2 ($n = 6$) grupo com infecção crônica, constituído por reprodutores naturalmente infectados. O sêmen foi coletado pelo método de vagina artificial, e a técnica de detecção viral foi (nPCR). Os resultados mostraram o início da infecção como o período de maior detecção do CAEV no sêmen, pois, o fragmento do DNA proviral foi amplificado em 4/5 (80%) dos animais pertencentes ao grupo G1, enquanto que no G2 o provirus foi detectado em 4/6 (66,7%) dos animais, porém, não foi observada diferença significativa ($P > 0.05$) entre as fases. Contudo, foi observado que os dois grupos apresentaram três padrões de eliminação do provirus no sêmen: ausente, contínuo e intermitente, ressaltando que a eliminação intermitente prevaleceu em relação às demais. Desse modo, tendo em vista a intermitência da eliminação viral no sêmen, esta possa ser um indicador para seleção de ejaculados livres do vírus por meio de técnicas moleculares, para um possível aproveitamento na reprodução utilizando biotécnicas reprodutivas.

Palavras chave: CAEV. Infecção aguda. Infecção crônica. Saliva. Sêmen.

Abstract

The detection of the genetic material of the caprine arthritis encephalitis virus (CAEV) in the semen of goats recently infected may happen even before the serological response. In addition, CAEV has also been proved to be transmitted through artificial insemination. However, there is need to seek greater knowledge about what happens in this fluid at all stages of infection. Moreover, besides semen, attention should be paid to the presence of the virus in other samples such as saliva, which is target of diagnosis of infectious diseases in humans and animals.

Thus, the first objective of this study was to determine the presence of proviral DNA in saliva of infected goats. Ten male goats were assorted into two groups: G1 (n = 8) composed of positive animals, and G2 (n = 2), composed of negative animals for control. Saliva was collected in fasting animals (12 h), by suctioning it from the oral cavity of the lateral side of the lower molars. Nested polymerase chain reaction (nPCR) was used to amplify a final 187 bp fragment of the CAEV proviral DNA. As a result, it was found that 100% of the animals of the positive group amplified the fragment in the saliva, although there were positive and negative results from the same animal at different times. None of the animals of the control group tested positive. Nevertheless, it was proved that infected goats excrete the virus in their saliva, and possibly salivary cells that shelter it can produce infectious virus.

The objective of the second study was to evidence CAEV elimination in seminal plasma of male goats with acute and chronic infection. Eleven male goats were divided into one of two groups, G1 (n = 5), consisting of experimentally infected males to represent the acute CAE phase, and G2 (n = 6), consisting of naturally infected reproducers which had chronic infection. The semen was collected by the artificial vagina method, and viral detection was also performed by nested PCR. The results showed that the beginning of the infection was the period of greatest CAEV elimination in the semen, because the target fragment was amplified in 4/5 (80%) of the animals belonging to the group G1, whereas in the G2 the provirus was detected in 4/6 (66,%) the animals, but not significantly different ($P > 0.05$) between the phases. However, the two groups presented three elimination patterns of the provirus in the semen: absent, continuous and intermittent, regardless of the phase of infection. Among these, intermittent elimination prevailed. Nevertheless, the intermittent viral elimination from the semen indicates that molecular biology techniques could be used to select virus-free ejaculates for possible use in reproduction by reproductive biotechniques.

Keywords: Acute infection. CAEV. Chronic infection. Saliva. Semen.

LISTA DE FIGURAS

Revisão de Literatura

- Figura 1 Estrutura de um retrovírus. A partícula viral contendo duas cópias da enzima transcriptase reversa (RT) associada ao RNA de cadeia positiva no interior do núcleo. Encontra-se também nucleocapsídeo (NC), capsídeo (CA), integrase (IN) e a protease (PR). O núcleo é envolvido por uma camada externa a matriz (MA), que por sua vez é englobada pela glicoproteína (ENV) do envelope 20
- Figura 2 Representação genômica dos lentivirus de pequenos ruminantes (LVPR). Com as repetições terminais longas (LTR) do provírus. Que são formadas a partir das regiões U3, R e U5 do genoma viral e 5' da região U3 contém o promotor e intensificador elementos importantes do vírus e a região 3' contém a região de poliadenilação da U3. Os genes das janelas abertas de leitura (ORF) são indicados: genes estruturais: *gag*, *pol*, *env*; gene de regulamentação: *rev*; gene acessório: *vif* das ORF S; região (*pro*) da protease do gene *pol* 22
- Figura 3 Replicação de um retrovírus. A infecção começa quando a proteína viral Env interage com o receptor celular e entra na célula. O RNA de sentido inverso é transcrito pela RT em DNA que depois entra no núcleo e é integrada no genoma do hospedeiro. Após a acumulação das proteínas virais sintetizadas de novo e RNA genômico viral, os componentes são unidos a partir da célula, com a aquisição de uma membrana celular derivada. A partícula amadurece quando as poliproteínas Gag e Gag-Pol são clivadas pela protease viral 23

Figura 4	Representação das glândulas salivares maiores dos ruminantes tendo como modelo um bovino. 1- Glândula parótida; 2- Glândula mandibular; 3a- Glândula sublingual polistomática e 3b- Glândula sublingual monostomática	24
----------	---	----

Capítulo II

Figura 1	Gel de agarose a 2% corado com brometo de etídio, apresentando produtos da amplificação do fragmento-alvo do DNA proviral do CAEV equivalente a 187pb. M (marcador DNA ladder 100pb); 1,5 (amostras negativas dos animais positivos); 2, 3, 4 e 6 (amostras positivas dos animais positivos) 7 e 8 (amostras negativas dos animais controles); C+ (controle positivo da reação); C- (controle negativo da reação)	54
----------	---	----

Capítulo III

Fig.1.	Results of the three different patterns of CAEV shedding in semen: absent (animal 1); continuous (animals 2 and 3) and intermittent (animals 2, 3, 4 and 5). Acute infection	70
Fig.2.	Results of the three different patterns of CAEV shedding in semen: absent (animals 9 and 11), continuous (animal 7) and intermittent (animals 6, 7, 8 and 10). Chronic infection	71

LISTA DE TABELAS

Capítulo II

Tabela 1	Sequências dos primers usados na reação de nPCR, com o tamanho dos fragmentos amplificados	52
Tabela 2	Resultados positivos e negativos obtidos nos testes de nPCR para o DNA proviral do CAEV na saliva dos animais dos diferentes grupos nas sete coletas	54

Capítulo III

Table 1	Mean and standard deviation of the semen parameters of male goats with acute and chronic infection by the CAEV	72
Table 2	Results of nested polymerase chain reaction (<i>nPCR</i>) test in semen and western blotting (WB) test in serum of male goats with acute CAEV infection	73
Table 3	Results of nested polymerase chain reaction (<i>nPCR</i>) test in semen and western blotting (WB) test in serum of male goats with chronic CAEV infection	74

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

%	Porcentagem
χ^2	Qui-quadrado
°C	Graus Celsius
AIDS	Síndrome da imunodeficiência adquirida (“Acquired immunodeficiency syndrome”)
BIV	Vírus da imunodeficiência bovina (“Bovine Immunodeficiency Virus”)
EIAV	Vírus da anemia infecciosa equina (“Equine Infectious Anemia Virus”)
CA	Proteína do cápsideo
CAE	Artrite encefalite caprina (“Caprine Arthritis Encephalitis”)
CAEV	Vírus da artrite encefalite caprina (“Caprine Arthritis Encephalitis Virus”)
CBRA	Colégio Brasileiro de Reprodução Animal
CEUA	Comitê de Ética para o Uso de Animais
CMhm	<i>Candidatus Mycoplasma haemominutum</i>
PCV2	Circovírus porcino de tipo 2 (“Porcine Circovirus type 2”)
DNA	Ácido desoxirribonucléico
DNTP	Desoxirribonucleotídeo fosfato
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético
ELISA	Ensaio de imunoadsorção enzimática (“Enzyme-linked immunosorbent assay”)
Embrapa	Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária
<i>env</i>	Gene codificante das proteínas do envelope viral
ENV	Proteína do envelope viral
EUA	Estados Unidos da América
FeLV	Vírus da leucemia felina (“Feline Leukemia Virus”)
FIV	Vírus da imunodeficiência felina (“Feline Immunodeficiency Virus”)
FMDV	Vírus da febre aftosa (“Foot-and-mouth Disease Virus”)
G1	Grupo 1
G2	Grupo 2
<i>gag</i>	Gene codificante dos antígenos específicos do grupo

gp	Glicoproteína
g/cm ³	Gramas por centímetro cúbico
h	Horas
HIV	Vírus da imunodeficiência humana (“Human Immunodeficiency Virus”)
HIV-1	Vírus da imunodeficiência humana tipo 1 (“Human Immunodeficiency Virus type 1”)
IA	Inseminação artificial
IDGA	Imunodifusão em gel de agarose
IgA	Imunoglobulina A
IgG	Imunoglobulina G
IgG1	Subclasse 1 da imunoglobulina G
IgG2	Subclasse 2 da imunoglobulina G
IgM	Imunoglobulina M
IN	Integrase
Kb	Kilobase
LTR	Terminações longas repetidas (“long terminal repeats”)
LVPR	Lentivírus de pequenos ruminantes
MA	Proteína da matriz
µg/ mL	Micrograma por microlitro
Mhf	<i>Mycoplasma haemofelis</i>
min	Minutos
mL	Mililitro
µL	Microlitro
µM	Micromolar
mM	Milimolar
mRNA	Ácido ribonucleico mensageiro
MVV	Vírus maedi visna (“Maedi Visna Vírus”)
NaCl	Cloreto de sódio
NC	Proteína do nucleocápsideo
nestedPCR	Reação em cadeia da polimerase aninhada (“Nested polymerase chain reaction”)
OIE	Organização Mundial de Saúde Animal (“Office International des Épizooties”)

ORFs	Regiões abertas de leitura (“Open Reading Frames”)
pb	Pares de bases (“base pairs”)
PCR	Reação em cadeia da polimerase (“Polymerase chain reaction”)
pH	Potencial hidrogeniônico
pmol	Picomol
PNSCO	Programa Nacional de Sanidade dos Caprinos e Ovinos
<i>pol</i>	Gene codificante das enzimas virais
<i>pro</i>	Gene codificante da protease
PR	Protease
PRRSV	Vírus da síndrome reprodutiva e respiratória (“Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Vírus”)
qPCR	Reação em cadeia da polimerase quantitativa (“Quantitative Polymerase Chain Reaction”)
RT	Transcriptase reversa
RT-PCR	PCR precedido da transcrição reversa
P<0,05	Probabilidade menor que 5%
RNA	Ácido ribonucleico
S	Segundo
SIV	Vírus da imunodeficiência símia (“Simian Immunodeficiency Virus”)
SU	Proteína de superfície
TAT	Proteína regulatória transativadora (“transactivator regulatory protein”)
TCID ₅₀	Dose infectante de 50% da cultura de tecido (“50% tissue culture infectious dose”)
TM	Proteína transmembranária
U	Unidade
<i>vif</i>	Fator de infectividade viral
VSV	Vírus da estomatite vesicular (“Vesicular Stomatitis Vírus”)
WB	Western blotting

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	18
2	REVISÃO DE LITERATURA	19
2.1	PARTE I - Vírus da Artrite Encefalite Caprina (CAEV)	19
2.1.1	Taxonomia	19
2.1.2	Constituição	20
2.1.3	Ciclo de Replicação	22
2.1.4	Células alvo	23
2.2	PARTE II - Fluido oral amostra para detecção de patógenos virais	24
2.2.1	Saliva: Conceitos Básicos	24
2.2.2	Saliva fonte de anticorpos	25
2.2.3	Saliva como fluido de diagnóstico na medicina humana	26
2.2.4	Saliva como fluido de diagnóstico na medicina veterinária	27
2.2.4.1	Felinos	27
2.2.4.2	Suínos	28
2.2.4.3	Bovinos	28
2.2.4.4	Ovinos e Caprinos	29
2.3	PARTE III - Vírus da artrite encefalite caprina em sêmen	29
3	JUSTIFICATIVA	30
4	HIPÓTESES CIENTÍFICAS	30
5	OBJETIVOS	31
5.1	Objetivo Geral	31
5.2	Objetivos Específicos	31
6	CAPÍTULO I – ARTIGO DE REVISÃO	32
7	CAPÍTULO II - ARTIGO CIENTÍFICO I	47
8	CAPÍTULO III - ARTIGO CIENTÍFICO II	62
9	CONCLUSÕES	83
10	PERSPECTIVAS	83
11	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	84
	ANEXO - Parecer do Comitê de Ética para Uso de Animais (CEUA).....	93

1 INTRODUÇÃO

A família Retroviridae inclui vários agentes infecciosos de importância na medicina veterinária e humana. Os membros dessa família estão classificados em diferentes gêneros e espécies, como os lentivirus de pequenos ruminantes que afetam caprinos (CAEV) e ovinos (MVV), o vírus da anemia infecciosa eqüina (EIAV), e os vírus da imunodeficiência felina (FIV), bovina (BIV), símia (SIV) e (HIV) humana (PATRICK et al., 2002; QUINN et al., 2005). Normalmente esses vírus estão associados a doenças de progressão lenta, crônica e degenerativa (LEITE et al., 2013).

Dentre os retrovírus acima citados, o vírus da artrite encefalite caprina (CAEV) é de grande importância para caprinocultura, por provocar a artrite encefalite caprina (CAE), uma infecção permanente, pois o vírus persiste no organismo por toda a vida do animal e leva a perdas econômicas expressivas devido à diminuição da produção animal e barreiras à importação de animais vivos e de seus produtos ou germoplasma (PINHEIRO et al., 2001).

A fonte de infecção da CAE são os animais infectados, que transmitem o agente por meio de secreções ou excreções ricas em células do sistema monocítico-fagocitário. Das vias de transmissão, a digestiva é a mais amplamente conhecida, ocorre geralmente no período neonatal com a ingestão pela cria de colostro e/ou leite de cabras infectadas (PUGH, 2004).

Para os animais adultos, o contato direto e prolongado representa um importante fator na transmissão do vírus, pelo contato com a saliva, as secreções respiratória e urogenital dos animais infectados, dependendo da situação particular de cada criação (BLACKLAWS et al., 2004).

Outros mecanismos para transmissão horizontal incluiriam a exposição dos animais susceptíveis a alimentos contaminados, água, rações e forragens contendo secreções infectadas pelo vírus e exposição a aerossóis contendo partículas virais (SMITH & SHERMAN, 1994). Em estudo recente Villoria et al. (2013) detectaram sequências virais dos lentivirus de pequenos ruminantes (LVPR) em amostras de água e ar, coletadas em instalações de rebanhos com prevalência média a alta da infecção, levantando questões sobre a transmissão horizontal do vírus.

A respeito do aspecto reprodutivo na transmissão do CAEV, o sêmen tem sido reconhecido como um importante fator. Pois, a forma proviral do vírus foi identificada em células não espermáticas no ejaculado de machos naturalmente e experimentalmente

infectados (TRAVASSOS et al., 1998; TRAVASSOS et al., 1999). E em tecidos de órgãos sexuais masculino como testículos, epidídimo, ampola vesicular, próstata, glândulas bulbouretrais (PETERSON et al. 2008), além dos vasos deferentes e glândulas vesiculares (ALI AL HAMAD et al., 2008).

Mais recentemente ficou comprovado que o CAEV é transmitido pela via reprodutiva, pois Souza et al. (2013) inseminaram fêmeas soronegativas por via transcervical com sêmen contaminado *in vitro* e, posteriormente, detectaram anticorpos anti-CAEV nessas fêmeas. Contudo, esse tema torna-se cada vez mais desafiador. Ainda persistem demandas por pesquisas que possam fornecer subsídios sobre a análise do CAEV no sistema reprodutivo.

Nesse contexto, no presente estudo propõem-se os seguintes objetivos: Avaliar a presença do CAEV na forma proviral em saliva de reprodutores infectados, e demonstrar a eliminação do vírus em sêmen nas fases aguda e crônica da infecção.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1. PARTE I - Vírus da Artrite Encefalite Caprina (CAEV)

2.1.1 Taxonomia

O CAEV é pertencente à família Retroviridae, e gênero *Lentivirus* (KLEVJER-ANDERSON et al., 1984; LARA et al., 2005). O nome do gênero esta associado à capacidade de se manterem latentes no hospedeiro por longos períodos de tempo, não se replicando e dificultando o reconhecimento por parte do sistema imune e a formação de anticorpos, atuando como um reservatório viral (LAIRMORE, 2011; MCDONNEL et al., 2013).

2.1.2 Constituição

O CAEV é um vírus envelopado de formato icosaédrico, têm 80-100 nanômetros de diâmetro (Figura 1) e densidade de 1,13-1,18 g/cm³ (DAHLBERG et al., 1981). Transporta duas pequenas moléculas de RNA (7-11 Kb) de cadeia simples com polaridade positiva (HAZIZA et al., 2001; LEROUX & MORNEX, 2008), e a transcriptase reversa dependente de magnésio e proteínas do nucleocapsídeo (GONDA et al., 1986).

O envelope viral está associado com as glicoproteínas transmembranárias e de superfície (HUSO et al., 1988). Outra estrutura presente na partícula viral é a matriz proteica que está situada entre o capsídeo e o envelope (PEPIN et al., 1998).

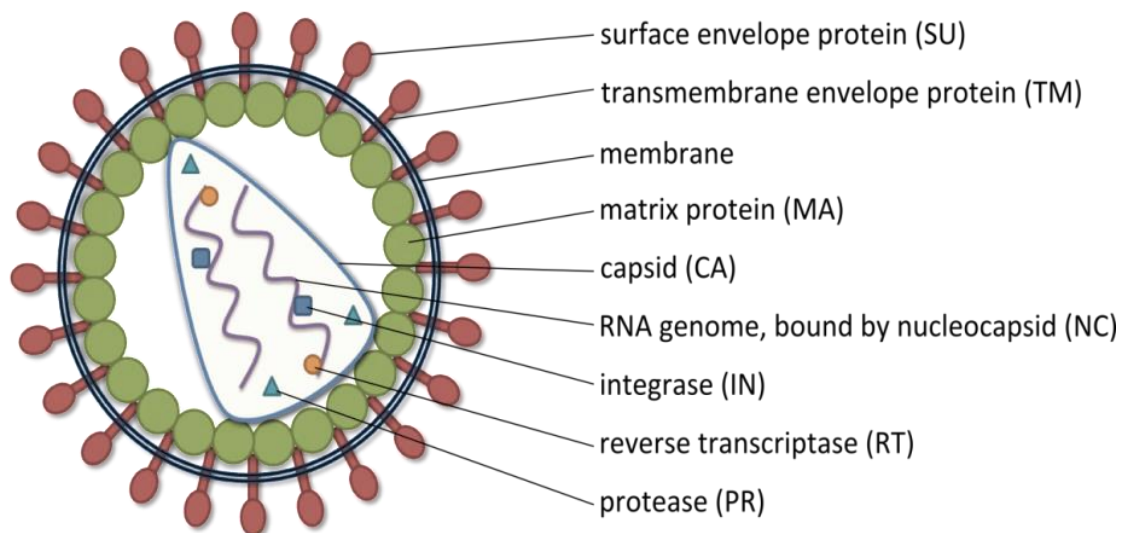


Figura 1. Estrutura de um retrovírus. A partícula viral contendo duas cópias da enzima transcriptase reversa (RT) associada ao RNA de cadeia positiva no interior do núcleo. Encontrase também nucleocapsídeo (NC), capsídeo (CA), integrase (IN) e a protease (PR). O núcleo é envolvido por uma camada externa a matriz (MA), que por sua vez é englobada pela glicoproteína (ENV) do envelope. (O'Keefe, 2013).

Como todo retrovírus, o genoma está organizado em três regiões principais (Figura 2).

Região *Gag* (group specific antigen) codifica as proteínas estruturais internas, (MA-matriz, CA-cápside e NC-nucleocápsideo) que constituem o vírion. Essas proteínas são originadas a partir de uma proteína precursora denominada Gag (CLEMETS & ZINK, 1996).

Região *Pol* (*polymerase*) que contém as ORFs (*open reading frames* ou regiões abertas de leitura) das enzimas virais responsáveis pelo processo de transcrição reversa e integração proviral (RT-transcriptase reversa, PR-protease, IN-integrase). Essas enzimas intervêm na transcrição reversa do RNA viral em DNA linear de cadeia dupla, e na integração deste nas células do hospedeiro (BERGER et al., 2001; HARE et al., 2009).

Região *Env* (*envelope*) responsável pela codificação das glicoproteínas do envelope (SU-superfície ou gp135, e TM-transmembranária) (CARTER & SAUNDER, 2007) com a capacidade de se ligar e fundir com as células alvo. Ambas as proteínas são derivadas de um precursor comum designado Env, na qual a função é mediar a adsorção e a fusão do invólucro vírico com a membrana celular, possibilitando a penetração do core nas células-alvo (HULLINGER et al., 1993).

A proteína *vif* está relacionada com a infectividade viral e com o controle da produção das partículas virais infecciosas, enquanto as proteínas *tat* e *env* estão envolvidas com a regulação da expressão viral (CLEMETS PAYNE, 1994).

O genoma apresenta ainda regiões não codificantes em suas terminações, que são fundamentais para a replicação do vírus: duas regiões R repetidas nas duas terminações, uma região U5 na terminação 5' e uma U3 na terminação 3'. Após a transcrição inversa, estas regiões, dão origem às extremidades do genoma do provírus denominados LTR ("long terminal repeats") compostos pelos três fragmentos U3-R-U5 (LEROUX & MORNEX, 2008).

As LTR podem apresentar tamanhos variáveis, servem de local de início da transcrição, contêm diversos elementos importantes para o tropismo celular do vírus, bem como os promotores virais e a "TATA box" (HESS et al., 1986; ANGELOPOULOU et al., 2006).

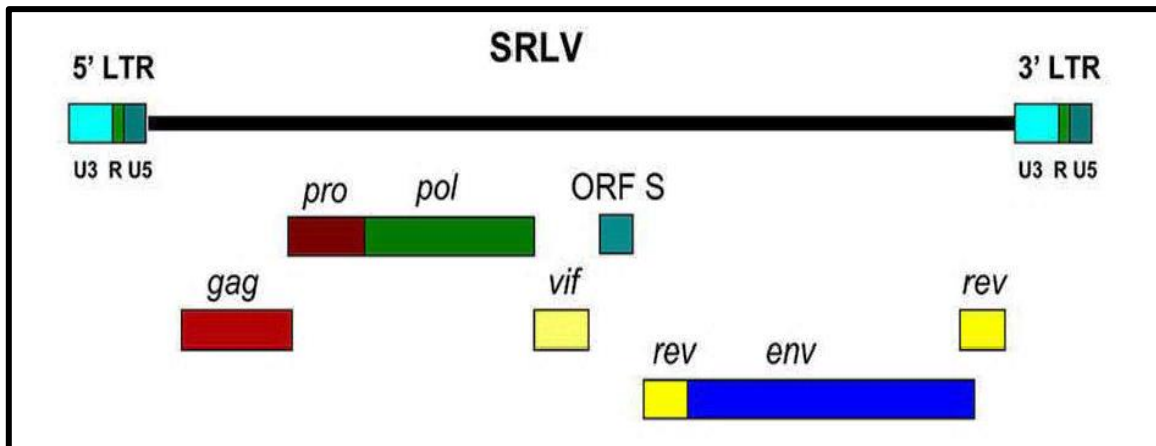


Figura 2. Representação genômica dos lentivírus de pequenos ruminantes (LVPR). Com as repetições terminais longas (LTR) do provírus. Que são formadas a partir das regiões U3, R e U5 do genoma viral e 5' da região U3 contém o promotor e intensificador elementos importantes do vírus e a região 3' contém a região de poliadenilação da U3. Os genes das regiões abertas de leitura (ORF) são indicadas: genes estruturais: *gag*, *pol*, *env*; gene de regulamentação: *rev*; gene acessório: *vif* das ORF S; região (*pro*) da protease do gene *pol* (BLACKLAWS & HARKISS 2010).

2.1.1 Ciclo de Replicação

O CAEV apresenta três propriedades biológicas que causam a infecção persistente nos caprinos: 1) integra seu genoma ao DNA da célula hospedeira evitando sua destruição pelo sistema imune; 2) replicação preferencial em macrófagos; 3) não indução a formação de anticorpos neutralizantes (NARAYAN et al., 1980, NARAYAN et al., 1982). As características permitem a continuação de sua multiplicação independente do controle do sistema imune humoral do hospedeiro (NARAYAN & CORK, 1990).

O ciclo de replicação propriamente dito acontece em várias etapas (Figura 3), sendo o primeiro passo: a ligação da partícula viral a receptores específicos na superfície da célula alvo (adsorção); após a ligação ocorre à fusão vírus-célula, permitindo a entrada do capsídeo na célula e a liberação do RNA genômico e enzimas virais no seu citoplasma (desnudamento); após a enzima RT transcreve o RNA genômico viral em uma dupla fita de DNA (transcrição reversa); esse DNA é transportado para o núcleo celular e integrado como um provírus por ação da enzima

integrase (integração). O provírus é transcrito em mRNA pela RNA polimerase II celular onde é traduzido em proteínas virais. Segue então as etapas de montagem; construção do capsídeo e brotamento do vírus (COFFIN, 1996).

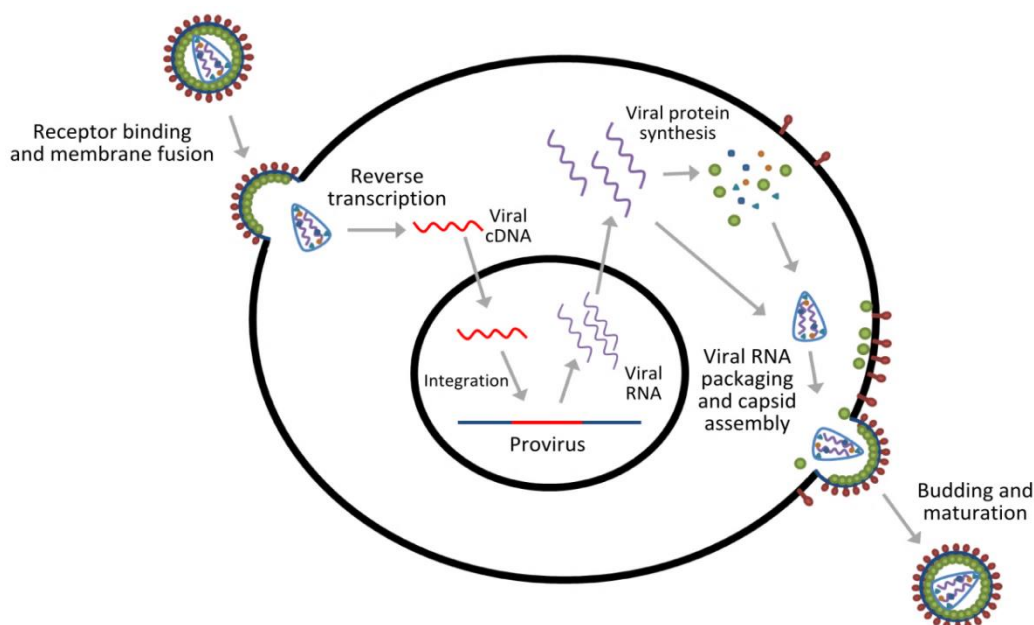


Figura 3. Replicação de um retrovírus. A infecção começa quando a proteína viral Env interage com o receptor celular e entra na célula. O RNA de sentido inverso é transcrito pela RT em DNA que depois entra no núcleo e é integrada no genoma do hospedeiro. Após a acumulação das proteínas virais sintetizadas de novo e RNA genômico viral, os componentes são unidos a partir da célula, com a aquisição de uma membrana celular derivada. A partícula amadurece quando as poliproteínas gag e gag-pol são clivadas pela protease viral (O'KEEFE, 2013).

2.1.2 Células alvo

O CAEV infecta principalmente células da linhagem monócito/macrófago (CLEMENTS et al., 1994). A diferenciação dos monócitos em macrófagos cria as condições para a ativação da replicação do vírus e transmissão a outras células (NARAYAN et al., 1982).

Além dos macrófagos o vírus já foi identificado em **células da membrana sinovial** (ZINK et al., 1990), em **células epiteliais de glândulas mamárias** (LERONDELLE et al., 1999; SINGH et al., 1999; BOLEA et al., 2006), **do sistema**

respiratório (SINGH et al., 1999), **da granulosa e do oviducto** (LAMARA et al., 2001; LAMARA et al., 2002), **em células do *cumulus oophorus*** (ALI AL AHMAD et al., 2005) dentre outras.

2.2 PARTE II - Fluido Oral amostra para detecção de patógenos virais

2.2.1 Saliva: Conceitos Básicos

As glândulas salivares dos mamíferos variam em número, estrutura, localização e tamanho (SHACKLEFORD & WILBORN, 1968). Os seres humanos e os animais domésticos (cães, gatos, suínos, ruminantes e equinos) possuem pelo menos três grandes glândulas salivares, assim como numerosas glândulas salivares menores. Os humanos possuem glândulas parótida, submandibular e sublingual (NAVAZESH, 1993); os equinos e suínos têm parótidas, mandibulares e sublinguais (SISSON, 1975a, 1975b); o cão e o gato têm parótida, mandibular, sublingual e glândula salivar zigomática, o gato apresenta ainda duas glândulas salivares molares bem desenvolvidas (WIGGS & LOBRISE, 1997). Os ruminantes em particular, apresentam quatro grandes glândulas (Figura 4) parótida, mandibular, sublingual monostomática e sublingual polistomática (HABEL, 1975).

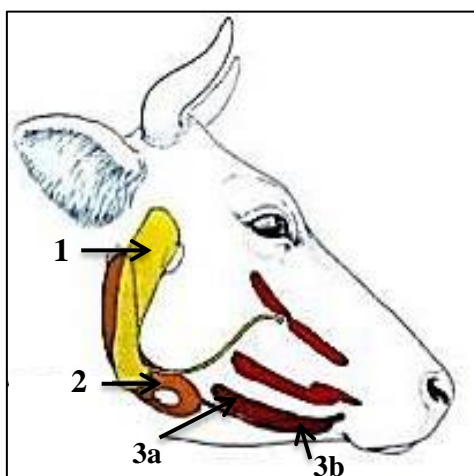


Figura 4. Representação das glândulas salivares maiores dos ruminantes tendo como modelo um bovino. 1. Glândula parótida; 2. Glândula mandibular; 3a. Glândula sublingual polistomática; 3b. Glândula sublingual monostomática.
<http://es.slideshare.net/arissx/glandulas-salivales-equino-bovino-canino-porcino>.

Nos ruminantes, a saliva atua principalmente como um tampão de bicarbonato-fosfato segregada a um pH médio de 8,1 (MCDOUGALL, 1948), que auxilia no tamponamento de ácidos graxos voláteis produzidos durante os processos de digestão ruminal, e desempenha um papel importante no eletrólito e homeostase da água. Fornece nutrientes para a microflora (por exemplo, ureia como fonte de nitrogênio), e um ambiente fluido para a fermentação no rúmen e para o transporte de ingesta, ambos de volta para a boca para remastigação em diante, através dos compartimentos gástricos para o intestino delgado (CARTER & GROVUN, 1990; VAN SOESTE, 1994) .

Nos mamíferos, em geral, as principais funções são lubrificar a cavidade oral, auxiliar na mastigação e deglutição, e em algumas espécies iniciar a digestão enzimática. Sua composição varia entre glândulas salivares, e muitas vezes refletem os hábitos alimentares das diversas espécies (AMADO et al., 2006). No entanto, independente da espécie, a saliva é constituída na maior parte de água (99 a 99,5% da massa total), na qual está suspensa uma variedade de moléculas com importantes funções biológicas (mucina, amilase, lisozima, lipase, e proteínas). A saliva possui ainda cloretos, fosfatos, bicarbonatos de potássio, sódio e cálcio; leucócitos, células epiteliais de descamação e microrganismos (PRICKETT, 2008).

2.2.2 Saliva fonte de anticorpos

Nos seres humanos, a IgA é a imunoglobulina predominante nas secreções das glândulas salivares menores, essas glândulas produzem de 30 a 35% de IgA que entra na cavidade oral (CRAWFORD et al., 1975). O potencial destas glândulas para estimulação antigênica, sugere que elas podem ser uma fonte importante de fatores do sistema imunológico que são envolvidos na regulação dos microrganismos no ambiente bucal. As imunoglobulinas IgM e IgG também foram encontradas localmente, mas em menor concentração (CHALLACOMBE et al., 1995).

Existe ainda evidência da passagem de anticorpos do soro (IgG, IgM, IgA) a partir do sistema circulatório para a cavidade oral. Challacombe et al. (1978) observaram anticorpos no fluido oral de macacos *Rhesus*, horas após terem recebido IgG, IgM e IgA por via intravenosa, demonstrando a transferência de anticorpos derivadas do soro em fluido oral.

Em ovinos, Scicchitano et al. (1986) estimaram que cerca de 81% de IgA nas secreções do trato respiratório superior e saliva desses animais eram de origem local, ao passo que a IgM, IgG1, IgG2 e albumina foram inteiramente derivadas do plasma. Smith et al. (1975) em outro estudo demonstrou ser a IgA a principal imunoglobulina na saliva, pulmão, fluido lacrimal e secreções nasais. Enquanto a imunoglobulina IgG foi predominante em colostro, leite, soro e secreção biliar.

2.2.3 Saliva como fluido de diagnóstico na medicina humana

Na medicina humana, o teste para HIV é um excelente exemplo da utilidade potencial da saliva no diagnóstico de doenças infecciosas.

Em 1984, Groopman et al. isolaram o vírus da leucemia de células T III (HTLV-III) de fluido oral coletados de pessoas com AIDS. Posteriormente, Archibald et al. (1986) detectaram anticorpos ao vírus no fluido oral em pacientes com AIDS e/ou em seus parceiros sexuais. Essa demonstração levou a conclusão de que anticorpos sistêmico (IgA, IgM, IgG) são produzidos localmente em fluido oral sugerindo a sua possível utilização como um espécimen de diagnóstico para doenças infecciosas.

Anos mais tarde, a Food and Drug Administration (FDA) aprovou o primeiro kit de coleta de fluido oral para a detecção de anticorpos anti-HIV (NIGHTINGALE, 1995). No período de 2002 a 2006 a FDA aprovou quatro ensaios rápidos de HIV, concebidos para detectar anticorpos no fluido oral (BRANSON, 2007). Destes ensaios houve kit que apresentou uma sensibilidade de diagnóstico de 99,6% e uma especificidade de 100%.

A partir dessa tecnologia os testes utilizando saliva têm fornecido dados epidemiológicos significativos sobre o HIV em países como África (CONNOLLY et al, 2004) e Tailândia (FRERICHS et al., 1994).

Para maiores evidências do fluido oral como espécimen para detecção de patógenos virais, Qureshi et al. (1997) observaram que o DNA proviral e o RNA genômico do HIV estavam presentes em amostras da glândula parótida de indivíduos infectados. Esses mesmos autores identificaram partículas virais consistente com HIV em associação com células epiteliais da mucosa bucal, especialmente na cavidade oral, evidenciando a infecção produtiva de linhagens de células epiteliais.

O HIV também foi identificado em ácinos e elementos ductais de glândulas salivares maiores. E através das técnicas de imunofluorescência e hibridização *in situ* o agente foi detectado em macrófagos, monócitos e linfócitos infiltrados nas glândulas salivares maiores e menores (GAYTÁN & HERNÁNDEZ, 1996).

Além do HIV, múltiplas publicações descrevem a aplicação de diagnóstico de fluido oral para agentes patogênicos e/ou de anticorpo para outras doenças infecciosas. Coronavirus vírus (PCR) (WANG et al., 2004); Cytomegalovirus IgG, IgA (HOCHMAN et al., 1998); Dengue vírus IgG, IgM (CUZZUBBO et al., 1998); Ebola vírus IgG, (PCR) (FORMENTY et al., 2006); Hantaan vírus IgG, IgM (PETRAITYTE et al., 2007); Hepatite A, B, C IgM (AMADO et al., 2006); Human herpes virus type 1 vírus (PCR) (SCOTT et al., 1997); Human herpes virus type 6 vírus (PCR) (COLLOT et al., 2002); Rotavirus IgA (WARD et al., 1992); Rubella IgG (BEN SALAH et al., 2003) Varicella-zoster vírus (PCR) (FURUTA et al., 2004), dentre outros.

2.2.4 Saliva como fluido de diagnóstico na medicina veterinária

Em medicina veterinária a utilização de secreções salivares como amostra para o diagnóstico é uma realidade. A literatura descreve detecções de anticorpos e agentes patogênicos em animais domésticos.

2.2.4.1 Felinos

No final dos anos 80 foi relatado pela primeira vez a detecção de antígenos ao vírus da leucemia felina (FeLV) em fluidos orais de gatos (LEWIS et al, 1987; LUTZ & JARRETT, 1987). Atualmente testes de antígeno em fluido oral estão comercialmente disponíveis e são amplamente utilizados no diagnóstico da infecção por FeLV.

Recentes publicações evidenciaram a detecção do RNA viral do FeLV em fluido oral por RT-PCR, e a comparação com o teste de ELISA utilizado rotineiramente em clínicas veterinárias. Os resultados apresentaram concordância entre a detecção do material genético do vírus por PCR no fluido oral e a detecção dos antígenos pelo ELISA (GOMES-KELLER et al., 2006a, b).

O FIV, um típico lentivirus, que se assemelha aos vírus da imunodeficiência humana e dos símios em características morfológicas, foi encontrado em fluido oral a

partir de gatos experimentalmente infectados (YAMAMOTO et al., 1988). Subsequentemente, Poli et al. (1992) detectaram anti-FIV IgG e anti-FIV IgA em amostras de fluido oral coletados de gatos soropositivos e soronegativos.

Na infecção por haemoplasma felino, o *Candidatus Mycoplasma haemominutum* (CMhm) e o *Mycoplasma haemofelis* (Mhf) foram amplificados a partir de amostras de saliva e de glândulas salivares de gatos infectados (DEAN et al., 2008).

2.2.4.2 Suínos

Vários patógenos suínos estão presentes em níveis detectáveis em amostras de fluido oral. O vírus da estomatite vesicular (VSV) já foi isolado em fluido oral a partir de suínos infectados por vetores mecânicos e de suínos que permaneceram em contato direto com animais infectados (STALLNECHT et al., 1999).

O circovírus porcino de tipo 2 (PCV2) e o vírus da síndrome reprodutiva e respiratória (PPRSV) foram detectados em amostras de fluidos orais suínos coletadas tanto em condições experimentais como de campo (PRICKETT et al., 2008, PRICKETT et al., 2008a).

O vírus da febre aftosa foi isolado 10 dias após a infecção em suínos experimentalmente infectados, bem como o material genético do vírus foi detectado 11 dias após a inoculação desses animais (EBLÉ et al., 2004).

2.2.4.3 Bovinos

A detecção do vírus da febre aftosa (FMDV) em bovinos tem sido foco de investigação. Figueroa et al. (1973) observaram que bezerros desenvolveram anticorpos nasal e salivar contra o vírus da febre aftosa, após inoculação nasal com vírus vivo. E Archetti et al. (1995), encontraram anti-FMDV imunoglobulina IgA em sonda esofágica no fluido orofaríngeo. Os autores sugerem que anticorpos anti-FMDV da mucosa, deve ser investigada no caso de vacinações de emergência em áreas afetadas ou em início de surto. Isso porque bovinos vacinados uma vez raramente mostraram uma resposta de anticorpos em mucosa.

2.2.4.4 Ovinos e Caprinos

Em pequenos ruminantes estudos com detecções de agentes patogênicos são pouco explorados, amostras dos fluidos orais de caprinos e ovinos têm sido mais utilizadas para pesquisas em nutrição.

Contudo, o MVV já foi isolado a partir de glândulas salivares e secreções nasais de ovinos experimentalmente infectados (GUDNADOTTIR & PALSSON, 1965).

Sequências virais dos LVPR foram encontradas em amostras de água e no ar expirado, de rebanhos com prevalência média a alta da infecção (VILLORIA et al., 2013).

2.2 PARTE III – Vírus da artrite encefalite caprina em sêmen

Corresponde ao Capítulo I.

3 JUSTIFICATIVA

Como o CAEV encontra-se associado às células do sistema monocítico/fagocitário, e estas estão dentre várias amostras biológicas, a pesquisa do vírus nestes meios e a possibilidade de transmissão têm sido estudadas, com o intuito de estabelecer eficientes programas de controle.

Em sêmen foi descrito que a detecção do CAEV não é necessariamente concordante com a detecção em sangue (CRUZ et al. 2009; PAULA et al. 2009). De forma que para seleção de animais com sêmen livre do vírus, a detecção do DNA proviral nas células do sangue não é um método confiável de seleção. Adicionalmente, a literatura refere que machos recentemente infectados eliminam o CAEV no ejaculado antes da detecção por anticorpos (PAULA et al. 2009) e a transmissão através de inseminação artificial com sêmen infectado foi recentemente comprovada (SOUZA et al., 2013). Contudo, a eliminação do vírus em sêmen nas fases aguda e crônica da infecção necessita de elucidação para prever o período de máximo risco da transmissão sexual do CAEV.

Tem sido sugerido que secreções de órgãos-alvo contendo macrófagos infectados são uma fonte potencial de infecção (MOOJEN, 2001; MCNEILLY et al., 2008). Ademais, a recente detecção dos LVPR em água de bebedouro e até no ar expirado a partir de animais com sintomas clínicos da infecção (VILLORIA et al., 2013), mostra que deve-se atentar a presença deste agente em outras partes do corpo como em mucosa oral, pois a saliva pode ser potencial fonte de infecção pelo CAEV.

4 HIPÓTESES CIENTÍFICAS

- ⊗ O conhecimento da eliminação do CAEV no sêmen de reprodutores nas fases aguda e crônica da infecção possibilita a identificação do período de máximo risco para a transmissão sexual do vírus.

- ⊗ A detecção do CAEV em fluido oral é importante na avaliação de possíveis rotas de transmissão viral, além de figurar como um meio alternativo de coleta de amostras para diagnóstico rápido.

5 OBJETIVOS

5.1 Objetivo Geral

Investigar a presença do DNA proviral do vírus da artrite encefalite caprina (CAEV) na saliva de reprodutores infectados e, observar a eliminação do vírus em sêmen nas fases aguda e crônica da infecção.

5.1 Objetivos Específicos

- ☉ Detectar o DNA proviral do CAEV em saliva;
- ☉ Identificar a eliminação do CAEV no sêmen de reprodutores recentemente infectados (fase aguda);
- ☉ Avaliar a eliminação do CAEV no sêmen de reprodutores nas fases avançadas da infecção (fase crônica);
- ☉ Verificar as respostas sorológicas dos reprodutores nas diferentes fases da CAE;
- ☉ Observar interferência da CAE nos parâmetros seminais dos reprodutores.

6 CAPÍTULO I – ARTIGO DE REVISÃO

Vírus da artrite encefalite caprina em sêmen: diagnóstico e transmissão

Caprine arthritis encephalitis virus in semen: diagnosis and transmission

K.C. Souza, A. Andrioli, M.F.S. Teixeira

Publicado na Revista Brasileira de Reprodução Animal

Rev. Bras. Reprod. Anim., Belo Horizonte, v.38, n.2, p.92-97, abr./jun. 2014

Disponível em www.cbra.org.br

Vírus da artrite encefalite caprina em sêmen: diagnóstico e transmissão

Caprine arthritis encephalitis virus in semen: diagnosis and transmission

K.C. Souza¹, A. Andrioli², M.F.S. Teixeira^{1,3}

¹UECE-FAVET-PPGCV, Labovir, Fortaleza, CE, Brasil.

²Embrapa Caprinos e Ovinos, Sobral, CE, Brasil.

³Correspondência: labovirfavetuece@yahoo.com.br

Resumo

Está consolidado que o vírus da artrite encefalite caprina (CAEV) está presente no sêmen, tanto na forma livre (RNA viral) no líquido seminal, como na forma de DNA pró-viral integrado às células não espermáticas. Estudos sugerem, ainda, que a presença do CAEV no sêmen pode não ter correlação positiva com o diagnóstico no sangue e que o patógeno pode ser detectado no plasma seminal antes mesmo da conversão sorológica. Além disso, os órgãos sexuais masculinos podem contribuir para a eliminação do DNA proviral do CAEV no ejaculado, e a transmissão do vírus pela via reprodutiva foi recentemente comprovada utilizando-se a inseminação artificial. Se considerada a adoção de testes de diagnósticos realizados diretamente no sêmen, pode-se diminuir o risco da entrada ou da disseminação do CAEV nos rebanhos pela via reprodutiva, especialmente na inseminação em que o número de fêmeas que podem receber sêmen contaminado é expressivamente maior. Neste contexto, objetivou-se com esta revisão fazer um levantamento bibliográfico e apontar perspectivas de utilização do sêmen para o diagnóstico da artrite encefalite caprina (CAE).

Palavras-chave: CAEV, detecção, plasma seminal.

Abstract

It is well established that the Caprine Arthritis Encephalitis Virus (CAEV) is found in semen, either in free form (RNA) in the seminal fluid or in the integrated proviral DNA in leukocytes and macrophages present in the semen. Studies also suggest that the presence of CAEV in semen may not have a positive correlation with the blood diagnosis, and that the pathogen can be detected in seminal plasma even before the seroconversion. Furthermore, male sexual organs may contribute to the DNA proviral elimination of CAEV in the ejaculate and transmission of the virus by reproduction was recently demonstrated using artificial insemination. If considered the adoption of diagnostic tests performed directly in semen, it can reduce the risk of entry of the virus or the spread of CAEV in flocks through reproduction, especially insemination, in which the number of females receiving contaminated semen is significantly higher. In this context, the aim of this report was to review the literature and point out perspectives for the use of semen in the diagnosis of caprine arthritis-encephalitis (CAE).

Keywords: CAEV, detection, seminal plasma.

Introdução

O sêmen tem sido reconhecido como um importante fator na transmissão sexual do vírus da artrite encefalite caprina (CAEV), quando da sua detecção no ejaculado de animais experimentalmente e naturalmente infectados (Travassos et al., 1998, 1999; Ali Al Hamad et al., 2008; Peterson et al., 2008; Cruz et al., 2009; Paula et al., 2009a; Gregory et al., 2011). Acresce-se a isso o fato de Rowe et al. (1992) observarem a soroconversão de fêmeas cobertas por machos soropositivos, o que levantou a suspeita de que a transmissão ocorreu pela cópula, e de Souza et al. (2013) comprovarem por inseminação artificial (IA) a transmissão do CAEV utilizando-se sêmen contaminado *in vitro*.

O risco de reprodutores permanecerem disseminando o CAEV nos rebanhos por monta natural (MN) ou IA é bastante relevante devido à ocorrência dos portadores assintomáticos e a falhas dos métodos de diagnósticos disponíveis. É importante ressaltar que a técnica mais amplamente utilizada para o diagnóstico da infecção é a

imunodifusão em gel de agarose (IDGA) no soro, adotada pelo Programa Nacional de Sanidade dos Caprinos e Ovinos (PNSCO) do Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento (Mapa), além de recomendada pela Organização Mundial de Saúde Animal (OIE). Entretanto, o IDGA apresenta baixa sensibilidade, e a identificação de animais na fase inicial da infecção fica limitada (Pinheiro et al., 2006). Isto permite a ocorrência de falso-negativos no rebanho (Andrioli et al., 2006; Tigre et al., 2006). Em termos práticos, o teste tem pouco valor no diagnóstico individual, sendo mais eficiente como teste de triagem.

Portanto, faz-se necessário um diagnóstico preciso e individual dos reprodutores, que pode ser alcançado com técnicas imunológicas mais sensíveis ou de biologia molecular. Tais técnicas, além de realizadas no sangue, podem ser aplicadas diretamente no sêmen, assegurando que este esteja livre do patógeno, o que diminui o risco da entrada ou da disseminação do CAEV nos rebanhos pela via reprodutiva. Assim, o objetivo desta revisão é fazer um levantamento bibliográfico e apontar perspectivas de utilização do sêmen para o diagnóstico da artrite encefalite caprina (CAE).

O vírus da artrite encefalite caprina (CAEV)

O CAEV é pertencente à família Retroviridae, gênero *Lentivirus* (Lara et al., 2005). A este gênero compreendem outros vírus de importância em patologia veterinária e humana, como o vírus do Maedi-Visna (MVV), o vírus da anemia infecciosa equina (EIAV), o vírus da imunodeficiência felina (FIV), o vírus da imunodeficiência bovina (BIV), o vírus da imunodeficiência símia (SIV) e o vírus da imunodeficiência humana (HIV) Patrick et al. (2002).

O CAEV é envelopado e tem como material genético duas fitas simples de ácido ribonucleico (RNA). A estrutura do envelope viral é composta por uma dupla camada de lipídeos, onde se encontram inseridas diversas glicoproteínas codificadas pelo vírus. O CAEV apresenta ainda uma grande quantidade de ácidos siálicos em sua superfície, o que dificulta a ação dos anticorpos neutralizantes.

A primeira fase da infecção viral é por meio da ligação da partícula viral com moléculas de superfície da célula hospedeira. As proteínas virais que promovem essa interação ligam-se de forma específica aos receptores encontrados em apenas alguns tipos de células (linfócitos e monócitos), o que determina o tropismo celular do vírus. Logo após essa ligação, o CAEV penetra na célula, sendo necessária a fusão da

partícula viral com a célula hospedeira, a fim de permitir a liberação do material genético viral para dentro do citoplasma ou do núcleo, onde irá iniciar o processo de replicação viral e a expressão dos genes virais (Kreutz, 2001). Por fim, a capacidade do vírus de infectar persistentemente os macrófagos, sem causar lise celular, facilita sua disseminação no hospedeiro.

O sêmen

O sêmen é produto da ejaculação e consiste de componentes celulares, os espermatozoides. É uma suspensão acelular líquida que contém secreções dos órgãos acessórios do trato genital masculino, o plasma seminal (Reece, 2006). Este se integra aos espermatozoides na ejaculação, servindo como meio de sobrevivência e de transporte para as células espermáticas. Além dos espermatozoides, outras células podem estar presentes no sêmen, como leucócitos, células epiteliais e células germinativas imaturas. Portanto, a identificação dos componentes do sêmen envolvidos na transmissão de patógenos é de grande importância.

Contaminação do sêmen pelo CAEV

O sêmen pode ser infectado com o vírus procedente dos testículos, epidídimo ou glândulas anexas, visto que foi demonstrada a presença do CAEV em diversos tecidos do trato genital masculino de bodes infectados (Ali Al Hamad et al., 2008; Peterson et al., 2008). Os microrganismos podem ainda contaminar amostras durante processos de manipulação como coleta, envasamento ou armazenamento (Bielanski, 2007). Outra forma de infecção do sêmen envolve a presença de inflamações no sistema reprodutor do macho. O processo inflamatório poderia desencadear um maior fluxo de células de defesa infectadas com o vírus, resultando em aumento da carga viral no sêmen (Andrioli et al., 2006). Segundo estudos, o principal tipo de células infectadas pelo CAEV no ejaculado são os leucócitos. Destas, os macrófagos são as células principais do vírus *in vivo*, podendo estar presentes no lúmen dos ductos espermáticos ou epidídimo e conter o vírus em concentração suficiente para permitir a detecção por testes de diagnóstico, mas sem afetar negativamente a função desses tecidos ou a fertilidade do ejaculado (Paula et al., 2009b). Além dos leucócitos, o CAEV pode infectar outros tipos celulares, tais como as células epiteliais, comumente encontradas no sêmen.

Detecções do CAEV em sêmen

A reação em cadeia da polimerase (PCR) provou ser um método sensível para detecção dos lentivírus tanto no sangue como no sêmen de humanos e animais. Nos caprinos, a utilização da *Nested* PCR mais a PCR precedida pela transcrição reversa (RT-PCR) possibilitou detectar o DNA pró-viral e o RNA genômico do CAEV no ejaculado e em tecidos do trato genital de machos infectados, como também correlacionar à detecção do vírus em sêmen e sangue (Travassos et al., 1998, 1999; Ali Al Hamad et al., 2008; Peterson et al., 2008; Cruz et al., 2009; Paula et al., 2009a; Gregory et al., 2011). Em adição às técnicas moleculares, alguns testes sorológicos foram realizados no plasma seminal e podem vir a ser utilizados para identificar reprodutores positivos e negativos (Ramirez et al., 2009; Andrioli et al., 2012).

Os primeiros estudos realizados com a aplicação da técnica de PCR no sêmen caprino ocorreram na década de 90. Travassos et al. (1998, 1999) relataram a presença do DNA pró-viral do CAEV no sêmen de bodes experimentalmente e naturalmente infectados e ressaltaram o risco de transmissão da enfermidade pelo sêmen.

Posteriormente, diversos estudos com técnicas moleculares para detecção do CAEV em reprodutores foram realizados. Andrioli et al. (2006) investigaram a presença do DNA pró-viral do CAEV por *Nested*PCR em amostras de sêmen lavado, não lavado e criopreservado. Encontraram resultados positivos em 53,6% das amostras totais de sêmen não lavado, em 17,9% de sêmen lavado e em 35,7% do sêmen criopreservado. Portanto, a lavagem do sêmen diminuiu a carga viral, porém não eliminou totalmente o CAEV, enquanto o sêmen criopreservado pode conter o vírus na forma infectante. Philpott, em 1993, já havia constatado a viabilidade do CAEV em amostras de sêmen criopreservado, evidenciando que a congelação do sêmen possibilita a sobrevivência do vírus, bem como de outros microrganismos.

Andrioli et al. (2006) observaram ainda que, após injúria testicular, houve um aumento de 21,4 para 50% de sêmen positivo à PCR. Possivelmente, o processo inflamatório aumentou a carga viral do sêmen por um maior fluxo de células de defesa nesse órgão. Em ovinos, os primeiros estudos sobre a presença do MVV no sêmen ocorreram após lesões patológicas nos testículos de animais infectados (Pálfi et al., 1989). Posteriormente, Concha-Bermejillo et al. (1996) e Preziuso et al. (2003) encontraram o lentivírus no epidídimo de carneiros infectados experimentalmente com

Brucella ovis e constataram que infecção persistente ou inflamação induziram à eliminação do MVV no sêmen.

Em 2008, Ali Al Hamad et al., com o objetivo de buscar elevar o conhecimento sobre infectividade em reprodutores, investigaram a presença do CAEV por técnicas moleculares tanto no sêmen quanto no trato genital de animais naturalmente infectados. Por PCR, encontraram o pró-vírus em células não espermáticas presentes no sêmen e em tecidos como testículo, epidídimo, vasos deferentes e glândulas vesiculares. Adicionalmente, detectaram RNA viral no plasma seminal por RT-PCR. E, mediante a hibridação *in situ*, demonstraram que as seções de tecido epididimal (cabeça, corpo e cauda), por meio de PCR positivos, contêm células infectadas.

Em estudo semelhante, Peterson et al. (2008) detectaram o DNA pró-viral do CAEV e do MVV em amostras de tecidos a partir de testículos, epidídimo, âmpola vesicular, próstata e glândulas bulbouretrais. Esses autores demonstraram claramente a importância dos órgãos sexuais masculinos na excreção dos lentivírus no ejaculado.

Nas células espermáticas, no entanto, não foram demonstrados resultados positivos ao CAEV. Para Ali Al Hamad et al. (2008), a ausência de receptores na membrana plasmática dos espermatozoides impossibilitaria a internalização da partícula viral, o que conferiria resistência deles à infecção. Em humanos, foi sugerido que espermatozoides não expressavam níveis significativos de receptores de superfície (CD4, CXCR4 e CCR5), portanto não seriam alvos principais de infecção pelo HIV, contudo os estudos ainda são controversos (Bielanski, 2007). Com o lentivírus caprino, Thibault et al. (2001) destacaram ainda que proteínas epididimárias protegeriam o espermatozoide durante o trânsito através do trato genital do macho.

Apesar da pouca probabilidade de os espermatozoides serem alvos dos lentivírus, Peterson et al. (2008) observaram o DNA pró-viral do CAEV e do MVV na fração composta de agregados e em partes de espermatozoides separados pelo gradiente de Percoll, bem como na fração do sêmen que continha macrófagos e gotículas citoplasmáticas. Em outro estudo, Ricarte et al. (2010) visualizaram, por microscopia eletrônica de transmissão, uma partícula viral semelhante ao CAEV na peça intermediária do espermatozoide de um macho infectado experimentalmente, o que sugere que essas células poderiam ser infectadas pelo vírus. Desta forma, a susceptibilidade dos espermatozoides ao CAEV, bem como as estruturas dos receptores de membrana espermática para os lentivírus dos pequenos ruminantes, necessita de elucidação.

Paula et al. (2009a) destacaram um fato importantíssimo para o diagnóstico da artrite encefalite caprina (CAE) em reprodutores. Os autores avaliaram o perfil viral do sangue e do sêmen em machos naturalmente e experimentalmente infectados, salientando que tanto no sêmen como no sangue a presença do vírus é intermitente e que pode não haver correlação positiva entre as detecções. Nos animais naturalmente infectados, o DNA pró-viral foi detectado no sangue em apenas um animal, enquanto no sêmen o pró-vírus foi detectado nos cinco reprodutores do grupo. Portanto, a ausência do vírus no sangue não exclui a excreção do agente patogênico no plasma seminal nem uma possível transmissão. Nos reprodutores infectados experimentalmente, o DNA foi detectado tanto no sangue quanto no sêmen na primeira semana pós-infecção em dois de cinco animais, demonstrando que machos com infecção recente excretam o vírus no sêmen, o que representa importante fonte de infecção.

Na detecção de anticorpos anti-CAEV por IDGA, Paula et al. (2009a) somente detectaram anticorpos contra o vírus na 16ª semana pós-infecção no grupo dos animais experimentalmente infectados. Além disso, um reprodutor apresentou soroconversão tardia, 32 semanas pós-infecção. Esses resultados sugerem uma baixa sensibilidade do IDGA em detectar precocemente a soroconversão. Contudo, no diagnóstico sorológico da infecção, deve-se considerar a existência da “janela imunológica” (período entre a infecção e a soroconversão), além da possibilidade de sororreação intermitente. Dessa forma, Cruz et al. (2009) sugeriram que as provas sorológicas dos reprodutores devem ser realizadas em associação com as moleculares, bem como a detecção do DNA pró-viral do CAEV deve ser realizada no sangue e no sêmen.

Com relação à aplicação de técnicas sorológicas no plasma seminal, Ramirez et al. (2009), baseados em diagnóstico por anticorpos anti-CAEV e MVV, verificaram, por meio da técnica de ensaio de imunoadsorção enzimática (ELISA), resultados concordantes com os realizados no soro. Do mesmo modo, Andrioli et al. (2012) compararam por *Western Blot* (WB) a detecção de anticorpos anti-CAEV no soro sanguíneo e no plasma seminal e encontraram uma especificidade de 100% e uma sensibilidade de 87,5% entre elas, o que demonstra que o WB pode ser aplicado no diagnóstico da CAE utilizando-se plasma seminal. Vale ressaltar que ELISA e WB são técnicas mais sensíveis em comparação ao IDGA.

Em se tratando de sensibilidade, uma nova técnica designada PCR em tempo real (qPCR), evolução da PCR convencional, vem crescendo de forma significativa como técnica de grande importância em vários domínios da ciência. A qPCR permite

quantificar as formas integrada e livre do CAEV, além de levar a um diagnóstico precoce em relação aos métodos convencionais. Entretanto, estudos com sua utilização nessa linha de pesquisa ainda são incipientes. Peterson et al. (2008) utilizaram a forma qualitativa da técnica e detectaram o CAEV em sêmen e tecidos do trato genital de machos. Em trabalhos com fêmeas, Ravazzolo et al. (2006) detectaram e avaliaram a carga viral na glândula mamária e no leite. Já Brajon et al. (2012) encontraram RNA viral e DNA pró-viral em amostras como fluido intra-articular e sangue.

Transmissão do CAEV pelo sêmen

Poucos estudos foram realizados visando à confirmação da transmissão sexual do CAEV. De acordo com Johnson et al. (1992) e Hubl et al. (1996), a comprovação somente é possível por meio da inseminação de fêmeas não infectadas utilizando-se ejaculados positivos, ou pela monta natural com macho infectado mais a subsequente comprovação da infecção nas fêmeas por meio de testes de diagnóstico. Para Peterson et al. (2008), é necessária a inclusão de atividade homossexual na transmissão dos lentivírus. Isso porque os animais, quando criados em lotes de mesmo sexo, desenvolvem hábitos comportamentais como montar uns nos outros.

Estudos iniciais não apontaram soroconversão de fêmeas que tiveram contato com sêmen contaminado (Adams et al., 1983). É provável, então, que a transmissão não tenha ocorrido, porque os ejaculados não continham partículas virais suficientes para infecção.

Por outro lado, Rowe et al. (1992) observaram que algumas cabras soroconverteram entre 100 e 140 dias após terem sido submetidas à MN com machos soropositivos e suspeitaram que a transmissão havia ocorrido pela cópula. Mais recentemente, Souza et al. (2013) comprovaram a transmissão sexual do CAEV por IA. No trabalho, 20 fêmeas foram inseminadas por via transcervical com sêmen fresco contaminado *in vitro*, sendo a transmissão comprovada 30 dias pós-infecção, quando 12 fêmeas apresentaram anticorpos anti-CAEV pela técnica de WB. Neste trabalho, pôde-se afirmar a via reprodutiva da infecção, pois o sêmen contaminado foi introduzido diretamente no trato genital das fêmeas, não existindo contato algum entre os animais. Em consonância a este resultado, Cortez-Romero et al. (2013) sugerem maior frequência de infecção observada em cabras na IA quando comparada ao acasalamento natural.

Técnicas de inativação viral

Em geral, esses procedimentos incluem metodologias aceitas internacionalmente e envolvem a utilização de lavagem, antibióticos, acidificação (pH), tripsina e outras enzimas, ozônio, agentes fotossensíveis (Bielanski, 2007). Os procedimentos de lavagem são as técnicas mais amplamente utilizadas, das quais se destacam *swim-up* e centrifugação em gradiente de Percoll. A inclusão de tripsina é um método seguro para inativar ou separar vírus que podem aderir aos espermatozoides (Loskutoff et al., 2005). A estratégia de lavagem para desinfecção seminal pelo CAEV foi utilizada por Andrioli et al. (2006), os quais observaram que o processo diminuiu a carga viral do sêmen, porém não eliminou totalmente o vírus. Peterson et al. (2008), após utilizarem gradiente de Percoll em amostras de sêmen caprino e ovino, conseguiram detectar resultados positivos. Já Ricarte et al. (2010) não detectaram o CAEV após *swim-up* realizado no sêmen de machos naturalmente infectados. Entretanto, observaram uma amostra positiva após *swim-up* de um macho experimentalmente infectado. Contudo, Bielanski (2007) evidencia que, embora alguns métodos não inativem ou removam completamente agentes infecciosos, a carga microbiana associada ao germoplasma pode ser reduzida a níveis baixos para infectividade intrauterina.

Considerações finais

Com base no que foi referenciado, acredita-se que técnicas de diagnóstico mais confiáveis como *Western Blot* ou reação em cadeia da polimerase, devam ser aplicadas em programas de controle da CAE pelos órgãos competentes, a fim de reduzir os falso-negativos, além de garantir vigilância clínica mais segura.

Adicionalmente, o procedimento de lavagem seminal poderia ser adotado como rotina em centrais de inseminação, associado às técnicas de PCR e RT-PCR para assegurar a negatividade do sêmen quanto às formas livre e integrada do CAEV. Estas medidas, embora laboriosas, certamente apresentariam um impacto significativo na prevenção da artrite encefalite caprina pela via venérea, além da possibilidade de o animal portador ter sua genética multiplicada sem comprometer a segurança do rebanho.

Agradecimentos

À Funcap, pela bolsa de estudos concedida; à Embrapa Caprinos e Ovinos, pelo apoio; e ao Laboratório de Virologia da Universidade Estadual do Ceará.

Referências

Adams DS, Kleyjer-Anderson P, Carlson JL, McGuire TC, Gorham JR. Transmission and control of caprine arthritis-encephalitis virus. *Am J Vet Res*, v.44, p.1670-1675, 1983.

Ali Al Ahmad MZ, Fieni F, Pellerin JL, Guiguen F, Cherel Y, Chatagnon G, Bouzar AB, Chebloune Y. Detection of viral genomes of caprine arthritis-encephalitis virus (CAEV) in semen and in genital tract tissues of male goat. *Theriogenology*, v.69, p.473-480, 2008.

Andrioli A, Abreu DA, Pinheiro RR, Sider LH, Rodrigues AS, Brito LLR, Souza KC, Santos VWS. Técnica de Western Blot para detecção de anticorpos antivírus da artrite encefalite caprina em plasma seminal. Sobral, CE: Embrapa Caprinos, 2012. 6 p. (Embrapa Caprinos e Ovinos. Comunicado Técnico, 130).

Andrioli A, Gouveia AMG, Martins AS, Pinheiro RR, Santos DO. Fatores de risco na transmissão do lentivírus caprino pelo sêmen. *Pesq Agropec Bras*, v.41, p.1313-1319, 2006.

Brajon G, Mandas D, Liciardi M, Taccori F, Meloni M, Corrias F, Montaldo C, Coghe F, Casciari C, Giammarioli M, Orrù G. Development and field testing of a Real-Time PCR assay for Caprine Arthritis-Encephalitis-Virus (CAEV). *Open Virol J*, v.6, p.82-90, 2012.

Bielanski A. Disinfection procedures for controlling microorganisms in the semen and embryos of humans and farm animals. *Theriogenology*, v. 68, p.1-22, 2007.

Concha-Bermejillo A, Magnus-Corral S, Brodie SJ, Demartini JC. Veneral shedding of ovine Lentivirus in infected rams. *Am J Vet Res*, v.57, p.684-688, 1996.

Cortez-Romero C, Pellerin JL, Ali-Al-Ahmad MZ, Chebloune Y, Gallegos-Sánchez J, Lamara A, Pépin M, Fieni F. The risk of small ruminant lentivirus (SRLV) transmission with reproductive biotechnologies: state-of-the-art review. *Theriogenology*, v.79, p.1-9, 2013.

Cruz JCM, Gouveia AMG, Souza KC, Braz GF, Teixeira BM, Heinemann MB, Leite RC, Reis JKP, Pinheiro RR, Andrioli A. Caprine arthritis-encephalitis virus (CAEV) detection in semen of endangered goat breeds by nested polymerase chain reaction. *Small Rumin Res*, v.85, p.149-152, 2009.

Gregory L, Lara MCCSH, Hasegawa MY, Castro RS, Rodrigues NM, Araújo Keller LW, Silva LKF, Durigon EL. Detecção do vírus da artrite encefalite caprina no sêmen através das técnicas de PCR e nested-PCR. *Arq Inst Biol*, v.78, p.599-603, 2011.

Hubl W, Tlustos L, Erath A, Andert S, Bayer PM. Proposed reference method for peripheral-blood monocyte counting using fluorescence-labelled monoclonal antibodies. *Cytometry*, v.26, p.69-74, 1996.

Johnson LK, Meyer AL, Zink MC. Detection of ovine lentivirus in seronegative sheep by in situ hybridization, PCR, and cocultivation with susceptible cells. *Clin Immunol Immunopathol*, v.65, p.254-260, 1992.

Kreutz LC. Imunidade contra vírus. In: Madruga CR, Araújo FR, Soares CO. *Imunodiagnóstico em Medicina Veterinária*. Campo Grande: Embrapa Gado de Corte, 2001. p.19-45.

Lara MCCSH, Birgel Junior EH, Birgel EH. Possibility of vertical transmission of Caprine Arthritis-Encephalitis Virus in neonate kids. *Arq Bras de Med Vet e Zootec*, v.57, p.553-555, 2005.

Loskutoff NM, Huyser C, Singh R, Walker DL, Thornhill AR, Morris L, Webber L. Use of a novel washing method combining multiple density gradients and trypsin for removing human immunodeficiency virus-1 and hepatitis C virus from semen. *Fertil Steril*, v.84, p.1001-1010, 2005.

Pálfi V, Glavits R, Hajtos I. Testicular lesions in rams infected by Maedi/Visna virus [Abstract]. *Acta Vet Hung*, v.37, p.97-102, 1989.

Patrick MK, Johnston JB, Power C. Lentiviral neuropathogenesis: comparative neuroinvasion, neurotropism, neurovirulence, and host neurosusceptibility. *J Virol*, v.76, p.7923-7931, 2002.

Paula NRO, Andrioli A, Cardoso JFS, Pinheiro RR, Sousa FML, Souza KC, Alves FSF, Campello CC, Ricarte ARF, Teixeira MFS. Profile of the Caprine arthritis-encephalitis virus (CAEV) in blood, semen from bucks naturally and experimentally infected in the semi-arid region of Brazil. *Small Rumin Res*, v.85, p.27-33, 2009.

Paula NRO, Andrioli A, Cardoso JFS, Pinheiro RR, Sousa FML, Souza KC, Alves FSF, Teixeira MFS. Características andrológicas de caprinos infectados naturalmente pelo lentivírus de pequenos ruminantes, durante as estações seca e chuvosa no Ceará. *Ciênc Anim*, v.19, p.7-18, 2009a.

Peterson K, Brinkhof, J, Houwers D, Colenbrander B, Gadella B. Presence of pro-lentiviral DNA in male sexual organs and ejaculates of small ruminants. *Theriogenology*, v.69, p.433-442, 2008.

Preziuso S, Sanna E, Sanna MP, Loddo C, Cerri D, Taccini E, Mariotti F, Braca G, Rossi G, Renzoni G. Association of Maedi-Visna virus with *Brucella ovis* infection in rams. *Eur J Histochem*, v.47, p.151-158, 2003.

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

Pinheiro RR, Gouveia AMG, Torres AMC, Andrioli A, Alves FSF. Custo dos antígenos e dos testes de diagnósticos de lentivírus de pequenos ruminantes. *Rev Bras de Med Vet*, v.28, p.110-113, 2006.

Ramirez H, San Roman B, Glaria I, Reina R, Hernandez MM, de Andres X, Crespo H, Hichou B, Cianca S, Goni X, Grandas A, Garcia-Pastor L, Vijil LE, Quintin F, Grillo MJ, de Andres D, Amorena B. Antibody-based diagnosis of small ruminant lentivirus infection in seminal fluid. *Theriogenology*, v.72, p.1085-1096, 2009.

Ravazzolo AP, Nenci C, Vogt H, Waldvogel A, Obexer-Ruff G, Peterhans E, Bertoni G. Viral load, organ distribution, histopathological lesions, and cytokine mRNA expression in goats infected with a molecular clone of the caprine arthritis encephalitis virus. *Virology*, v.350, p. 116-127, 2006.

Reece WO. Dukes, *Fisiologia dos Animais Domésticos*. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2006.

Ricarte ARF, Andrioli A, Pinheiro RR, Bão SN, Silva JS, Braz SV, Name KPO, Lima-Verde IB, Brito IF, Dias RP, Freitas Aguiar TD, Dantas TVM, Araújo SAC, Cavalcanti DMLP, Paula NRO, Teixeira MFS. Avaliação imuno-histoquímica e ultraestrutural de gametas e embriões caprinos infectados com o CAEV. *Arq Inst Biol*, v.77, p.217-223, 2010.

Rowe JD, Esast NE, Franti CE, Thurmond MC, Pederson NC, Theilen GH. Risk factors associated with the incidence of seroconversion to caprine arthritis-encephalitis virus in goats on California dairies. *Am J Vet Res*, v.53, p.2396-2430, 1992.

Souza KC, Pinheiro RR, Santos DO, Brito RLL, Rodrigues AS, Sider LH, Paula NRO, Avila AA, Cardoso JFS, Andrioli A. Transmission of the caprine arthritis-encephalitis virus through artificial insemination. *Small Rumin Res*, v.109, p.193-198, 2013.

Thibault C. La fécondation. In: Thibault C, Levasseur MC. La Reproduction chez les Mammifères et l'Homme. Paris: Ellipses & INRA, 2001. p.367-389.

Tigre DM, Campos GS, Sardi SI. Isolamento e identificação do Vírus da Artrite Encefalite Caprina, a partir do co-cultivo de células mononucleares do sangue com células de membrana sinovial de cabra. Rev Ciênc Méd Biol, v.5, p.124-131, 2006.

Travassos C, Benoit C, Valas S, Silva AG, Perrin G. Detection du virus de l'arthrite encéphalite caprine dans Le esperme de boucs infectes xpérimentalement. Vet Res, v.29, p.579-585, 1998.

Travassos C, Benoît C, Valas S, Silva AG, Perrin G. Caprine Arthritis-Encephalitis Virus in semen of naturally infected bucks. Small Rumin Res, v.32, p.101-106, 1999.

7 CAPÍTULO II - ARTIGO CIENTÍFICO I

Deteccão de sequências do DNA proviral do vírus da artrite encefalite caprina em saliva

Detection of proviral sequences of the caprine arthritis encephalitis virus in saliva

Kelma Costa de Souza, Alice Andrioli, Lucia Helena Sider, Raymundo Rizaldo Pinheiro, Rosivaldo Quirino Bezerra Junior, Renato Mesquita Peixoto & Maria Fatima da Silva Teixeira

Publicado no periódico Acta Scientiae Veterinariae

Acta Scientiae Veterinariae, 2015. 43: 1266

Disponível em <http://www.ufrgs.br/actavet/43/PUB%201266.pdf>

Detecção de sequências do DNA proviral do vírus da Artrite Encefalite Caprina em saliva*

Detection of Proviral Sequences of the Caprine Arthritis Encephalitis Virus in Saliva

Kelma Costa de Souza¹, Alice Andrioli², Lucia Helena Sider², Raymundo Rizaldo Pinheiro², Rosivaldo Quirino Bezerra Junior¹, Renato Mesquita Peixoto¹ & Maria Fatima da Silva Teixeira¹

*Artigo baseado em projeto de tese do autor em cumprimento parcial dos requisitos para o título de doutor. ¹Laboratório de Virologia (LABOVIR), Programa de Pós-graduação em Ciências Veterinárias (PPGCV). Universidade Estadual do Ceará (UECE), Fortaleza, CE, Brasil. ²EMBRAPA Caprinos e Ovinos (CNPACO), Sobral, CE, Brasil. CORRESPONDÊNCIA: Souza KC [kelma_zoo@hotmail.com; Teixeira MFS labovirfavetuece@yahoo.com - Fax: +55(85)3101-9849]. LABOVIR, Faculdade de Veterinária, Universidade Estadual do Ceará (UECE). Av. Dr. Silas Muguba, 1700 - Campus do Itaperi, CEP 60740-000 Fortaleza, CE, Brasil.

ABSTRACT

Background: Goats can be infected by a lentivirus called the caprine arthritis encephalitis virus (CAEV) that causes an infectious disease characterized by a chronic. For replication, the CAEV, integrate as a provirus in the DNA of the host cell genome. By consequence, infection of cells persistent life-long infection of the animal. The CAEV can be found in most body fluids, It has been demonstrated its presence in blood, milk, semen. However, the search for the CAEV in other body fluids besides blood is important to assess possible viral transmission. The aim of this study was to determine whether the presence of proviral DNA sequences in saliva of animals infected.

Materials, Methods & Results: The study was carried out on the farm belonging to the Embrapa Goat and Sheep Research Center, located in the municipality of Sobral, Ceará, Brazil. To assess the oral fluid for the presence of CAEV, samples of saliva from eight infected breeders were collected by suctioning saliva from the oral cavity on the side region of the breeders lower molar teeth using a probe coupled to a plastic 5 mL syringe. And pro-viral DNA was extracted from the samples using NaCl and proteinase K. Two rounds of polymerase chain reaction (nested PCR) were carried out to amplify the final 187 pb fragment of the pro-viral DNA. All the oligonucleotide primers were determined from the *gag* region of the structural gene of the CAEV-Cork. The fragments amplified by PCR were analyzed in electrophoresis in a horizontal cube. On 2% agarose gel and stained with ethidium bromide (10 µg/µL). The products of the

PCR amplification were sequenced in platform Applied Biosystems, the sequences were compared to available GenBank strains, and the results of this comparison demonstrated that were more related to the caprine strains regional. The presence of pro-viral DNA was observed in saliva in of 100% animals and proved that saliva of infected goats contained the CAEV. However, when assessing the results of CAEV pro-viral DNA detection in the present study, it was observed variation in the detection frequency of lentivirus in samples collected at different times.

Discussion: This finding indicated that the CAEV was present in saliva samples in its pro-viral form, a factor that would not limit its contagion capacity and that direct, continued exposure in a favorable environment presents perfect conditions for its transmission by this pathway. The results found in the present study corroborated studies on other lentivirus. Isolated the maedi-visna virus (MVV) in saliva glands of experimentally infected sheep. In cats, the feline immunodeficiency virus (FIV) was also detected in the saliva of infected animals and transmission was reported. In a recent study, was detected the presence of the lentivirus in small ruminants by PCR in water and air samples in different installations that housed herds with medium to high infection prevalence. Throughout in this study, an intermitency in proviral elimination was observed in saliva similar blood and semen, as reported by other authors for CAEV and other virus. Although the determining mechanism of horizontal transmission through the oral fluids was not definitively elucidated, these studies highlight the risks of transmission through direct contact with animals or indirect contamination by food and/or water in the drinker. This study proved that saliva from infected goats contains the CAEV, more studies should be carried out to analyze the degree of infectiousness of the virus in the saliva and the viral elimination characteristics in this medium.

Keywords: CAEV, detection, PCR, saliva, transmission.

Descritores: CAEV, detecção, PCR, saliva, transmissão.

INTRODUÇÃO

Os lentivírus responsáveis pela Artrite encefalite caprina (CAEV) e Maedi-Visna (MVV) pertencem à família Retroviridae, são complexos não oncogênicos, e intimamente relacionados fenotípica, biológica e antigenicamente, o que os insere no conceito de *quasispecies virais* [13]. São agrupados como Lentivírus de Pequenos Ruminantes (LVPR). Esses vírus geralmente limitam a infecção a um simples hospedeiro, acarretando sérios problemas ou mesmo à morte; multiplicam-se em células em repouso (não ativadas); infectam monócitos, macrófagos e/ou linfócitos, determinando infecção persistente e multisistêmica e apresentam alta taxa de mutação [19].

Os LVPR podem ser encontrados na maior parte dos fluidos corporais, e o CAEV na forma proviral já foi detectado em sangue [15], leite [18] e sêmen [2,6], com ocorrência de transmissão. Porém, deve-se atentar a presença deste agente em outras partes do corpo, como na mucosa oral. Nos ovinos, por exemplo, o MVV foi isolado na saliva e em secreções nasais [11]. Em gatos, o agente da imunodeficiência felina (FIV), outro lentivírus, foi detectado na saliva de animais infectados, com transmissão comprovada [25]. E em humanos, detecções do DNA do vírus da imunodeficiência humana (HIV-1) em células de mucosa oral [17] e do herpesvírus em fluido de lavagem oral [5] sugerem que células epiteliais, em outras áreas do corpo, podem ser infectadas. Nos caprinos os estudos são incipientes, contudo, sequências virais já foram identificadas em água de bebedouros e no ar expirado por animais infectados [24]. Assim, este trabalho tem o objetivo de estabelecer a presença do DNA proviral do CAEV na saliva de animais infectados.

MATERIAIS E MÉTODOS

Animais

Foram estudadas amostras de saliva de dez machos caprinos alojados em baias e mantidos em sistema intensivo de criação, pertencentes ao rebanho experimental da Embrapa Caprinos e Ovinos.

Cada animal foi avaliado pré-experimento em vários momentos, através dos testes de *western blotting* (WB) e reação em cadeia da polimerase (PCR) no sangue, por se tratar de um programa de controle adotado no rebanho. Dois grupos então foram

selecionados, o grupo G1 (n = 8) composto por animais positivos e o G2 (n = 2) com animais negativos como controle.

Amostras

As amostras de saliva foram coletadas com os animais em jejum de 12 h, e obtidas através de sucção do fluido da cavidade oral na região lateral dos dentes molares inferiores. O aparato utilizado constava de uma sonda acoplada a uma seringa plástica de 5 mL. Após as coletas as amostras foram transferidas para microtubos de 1,5 mL e armazenadas a 4 °C até o momento da extração de DNA. Para a realização da reação em cadeia da polimerase (PCR)

Um total de sete coletas por animal foi realizada, havendo intervalo entre elas com o objetivo de avaliar o comportamento de eliminação do vírus na saliva. As três primeiras coletas ocorreram mensalmente, após estas semanalmente.

Extração de DNA

O método de extração do DNA proviral utilizado nas amostras foi baseado na utilização do NaCl e da proteinase K [1]. Posteriormente, as amostras foram quantificadas em espectrofotometro¹.

Reação em Cadeia da Polimerase Nested (nPCR)

Para a PCR foram realizados dois rounds de PCR (*nPCR*) para amplificar uma fragmento final de 187 pb do DNA proviral do CAEV. Todos os oligonucleotídeos iniciadores foram determinados a partir da região do gene estrutural *gag* da amostra padrão CAEV-Cork [21] (Tabela 1).

As reações de PCR foram realizadas em termociclador (Mastercycler ep Gradient 5341)² em um volume final de 50 µL. Estas consistiam de tampão Tris HCl – 10 mM (pH 8,3)³; KCl - 500 mM³; MgCl₂ - 25 mM³; Gelatina - 0,001% (w/v)³; dNTP - 100 µM³ (de cada); Primers – 20 pmol (de cada); Taq DNA polimerase - 2U³; Target DNA 3 µL e água livre de DNase autoclavada 50 µL q.s.p.

As condições de amplificação foram: desnaturação inicial 94 °C por cinco min, seguida de 35 ciclos: desnaturação 94 °C por um min, anelamento 63 °C por um min, extensão 72 °C por 45 s, seguida de uma adicional extensão final de 72 °C por sete min. Para cada *round* de amplificação foi utilizado um controle positivo, referente amostra padrão de DNA proviral CAEV Cork derivada do cultivo de células de membrana

sinovial de caprinos infectados, amostra de DNA de animal negativo e para controle de qualidade das amplificações, água livre de DNase. Seguiu-se metodologia de Barlough *et al.* [3] com modificações sugeridas por Andrioli *et al.* [2].

Os fragmentos amplificados pela PCR foram analisados por eletroforese em cuba horizontal. Uma alíquota de 10 µL de cada amostra mais 2 µL do tampão de carregamento foi disposta em gel de agarose a 2% corado com brometo de etídio (10 µg/µL). As bandas foram visualizadas em transiluminador de luz ultravioleta (Benchtop™ UV)⁴ e fotodocumentadas. Os tamanhos dos fragmentos amplificados foram comparados ao padrão de peso molecular 100 pb DNA ladder (TrackIt™)⁵ e ao controle positivo.

Sequências de DNA

As amostras positivas foram purificadas em gel de agarose a 1%, usando kit comercial⁷ e sequenciadas em plataforma ABI 3500⁸. As sequências do gene foram comparadas com MEGA6 software de análise, e Basic Local Alignment Search Tool - Blast.

Tabela 1. Sequências dos primers usados na reação de nPCR, com o tamanho dos fragmentos amplificados.

Gene	Primers	Sequências	Fragmentos
Gag		5' → 3'	(pb)
1º round	Gag1	CAAGCAGCAGGAGGGAGAAGCTG	296
	Gag2	TCCTACCCCCATAATTTGATCCAC	
2º round	Gag3	GTTCCAGCAACTGCAAACAGTAGCAATG	187
	Gag4	ACCTTTCTGCTTCTTCATTTAATTTCCC	

RESULTADOS

O DNA proviral do CAEV foi detectado na saliva em 100% (8/8) dos animais pertencentes ao G1. Seis animais apresentaram pelo menos dois resultados positivos na *n*PCR, por amplificarem um fragmento de 187 bp do provirus correspondente ao gene *gag* do CAEV. Exceto os animais A e B (Tabela 2) que vieram a óbito antes da segunda coleta devido à cronicidade da doença. Com relação ao grupo controle nenhum animal apresentou resultado positivo (Figura 1).

Avaliando os resultados por coleta observou-se que 25% (2/8) dos animais amplificaram o fragmento do DNA proviral na primeira coleta. Na segunda, dos seis animais infectados restantes, nenhum apresentou resultado positivo. Já nas coletas subsequentes, 33,3% (2/6), 66,6% (4/6), 16,6% (1/6), 16,6% (1/6) e 100% (6/6) dos animais apresentaram o provirus na saliva.

Verificou-se intermitência entre as análises ocorrendo resultados positivos e negativos para o mesmo animal, em momentos diferentes. Sendo que 33,3% (2/6) apresentaram três vezes salivas positivas para o CAEV, e 66,6% (4/6) apresentaram positividade duas vezes (Tabela 2).

Na análise das sequências, verificou-se 100% de convergência e 99% de identidade com as sequências CAEV10, CAEV09, CAEV08, CAEV07, CAEV06, CAEV05, CAEV04, CAEV03, CAEV02, CAEV01, BR/CNPC-G1, BR/CNPC-G2, BR/CNPC-G3, BR/CNPC-G4 (sequências de LVPR isoladas em animais de rebanhos do Nordeste do Brasil), CAN_23-18CAEV, e CAEV-Cork, obtidas no GenBank numeradas em: JQ290327.1[7], JQ290326.1[7], JQ290325.1[7], JQ290324.1[7], JQ290323.1[7], JQ290322.1[7], JQ290321.1[7], JQ290320.1[7], JQ290319.1[7], JQ290318.1[7], EU300979.1[8], EU300978.1[8], EU300977.1[8], EU300976.1[8], KC241951.1[22], e M33677.1[21], respectivamente.

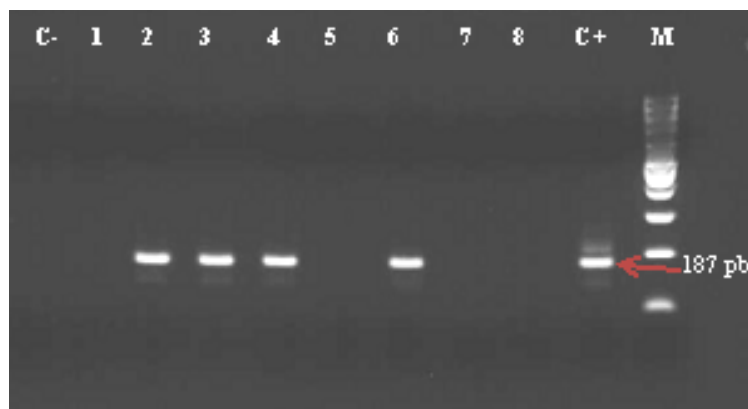


Figura 1. Gel de agarose a 2% corado com brometo de etídio, apresentando produtos da amplificação do fragmento-alvo do DNA proviral do CAEV equivalente a 187pb. M (marcador DNA ladder 100pb); 1,5 (amostras negativas dos animais positivos); 2, 3, 4 e 6 (amostras positivas dos animais positivos); 7 e 8 (amostras negativas dos animais controles); C+ (controle positivo da reação); C- (controle negativo da reação).

Tabela 2. Resultados positivos e negativos obtidos nos testes de nestedPCR para o DNA proviral do CAEV na saliva dos animais dos diferentes grupos nas sete coletas.

		Coletas						
Animal	Grupo	1	2	3	4	5	6	7
*A	G1	+	—	—	—	—	—	—
*B	G1	+	—	—	—	—	—	—
C	G1	-	-	+	+	-	-	+
D	G1	-	-	-	+	-	-	+
E	G1	-	-	-	+	-	-	+
F	G1	-	-	+	-	+	-	+
G	G1	-	-	-	+	-	-	+
H	G1	-	-	-	-	-	+	+
I	G2	-	-	-	-	-	-	-
J	G2	-	-	-	-	-	-	-

*Animais que foram a obito antes da segunda coleta; G1- grupo de animais positivos para a CAE; G2- grupo de animais negativos para a CAE; (—) nao houve coleta; (+) resultado positivo; (-) resultado negativo.

DISCUSSÃO

A positividade no *n*PCR para o CAEV na saliva a partir da constatação do DNA proviral, apontaram que leucócitos e/ou células epiteliais de descamação encontradas neste meio podem ser produtivamente infectadas pelo vírus. Na avaliação do sequenciamento encontrou-se alta relação com sequências de cepas de LVPR regionais [7,8] e ao genoma completo da cepa CAEV-Co [21] disponíveis no GenBank. Desse modo, a extração de DNA a partir da saliva total ou células bucais pode ser utilizada para a pesquisa da infecção, para maior conhecimento da etiopatogenia da enfermidade, bem como para o estudo da possibilidade de transmissão oral a partir de certas concentrações e quais as circunstâncias de maior vulnerabilidade.

Sequências virais dos LVPR foram recentemente detectadas em amostras de água e ar, coletadas em instalações de rebanhos com prevalência média a alta da infecção [24]. Muito provavelmente os bebedouros foram infectados pelas secreções que continham o vírus. Os mencionados autores ressaltaram que a forma proviral foi a mais frequente entre as detecções. Fato que não limitaria sua capacidade infecciosa, mas pode afetar sua resistência às condições ambientais, e uma exposição próxima e contínua em ambiente favorável pode oferecer condições para sua transmissão [12].

Num estudo com oito ovelhas sadias mantidas em contato direto com cabras soropositivas o CAEV foi capaz de infectá-las. Das oito ovelhas, seis (75%) apresentaram resultados positivos na *n*PCR no sangue. Em cinco (62,5%), detectou-se o DNA proviral do CAEV já aos 30 dias de confinamento [23]. Sabe-se que os caprinos tem um comportamento característico como bufar e/ou tossir ao se alimentarem ou beberem, liberando descargas nasais e/ou orais, o que pode favorecer a disseminação do vírus. Ademais, evidências epidemiológicas apontam para a importância de transmissão por aerossóis, e que secreções de órgãos-alvo contendo macrófagos infectados são uma

fonte potencial de infecção [4]. Soma-se a isto a adaptação dos LVPR para o hospedeiro, demonstrando que a transmissão e disseminação desses vírus são mais complexas que a simples ideia da especificidade à espécie [10,16].

A intermitência nas detecções do DNA proviral do CAEV no presente trabalho, é corroborada com resultados semelhantes observados em outros fluidos corporais como em sangue e sêmen [14]. Na saliva de humanos, quando amostras individuais foram testadas, apenas 50% dos pacientes eram positivos para sequências de HIV-1. No entanto, quando várias amostras de um mesmo indivíduo foram testadas, 100% dos pacientes apresentaram resultados positivos [9]. De modo similar, no presente trabalho somente chegou-se a 100% de positividade do CAEV na saliva dos animais, com maior frequência das coletas. Possivelmente, o número de células infectadas na saliva esteja em constante mudança, ou em número insuficiente para detecção, até mesmo que o provírus esteja ausente no fluido em determinados momentos. Resultando em variação na frequência de detecção nas amostras colhidas de um mesmo animal. Outros fatores como latência viral e replicação viral restrita nos animais infectados pelo LVPR podem, também, contribuir para explicar a intermitência dos resultados [20].

CONCLUSÃO

Neste trabalho, comprovou-se que caprinos infectados excretam o CAEV na saliva em sua forma proviral, e possivelmente as células deste fluido que o albergam podem produzir vírus infeccioso. Este achado tem impacto na epidemiologia da enfermidade e deve ser levado em consideração na implantação de programas de controle desta lentivirose.

Contudo, outros estudos ainda devem ser realizados para se determinar a participação desse agente na saliva, bem como a possibilidade de transmissão a partir de certas concentrações e quais as circunstâncias de maior vulnerabilidade dos animais.

SOURCES AND MANUFACTURERS

¹Ultrospec™ 2100 pro - GE Healthcare - Cambridge - Cambridgeshire - England

²Mastercycler ep Gradient 5341- Eppendorf - Hamburg - German

^{3,4}Sigma Aldrich - St. Louis - Missouri - USA

⁵Benchtop™ UV- Cambridge - Cambridgeshire - Englad

⁶TrackIt™ - Invitrogen - Carlsbad - California - USA

⁷ BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing - Foster City - California - USA

⁸ Genetic Analyzer - Foster City - California - USA

Ethical Approval. This work is part of the PhD thesis of the first author. The research project was approved by the Ethics Committee for the Use of Animals (CEUA) under number 01912.

Declaration of interest. The authors declare that no conflict of interest exists.

REFERÊNCIAS

- 1** **Abrão M.G., Billerbeck A.E.C., Nishi M.Y., Marui S. & Mendonça B.B.** 2005. Padronização da Técnica de Extração de DNA de Células de Mucosa Oral Com NaCl: Aplicação no Estudo do Gene PROP1. *Arquivos Brasileiros de Endocrinologia & Metabologia*. 49(6): 978-982.
- 2** **Andrioli A., Gouveia A.M.G., Martins A.S., Pinheiro R.R. & Santos D.O.** 2006. Fatores de risco na transmissão do lentivírus caprino pelo sêmen. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*. 41(8): 1313-1319.

- 3 **Barlough J., East N., Rowe J.D., Hoosear K.V., Derock E., Bigornia L. & Rimstad E.** 1994. Double-nested polymerase chain reaction for detection of caprine arthritis-encephalitis virus proviral DNA in blood, milk and tissues of infected goats. *Journal of Virological Methods*. 50(1-3): 101-114.
- 4 **Broughton-Neiswanger L.E., White S.N., Knowles D.P., Mousel M.R., Lewis G.S., Herndon D.R. & Herrmann-Hoesing L.M.** 2010. Non-maternal transmission is the major mode of ovine lentivirus transmission in a ewe flock: A molecular epidemiology study. *Infection, Genetics and Evolution*. 10(7): 998-1007.
- 5 **Cattani P., Capuano M., Cerimele F., La Parola I.L., Santangelo R., Masini C., Cerimele D. & Fadda G.** 1999. Human herpesvirus 8 seroprevalence and evaluation of nonsexual transmission routes by detection of DNA in clinical specimens from human immunodeficiency virus-seronegative patients from central and southern Italy, with and without Kaposi's Sarcoma. *Journal of Clinical Microbiology*. 37(4): 1150-1153.
- 6 **J.C.M., Gouveia A.M.G., Souza K.C., Braz G.F., Teixeira B.M., Heinemann M.B., Leite R.C., Reis J.K.P., Pinheiro R.R. & Andrioli A.** 2009. Caprine arthritis-encephalitis virus (CAEV) detection in semen of endangered goat breeds by nested polymerase chain reaction. *Small Ruminants Research*. 85(2-3): 149-152.
- 7 **Feitosa A.L.V.L., Gregori F., Brandao P.E., Pinheiro R.R. & Teixeira M.F.S.** Molecular characterization of Small Ruminant Lentiviruses isolated from Brazilian goats based on gag gene sequence analysis. Unpublished. Disponível em: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucleotide/409093671?report=genbank&log\\$=nucltop&blast_rank=1&RID=1CE56WA501N](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucleotide/409093671?report=genbank&log$=nucltop&blast_rank=1&RID=1CE56WA501N). Acessado em: 09/2014.
- 8 **Feitosa A.L.V.L., Teixeira M.F.S., Pinheiro R.R., Da Cunha R.M.S., Lima J.P.M.S., Andrioli A., Dantas T.V.M., De Melo V.S.P. & Pinheiro D.C.S.N.** 2010.

- Phylogenetic analysis of small ruminant lentiviruses from Northern Brazil. *Small Ruminants Research*. 94(1-3): 205-209.
- 9 Goto Y., Yeh C., Notkins A.L. & Prabhakar B.S.** 1991. Detection of Proviral Sequences in Saliva of Patients Infected with Human Immunodeficiency Virus Type 1. *AIDS Research and Human Retroviruses*. 7(3): 343-347.
- 10 Grego E., Bertolotti L., Quasso A., Profiti M., Lacerenza D., Muz D. & Rosati S.** 2007. Genetic characterization of small ruminant lentivirus in italianmixed flocks: evidence for a novel genotype circulating in a local goat population. *Journal of General Virology*. 88(12): 3423-3427.
- 11 Gudnadottir M. & Palsson P.A.**1965. Host-virus interaction in Visna infected sheep. *The Journal of Immunology*. 95(6): 6111-6120.
- 12 McNeilly T.N., Baker A., Brown J.K., Collie D., Maclachlan G., Rhind S.M. & Harkiss G.D.** 2008. Role of alveolar macrophages in respiratory transmission of Visna/Maedi virus. *Journal of Virology*. 82(3): 1526-1536.
- 13 Pasick J.** 1998. Maedi-Visna Virus and Caprine Arthritis-Encephalitis Virus: Distinct species or quasispecies and its implications for laboratory diagnosis. *Canadian Journal of Veterinary Research*. 62(4): 241-244.
- 14 Paula N.R.O., Andrioli A., Cardoso J.F.S., Pinheiro R.R., Sousa F.M.L., Souza K.C., Alves F.S.F., Campello C.C., Ricarte A.R.F. & Teixeira M.F.S.** 2009. Profile of the Caprine arthritis-encephalitis virus (CAEV) in blood, semen from bucks naturally and experimentally infected in the semi-arid region of Brazil. *Small Ruminants Research*. 85(1): 27-33.
- 15 Pinheiro R.R., Andrioli A., Gouveia A.M.G., Aragão M.A.C. & Martinez P.M.** 2010. Avaliação de antígenos para o diagnóstico de lentivírus em rebanho caprino sob programa de controle. *Arquivos do Instituto Biológico*. 77(1): 133-137.

- 16 Pisoni G., Bertoni G., Puricelli M., Maccalli M. & Moroni P.** 2007. Demonstration of coinfection with and recombination by caprine arthritis-encephalitis virus and maedi-visna virus in naturally infected goats. *Journal of Virology*. 81(10): 4948-4955.
- 17 Qureshi M.N., Barr'P C.E., Hewlitt I., Boorsteirr R., Kong F., Bagasra O., Bobroski L.E. & Joshi B.** 1997. Detection of HIV in oral mucosal cells. *Oral Disease*. 3(suppl. L): 73-78.
- 18 Ravazzolo A.P., Nenci C., Vogt H.R., Waldvogel A., Obexer-Ruff G., Peterhans E. & Bertoni G.** 2006. Viral load, organ distribution, histopathological lesions and cytokine mRNA expression in goats infected with a molecular clone of the caprine arthritis encephalitis virus. *Virology*. 350(1): 116-127.
- 19 Reischak D., Wendelstein A.C., Korndörfer C.N., Dezan C.P., Guglielmi V.O. & Moojen, V.** 2002. Importância da escolha dos reagentes para o diagnóstico de infecção por lentivírus de pequenos ruminantes em caprinos. *Veterinária Notícias*. 8(2): 51-56.
- 20 Rimstad E., East N.E., Torten M., Higgins J., Derock E., & Pedersen N.C.** 1993. Delayed seroconversion following naturally acquired caprine arthritis-encephalitis virus infection in goats. *American Journal of Veterinary Research*. 54 (11): 1858-1862.
- 21 Saltarelli M., Querat G., Konings D.A., Vigne R. & Clements, J.E.** 1990. Nucleotide sequence and transcriptional analysis of molecular clones of CAEV which generate infectious virus. *Virology*. 179(1): 347- 364.
- 22 Santry L.A., de Jong J., Gold A.C., Walsh S R., Menzies P.I. & Wootton S.K.** 2013. Genetic characterization of small ruminant lentiviruses circulating in naturally infected sheep and goats in Ontario. *Canada Virus Research*. 175(1): 30-44.
- 23 Sousa T.S.** 2014. Transmissão interespecies de lentivírus de caprinos para ovinos: aspectos clínicos e epidemiológicos, monitoramento sorológico e análise molecular.

127f. Salvador-BA. Tese (Doutorado em Ciências Animais nos Trópicos), Universidade Federal da Bahia.

24 Villoria M., Leginagoikoa I., Luján L., Pérez M., Salazar E., Berriatua E., Juste R.A. & Minguijón E. 2013. Detection of Small Ruminant Lentivirus in environmental samples of air and water. *Small Ruminants Research*. 110(2-3): 155-160.

25 Yamamoto J.K., Sparger E.W., Ho P.R., Andersen T.P., O'Connor C.P., Mandell L., Lowestine R. & Munn N.C. Pedersen. 1988. Pathogenesis of experimentally induced feline immunodeficiency virus infection in cats. *American Journal of Veterinary Research*. 49(8): 1246-1258.

8 CAPITULO III - ARTIGO CIENTÍFICO II

Proviral elimination of caprine arthritis encephalitis virus in semen and serological responses during acute and chronic infection

Kelma Costa de Souza, Alice Andrioli, Raymundo Rizaldo Pinheiro, Lucia Helena

Sider, Marta Fonseca Martins, Isabela Gomes Barreto da Motta, Renato Mesquita

Peixoto, Maria Fátima da Silva Teixeira

**Submetido em Abril de 2015 ao periódico: The Veterinary Journal
Qualis: B1**

Proviral elimination of caprine arthritis encephalitis virus in semen and serological responses during acute and chronic infection

Kelma Costa de Souza^{a,*}, Alice Andrioli^b, Raymundo Rizaldo Pinheiro^b, Lucia Helena Sider^b, Marta Fonseca Martins^c, Isabela Gomes Barreto da Motta^c, Renato Mesquita Peixoto^a, Maria Fátima da Silva Teixeira^a

^a*Laboratory of Virology, Veterinary Faculty, Universidade Estadual do Ceará, Av. Dr. Silas Muguba, 1700 - Campus do Itaperi, 60740-000 Fortaleza, CE, Brazil.*

^b*Embrapa Goats and Sheep, Fazenda Três Lagoas, Estrada Sobral/Groaíras, Km 4 Caixa Postal: 145, 62010-970 - Sobral, CE, Brazil.*

^c*Embrapa Dairy Cattle, Rua Eugênio do Nascimento, 610 - Dom Bosco, 36038-330 - Juiz de Fora, MG, Brazil.*

* *Corresponding author: Fones: +55 85 3101-9849, +55 88 9611-8072
E-mail address: kelma_zoo@hotmail.com (K.C. Souza).*

Abstract

The dynamics of the caprine arthritis encephalitis virus (CAEV) in semen of male goats with acute and chronic CAEV infection and their serological responses were investigated. Blood and semen samples were collected over three months from 11 breeder male goats, ($n = 5$) recently and ($n = 6$) chronically infected. The start of the infection was the period of greatest provirus elimination in the semen. The product of 185 bp corresponding to the CAEV *gag* gene was amplified in the semen in 4/5 (80%) of the animals of the recently infected group whereas the provirus was detected in 4/6 (66.7%) of the animals of the chronically infected group. But not significantly different ($P > 0.05$) between the phases. The male goats had higher percentages of positive results for antibody detection in the acute phase. Regardless of the infection phase, CAEV proviral DNA was shed in the semen following three patterns: absent, intermittent or continuous while intermittent prevailed. Nevertheless, the intermittent viral shedding in the semen indicates that molecular biology techniques could be used to select virus-free ejaculate for possible use in breeding biotechniques.

Keywords: Chronic infection; *Gag* gene; Provirus; Recent infection; Semen

Introduction

The caprine arthritis-encephalitis virus (CAEV) belongs to the Retroviridae family, *Lentivirus* genus, and infects monocytes, macrophages and/or lymphocytes, resulting in persistent and multi-systemic infection with high mutation rate (Reischak et al., 2002).

CAEV can be found in most body fluids and proviral DNA has been detected in the semen of experimentally and naturally infected male goat breeders (Travassos et al., 1998; Travassos et al., 1999). The provirus was found in the male sex organs in tissues such as the testis, epididymis, vas deferens, vesicular glands (Ali Al Hamad et al., 2008); vesicular ampulla, prostate and bulbourethral glands (Peterson et al., 2008) of naturally infected animals. Thus, these organs play an important role in the shedding of lentivirus in the ejaculate, especially during inflammatory processes (Andrioli et al., 2006) or stress caused by increased sexual activity in the breeding season (Peterson et al., 2008).

CAEV has also been transmitted through artificial insemination (Souza et al., 2013). Some recently infected males tested positive for proviral DNA in the semen before serological antibody detection (Paula et al., 2009). Furthermore, studies assessing the blood and semen viral profiles of naturally and experimentally infected males reported that the virus is not necessarily detected simultaneously in the semen and blood samples (Cruz et al., 2009; Paula et al., 2009). Therefore, detection by polymerase chain reaction (PCR) of proviral DNA in the blood cells is not a reliable method to select animals with CAEV- free semen.

To this end, the dynamics of CAEV in the breeder semen needs to be understood to predict the magnitude of CAEV infection in the acute and chronic infection stages and to determine when the risk of sexual transmission is maximized. This knowledge should assist the selection of virus-free semen samples and enable the use of semen of high genetic and economic value CAEV carriers to perform assisted reproductive techniques (Paula et al., 2008).

The objective of the present study was to investigate the dynamics of CAEV in the semen and determine how the virus is shed in the acute and chronic phases of the infection. Serological responses were assessed to show the antibody profile in these two phases. The results should assist the development of procedures to avoid caprine arthritic encephalitis (CAE) transmission by breeders.

Materials and methods

The project was approved by the Ethics Committee for Use of Animals (CEUA) Universidade Estadual Vale do Acaraú, protocol number: 01912; on February 20, 2013.

Animal groups

The eleven male goats used in the trial belong to the experimental herd of Embrapa Goat and Sheep, in Ceará, Brazil. They were housed in stalls under intensive rearing system (feedlot) and, prior to the experiment, each animal was confirmed seropositive or negative for CAEV by the western blotting (WB) test. The male goats were then, divided into two groups. The first, G1 ($n = 5$) consisted of seronegative male goats that were experimentally infected with 1 mL of the standard strain CAEV-Cork infective titre $10^{5.3}$ TCID₅₀ (50% tissue culture infectious dose)/mL by intramuscular injection, in

the acute CAE phase. The second, G2 ($n = 6$) consisted of naturally infected male goats in the chronic stage of the disease.

Semen and blood collection

Semen and blood samples were collected weekly during three months. The semen was collected using an artificial vagina in the presence of a female oestrogenised with 1 mL estradiol cypionate (E.C.P., Pfizer). Semen quality was then assessed by a spermogram according to criteria recognised by the Brazilian College of Animal Reproduction - CBRA (2013). The samples were stored at $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ until the DNA was extracted to perform the nested polymerase chain reaction (nPCR).

Blood samples were collected from the jugular in 10 mL vacutainer® tubes without anticoagulant to separate the serum. The presence of anti-CAEV antibodies was determined in each blood sample by the western blotting (WB) technique following methodology by Rodrigues et al. (2014).

DNA extraction

DNA was extracted from the semen samples using the QIAamp DNA Mini Kit (Qiagen, Germany) in QIASymphony SP (Qiagen) according to the manufacturer's instructions and quantified in a spectrophotometer (Ultrospec 2100 pro, England).

Nested polymerase chain reaction (nPCR)

The nPCR followed the methodology described by Barlough et al. (1994) modified by Andrioli et al. (2006) to amplify a 185 base pairs (bp) fragment of the CAEV proviral DNA based on the gag region.

Two rounds were carried out in a final volume of 50 μ L. The first amplification reaction used 20 pmol of each one of the primer sets, gag1 5'-CAAGCAGCAGGAGGGAGAAGCTG-3', gag2 5'-TCCTACCCCCATAATTTGATCCAC-3'' bases corresponding to (953 and 975) (Saltarelli et al., 1990), 10 mM Tris HCl (pH 8.3), 500 mM KCl, 25 mM MgCl₂, 0.001 % (w/v) gelatine; 2U Taq DNA polymerase; 100 μ M of each dNTP (Sigma Aldrich, USA); Target DNA 3 μ L (200 ng) and 50 μ L q.s.p. autoclaved DNase-free water. The amplification conditions were as follows: initial denaturing at 94 °C for five min, followed by 35 cycles: denaturation at 94 °C for one min, annealing 63 °C for one min, extension at 72 °C for 45 s, followed by an additional extension phase at 72 °C for seven min. An aliquot of 1.0 μ L of this PCR product was transferred directly to a second reaction and amplified using the following set of primers, gag3 5'-GTTCCAGCAACTGCAAACAGTAGCAATG-3', gag4 5'-CCTTTCTGCTTCTTCATTTAATTTCCC-3'' bases (997 and 1024). The amplification was repeated for 35 cycles, as described previously, in a thermocycler (Mastercycler ep Gradient 5341, Eppendorf, German). The amplified DNA sequences were separated by 2% agarose gel electrophoresis containing ethidium bromide (10 μ g/ μ L) and the fragments were compared to the standard 100 bp molecular weight (TrackIt Invitrogen, USA) and to the positive control. The bands were visualized and photographed using a gel documentation system (Benchtop UV, England).

Statistical analysis

The results were compared by chi-squared (χ^2) and the exact Fisher tests using the EpiInfo software, version 6.0, at 5% confidence ($P > 0.05$).

The semen parameters were expressed as means and standard deviation, evaluated by the Shapiro-Wilk and Battlet tests. The normality and homogeneity of the data was checked using the logarithmic transformation. The Statistical Analysis Systems (SAS version 9.2) software was used. Analysis of variance was performed and means and standard deviations were compared by Tukey test at 5%.

Results

The nPCR was used to assess the presence of CAEV proviral DNA in semen samples from male goats in both recently and chronically infected stages. The results showed that the start of the infection was the period of greatest virus elimination in the semen. Anti-CAEV antibodies were also detected by WB and the results again showed the acute phase with period greater of positive results.

PCR analysis

In the male goats of Group 1 that had been recently infected, the product of 185 bp corresponding to the CAEV gag gene was amplified in the semen in 4/5 (80%) of the animals. The provirus was detected in the semen of four of the five male goats between the third and fifth weeks after infection. Of the 55 samples collected throughout the experimental period, 10 (18.0%) amplified the proviral DNA, of which 2/10 (20%) were observed in the third week after inoculation and remained until the following blood collection. At five weeks of infection, 3/10 (30%) were positive; in the other collections from the group 1/10 (10%) CAEV was detected, showing that virus elimination peaked in the first month of infection and then declined rapidly.

In an individual assessment, intermittence was observed between positivity and negativity in the nPCR of the same animal. Of the five male goats, 1/5 (20%) had the virus in the semen once; 3/5 (60%), three times; and in 1/5 (20%), the CAEV proviral DNA was not detected in the semen at any moment (Fig. 1).

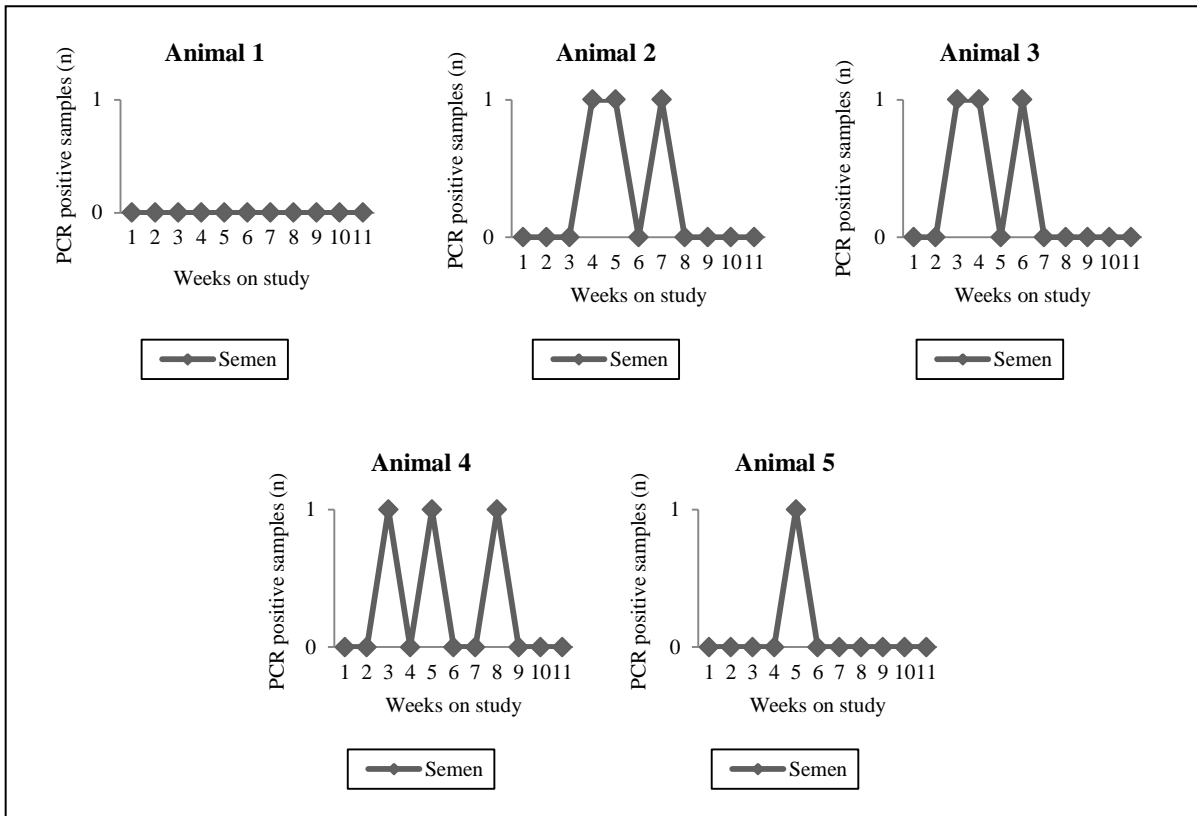


Fig. 1. Results of the three different patterns of CAEV shedding in semen: absent (animal 1); continuous (animals 2 and 3) and intermittent (animals 2, 3, 4 and 5). Acute infection.

In the chronically infected male goats of Group 2, the 185 bp fragment of the provirus was detected in 4/6 (66.7%) of the animals while 8/66 (12.1%) of the 66 samples collected throughout the experimental period were considered positive. There was no elimination of the CAEV in the first four collections and no animal had the

provirus in collection six. However, at least one positive result was observed in samples five, eight and nine while two and three positive semen results were detected in samples seven and ten, respectively.

The individual nPCR assessment, similar to the G1 animals, showed the intermittent presence of the virus in the same sample, 1/6 (16.6%) presented the virus in the semen once; 2/6 (33.3%), twice; and 1/6 (16.6%), three times. In contrast, 2/6 (33.3%) of the animals did not eliminated the CAEV in the semen at any time during the experimental period (Fig. 2).

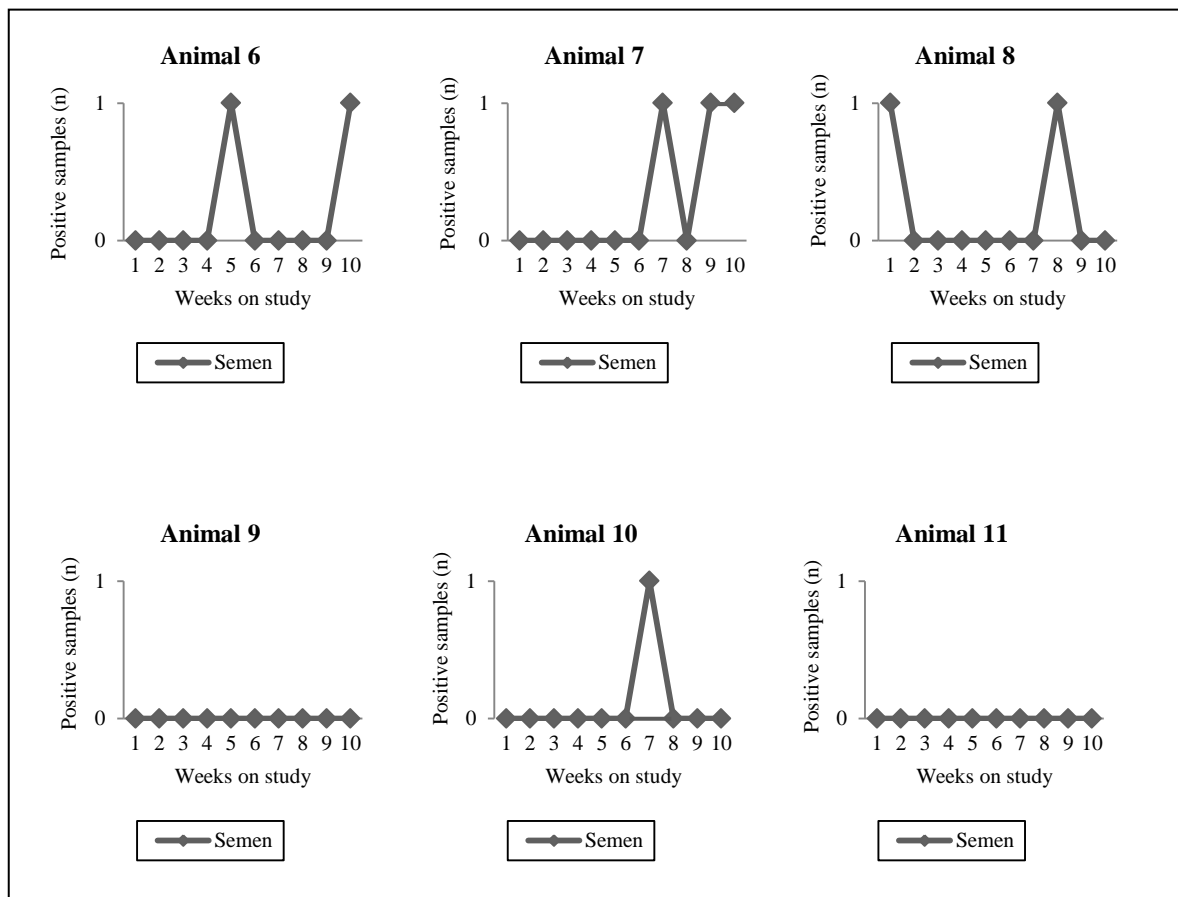


Fig. 2. Results of the three different patterns of CAEV shedding in semen: absent (animals 9 and 11), continuous (animal 7) and intermittent (animals 6, 7, 8 and 10). Chronic infection.

Interference from CAE was not observed in the weekly assessments of the reproductive parameters. The sperm concentration, sperm motility and vigour values were within the standards for male goats and did not differ statistically at ($P > 0.05$) between the acute and chronic phases. However, the semen volume was significantly greater in chronically infected breeders (Table 1), probably because they had a more active reproducer profile.

Table 1 Mean and standard deviation of the semen parameters of male goats with acute and chronic infection by the CAEV

Parameters	Experimental Groups	
	Acute infection	Chronic infection
Volume (mL)	0,84 ± 0,45 ^b	1,39 ± 0,54 ^a
Concentration (x 10 ⁹)	3,84 ± 1,10 ^a	3,80 ± 1,09 ^a
Motility (%)	83,53 ± 14,93 ^a	83,41 ± 7,74 ^a
Vigor (0-5)	4,02 ± 0,61 ^a	3,95 ± 0,63 ^a

Values followed by the same letter on the same line did not differ statistically at the level of 5%.

Serological analysis

The seroconversions detected by WB in G1 occurred simultaneously with the provirus detections in the semen. Furthermore, the five-week period was sufficient for 5/5 (100%) of the animals to seroconvert since 1/5 (20%) and 2/5 (40%) of the animals had anti-CAEV antibodies two and three weeks after the experimental infection, respectively. In the general assessment, WB demonstrated that 28/55 (51%) of the blood serum samples from G1 were positive. Of this percentage, 3/28 (10.7%) were detected by the third week of the experiment and remained for five collections; a higher incidence, 4/28 (14.3%), was detected in the sixth and seventh weeks of infection.

Although the two techniques serve different specific purposes, the nPCR detects the virus in the semen while WB determines seropositive blood, the comparison of the results show that 6/11 (54.5%) of the semen and blood serum samples were positive simultaneously. On the other hand, 100% of the reproducers in G1 had anti-CAEV antibodies, while the provirus in the semen was detected in 80% (Table 2).

Table 2 Results of nested polymerase chain reaction (*nPCR*) test in semen and western blotting (WB) test in serum of male goats with acute CAEV infection.

Weeks	Animals				
	1	2	3	4	5
	nPCR/WB	nPCR/WB	nPCR/WB	nPCR/WB	nPCR/WB
1	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-
2	-/+	-/-	-/-	-/-	-/-
3	-/-	-/+	+/+	+/-	-/-
4	-/-	+/+	+/+	-/+	-/-
5	-/-	+/-	-/+	+/-	+/+
8	-/-	-/+	+/+	-/+	-/+
9	-/-	+/+	-/+	-/+	-/+
10	-/-	-/-	-/+	+/+	-/+
11	-/-	-/-	-/+	-/+	-/+

NOTE. (+) positive result; (-) negative result.

The results of the WB test showed that 15/66 (22.7%) of the blood serum samples from the chronically infected reproducers had anti-CAEV antibodies. Positive results were observed in 100% of the collections; 50% had at least one serum reaction and 50% had two serum reactions. However, although they were CAEV carriers, 4/6

(66.7%) of the animals presented false negative results to the test, while a smaller percentage 2/6 (33.3%) showed antibodies to the virus.

Comparisons between the results obtained by the nPCR and WB techniques in G2 show that 5/10 (50%) of the semen and blood serum collections were positive for both tests. Of the six animals, only 33.3% had anti-CAEV antibodies and the same animals had positive semen by nPCR. In this group, the WB results indicated a higher, percentage of positive results compared to nPCR (Table 3).

Table 3 Results of nested polymerase chain reaction (*nPCR*) test in semen and western blotting (WB) test in serum of male goats with chronic CAEV infection.

Weeks	Animals					
	6	7	8	9	10	11
	nPCR/WB	nPCR/WB	nPCR/WB	nPCR/WB	nPCR/WB	nPCR/WB
1	-/-	-/-	+/+	-/-	-/-	-/-
2	-/-	-/-	-/+	-/-	-/-	-/-
3	-/-	-/-	-/+	-/-	-/-	-/-
4	-/-	-/-	-/+	-/-	-/-	-/-
5	+/+	-/-	-/+	-/-	-/-	-/-
6	-/+	-/-	-/+	-/-	-/-	-/-
7	-/+	+/-	-/+	-/-	+/-	-/-
8	-/+	-/-	+/+	-/-	-/-	-/-
9	-/+	+/-	-/+	-/-	-/-	-/-
10	+/+	+/-	-/+	-/-	-/-	-/-

NOTE. (+) positive result; (-) negative result.

Discussion

There are reports in the literature that goats recently infected by CAEV can eliminate the provirus in the semen before seroconversion (Paula et al., 2009) but there has been little investigation regarding the CAEV viral dynamics in the semen during the acute and chronic phases of the infection.

The human lentivirus presents similarities to the small ruminant lentivirus (LVPR) in the initial stages of infection (Blacklaws and Harkiss, 2010). Studies show that the RNA levels of the human immunodeficiency virus (HIV) in the seminal plasma tend to remain high for two months or more following infection. Furthermore, HIV-positive men can be more infectious in the first months after acquiring the virus (Stekler et al., 2008).

However, in the recently infected goats in the present study, the CAEV proviral DNA dynamics in the semen agreed with studies on HIV (Pilcher et al., 2004; Pilcher et al., 2007) and the data observed in acutely infected rhesus monkeys (Pullium et al., 2001). The similarity consisted of a lentivirus elimination peak in the first month of infection, but the shedding explosion was contained in later weeks. Paula et al. (2009) did not identify a viral shedding pattern in experimentally infected male goats, but they did observe that proviral DNA was present at shorter intervals after the 18th week of infection. It can be argued that during the post seroconversion phase, there is either an increase in the antibody levels (Eltahir et al., 2006) or a decrease in the viral load that would reduce the PCR sensitivity (Andrés et al., 2005).

During the present study, the CAEV shedding changed greatly in male goats with acute infection compared to those with chronic infection, and they had more positive results. Also, four animals from the chronic group did not show any elimination of CAEV in the semen. This fact suggests that as time passes the virus tends to remain quiescent in the infected animals and the proviral DNA may not have integrated, or it was integrated without activation (Cavalcante et al., 2013). Another hypothesis is that fewer macrophages may be found in the semen of these animals (Paula et al., 2009). Nevertheless, Ali Al Hamad et al. (2008) found the provirus in the semen and tissues such as the testis, epididymis, vas deferens and vesicular glands of naturally infected animals. Likewise, Peterson et al. (2008) detected the provirus in tissue samples such as the vesicular ampulla, prostate, and bulbourethral glands. This result demonstrated that the sex organs are involved in shedding the lentivirus in the ejaculate. Andrioli et al. (2006) observed an increase in CAEV expression frequency in the semen of animals with testicular trauma.

In this study, the CAEV was shed in the semen following three patterns: absent, intermittent or continuous in all infection phases, but intermittent shedding prevailed. However, it is not clear whether the lentivirus was not detected at different times because there was no genetic material or because of the number of infected cells. Whatever the case, some authors have suggested that CAEV is shed intermittently in the semen or in such minimal quantities that it is not detectable by tests (Travassos et al., 1998; Travassos et al., 1999; Ali Al Hamad et al., 2008; Peterson et al., 2008; Paula et al., 2009; Andrioli et al., 2006). This fact is in agreement with Concha-Bermejillo et al. (1996), who reported that the maedi visna virus (MVV) was shed intermittently in sheep

semen. Jordan et al. (1999) reported variation in lentivirus presence in the ejaculate from different animals and in various ejaculates from the same animal.

Thus, bearing in mind the intermittence of viral shedding in the semen, using the nPCR allied to reverse transcription PCR (RT-PCR) would guarantee that the ejaculate is negative for the free and integrated CAEV forms, and using the methodologies to eliminate the virus from the ejaculate as carried out in humans with the HIV virus and hepatitis C virus (Loskutoff et al., 2005) would enable the use of genetic material from reproducers of high genetic and economic value. First, because the likelihood of the spermatozoids to become targets of the lentivirus is very low (Ali Al Hamad et al., 2008) or because they do not replicate in these cells (Ricarte 2010). Next, according to results of the present state study and data by Rodríguez et al., 2005; Paula et al., 2009a the semen quality of CAEV carrier goat reproducers is not affected by the disease.

Intermittent antibodies were also observed for the serological responses in the present study. This intermittence pattern was consistent with data observed over the weeks, months or years in some CAE carrier animals, by the IDGA, ELISA, or WB tests (Ellis et al., 1986; Mackenzie et al., 1987; Houwers and Nauta, 1989; Rowe et al., 1992; Rimstad et al., 1993; Hanson et al., 1996; Krassnig and Schuller, 1998; Preziuso et al., 2003). Greater occurrences of false negatives were observed in the chronically infected animals, very probably because of the low antibody levels in this phase of the infection or serological latency (Pinheiro et al., 2012). Thus, when identifying male carriers of the virus, it may be useful to associate serological tests with molecular tests (Andrés et al., 2005; Cruz et al., 2009). For example, a study showed that in men, HIV-1 can be detected in the semen in 66% of seropositive individuals (Coombs et al., 1998).

Conclusions

The data reported in the present study the “acute phase” was the period of greatest virus elimination in the semen. However, provirus was shed intermittently in the semen at all infection stages. Antibody detection was similar in the blood serum. Nevertheless, future studies should confirm the results, and larger samples may be necessary to understand fully the role of the virus dynamic in CAEV sexual transmission.

Conflict of interest statement

The authors declare that they have no conflict of interest.

Acknowledgements

The authors thank the Fundação Cearense de Apoio ao Desenvolvimento Científico e Tecnológico (FUNCAP) and the Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) for financial support. They also thank Embrapa Goat and Sheep and Embrapa Dairy Cattle for the use of their structure, and the Universidade Federal do Ceará.

References

- Ali Al Ahmad, M.Z., Fieni, F., Pellerin, J.L., Guiguen, F., Cherel, Y., Chatagnon, G., Bouzar, A.B., Chebloune, Y. 2008. Detection of viral genomes of caprine arthritis-encephalitis virus (CAEV) in semen and in genital tract tissues of male goat. *Theriogenology* 69, 473-480.
- Andrés, D., Klein, D., Watt, N.J., Berriatua, E., Torsteinsdottir, S., Blacklaws, B.A., Harkiss, G.D. 2005. Diagnostic tests for small ruminant lentiviruses. *Veterinary Microbiology* 107, 49-62.
- Andrioli, A., Gouveia, A.M.G., Martins, A.S., Pinheiro, R.R., Santos, D.O. 2006. Fatores de risco na transmissão do lentivírus caprino pelo sêmen. *Pesquisa Agropecuária Brasileira* 41, 1313-1319.

- Barlough, J., East, N., Rowe, J.D., Hoosear, K.V., Derock, E., Bigornia, L., Rimstad, E. 1994. Double-nested polymerase chain reaction for detection of caprine arthritis-encephalitis virus proviral DNA in blood, milk and tissues of infected goats. *Journal of Virological Methods* 50, 101-114.
- Blacklaws, A.B., Harkiss, D.G. 2010. Small Ruminant Lentiviruses and Human Immunodeficiency Virus: Cousins that Take a Long View. *Current HIV Research* 8, 26-52.
- Cavalcante, F.R.A., Andrioli, A., Pinheiro, R.R., Souza, K.C., Veras, A.K.A., Lopes, T.A., Sousa, S.D., Silva, P.A.F. 2013. Detecção do vírus da Artrite Encefalite Caprina por *nested* PCR e *nested* RT-PCR em ovócitos e fluido uterino. *Arquivos do Instituto Biológico* 80, 381-386.
- CBRA – Colégio Brasileiro De Reprodução Animal. 2013. Manual para exame andrológico e avaliação de sêmen animal. Belo Horizonte.
- Concha-Bermejillo, A., Magnus-Corral, S., Brodie, S.J., Demartini JC (1996) Veneral shedding of ovine Lentivirus in infected rams. *American Journal of Veterinary Research* 57,684-688.
- Coombs, R., Speck, C., Hughes, J., Lee, W., Sampoleo, R., Ross, S.O., Dragavon, J., Peterson, G., Hooton, T.M., Collier, A.C., et al., 1998. Association between culturable human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) in semen and HIV-1 RNA levels in semen and blood: evidence for compartmentalization of HIV-1 between semen and blood. *Journal of Infectious Diseases* 177, 320-30.
- Cruz, J.C.M., Gouveia, A.M.G., Souza, K.C., Braz, G.F., Teixeira, B.M., Heinemann, M.B., Leite, R.C., Reis, J.K.P., Pinheiro, R.R., Andrioli, A. 2009. Caprine arthritis-encephalitis virus (CAEV) detection in semen of endangered goat breeds by nested polymerase chain reaction. *Small Ruminant Research* 85, 149-152.
- Ellis, T.M., Carmen, H., Robinson, W.F., Wilcox, G.E.1986. The effect of colostrum-derived antibody on neo-natal transmission of caprine arthritis-encephalitis virus infection. *Australian Veterinary Journal* 63, 242-245.
- Eltahir, Y.M., Dovas, C.I., Papanastassopoulou, M., Koumbati, M., Giadinis, N., Verghese-Nikolakaki, S., Koptopoulos, G. 2006. Development of a semi-nested PCR using degenerate primers for the generic detection of small ruminant lentivirus proviral DNA. *Journal of Virological Methods* 135, 240-246.
- Hanson, J., Hydbring, E., Olsson, K. 1996. A long term study of goats naturally infected with caprine arthritis-encephalitis virus. *Acta Veterinaria Scandinavica* 37, 3-39.
- Houwers, D.J., Nauta, I.M. 1989. Immunoblot analysis of the antibody response to ovine lentivirus infections. *Veterinary Microbiology* 7, 209-219.

- Jordan, H.L., Howard, J., Tompkins, W.A., Kennedystoskopf, S. 1999. Detection of feline immunodeficiency virus in semen from seropositive domestic cats (*Felis catus*) *Journal of Virology* 69, 7328-7333.
- Krassnig, R., Schuller, W. 1998. Continuation of the observation and serological investigation of a maedi-visna-virus-infected sheep flock from January 1990 to June 1996. *Deutsche Tierärztliche Wochenschrift* 10, 50-53.
- Loskutoff, N.M., Huyser, C., Singh, R., Walker, D.L., Thornhill, A.R., Morris, L., Webber, L. 2005. Use of a novel washing method combining multiple density gradients and trypsin for removing human immunodeficiency virus-1 and hepatitis C virus from semen. *Fertility and Sterility* 84, 1001-1010.
- Mackenzie, R.W., Oliver, R.E., Rooney, J.P., Kagel, H. 1987. A successful attempt to raise goat kids free of infection with caprine arthritis encephalitis virus in an endemically infected goat herd. *New Zealand Veterinary Journal* 3, 184-186.
- Paula, N.R.O., Andrioli, A., Cardoso, J.F.S., Sousa, F.M.L., Souza, K.C. de., Pinheiro, R.R., Alves, F.S.F., Teixeira, M.F.S. 2008. Parâmetros clínicos e hematológicos de reprodutores caprinos infectados naturalmente pelo vírus da artrite encefalite caprina durante a transição da estação seca para chuvosa no ceará. *Arquivos do Instituto Biológico* 75, 141-147.
- Paula, N.R.O., Andrioli, A., Cardoso, J.F.S., Pinheiro, R.R., Sousa, F.M.L., Souza, K.C., Alves, F.S.F., Campello, C.C., Ricarte, A.R.F., Teixeira, M.F.S. 2009. Profile of the Caprine arthritis-encephalitis virus (CAEV) in blood, semen from bucks naturally and experimentally infected in the semi-arid region of Brazil. *Small Ruminant Research* 85, 27-33.
- Paula, N.R.O., Andrioli, A., Cardoso, J.F.S., Pinheiro, R.R., Sousa, F.M.L., Souza, K.C., Alves, F.S.F., Teixeira, M.F.S. 2009a. Características andrológicas de caprinos infectados naturalmente pelo lentivírus de pequenos ruminantes, durante as estações seca e chuvosa no Ceará. *Ciência Animal* 19, 7-18.
- Peterson, K., Brinkhof, J., Houwers, D., Colenbrander, B., Gadella, B. 2008. Presence of pro-lentiviral DNA in male sexual organs and ejaculates of small ruminants. *Theriogenology* 69, 433-442.
- Pilcher, C.D., Tien, H.C., Eron, J.J.Jr., Vernazza, P.L., Leu, S.Y., Stewart, P.W., Goh, L.E., Cohen, M.S., Quest Study; Duke-UNC-Emory Acute HIV Consortium. 2004. Brief but efficient: Acute HIV infection and the sexual transmission of HIV. *The Journal of Infectious Diseases* 189, 1785-1792.
- Pilcher, C.D., Joaki, G., Hoffman, I.F., Martison, F.E., Mapanje, C., Stewart, P.W., Powers, K.A., Galvin, S., Chilongozi, D., Gama, S., et al., 2007. Amplified transmission of HIV-1: comparison of HIV-1 concentrations in semen and blood during acute and chronic infection. *AIDS* 21, 1723-1730.
- Pinheiro, R.R., Andrioli, A., Sider, L.H., Santiago, L.B., Oliveira, E.L., Sousa, A.L.M., Alves, F.S.F., Cruz, J.C.M. 2012. Lentivirose em Pequenos Ruminantes:

Principais Métodos de Diagnóstico. In: Documentos 107. Sobral:Embrapa Caprinos e Ovinos.

- Preziuso, S., Taccini, E., Rossi, G., Renzoni, G., Braca, G. 2003. Experimental maedi visna virus infection in sheep: a morphological, immunohistochemical and PCR study after three years of infection. *European Journal of Histochemistry* 47, 373-378.
- Pullium, J.K., Adams, D.R., Jackson, E., Kim, C.N., Smith, D.K., Janssen, R., Gould, K., Folks, T.M., Butera, S., Otten, R.A. 2001. Pig-tailed macaques infected with human immunodeficiency virus (HIV) type 2GB122 or simian/HIV89.6p express virus in semen during primary infection: new model for genital tract shedding and transmission. *The Journal of Infectious Diseases* 183, 1023-1030.
- Reischak, D., Wendelstein, A.C., Korndörfer, C.N., Dezan, C.P., Guglielmi, V.O., Moojen, V. 2002. Importância da escolha dos reagentes para o diagnóstico de infecção por lentivírus de pequenos ruminantes em caprinos. *Veterinária Notícias* 8, 51-56.
- Ricarte, A.R.F., Andrioli, A., Pinheiro, R.R., Bão, S.N., Silva, J.S., Braz, S.V., Name, K.P.O., Lima-Verde, I.B., Brito, I.F., Dias, R.P., et al., 2010. Avaliação imunohistoquímica e ultraestrutural de gametas e embriões caprinos infectados com o CAEV. *Arquivos do Instituto Biológico* 77, 217-223.
- Rimstad, E., East, N.E., Torten, M., Higgins, J., Derock, E., Pedersen, N.C. 1993. Delayed seroconversion following naturally acquired caprine arthritis-encephalitis virus infection in goats. *American journal of veterinary research* 54, 1858-1862.
- Rodrigues, A.S., Brito, R.L.L., Pinheiro, R.R., Dias, R.P., Alves, S.M., Souza, T.S., Souza, K.C., Azevedo, D.A.A., Andrioli, A., Magalhães, D.C.T., et al., 2014. Padronização do Elisa indireto e Western Blot para diagnóstico da artrite-encefalite caprina. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia* 66, 417-424.
- Rodríguez, H.A.M., Álvarez, H.R., Pérez, J.T., Crespo, J.A.M., Fariña, G.I.G., Martínez, H.A.R. 2006. Efecto del virus de Artritis Encefalitis Caprina en el aparato reproductor de machos caprinos. *Veterinaria México* 36, 159-176.
- Rowe, J.D., East, N.E., Franti, C.E., Thurmond, M.C., Pedersen, N.C., Theilen, G.H. 1992. Risk factors associated with the incidence of seroconversion to caprine arthritis-encephalitis virus in goats on California dairies. *American journal of veterinary research* 53, 2396-2403.
- Saltarelli, M., Querat, G., Konings, D.A., Vigne, R., Clements, J.E. 1990. Nucleotide sequence and transcriptional analysis of molecular clones of CAEV which generate infectious virus. *Virology* 179, 347- 364.
- Souza, K.C., Pinheiro, R.R., Santos, D.O., Brito, R.L.L., Rodrigues, A.S., Sider, L.H., Paula, N.R.O., Avila, A.A., Cardoso, J.F.S., Andrioli, A. 2013. Transmission of

the caprine arthritis-encephalitis virus through artificial insemination. *Small Ruminant Research* 109, 193-198.

Stelkler, J., Sycks, B.J., Holte, S., Maenza, J., Estevens, C.E., Collier, A.C., Coombs, W.R. 2008. HIV Dynamics in Seminal Plasma during Primary HIV Infection. *Aids Research and Human Retroviruses* 24, 1269-1274.

Travassos, C., Benoit, C., Valas, S., Silva, A.G., Perrin, G. 1998. Detection du virus de l'arthrite encéphalite caprine dans Le esperme de boucs infectes xpérimentalement. *Veterinary Research* 29, 579-585.

Travassos, C., Benoît, C., Valas, S., Silva, A.G., Perrin, G. 1999. Caprine Arthritis-Encephalitis Virus in semen of naturally infected bucks. *Small Ruminant Research* 32, 101-106.

CONCLUSÕES

- ☉ Comprovou-se que a saliva de caprinos infectados contém o CAEV e tem importante papel na patogenia da enfermidade.
- ☉ A eliminação do DNA proviral do CAEV no sêmen ocorre de forma intermitente em todas as fases da CAE.
- ☉ O sêmen dos reprodutores caprinos pode apresentar maior eliminação do CAEV nos primeiros meses após os animais adquirirem o vírus.
- ☉ Reprodutores mesmo na fase crônica da infecção podem não apresentar a fertilidade do sêmen afetada pela enfermidade.

10 PERSPECTIVAS

- ☉ Visando o bem estar animal utilizar saliva como amostra de diagnóstico ao invés da venopunção para coleta de sangue.
- ☉ Padronizar protocolos de diagnóstico baseado em fluido oral para detecção de doenças infecciosas como é o caso da CAE.
- ☉ Aliar biotécnicas reprodutivas às técnicas de biologia molecular para o aproveitamento de ejaculados livres do vírus.

11 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALI AL AHMAD, M.Z.; FIENI, F.; MARTIGNAT, L.; CHATAGNON, G.; BARIL, G.; BOUVIER, F.; CHEBLOUNE, Y. 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, p. 1656-1666, 2005.

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

AMADO, L.A.; VILLAR, L.M.; DE PAULA, V.S.; DE ALMEIDA, A.J.; GASPAS, A.M.C. Detection of hepatitis A, B, and C virus-specific antibodies using oral fluid for epidemiological studies. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, v.101, p.149-155, 2006.

ANGELOPOULOU, K.; BRELLOU, G.D.; GREENLAND, T.; VLEMMAS, I. A novel deletion in the LTR region of a Greek small ruminant lentivirus may be associated with low pathogenicity. *Virus Research*, v. 118(1-2), p.178-184, 2006.

ARCHETTI, I.; AMADORI, M.; DONN, A.; SALT, J.; LODETTI, E. Detection of foot-and-mouth disease virus-infected cattle by assessment of antibody response in oropharyngeal fluids. *Journal of Clinical Microbiology*, v. 33, p.79-84, 1995.

ARCHIBALD, D.W.; ZON, L.; GROOPMAN, J.E.; MCLANE, M.F.; ESSEX, M. Antibodies to human T-lymphotropic virus type III (HTLV-III) in saliva of acquired immunodeficiency syndrome (AIDS) patients and in persons at risk for AIDS. *Blood*, v. 67, p. 831-834, 1986.

BEN SALAH, A.; ZAÂTOUR, A.; POMERY, L.; COHEN, B.J.; BROWN, D.W.; ANDREWS, N. Validation of a modified commercial assay for the detection of rubella-specific IgG in oral fluid for use in population studies. *Journal of Virological Methods*, v. 114, p.151-158, 2003.

BERGER, N.; HELLER, A.E.; STORMANN, K.D.; PFAFF, E. Characterization of chimeric enzymes between caprine arthritisencephalitis virus, maedi-visna virus and human immunodeficiency virus type 1 integrases expressed in Escherichia coli. *Journal of General Virology*, v. 82(1), p.139-148, 2001.

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

BLACKLAWS, A.B.; HARKISS, D.G. Small Ruminant Lentiviruses and Human Immunodeficiency Virus: Cousins that Take a Long View. *Current HIV Research*, v. 8, p. 26-52, 2010.

BOLEA, R.; MONLEON, E.; CARRASCO, L.; VARGAS, A.; de ANDREC, D.; AMORENA, B.; BADIOLA, J.J.; LUJAN, L. Maedi-visna virus infection of ovine mammary epithelial cells. *Veterinary Research*, v. 37, p.133-144, 2006.

BRANSON, B. State of the art for diagnosis of HIV infection. *Clinical Infectious Diseases*, v. 45 (Supplement 4) p.221-225, 2007.

CARTER, J.B.; SAUNDERS, V.A.; RETROVIRUSES. In: Carter, J.B. & Saunders, V. A. *Virology: principles and applications*. 1. ed. Wiley, 2007, p. 185-196.

CARTER, R.R.; GROVUM, W.L. A review of the physiological significance of hypertonic body fluids on feed intake and ruminal function: salivation, motility and microbes. *Journal of Animal Science*, v. 68, p.2811-32, 1990.

CHALLACOMBE, S.; PERCIVAL, R.; MARSH, P. Age-related changes in Immunoglobulin isotypes in whole and parotid saliva and serum in healthy individuals. *Oral Microbiology and Immunology*, v. 10, p.202-207, 1995.

CHALLACOMBE, S.; RUSSEL, M.; HAWKES, J.; BERGMEIER, L.; LEHNER, T. Passage of immunoglobulins from plasma to the oral cavity in rhesus monkeys. *Immunology*, v. 35, p.923-931, 1978.

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

CLEMENTS, J.E.; ZINK, M. Molecular biology and pathogenesis of animal lentivirus infections. *Clinical Microbiology Reviews*, v. 9(1), p.100-117, 1996.

COFFIN, J.M. Retroviridae: the viruses and their replication. In: FIELDS, B.N.; KNIPE, D.M.; HOWLEY, P.N. et al. *Fields Virology*. Philadelphia: Lippincott-Raven Publishers, 1996. p. 1767 - 1847.

COLLOT, S.; PETIT, B.; BORDESSOULE, D.; ALAIN, S.; TOUATI, M.; DENIS, F.; RANGER-ROGEZ, S. Real-time PCR for quantification of human herpesvirus 6 DNA from lymph nodes and saliva. *Journal of Clinical Microbiology*, v. 40 p. 2445-2451, 2002.

CONNOLLY, C.; SHISANA, O.; COLVIN, M.; STOKER D. Epidemiology of HIV in South Africa--results of a national, community-based survey. *South African Medical Journal*, v. 94, p.776-781, 2004.

CRAWFORD, J.; TAUBMAN, M.; SMITH, D. Minor salivary glands as a major source of secretory immunoglobulin A in the human oral cavity. *Science*, v. 190, p.1206-1209, 1975.

CRUZ, J.C.M.; GOUVEIA, A.M.G.; SOUZA, K.C.; BRAZ, G.F.; TEIXEIRA, B.M.; HEINEMANN, M.B.; LEITE, R.C.; REIS, J.K.P.; PINHEIRO, R.R.; ANDRIOLI, A. Caprine arthritis-encephalitis virus (CAEV) detection in semen of endangered goat breeds by nested polymerase chain reaction. *Small Rumin Research*, v. 85, p.149-152, 2009.

CUZZUBBO, A.J.; VAUGHN, D.W.; NISALAK, A.; SUNTAYAKORN, S.; AASKOV, J.; DEVINE, P.L. Detection of specific antibodies in saliva during Dengue infection. *Journal of Clinical Microbiology*, v. 36, p.3737-3739, 1998.

DAHLBERG, J.E.; GASKIN, J.M.; PERK, K. Morphological and immunological comparison of caprine arthritis encephalitis and ovine progressive pneumonia viruses. *Journal of Virology*, v. 39(3), p.914-9, 1981.

DEAN, R.; HELPS, C.; GRUFFYDD JONES, T.J.; TASKER, S. Use of real-time PCR to detect *Mycoplasma haemofelis* and '*Candidatus Mycoplasma haemominutum*' in the saliva and salivary glands of haemoplasma-infected cats. *Journal of Feline Medicine and Surgery*, v.10, p.413-417, 2008.

EBLÉ, P.; BOUMA, A.; DE BRUIN, M.; VAN HEMERT-KLUITENBERG, F.; VAN OIRSCHOT, J.; DEKKER A. Vaccination of pigs two weeks before infection significantly reduces transmission of foot-and-mouth disease virus. *Vaccine*, v.22, p.1372-1378, 2004.

FIGUEROA, F.; OHLBAUM, A.; CONTRERAS, G. Neutralizing antibody response in bovine serum and nasal and salivary secretions after immunization with live or inactivated food-and-mouth disease virus. *Infection and Immunity*, v.8:296-298, 1973.

FORMENTY, P.; LEROY, E.M.; EPELBOIN, A.; LIBAMA, F.; LENZI, M.; SUDECK, H.; YABA, P.; ALLARANGAR, Y.; BOUMANDOUKI, P.; NKOUNKOU, V.B.; DROSTEN, C.; GROLLA, A.; FELDMANN, H.; ROTH, C. Detection of Ebola virus in oral fluid specimens during outbreaks of Ebola virus hemorrhagic fever in the Republic of Congo. *Clinical Infectious Diseases*, v. 42, p.1521-1526, 2006.

FRERICHS, R.; SILARUG, N.; ESKES, N.; PAGCHAROENPOL, P.; RODKLAI, A.; THANGSUPACHAI, S.; WONGBA, C. Saliva-based HIV-antibody testing in Thailand. *AIDS*, v.8, p.885-894, 1994.

FURUTA, Y.; AIZAWA, H.; OHTANI, F., SAWA, H.; FUKUDA, S. Varicella-Zoster virus DNA level and facial paralysis in Ramsay Hunt Syndrome. *The Annals of Otolaryngology, Rhinology, and Laryngology*, v. 113, p.700-705, 2004.

GAYTÁN, L.; HERNÁNDEZ, A. Sida y Saliva. *Revista ADM*; v. 3, p. 139-144, 1996.

GOMES-KELLER, M.; TANDON, R.; RIONDATO, F.; GÖNCZI, M.; MELI, M.; HOFMANN-LEHMANN, R.; LUTZ H. Detection of feline leukemia virus RNA in

saliva from naturally infected cats and correlation of PCR results with those of current diagnostic methods. *Journal of Clinical Microbiology*, v. 44, p.916-922, 2006a.

GOMES-KELLER, M.; TANDON, R.; GÖNCZI, E.; MELI, M.; HOFMANN-LEHMANN, R.; LUTZ H. Shedding of feline leukemia virus RNA in saliva is a consistent feature in viremic cats. *Veterinary Microbiology*, v. 112, p.11-21, 2006b.

GONDA, M.A.; BRAUM, M.J.; CLEMENTS, J.E.; PYPHER, J.M.; WONGSTAAL, F.; GALLO, R.C.; GILDEN, R.V. Human T-cell lymphotropic virus type III shares sequence homology with a family of pathogenic lentiviruses. *Proceedings National Academy Science*, v.38, p. 4007-4011, 1986.

GROOPMAN, J.; SALAHUDDIN, S.; SARNGADHARAN, M.; MARKHAM, P.; GONDA, M.; SLISKI, A.; GALLO R. HTLV-III in saliva of people with AIDS-related complex and healthy homosexual men at risk for AIDS. *Science*, v. 226, p.447-449, 1984.

GUDNADOTTIR, M.; PALSSON, P.A. Host-virus interaction in Visna infected sheep. *The Journal of Immunology*, v. 95(6), p. 6111-6120, 1965.

HABEL RE. Ruminant digestive system. In: Getty R, Rosenbaum CE, Ghoshal NG, and Hillman D (Eds). *The Anatomy of the Domestic Animals* (5th ed), v 1.Philadelphia: Saunders, p. 861-915, 1975.

HARE S, DI NUNZIO F, LABEJA A, WANG J, ENGELMAN, A.; CHEREPANOV, P. Structural basis for functional tetramerization of lentiviral integrase. *PLoS Pathogens*. v.5(7), pp.1000515, 2009.

HAZIZA, B.; CHAUVIN, J.P.; GLUSCHANKOF, P.; SUZAN M. Caprine arthritis encephalitis virus: evidence for a B/D-type assembly pathway in a C-type lentivirus replication. *Virology*, v. 286(2), p.434-45, 2001.

HESS, J.L.; PYPHER, J.M.; CLEMENTS, J.E. Nucleotide sequence and transcriptional activity of the caprine arthritisencephalitis virus long terminal repeat. *Journal of Virology*, v. 60(2), p.385-393, 1986.

HOCHMAN, N.; ZAKAY-RONES, Z.; SHOHAT, H.; EVER-HADANI, P.; EHRLICH, J.; SCHLESINGER, M.; MORAG A. Antibodies to cytomegalo and Epstein-Barr viruses in human saliva and gingival fluid. *The New Microbiologica* v. 21, p.131-139, 1998.

HULLINGER, G.A.; KNOWLES, D.P.; MCGUIRE, T.C.; CHEEVERS, W.P. Caprine Arthritis-Encephalitis Lentivirus SU Is the Ligand for Infection of Caprine Synovial Membrane Cells. *Virology*, v.192(1), p.328-331, 1993.

HUSO, L.D.; NARAYAN, O.; HART, W.G. Sialic acids on the surface of caprine arthritis-encephalitis virus define the biological properties of the virus. *Journal Virology*, v. 62, p.1974-1980, 1988.

KLEVJER-ANDERSON, P.; ADAMS, D. S.; ANDERSON, L. W.; BANKS, K. L.; AND McGUIRE, T.C. A sequential study of virus expression in retrovirus-induced arthritis of goats. *Journal of General Virology*, v. 65, p. 1519-1525, 1984.

LAIRMORE, M.D. *Fenner's Veterinary Virology* (4^a ed.). San Diego, USA: Elsevier, 2011.

LAMARA, A.; FIENI, F.; MSELLI-LAKHAL, L.; TAINTURIER, D.; CHEBLOUNE, Y. 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 Research*, v.79, p. 165-172, 2001.

LARA, M.C.C.S.H.; BIRGEL JUNIOR, E.H.; BIRGEL, E.H. Possibility of vertical transmission of Caprine Arthritis-Encephalitis Virus in neonate kids. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*, Belo Horizonte, v. 57, n. 4, p. 553 - 555, 2005.

LEITE, R.C.; REIS, J.K.P.; OLIVEIRA, A.P.; NASCIMENTO, P.M.P.; OLIVEIRA, F.G.; NAVES, J.H.F.F.; RODRIGUES, A.P.S.; GASPARINI, M.R.; ALVES, F.; OLIVEIRA, C.H.S.; RAJÃO, D.S.; GALINARI, G.C.F. Retrovíroses Dos Animais Domésticos. *Veterinária e Zootecnia*, v 20 (Edição Comemorativa), p. 73-92, 2013.

LERONDELLE, C.; GODET, M.; MORNEX, J. F. Infection of primary cultures of mammary epithelial cells by small ruminant lentiviruses. *Veterinary Research*, v.5, n. 30, p.467-474, 1999.

LEROUX, C.; MORNEX, J.F. Retroviral infections in sheep and the associated diseases. *Small Ruminant Research*, v. 76(1-2) p.68-76, 2008.

LEWIS, M.; WRIGHT, K.; LAFRADO, L.; SHANKER, P.; PALUMBO, N.; LEMOINE, E.; OLSEN, R. Saliva as a source of feline leukemia virus antigen for diagnosis of disease. *Journal of Clinical Microbiology*, v.25, p.1320-1322, 1987.

LUTZ, H.; JARRETT, O. Detection of feline leukemia virus infection in saliva. *Journal of Clinical Microbiology*, v. 25, 827-831 1987.

MCDUGALL, E.I. Studies on ruminant saliva.1. The composition and output of sheep's saliva. *Biochemical Journal*,v.43, p.99-109 1948.

MCDONNEL, S.; SPARGER, E.; MURPHY, B. Feline immunodeficiency virus latency. *Retrovirology*, 69, 2013.

MCNEILLY, T.N.; BAKER, A.; BROWN, J.K.; COLLIE, D.; MACLACHLAN, G.; RHIND, S.M.; HARKISS, G.D. Role of alveolar macrophages in respiratory transmission of Visna/Maedi virus. *Journal of Virology*. v. 82(3), p. 1526-1536, 2008.

MOOJEN, V. Maedi-visna dos ovinos. In: RIET-CORREA, F.; SCHILD, A.L.; MENDEZ, M.D.C.; LEMOS, R.A.A. Doenças de Ruminantes e Equinos. 2. ed. São Paulo: Varela, São Paulo, 2001, p.138-144.

NARAYAN, O.; CLEMENTS, J.E.; STRANDBERG, J.D.; CORK, L.C.; GRIFFIN, D. E. Biologic characterization of the virus causing leuko-encephalitis arthritis in goats. 1. *Journal of General Virology*. v.50, p. 69-79, 1980.

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.; CORK, L.C. Caprine arthritis-encephalitis virus. IN: DINTER, Z.; MOREIN, B. Virus infection of ruminants. Amsterdam, Netherlands: Elsevier Science, 1990. P. 441-452

NAVAZESH, M. Methods for collecting saliva. *Annals of the New York Academy of Sciences*, v. 694, p.72-77, 1993.

NIGHTINGALE, S. From the Food and Drug Administration: Oral Fluid Specimen Test System for HIV-1 Approved. *Journal of the American Medical Association*, v.273 p.613, 1995.

O'KEEFE, E.P. Nucleic Acid Delivery: Lentiviral and Retroviral Vectors. Disponível em <http://dx.doi.org/10.13070/mm.en.3.174>. Acesso 30 Mai 2015.

PAULA, N.R.O.; ANDRIOLI, A.; CARDOSO, J.F.S.; PINHEIRO, R.R.; SOUSA, F.M.L.; SOUZA, K.C.; ALVES, F.S.F.; CAMPELLO, C.C.; RICARTE, A.R.F.; TEIXEIRA, M.F.S. Profile of the Caprine arthritis-encephalitis virus (CAEV) in blood, semen from bucks naturally and experimentally infected in the semi-arid region of Brazil. *Small Ruminant Research*, v. 85, 27-33, 2009.

PEPIN, M.; VITU, C.; RUSSO, P.; MORNEX, J.F.; PETERHANS, E. Maedi-visna virus infection in sheep: a review. *Veterinary Research*, v.29, n.3-4, p. 341-367, 1998.

PETERSON, K.; BRINKHOF, J.; HOUWERS, D.; COLENBRANDER, B.; GADELLA, B. Presence of pro-lentiviral DNA in male sexual organs and ejaculates of small ruminants. *Theriogenology*, v. 69, n. 4, p. 433-442, 2008.

PETRAITYTE, R.; JIN, L.; HUNJAN, R.; RAZANSKIENE, A.; ZVIRBLIENE, A.; SASNAUSKAS, K. Use of *Saccharomyces cerevisiae*-expressed recombinant nucleocapsid protein to detect Hantaan virus-specific immunoglobulin G (IgG) and IgM in oral fluid. *Clinical and Vaccine Immunology*, v. 14 p.1603-1608, 2007.

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

POLI, A.; GIANNELLI, C.; PISTELLO, M.; ZACCARO, L.; PIERACCI, D., BENDINELLI, M.; MALVALD, I G. Detection of salivary antibodies in cats infected with feline immunodeficiency virus. *Journal of Clinical Microbiology*, v. 30, p.2038-2041, 1992.

PRICKETT, J.; SIMER, R.; CHRISTOPHER-HENNINGS, J.; YOON, K-J.; EVANS, R.B.; ZIMMERMAN, J. Detection of porcine reproductive and respiratory syndrome virus infection in porcine oral fluid samples: A longitudinal study under experimental conditions. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, v.20, p.156-163, 2008.

PRICKETT, J.; SIMER, R.; YOON, K-J.; KIM, W-I.; ZIMMERMAN, J. Surveillance of commercial growing pigs for PRRSV and PCV2 infections using pen-based oral fluid samples: A pilot study. *Journal of Swine Health and Production*, v.16, p.86-91, 2008a.

PUGH, D. C. Clínica de ovinos e caprinos. São Paulo: Roca, 2004. 513 p.

QUINN, P. J.; MARKEY, B. K.; CARTER, M. E.; DONNELLY, W. J.; LEONARD, F. C. Microbiologia Veterinária e Doenças Infeciosas. Porto Alegre: Artimed, 2005. 511 p.

QURESHI, M.N.; BARR'P, C.E.; HEWLITT, I.; BOORSTEIRR, R.; KONG, F.; BAGASRA, O.; BOBROSKL, L.E.; JOSHI B. Detection of HIV in oral mucosal cells. *Oral Disease*, v 3(suppl. L), p. 73-78, 1997.

SCICCHITANO, R.; SHELDRAKE, R.F.; HUSBAND, A.J. Origin of immunoglobulins in respiratory tract secretion and saliva of sheep. , v. 58, p.315-321 1986.

SCOTT, D.A.; COULTER, W.A.; LARNEY, P.J. Oral shedding of herpes simplex virus type 1: a review. *Journal of Oral Pathology and Medicine*, v. 26, p.441-447, 1997.

SHACKLEFORD, J.; WILBORNW, H. Structural and histochemical diversity in mammalian salivary glands. *The Alabama Journal of Medical Sciences*, v. 5(2), p.180-203 1968.

SINGH, D.K.; CHEBLOUNE, Y.; MSELLI-LAKHAL, L.; KARR, B.M.; NARAYAN, O. Ovine lentivirus-infected macrophages mediate productive infection in cell types that are not susceptible to infection with cell-free virus. *Journal of General Virology*, v. 80(6), p.1437-1444 1999.

SMITH, W.; DAWSON, A.; WELLS, P.; BURRELLS, C. Immunoglobulin concentrations in ovine body fluids. *Research in Veterinary Science*, v.19, p. 89-194, 1975.

SMITH, M. C.; SHERMAN, D. M. **Goat medicine**. Pennsylvania: Lea & Febiger,1994. 620 p.

SISSON, S. Equine digestive system. In: Getty R, Rosenbaum CE, Ghoshal NG, and Hillman D (Eds). *The Anatomy of the Domestic Animals* (5th ed.), V1, Philadelphia: Saunders, p. 454-497, 1975a.

SISSON, S. Porcine digestive system. In: Getty R, Rosenbaum CE, Ghoshal NG, and Hillman D (Eds). *The Anatomy of the Domestic Animals* (5th ed.), v 1. Philadelphia: Saunders, p. 1269-1282 1975b.

STALLKNECHT, D.; HOWERTH, E.; REEVES, C.; SEAL, B. Potential for contact and mechanical vector transmission of vesicular stomatitis virus New Jersey in pigs. *American Journal of Veterinary Research*, v. 60, p.43-48, 1999.

SOUZA, K.C.; PINHEIRO, R.R.; SANTOS, D.O.; BRITO, R.L.L.; RODRIGUES AS, SIDER LH, PAULA NRO, AVILA AA, CARDOSO JFS, ANDRIOLI A. Transmission of the caprine arthritis-encephalitis virus through artificial insemination. *Small Ruminant Research*, v.109, p.193-198, 2013.

TRAVASSOS, C.; BENOIT, C.; VALAS, S.; SILVA, A.G.; PERRIN, G. Detection du virus de l'arthrite encéphalite caprine dans Le esperme de boucs infectes xpérimentalement. *Veterinary Research*, v.29, p.579-585, 1998.

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

VAN SOEST, P.J. Nutritional ecology of the ruminant. 2nd ed. New York: Cornell niversity Press; 1994.

UCHOA, A. 2013. Glândulas salivares, Equino, Bovino, Canino, Porcino. Disponível em: <http://es.slideshare.net/arissx/glandulas-salivares-equino-bovino-canino-porcino>. Acesso em 29 Mai 2015.

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

WANG, W.K.; CHEN, S.Y.; LIU, I.J.; CHEN, Y.C.; CHEN, H.L.; YANG, C.F.; CHEN, P.J.; YEH, S.H.; KAO, C.L.; HUANG, L.M.; HSUEH, P.R.; WANG, J.T.; SHENG, W.H.; FANG, C.T.; HUNG, C.C.; HSIEH, S.M.; SU, C.P.; CHIANG, W.C.; YANG, J.Y.; LIN, J.H.; HSIEH, S.C.; HU, H.P.; CHIANG, Y.P.; WANG, J.T.; YANG, P.C.; CHANG, S.C. Detection of SARS-associated coronavirus in throat wash and saliva in early diagnosis. *Emerging Infectious Diseases*, v.10, p.1213-1219, 2004.

WARD, R.L.; PAX, K.A.; SHERWOOD, J.R.; YOUNG, E.C.; SCHIFF, G.M.; BERNSTEIN, D.I. Salivary antibody titers in adults challenged with a human rotavirus. *Journal of Medical Virology*, v. 36, p.222-225, 1992.

WIGGS, R.B.; AND LOBPRISE, H.B. Oral anatomy and physiology. In: *Veterinary Dentistry, Principles and Practice*. Philadelphia: Lippincott-Raven Publishers, 1997, pp. 55-86.

ZINK, M.C.; YAGER, J.A.; MYERS, J.D. Pathogenesis of caprine arthritis encephalitis virus. Cellular localization of viral transcripts in tissues of infected goats. *American Journal of Pathology*, v.136, 843-854, 1990.

YAMAMOTO, J.K.; SPARGER, E.W.; HO, P.R.; ANDERSEN, T.P.; O'CONNOR, C.P.; MANDELL, L.; LOWESTINE, L.; MUNN, R.; PEDERSEN, N.C. Pathogenesis of experimentally induced feline immunodeficiency virus infection in cats. *American Journal of Veterinary Research*, v. 49(8) p. 1246-1258, 1998.

ANEXO

(Parecer do Comitê de Ética para Uso de Animais - CEUA)



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



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

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

Certificamos que o Protocolo nº 019.12, sob título "Quantificação da carga viral do CAEV em sêmen e sangue de machos natural e experimentalmente infectado" sob a responsabilidade de, Maria Fátima da Silva Teixeira, está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotados pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal - CONCEA (Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008), **TENDO SIDO CONSIDERADO APROVADO PELA** Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Estadual Vale do Acaraú (CEUA/UVA).

Sobral, 02 de junho de 2015.

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