

Lavagem do sêmen de reprodutores caprinos com solução Krebs-Ringer-Fosfato no controle da Artrite Encefalite Caprina (CAE)

Richard Elaino de Oliveira Ferraz^{1a}; Maria Fátima da Silva Teixeira^{1b}; Alice Andrioli^{2c}; Raymundo Rizaldo Pinheiro^{2d}; Valeska Shelda Pessoa de Melo^{1e}; Tânia Valeska Medeiros Dantas^{1f}, **Cinthia Maria Monteiro Caminha^{1g}**, Igor Ciríaco Barroso^{1h}

¹Universidade Estadual do Ceará/UECE - CE; ²EMBRAPA/CNPC – CE

^aricferraz2000@gmail.com; ^bmfteixeira@hotmail.com; ^calice@cnpic.embrapa.br;
^drizaldo@cnpic.embrapa.br; ^emelovsp@ig.com.br; ^ftaniavet@yahoo.com.br;
^gcinthia.caminha@gmail.com; ^higorcbarroso@yahoo.com.br

Resumo – Procedimentos de lavagem do sêmen têm sido testados visando minimizar o risco desta forma de transmissão. O objetivo deste trabalho foi avaliar a influência dos procedimentos de lavagem com Krebs-Ringer-Fosfato na detecção do CAEV usando Nested-PCR como técnica de diagnóstico. Onze coletas de sêmen de sete reprodutores soropositivos foram realizadas. As coletas foram fracionadas em duas alíquotas: na primeira (T) o ejaculado foi lavado com solução Krebs-Ringer-Fosfato; e o grupo controle (C) no qual as amostras de sêmen não foram submetidas aos procedimentos de lavagem. Os resultados mostraram que o DNA proviral foi detectado em 3 (27%) das 11 amostras que não foram submetidas a nenhum procedimento de lavagem. No grupo T foram detectadas 5 (45,45%) amostras positivas. A análise estatística mostrou que houve influência do tratamento do sêmen na detecção do DNA-proviral através da PCR.

Palavras-chave: CAEV, sêmen, Krebs-Ringer-Fosfato

Introdução

Em pequenos ruminantes, vários patógenos foram detectados no sêmen, com transmissão potencial ou comprovada, incluindo os lentivírus que infectam caprinos e ovinos.

Nesses reprodutores a eliminação do DNA proviral apresenta caráter intermitente. O sêmen também pode infectar-se por patógenos procedentes dos testículos, epidídimo, glândulas anexas, da uretra ou do prepúcio, ou os patógenos podem ganhar acesso ao sistema reprodutor, pelo sangue e líquidos tissulares extravasados para este sistema, nas bacteremias ou viremias, ou no caso de qualquer inflamação ou infecção nestes órgãos (ANDRIOLI et al., 2006).

O uso de biotécnicas reprodutivas surge como uma alternativa para o resgate e utilização do material genético desses animais. Entretanto, como a transmissão de patógenos pelo sêmen é relevante, faz-se necessário um controle da qualidade sanitária na produção de sêmen. Uma medida razoável seria submeter o sêmen a um protocolo experimental onde o mesmo oferecesse perigos mínimos de contaminação às fêmeas que o recebessem.

Neste sentido, o presente trabalho teve como objetivo testar um protocolo de lavagem de sêmen de reprodutores caprinos soropositivos para CAE, com finalidade de obter espermatozoides livres do CAEV.

Metodologia

Neste estudo foram realizadas 11 coletas de sêmen de sete machos caprinos sorologicamente positivos.

As amostras de sêmen foram analisadas segundo os parâmetros: volume e quantidade total de espermatozoides por ejaculado, concentração de espermatozoides por mililitro de sêmen, vigor e motilidade (COELHO et al., 2006).

A lavagem das amostras foi realizada com solução de Krebs-Ringer-Fosfato (T), e o grupo controle (C) constituiu a alíquota de sêmen que não foi submetida ao tratamento de lavagem. Foi adicionado 2,7 mL da solução Krebs-Ringer-Fosfato em cada alíquota de 0,3 mL de sêmen. Em seguida, as suspensões foram centrifugadas duas vezes a 4000g por 10 minutos, e os sobrenadantes descartados.

Para extração do DNA utilizou-se 200µl de Chelex a 5%, 7 µl de dithiothreitol e 2µl de proteinase K (10µg/µl) em cada amostra. Em seguida foram incubadas a 56° C (banho-maria) por 60 minutos, agitadas por 5-10 segundos e centrifugadas por 10 segundos a 15000g. Foram colocadas em água a 100 °C por 8 minutos para desnaturação da proteinase K e depois agitadas por 10 segundos. As amostras foram centrifugadas por 3 minutos a 15000 g e armazenadas a 4° C para serem utilizados na reação de Nested PCR (SANTURDE et al., 1996).

Foram utilizados dois pares de iniciadores derivados das seqüências das regiões *gag* da amostra padrão CAEV- Cork (SALTARELLI et al., 1990), sendo os iniciadores externos P1 (5' CAAGCAGCAGGAGGGAGAAGCTG-3', nucleotídeos 953 a 975) e P2 (5'TCCTACCCCCATAATTTGATCCAC-3' nucleotídeos 1249 a 1226). Os iniciadores internos P3 (5' GTTCCAGCAACTGCAAACAGTAGCAATG-3' nucleotídeos 997-1024) e P4 (5'ACCTTTCTGCTTCTTCATTTAATTTCCC3'- nucleotídeos 1181 a 1154) foram utilizados na segunda amplificação, resultando em um fragmento final de 185 pb (RIMSTAD et al., 1993).

As reações de amplificação foram constituídas de um ciclo inicial de 94°C por 5 minutos; seguidos 35 ciclos: 94°C - 1 minuto, 56°C - 1 minuto, 72°C - 45 segundos; com extensão final a 72°C por 7 minutos.

Resultados e Discussão

No grupo controle, composto por alíquotas de sêmen integral não submetido a lavagens, observou-se três resultados positivos (27%), enquanto no grupo T foram detectados 5 resultados positivos (45%). Em apenas duas amostras não foi detectado qualquer DNA proviral. Utilizou-se o teste Qui-Quadrado para comparar a dispersão nos tratamentos. Como o valor de χ^2 obtido foi maior que o χ^2_{tab} conclui-se que os desvios são significativos. Portanto, os ejaculados submetidos aos tratamentos (controle, T) reagem diferentemente ao teste. Portanto, a detecção do DNA-proviral do CAEV é influenciada pela técnica de tratamento de sêmen empregada neste trabalho.

O DNA-proviral foi encontrado em sete amostras, concluindo que 63,64% das amostras continham o DNA-proviral do CAEV. Esses resultados estão de acordo com outros trabalhos que encontraram o DNA proviral do HIV em 60 a 80% das amostras de sêmen provenientes de homens não tratados (LERUEZ-VILLE et al., 2006). Pode-se dizer que a PCR do grupo controle deixou de detectar 5 amostras certamente infectadas. Este fato pode apoiar a hipótese de que a repetição da PCR pode ajudar a detectar DNA-proviral em amostras anteriormente negativas.

Os resultados observados reforçam a hipótese que a transmissão do vírus via inseminação (natural ou artificial) é possível, já que foi detectado DNA-proviral no sêmen de animais infectados mesmo utilizando-se procedimento de lavagem. No entanto, não se pode afirmar categoricamente que o DNA pro-viral encontrado neste sêmen seja capaz de causar a infecção nas fêmeas com ele inseminadas. São necessários mais estudos que relacionem a detecção do DNA-proviral no sêmen e sua capacidade de transmitir a infecção de forma natural.

É possível que o vírus não tenha sido detectado em algumas amostras por ter sido efetivamente eliminado da amostra de sêmen. É conhecido que os vírus possuem suscetibilidade a inúmeros fatores do meio ambiente que influenciam na sua viabilidade como a faixa de pH, umidade, etc. (FENNER et al., 1987; BIELANSKI et al., 1991). Alguns fatores, que interferem na viabilidade dos vírus (ex.:pH), podem influenciar muito entre as amostras submetidas ou não a processos de lavagem. Há a hipótese de que o vírus possa ter sido inativado em amostras onde o mesmo foi encontrado.

Com relação aos resultados negativos existem fatores que tornam o teste menos sensível, resultando em falsos negativos. A primeira hipótese se refere a um fenômeno anteriormente descrito por Andrioli et al. (2006) os quais afirmam a natureza intermitente da eliminação do vírus pelo sêmen de animais natural e artificialmente infectados.

Outra hipótese é que apenas uma pequena quantidade de células como macrófagos possam estar presentes no sêmen desses animais. Portanto, há uma diminuição da sensibilidade da técnica secundária à baixa quantidade de DNA proviral integrado disponível à detecção (PAULA, 2008). Outra hipótese é que pode haver falha dos "primers" em detectar as variantes virais ou "quasispecies" (LEUROUX et al., 1997).

Andrioli et al. (2006) sugeriram que a presença de DNA proviral em sêmen de caprinos não é constante ou pode estar em quantidades mínimas indetectáveis. Peterson et al. (2008) trabalhando com gradientes de Percoll encontrou o DNA proviral em 55% das amostras em frações do sêmen que consistiam de *debris* citoplasmáticos e de macrófagos.

A importância da presença de células infectadas para que haja detecção do DNA proviral foi sugerida por Andrioli et al. (2006) ao afirmar que a presença do vírus no sêmen está relacionada a danos testiculares provavelmente porque a quantidade dessas células aumente durante a infiltração de macrófagos secundária à inflamação.

Podemos propor que algumas discrepâncias podem refletir a variação amostral, falha ou baixa sensibilidade da técnica de PCR quando utilizada para detectar o CAEV no sêmen. Há a possibilidade desse material genômico não estar sob uma forma detectável pela PCR, como não

haver macrófagos ativados ou não haver material genético do vírus integrado ao genoma do hospedeiro naquela porção da alíquota.

Além disso, durante a realização da técnica de PCR pode haver influência de fatores devidos ao acaso que levem a não alíquotagem de uma porção da amostra que contenha o vírus na sua forma detectável.

Agradecimentos

Os autores agradecem o suporte financeiro da FUNCAP e a Embrapa – CNPC pelo suporte técnico.

Referências Bibliográficas

ANDRIOLI, A., et al. Fatores de risco na transmissão do lentivírus caprino pelo sêmen. *Pesq. Agropec. Bras.*, 41, 1313-1319, 2006.

BIELANSKI A, EASTMAN P, HARE WCD. Transitory acidification of semen as a potential method for the inactivation of some pathogenic microorganisms. Effect on fertilization and development of ova in superovulated heifers. *Theriogenology*, 36, 33–40, 1991.

COELHO, L.A.; et al. Característica do ejaculado de caprinos sob estresse calórico em câmaras bioclimática. *Arq. Bras. de Med. Vet. e Zootec.*, v58, n.4, p. 544-549, 2006.

FENNER F, BACHMANN et al. *Veterinary virology: structure and composition of viruses*. New York: Academic Press; 1987. 3–19.

LEROUX, C. et al. Genomic heretogeneity of small ruminant lentiviruses: existence of heteroneous populations in sheepand of the same lentiviral genotypes in sheep and goats. *Arch. Virol.*, 142, 1125-1137, 1997.

LERUEX-VILLE, M.; et al. Virus et sperm: implications pour l'assistance medicale a la procreation (AMP). *Imm.- analyse & Biologiespecialisée*, 21, 81-188, 2006.

PAULA, N.R.O. *Parâmetros Clínicos, Hematológicos, Sorológicos e Reprodutivos em Reprodutores Natural e Artificialmente Infectados com CAEV*. Tese de Doutorado. Fortaleza, Ceará. 2008.

RIMSTAD, E., et al. Delayed seroconversion following naturally acquired caprine arthritis-encephalitis virus infection in goats. *Am. J. of Vet. Res.*, 54, 858-1862, 1993.

SALTARELLI, M.; QUERAT, et al. Nucleotide and transcriptional analysis of molecular clones of CAEV which generate infections vírus. *Virology*, 179, 347-364,1990.

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