

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

**USO DA TÉCNICA DE *SWIM-UP* PARA A REMOÇÃO DO VÍRUS DA
ARTRITE ENCEFALITE CAPRINA E OBTENÇÃO DE ESPERMATOZOIDES
VIÁVEIS**

AMANDA ARAGÃO ÁVILA

**SOBRAL - CE
ABRIL – 2013**

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

**USO DA TÉCNICA DE *SWIM-UP* PARA A REMOÇÃO DO VÍRUS DA
ARTRITE ENCEFALITE CAPRINA E OBTENÇÃO DE ESPERMATOZOIDES
VIÁVEIS**

AMANDA ARAGÃO ÁVILA

**SOBRAL - CE
ABRIL – 2013**

AMANDA ARAGÃO ÁVILA

**USO DA TÉCNICA DE *SWIM-UP* PARA A REMOÇÃO DO VÍRUS DA
ARTRITE ENCEFALITE CAPRINA E OBTENÇÃO DE ESPERMATOZOIDES
VIÁVEIS**

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

Área de Concentração: Reprodução Animal

**ORIENTADORA:
PROFA. DRA. ALICE ANDRIOLI PINHEIRO**

**SOBRAL - CE
ABRIL – 2013**

AMANDA ARAGÃO ÁVILA

USO DA TÉCNICA DE *SWIM-UP* PARA A REMOÇÃO DO VÍRUS DA ARTRITE
ENCEFALITE CAPRINA E OBTENÇÃO DE ESPERMATOZOIDES VIÁVEIS

Dissertação defendida e aprovada em: ____ / ____ / ____ pela Comissão
Examinadora:

Dr. Raymundo Rizaldo Pinheiro
Embrapa Caprinos e Ovinos

Dra. Lúcia Helena Sider
Embrapa Caprinos e Ovinos

Dr. Diônes Oliveira Santos
Embrapa Caprinos e Ovinos

Dr.^a. Alice Andrioli
Universidade Estadual Vale do Acaraú
Embrapa Caprinos e Ovinos
Presidente

SOBRAL - CE
ABRIL - 2013

Aos meus pais, Ana Maria Aragão Ávila e Antonio Augusto Ávila Cunha, pela educação, amor, apoio, confiança e grande incentivo durante todos esses anos de estudos e dedicação. Ao meu amor, Mário André de Carvalho Lima, pela confiança, carinho, companheirismo e amor em todos os momentos. Aos meus irmãos Alana Aragão Ávila e Alex Aragão Ávila.

Dedico

Agradecimentos

Agradeço, primeiramente, a Deus por me abençoar com força, coragem e sabedoria, permitindo assim que eu não desviasse do meu objetivo profissional e pessoal.

Aos meus pais Ana Maria e Antonio Augusto por acreditar no meu potencial e me incentivar à sempre seguir adiante para que eu alcance minha estrela, ou seja, meus objetivos de vida.

Ao meu noivo André Lima, pelo amor, dedicação, incentivos, paciência e risadas que me ajudaram durante o mestrado.

À minha grande amiga e orientadora Dra. Alice Andrioli, carinhosamente chamada de chefe, pela oportunidade a mim oferecida para que pudesse aperfeiçoar e adquirir novos conhecimentos na área da pesquisa em reprodução animal. A ela também agradeço por seus sábios conselhos e inúmeras horas que passamos conversando e rindo. Essas tornaram o desenvolvimento desse experimento bem mais agradável e divertido.

Ao Dr. Rizaldo Pinheiro, a quem chamo de doctor, pelas contribuições para a realização do experimento, além do seu bom humor com que encara os pequenos problemas que surgiram no desenvolver da atividade.

À minha grande amiga e também coorientadora Dra. Lúcia Sider, a quem chamo de Lu, primeiramente por suas sábias dicas que me ajudaram a conseguir alternativas para solucionar detalhes do experimento e por sua amizade sincera a qual tenho grande apreço.

Ao André Mariano Batista, pessoa a qual não conheço pessoalmente, porém foi de fundamental importância para o desenvolvimento do meu experimento, ao oferecer a formulação usada para o preparo do meio de cultura utilizado no swim-up.

Às minhas amigas (o) e colaboradoras (o) Kamila, Layris, Solange, Laninha, Ana Lúcia e Pedro Alberto por auxiliarem no desenvolvimento das análises, além de tornarem o ambiente de trabalho bem mais animado e produtivo.

Ao laboratorista José Nobrega, por ajudar nas análises e por contribuir para o aprimoramento de meus conhecimentos sobre técnicas de processamento seminal.

Aos funcionários dos campos experimentais que contribuíram para a manutenção dos animais.

A Embrapa Caprinos e Ovinos por disponibilizar os animais experimentais e infraestrutura para a realização do experimento.

À Fundação Cearense de Apoio a Pesquisa (FUNCAP), instituição de fomento da bolsa de mestrado e dos materiais de consumo, por contribuir na formação de uma profissional diferenciada, que busca contribuir de forma positiva para o avanço tecnológico brasileiro.

À Universidade Estadual Vale do Acaraú (UVA), em especial o Programa de Pós Graduação em Zootecnia e seus professores que contribuíram com minha formação acadêmica e elaboração do experimento.

***“I haven't got much time to waste, it's time to make my way
I'm not afraid what I'll face, but I'm afraid to stay
I'm going down my own road and I can make it alone
I'll work and I'll fight till I find a place of my own...”***

(Jump – Madonna)

*“Eu não tenho muito tempo a perder, é hora de fazer o meu caminho
Não estou com medo do que eu vou enfrentar, mas eu tenho medo de ficar
Eu estou indo na minha própria jornada e eu posso fazer isso sozinha
Vou trabalhar e eu vou lutar até eu encontrar meu próprio lugar...”*

Tradução

***Que os vossos esforços desafiem as impossibilidades, lembrai-vos de que as grandes
coisas do homem foram conquistadas do que parecia impossível.***

(Charles Chaplin)

SUMÁRIO

LISTA DE TABELAS.....	XI
LISTA DE FIGURAS.....	XII
LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS.....	XIII
RESUMO GERAL.....	XV
GENERAL ABSTRACT.....	XVI
CONSIDERAÇÕES GERAIS.....	18
CAPÍTULO I – REFERÊNCIAL TEÓRICO.....	19
1. INTRODUÇÃO.....	20
2. SÊMEN.....	22
3. FATORES QUE INFLUENCIAM O DESEMPENHO REPRODUTIVO DO MACHO.....	25
4. ARTRITE ENCEFALITE CAPRINA (CAE).....	27
4.1. AGENTE ETIOLÓGICO.....	27
4.2. SINAIS CLÍNICOS.....	28
4.3. EPIDEMIOLOGIA E TRANSMISSÃO.....	30
4.4. DIAGNÓSTICO.....	32
4.5. CONTROLE.....	33
5. FORMAS DE DESINFECÇÃO DO SÊMEN.....	34
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	37
CAPÍTULO II –.....	48
RESUMO.....	49
ABSTRACT.....	50
1. INTRODUÇÃO.....	51
2. MATERIAL E MÉTODOS.....	53
2.1. LOCAL E PERÍODO EXPERIMENTAL.....	53
2.2. GRUPO EXPERIMENTAL.....	53
2.3. MANEJO ALIMENTAR.....	53
2.4. COLETAS DE SÊMEN E AVALIAÇÃO ESPERMÁTICA ANTES DA TÉCNICA DE <i>SWIM-UP</i>	53
2.5. DETECÇÃO DO DNA PRÓ-VIRAL EM AMOSTRAS DE SÊMEN ANTES DA TÉCNICA DE <i>SWIM-UP</i>	54

2.5.1. EXTRAÇÃO DE DNA.....	54
2.5.2. AMPLIFICAÇÃO POR NESTED PCR.....	55
2.6. TÉCNICA DE <i>SWIM-UP</i>	56
2.7. DETECÇÃO DO CAEV EM AMOSTRAS DE SÊMEN APÓS A TÉCNICA DE <i>SWIM-UP</i>	57
2.7.1. EXTRAÇÃO DE DNA.....	57
2.7.2. EXTRAÇÃO DE RNA.....	58
2.7.3. AMPLIFICAÇÃO POR NESTED PCR.....	58
2.8. DELINEAMENTO EXPERIMENTAL E ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	58
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	59
4. CONCLUSÃO.....	67
5. PERSPECTIVAS.....	68
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	69

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO II

	PÁGINAS
Tabela 1. Resultados do diagnóstico por <i>Nested</i> PCR e RT- <i>nested</i> PCR em amostras de sêmen de reprodutores caprinos soropositivos para o CAEV.....	64
Tabela2. Dados obtidos antes e depois da técnica de <i>swim-up</i> em amostras seminais.....	65

LISTA DE FIGURAS

CAPÍTULO I

	PÁGINAS
Figura 1. Esquema representativo de um espermatozoide.....	22

CAPÍTULO II

	PÁGINAS
Figura 1. Tubos contendo sêmen e sp. TALP inclinados a 45° em estufa de CO ₂ (37°C).....	57
Figura 2. Gel de agarose a 1% corado com brometo de etídio. Amplificação do DNA pró-viral de amostras de sêmen de caprinos infectados com o CAEV antes do <i>swim-up</i>	59
Figura 3. Gel de agarose a 1% corado com brometo de etídio. Amplificação do DNA pró-viral de amostras de sêmen de caprinos infectados com o CAEV após o <i>swim-up</i>	61

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

μL -	Microlitros
μg -	Micrograma
A -	Ampere
AMPc	3'-5' Monofosfato cíclico de adenosina
CAE -	Artrite Encefalite Caprina
CAEV -	Vírus da Artrite Encefalite Caprina
CBRA -	Colégio Brasileiro de Reprodução Animal
cDNA -	Ácido Desoxirribonucléico complementar
CO ₂ -	Gás carbônico
DEPC	Diethylpyrocarbonate
DNA -	Ácido Desoxirribonucléico
DTT -	Dithiothreitol
EDTA -	Do inglês <i>Ethylenediamine Tetraacetic Acid</i> - Ácido Etilenodiamino Tetra- Acético
ELISA -	Do inglês Enzyme Linked Immunosorbent Assay
EUA -	Estados Unidos da América
FIV -	Fertilização <i>in vitro</i>
FSH -	Hormônio Folículo Estimulante
GnRH -	Gonadotrofina coriônica humana
gag -	Gene viral que codifica as proteínas internas do capsídeo viral
g -	Gramma
IA-	Inseminação Artificial
IDGA -	Imunodifusão em Gel de Ágar
IBGE	Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
LH -	Hormônio Luteinizante
L -	Litro
MAPA-	Ministério da Pecuária e Abastecimento
mL-	Mililitro
M -	Molar
mg -	Miligrama
ME -	Mercapto Etanol
MN -	Membrana de Nitrocelulose
mm	Milímetros
MIP -	Motilidade Individual Progressiva
nm -	Nanômetro
°C -	Graus Celsius
P -	<i>Primers</i>
pb -	Pares de bases
PBS -	Do inglês <i>Phosphate Buffered Saline</i> - Solução de Tampão de Fosfato
p28 -	Proteína do capsídeo viral
PCR -	Reação em Cadeia da Polimerase
PCRn -	Reação em Cadeia da Polimerase <i>nested</i>
RNA -	Ácido ribonucleico
RT -	Transcrição Reversa
sp. TALP -	Talp sperm
sptz	Espermatozoide
TE -	Transferência de Embrião

TBE - Tris Borato EDTA
WB - Do inglês *Western Blot*
xg - Unidade de força centrífuga relativa
% - Percentagem

RESUMO GERAL

Os procedimentos de lavagem seminal associados a testes moleculares de alta sensibilidade para o diagnóstico do vírus da Artrite Encefalite Caprina (CAEV), como a *Nested* PCR e a *RT-nested* PCR, podem ter um impacto significativo na prevenção da transmissão de enfermidades e preservação do germoplasma de reprodutores portadores do CAEV, a fim de ser utilizado sem o risco de contaminação da fêmea por via reprodutiva. Nesse cenário, objetivou-se com o presente trabalho determinar a influência da técnica de *swim-up* sobre a viabilidade espermática e sua eficiência na remoção de partículas virais de amostras de sêmen de reprodutores caprinos portadores do CAEV. Nesse estudo, 67 ejaculados foram avaliados antes da técnica de *swim-up*, quanto ao volume, concentração, motilidade individual progressiva (MIP), vigor e a presença do DNA pró-viral do CAEV por *Nested* PCR. Após essa etapa, as amostras foram submetidas ao teste de *swim-up* seguido da retirada do sobrenadante, contendo os espermatozoides, para avaliação quanto à MIP e ao vigor, como também presença de formas pró-viral e RNA viral livre do CAEV pela *Nested* PCR e *RT-nested* PCR, respectivamente, para avaliar a influência do procedimento de lavagem seminal nos parâmetros seminais. Das 67 amostras testadas por *Nested* PCR, antes do *swim-up*, 47 (70,15%) foram positivas para o DNA pró-viral. Além disso, quatro amostras adicionais foram positivas ao *RT-nested* PCR após o *swim-up*, o que permite dizer que pelo menos 76,12% (51/67) delas estavam infectadas antes da lavagem. Todavia, em 23,88% (16/67) das amostras não foram detectados a presença do CAEV antes do *swim-up*. Após a aplicação da técnica de *swim-up* constatou-se, pela *Nested* PCR e *RT-nested* PCR, que houve uma redução significativa ($\chi^2 = 9,078$; $p < 0,001$) da presença do CAEV nas amostras seminais, onde 28 de 51 amostras positivas resultaram livres do vírus (54,90%) tanto para DNA pró-viral quanto para o vírus livre. Ao demonstrar os resultados dos dois testes moleculares e avaliá-los individualmente, observou-se que em relação aos resultados da *Nested* PCR, o procedimento de *swim-up* foi capaz de remover de forma significativa ($\chi^2 = 0,1965$, $p < 0,002$), a maioria das células infectadas, uma vez que 30 amostras, de um total de 47 (63,83%) positivas para a presença de DNA pró-viral pré *swim-up*, obtiveram resultado negativo após lavagem espermática. No que diz respeito aos resultados da *RT-nested* PCR, foi possível constatar que nove amostras ainda continham o vírus em sua forma livre, sendo que quatro dessas eram negativas quanto à presença de DNA pró-viral antes do *swim-up*. Em relação à análise das respostas obtidas, antes e depois da técnica de *swim-up*, sobre a MIP e vigor espermático observou-se que houve uma diminuição, significativa na média das variáveis estudadas sendo o MIP 86,42% e 4,16 para vigor antes do *swim-up*, e após o procedimento as variáveis estudadas obtiveram média de 71,49% para a MIP e de 3,93 para o vigor. Além disso, todos os animais tiveram pelo menos um ejaculado negativo para a presença do vírus. Desta forma, conclui-se que a eliminação do CAEV no sêmen é de caráter intermitente. Finalmente, o monitoramento da presença do CAEV no sêmen não pode se basear apenas na presença de DNA pró-viral, pois pode conter o vírus em sua forma livre, RNA viral. Portanto, a associação da *Nested* PCR e *RT-nested* PCR é uma opção segura para a certificação sanitária individual das amostras seminais quanto à presença ou ausência do CAEV. A técnica de *swim-up* promove uma redução na infectividade de amostras de sêmen contaminadas, entretanto deve ser associada a outros protocolos de processamento seminal para alcançar melhores resultados. Mesmo, com a aplicação do *swim-up* é possível promover a recuperação de espermatozoides de alta motilidade individual progressiva e vigor espermático.

GENERAL ABSTRACT

The washing seminal procedures associated with highly sensible molecular tests for the diagnosis of Caprine Arthritis-Encephalitis virus (CAEV), such as *Nested* PCR and *RT-nested* PCR, may have a significant impact in preventing the transmission of diseases as well as preserving germplasm in breeding CAEV carriers in order to be used with no risk of contamination of the female reproductive tract. In this scenario, the aim of the present work was to determine the influence of the swim-up technique on sperm viability and efficiency in the removal of viral particles in semen samples from male CAEV carries goats. In this study, 67 samples were evaluated before the swim-up technique, for volume, sperm concentration, individual progressive motility (MIP), vigor and the presence of CAEV proviral DNA by *Nested* PCR. After this step, samples were subjected to the swim-up test followed by removal of the supernatant, containing the spermatozoa in order to be evaluated for MIP and vigor and also the presence of CAEV's proviral and free forms of the virus by *nested* PCR and *RT-nested* PCR, respectively, as well as to evaluate the influence of the washing procedure in seminal parameters. the 67 samples tested by *Nested* PCR, before *swim-up*, 47 (70.15%) were positive for viral DNA. Furthermore, four additional samples were positive for *RT-nested* PCR after *swim-up*, which allows us to say that at least 76.12% (51/67) were infected by CAEV. However, 23.88% (16/67) of the samples did not detect the presence of CAEV before the *swim-up*. After application of the *swim-up* technique was verified by *Nested* PCR and *RT-nested* PCR, there was a significant decrease ($\chi^2 = 9.078$, $p < 0.001$) in the presence of CAEV in semen samples, once 28 of 51 positive samples resulted free from the virus (54.90%) for both DNA proviral and the free form of the virus. Taking apart the results of the two molecular tests and evaluating them individually, it was observed that concerning results of the nested PCR, the *swim-up* procedure was able to significantly remove ($\chi^2 = 0.1965$, $p < 0.002$) most infected cells, as 30 samples, from a total of 47 (63.83%), previously shown as positive for the presence of the proviral DNA pre *swim-up*, were negative after sperm washing. Concerning the *RT-nested* PCR results, it was determined that nine samples still contained the virus in its free form, and four of these were negative for the presence of proviral DNA. Regarding the analysis of the responses obtained before and after swim-up technique on MIP and spermatic vigor, it was observed that there was a decrease, in the average of significant variables, being the IPM 86.42% and 4.16 to vigor before the swim-up, and after the procedure the studied variables had an average of 71.49% for MIP and rate of 3.93 for the vigor. Besides, all animals had at least one ejaculate negative for the presence of virus. Thus, it is concluded that the removal of CAEV in semen has an intermittent character. Finally, the monitoring of CAEV presence in semen cannot be based only on *nested PCR*, once negative samples for the presence of DNA proviral may contain the virus in its free form, viral RNA. Therefore, the combination of PCR-nested and RT-nested PCR is a safe option for health certification of individual semen samples for the presence or absence of CAEV. The *swim-up* technique promotes a reduction in the infectivity of contaminated semen samples,

however it should be associated with other sperm processing protocols to achieve better results. Even, with the implementation of the *swim-up* it is possible to promote the recovery of high individual progressive motility sperm and sperm vigor.

CONSIDERAÇÕES GERAIS

A caprinocultura tem desempenhado importante função socioeconômica, principalmente em países ou regiões em desenvolvimento, como geradora de renda e fonte de proteína de alto valor biológico. Em decorrência do crescimento sistemático da população brasileira há um aumento na demanda de proteína animal em termos quantitativos e qualitativos, e conseqüentemente da necessidade de comercialização de matrizes e reprodutores de alta linhagem genética, além de germoplasma como sêmen e embriões, desses animais, para promover a melhoria da produtividade do rebanho nacional.

A utilização de biotecnologias reprodutivas, tais como o processamento de sêmen, inseminação artificial (IA), transferência de embrião (TE) e a fertilização *in vitro* (FIV) permitem que as taxas de progresso genético sejam majoradas de forma rápida. Entretanto, caso não sejam tomadas as devidas medidas sanitárias pode-se tornar uma ameaça à caprinocultura, uma vez que a utilização de germoplasma contaminado facilita a disseminação de enfermidades nos rebanhos.

Dentre as enfermidades que podem ser transmitidas por via sexual como a epididimite ovina, brucelose, leptospirose, dentre outras, destaca-se a artrite encefalite caprina (CAE), por ser infectocontagiosa crônica, sem tratamento e que requer, que os animais infectados sejam retirados do rebanho e sacrificados o que leva a perda de animais com importantes características genéticas de interesse econômico. Além disso, estudos demonstram a ocorrência de células infectadas pelo CAEV no plasma seminal (Andrioli et al., 2006a) sendo imprescindível controle desta via de infecção.

Por outro lado, técnicas de processamento espermático, como os protocolos de lavagem de seminal, permitem a seleção de uma população de espermatozoides qualitativamente superiores com influência direta na capacidade de fertilização além de potencialmente livres de agentes patógenos. Nesse contexto, a presente proposta abrangerá o estudo da técnica de *swim-up* para aplicação em sêmen de reprodutores soropositivos para o vírus da CAE, objetivando a utilização do germoplasma de animais de alta qualidade genética, sem o risco de disseminação da enfermidade por essa via. Se resultados alentadores forem alcançados, a técnica contribuirá para o estímulo da comercialização de germoplasma animal, além de fortalecer programas de controle e erradicação da CAE.

CAPÍTULO 1 - REFERENCIAL TEÓRICO

1. INTRODUÇÃO

A caprinocultura é uma atividade de crescente importância social e econômica no Brasil, cujo rebanho é da ordem de 9.163.560 cabeças, segundo os dados do Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE, 2009), sendo a região Nordeste detentora do maior efetivo, com 90,6 % do rebanho nacional. No entanto, o crescimento acelerado da caprinocultura levou a importações de reprodutores e matrizes sem maiores critérios sanitários. Segundo Saraiva Neto (1993), importações de caprinos puros de raças leiteiras provenientes de rebanhos europeus e americanos, com o objetivo de melhorar a genética dos rebanhos brasileiros, introduziram o vírus da Artrite Encefalite Caprina (CAEV) no País.

A CAE é uma enfermidade infecto-contagiosa crônica, que ocasiona significativas perdas econômicas na caprinocultura. Sua ocorrência em matrizes e reprodutores de alto valor genético gera grande preocupação para os caprinocultores, uma vez que uma das formas de controle baseia-se na detecção via testes sorológicos com o sacrifício de animais soropositivos. Isso leva à perda de material genético, além de comprometer a comercialização de germoplasma. Estudos recentes relatam a presença do vírus no sêmen de animais infectados (Andrioli et al., 2006a e Paula, 2008). Além disso, já foi constatada a transmissão do CAEV por inseminação artificial (Souza et al., 2013).

O sêmen, de forma geral, pode ser contaminado por bactérias e vírus procedentes do epidídimo, testículos, glândulas anexas, uretra e do prepúcio. Os patógenos podem também ganhar acesso ao sistema reprodutor, pelo sangue e líquidos tissulares extravasados para esse sistema (Thibier & Guérin, 2000). Durante a inseminação artificial o potencial de disseminação da enfermidade é relevante, pois o número de fêmeas que podem receber o sêmen contaminado é expressivamente maior, caso não sejam rigorosamente seguidas às normas técnicas e sanitárias para o processamento do mesmo.

Técnicas que utilizam métodos físicos para separação dos espermatozoides do fluido seminal são desenvolvidas objetivando a eliminação dos patógenos para futura utilização em biotecnologias da reprodução, além disso, podem ser empregadas para obter espermatozoides de alta motilidade e vigor (Martí et al., 2006 e Jameel, 2008). Procedimentos como a centrifugação em gradiente de densidade e *swim-up* são capazes de separar populações de espermatozoides com diferentes motilidades e vigor, de espermatozoides imaturos, defeituosos, além de microorganismos, detritos não

específicos e células sanguíneas, resultando, assim, numa amostra de alta qualidade (Tucker & Jansen, 2002).

Na reprodução humana assistida há técnicas sendo aperfeiçoadas que ajudam casais sorodiscordantes para o vírus da imunodeficiência humana (HIV) a terem filhos. Esses procedimentos consistem na fertilização *in vitro* com sêmen lavado e é uma das técnicas de maior sucesso para esse objetivo (Dalapria & Ximenes Neto, 2004).

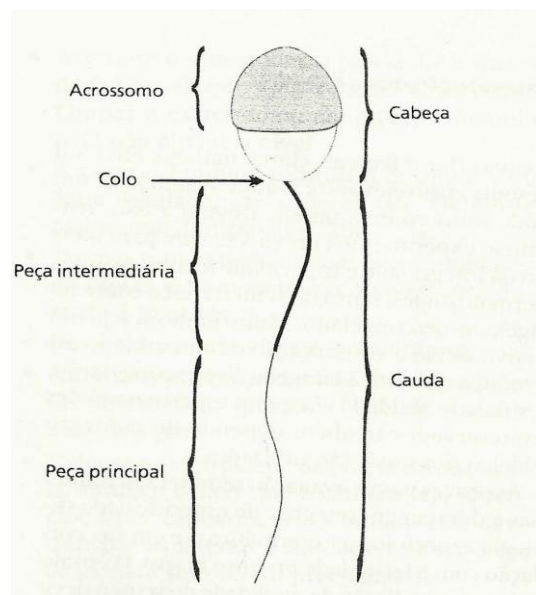
A técnica de *swim-up*, além de ser simples, eficiente e de baixo custo, é rotineiramente aplicada em laboratórios que utilizam técnicas de reprodução assistida (Martí et al., 2006). Entretanto, pouco se sabe sobre a eficiência desses procedimentos de lavagem seminal em amostras espermáticas de caprinos infectados pelo vírus da CAE.

2. SÊMEN

O sêmen é uma suspensão celular líquida contendo espermatozoides (gametas masculinos) e secreções produzidas no testículo, epidídimo e glândulas sexuais acessórias do trato genital masculino (Glarner & Hafez, 2004). O plasma seminal proporciona boas condições de manutenção da motilidade, sobrevivência e transporte dos espermatozoides, no trato genital masculino e feminino. Podem estar presentes no sêmen outras células além dos espermatozoides como os leucócitos, células epiteliais e células germinativas imaturas (Hansen, 2004).

Os espermatozoides são células haplóides altamente especializadas, cuja função é transportar até o oócito as informações genéticas de sua espécie (Aisen & Venturino, 2008). Sua formação ocorre no interior dos túbulos seminíferos, onde contém uma série complexa de células germinativas, que posteriormente se transformaram em células altamente especializadas, os gametas masculinos (Glarner & Hafez, 2004).

A célula espermática (figura 1) é organizada em uma cabeça achatada com seu núcleo e capuchão acrossômico, uma cauda, que é o aparelho necessário para a motilidade celular, a qual é dividida em peça intermediária e peça principal (Aisen & Venturino, 2008). A cabeça e a cauda se unem por uma estreita porção, o colo, que apresenta certa facilidade de ruptura.



Fonte: Aisen & Venturino (2008)

Figura 1. Esquema representativo de um espermatozoide.

A necessidade de testes para prever a capacidade reprodutiva do macho vem crescendo, pois são uma importante ferramenta para aumentar os índices de produtividade da caprinocultura nacional, por meio da seleção de reprodutores. As avaliações macro e microscópica do material seminal permitem determinar a viabilidade e fertilidade dos espermatozoides. Entretanto, segundo Aisen & Venturino (2008), não se dispõe de uma única prova para detectar com exatidão a fertilidade dos ejaculados individuais, porém quando se combinam cuidadosamente várias delas, podem-se selecionar os ejaculados para utilizar os que tenham um potencial de fecundação mais elevado entre os demais.

Os parâmetros de rotina utilizados em laboratórios de análise seminal são: o volume seminal, o aspecto, a concentração espermática, a motilidade individual progressiva (MIP), o vigor e a morfologia espermática.

Segundo o Colégio Brasileiro de Reprodução Animal (CBRA, 1997), o volume seminal pode ser relativo dependendo do método de coleta de sêmen, sendo o método da vagina artificial o que apresenta valores mais próximos ao fisiológico. O volume do ejaculado caprino pode variar entre 0,5 a 1,2 mL, sendo que para trabalhos de rotina são descartados aqueles ejaculados com volume inferior a 0,4 mL (Ax et al., 2004 e Aisen & Venturino, 2008).

O sêmen do macho caprino tem coloração branco cremoso, devendo-se descartar os ejaculados que apresentem coloração branco-rosada ou branco-acinzentada, pois indicam, respectivamente, a existência de sangue ou algum tipo de infecção no aparelho reprodutor (Aisen & Venturino, 2008). Em relação à consistência de acordo com o CBRA (1997), o sêmen pode apresentar-se com aparência cremosa, leitosa, serosa ou aquosa e estão correlacionados com a concentração espermática.

A concentração espermática normal para caprinos varia de $2,5 \times 10^9$ a $5,0 \times 10^9$ espermatozoides por mililitro e sua determinação pode ser feita por meio da câmara de contagem microscópica ou espectrofotômetro (Ax et al., 2004 e Aisen & Venturino, 2008).

Segundo Arruda et al (2011), a MIP e o vigor espermático são estimados de forma subjetiva e utilizados rotineiramente em laboratórios. No entanto, continuam tendo grande valor, principalmente para diferenciar sêmen de baixa e alta qualidade, além de ter relevância na determinação do potencial de fertilidade dos espermatozoides (Verstegen et al., 2002 e Matos et al., 2008).

A MIP é determinada pela contagem de espermatozoides móveis, em relação ao total (Aisen & Venturino, 2008). Já o vigor, segundo o CBRA (1997), representa a velocidade com que os espermatozoides se deslocam no campo microscópico. Para ambas as variáveis os valores mais elevados representam sêmen de melhor qualidade.

Segundo Cascieri et al. (1976), os espermatozoides de mamíferos ao saírem dos testículo são completamente desprovidos de motilidade. Esses adquirem motilidade progressiva graças ao contato com os fluídos presentes na região do corpo e cauda do epidídimo, pois sofrem várias modificações químicas e estruturais. Acredita-se que os mecanismos através do qual a atividade flagelar se inicia envolvam alterações nas concentrações intracelulares de AMPc (3'-5' monofosfato cíclico de adenosina), de cálcio e no pH intracitoplasmático, entre outros (Vijayaraghavan et al., 1996).

Em relação ao exame da morfologia espermática, esse avalia a presença de espermatozoides anormais, sendo que quando a proporção é muito alta, indica baixa fertilidade do sêmen, no caso de ruminantes as amostras que contenham mais de 15% de anormalidades não devem ser utilizadas em inseminação artificial (Aisen & Venturino, 2008). Para a avaliação das características morfológicas dos espermatozoides poderão ser utilizados esfregaços corados que são visualizados em microscópio de campo claro, ou pela técnica de preparação úmida, feita a leitura em microscópio de contraste de fase (CBRA, 1997).

As anormalidades morfológicas segundo Arruda et al. (2011) e Freneau (2011), são classificadas de diversas formas sendo que umas dividem os defeitos em primários, secundários e terciários, ou seja, estão relacionados com a origem sendo essa testicular ou extratesticular. Outras simplesmente são classificadas dividindo as alterações de acordo com a região da célula onde a mesma ocorreu como: cabeça, peça intermediária ou cauda.

De acordo com Lagerlof (1934), os defeitos primários são aqueles que se originam no epitélio seminífero durante a espermatogênese, já os secundários, seriam os defeitos que se originam distalmente ao epitélio seminífero nas vias intra e extratesticulares durante o armazenamento e a ejaculação. Os terciários são aqueles originados pela manipulação dos espermatozoides após a ejaculação.

Dentre as diversas classificações de formas anormais dos espermatozoides pode-se citar as alterações de cauda com peça principal, por exemplo, enrolada, simplesmente dobrada ou fortemente dobrada, alterações de cabeça podendo ser pequena, gigante, delgada, subdesenvolvida, piriforme, dupla, dentre outras (CBRA, 1997).

3. FATORES QUE INFLUENCIAM O DESEMPENHO REPRODUTIVO DO MACHO

Dentre os fatores que influenciam, negativamente, a produção espermática do macho destacam-se o estresse calórico, a subalimentação, a estacionalidade reprodutiva e a sanidade animal.

Segundo Brito et al. (2004) e Setchell, (2006), existem evidências de que a resposta testicular ao estresse calórico é variável conforme a espécie, raça, linhagem e indivíduo. Donin et al, (2007), observaram em reprodutores suínos e ovinos, que altas temperaturas afetam a libido e os mecanismos de termoregulação testicular, causando alterações na qualidade espermática, como aumento nos processos de degeneração do sêmen com consequente diminuição da concentração espermática. De acordo com Coelho et al. (2008), o estresse calórico afeta principalmente os espermátocitos primários, as espermátides e espermatogônias de caprinos. Contudo, não existem evidências em caprinos de que as células de Leydig e a produção de andrógenos sejam diretamente afetadas (Setchell, 2006). Esse fato foi evidenciado também por Coelho et al. (2008), ao avaliarem os níveis de testosterona em caprinos submetidos ao estresse calórico com temperatura média de $34,0 \pm 1,3^{\circ}\text{C}$, os quais constataram que não houve alterações dos níveis plasmáticos desses hormônios.

Em relação aos aspectos nutricionais, alguns nutrientes, quando em baixa concentração, podem afetar a frequência de pulso de hormônio liberador de gonadotrofina (GnRH). Ácidos graxos, insulina e leptina precisam estar em níveis mínimos, pois são responsáveis pelo aumento na frequência de pulsos de GnRH, sendo este responsável pela liberação das gonadotrofinas hormônio folículo estimulante (FSH) e hormônio luteinizante (LH) (Freitas, 2008). No macho, o FSH atua nas células germinativas dos túbulos seminíferos do testículo, sendo responsável pela espermatogênese até o estágio de espermátocito secundário, já o LH estimula as células Leydig a produzirem testosterona (Ax et al., 2004). Desta forma, animais subnutridos tendem a apresentar diminuição da qualidade seminal.

Já a estacionalidade reprodutiva segundo Morello & Chemineau (2008), constitui uma barreira biológica importante que limita a produção dos animais, evitando que esses não produzam crias quando não há condições adequadas de sobrevivência. De acordo com Traldi (1994), a luz recebida pela retina dos olhos, e pelo nervo óptico

envia uma mensagem, por meio de estímulo nervoso, até a glândula pineal. Essa, na ausência de luz no meio ambiente, produz a melatonina que, por sua vez, estimula o hipotálamo, a hipófise e os ovários (ou os testículos) ao retorno da atividade reprodutiva.

Outro fator de extrema importância que pode limitar o uso e desempenho produtivo dos animais são as enfermidades. Alguns microorganismos podem comprometer os mais variados órgãos, inclusive o sistema reprodutivo, causando subfertilidade ou infertilidade. Estudos realizados em ovinos observaram que os animais acometidos pela bactéria *Actinobacillus seminis* geralmente apresentam epididimite e/ou orquite unilateral palpável, com hipoplasia testicular (Puente-Redondo, et al., 2000 e Gregory et al., 2008). Essas alterações clínicas estão associadas à baixa concentração espermática, baixa motilidade e a não viabilidade espermática, além da presença de neutrófilos no sêmen (Bezerra et al., 2012).

A brucelose é uma zoonose que está disseminada por todo o mundo e pode infectar várias espécies animais, dentre elas os ovinos e caprinos. De acordo com Varges et al. (2008), os caprinos são normalmente acometidos pela bactéria *Brucella melitensis*, entretanto essa nunca foi relatada no Brasil, enquanto que a *Brucella abortus*, foi encontrada em 5,6% (7/124) de um rebanho caprino. Clementino et al. (2007), reportaram que a ocorrência de brucelose ovina, ocasionada pela bactéria *Brucella ovis*, é caracterizada por vários graus de epididimite e orquite, com consequências sobre a fertilidade dos carneiros.

No caso de reprodutores acometidos pelo vírus da CAE Rodríguez et al. (2005), reportaram que esses animais não tiveram sua qualidade seminal afetada pela enfermidade. Entretanto, caso os animais infectados não sejam retirados do plantel, podem atuar como potenciais fontes de disseminação do vírus. Devido ao seu caráter crônico e degenerativo o sacrifício dos animais soropositivos para a doença é adotado como medida controle e erradicação, o que afeta os programas de melhoramento genético (Andrioli, 2001).

Os ejaculados de reprodutores também podem atuar como importante fonte de disseminação de microorganismos oriundos de contaminação externa ou aqueles pré existentes no organismo de animais enfermos, como por exemplo, a brucelose e a leptospirose.

Com a utilização da inseminação artificial (IA) tornou-se possível o intercâmbio de material genético de melhor qualidade a nível nacional e internacional. Entretanto,

em muitas situações a implantação de um programa de IA ocorre sem a mínima orientação ou treinamento adequado do pessoal, tendo um reflexo negativo nas doses de sêmen produzidas, e conseqüentemente, nos dados de produtividade do plantel (Dias et al., 2000). Os equipamentos utilizados na coleta e os processos de manipulação do sêmen até o envasamento podem ser responsáveis pela contaminação das amostras durante o processo de refrigeração e congelamento (Souza et al., 2006).

Outros fatores de relevância na contaminação do ejaculado são a presença de agentes patógenos que podem ganhar acesso ao sistema reprodutor pelo sangue e líquidos tissulares extravasados para esse sistema. Além disso, o estado imunológico ou nutricional, além de injúrias, inflamações e infecções no órgão reprodutor, podem desencadear um maior fluxo de células sanguíneas juntamente com os patógenos, para o sêmen (Andrioli et al., 2006a).

Peterson et al. (2008), ao avaliarem amostras teciduais de reprodutores acometidos pelo CAEV oriundas dos testículos, epidídimo e glândulas sexuais acessórias, constataram a presença de DNA pró-viral, ou seja células infectadas. De acordo com Andrioli et al. (2006a) e Peterson et al. (2008), a eliminação do DNA pró-viral do CAEV no ejaculado caprino, apresenta caráter intermitente, dessa forma uma única amostra de sêmen, PCR-negativo, não pode ser usado como uma ferramenta de diagnóstico para prever que ejaculados subsequentes serão livres do vírus. Outro fator que contribui para o aumento da eliminação do DNA pró-viral do CAEV no sêmen são os danos testiculares uma vez que, segundo Andrioli et al. (2006a), 50% das amostras de sêmen coletadas depois da injúria foram positivas, enquanto 21,4% das amostras coletadas antes do dano acusaram a presença do vírus.

4. ARTRITE ENCEFALITE CAPRINA (CAE)

4.1. AGENTE ETIOLÓGICO

A artrite encefalite caprina é uma enfermidade infecto-contagiosa crônica, de evolução lenta, que tem como agente etiológico um vírus pertencente à família *Retroviridae*, subfamília *Lentivirinae* e gênero *Lentivirus* (Haase, 1986).

Esse vírus possui uma particular afinidade por células do sistema monocítico-fagocitário, principalmente macrófagos, sendo o vírus também identificado em células

epiteliais, fibroblásticas, endoteliais, da glândula mamária e do sistema nervoso (Capucchio et al., 2003). A presença do vírus também já foi demonstrada em diferentes tecidos do trato genital masculino de caprinos (Ali Al Ahmad et al., 2008 e Peterson et al., 2008). O vírus da artrite encefalite caprina (CAEV) é envelopado, de formato esférico, com diâmetro de aproximadamente 80 a 100 nm (Jones et al., 2000), e possui genoma viral formado por duas fitas de RNA não complementares e idênticas.

A primeira fase de infecção viral é a ligação da partícula viral, por meio de receptores glicoprotéicos presentes no envelope viral, a receptores específicos presentes na superfície de células hospedeiras, o que determina o tropismo celular do vírus (Test, 2006). Logo após essa ligação o vírus libera seu material genético, o RNA, dentro da célula hospedeira onde irá ocorrer o processo de replicação viral, o qual por meio de uma enzima viral chamada transcriptase reversa, dá origem ao DNA pró-viral. Esse, por sua vez, se incorpora ao genoma da célula alvo, por meio da enzima integrase, sendo que sua replicação resulta na produção e liberação de vírus infecciosos (Silva, 2005 e Araújo, 2008). Devido ao DNA pró-viral se integrar ao genoma da célula alvo, que geralmente são células do sistema imunológico, torna-se difícil o organismo animal desenvolver uma resposta imunológica curativa, o que contribui para a persistência da enfermidade (Silva, 2005).

4.2. SINAIS CLÍNICOS

De acordo com Lara (2002), a CAE pode acometer animais em diferente faixa etária e de ambos os sexos. Caracteriza-se por ser uma enfermidade crônica, de evolução lenta e com agravamento progressivo das lesões. Entretanto, segundo Alves (1999), alguns animais podem apresentar sinais clínicos de meses a anos, enquanto em outros a manifestação da sintomatologia da enfermidade pode nunca ocorrer.

De forma geral as perdas econômicas se caracterizam por morte de animais jovens, diminuição da produção láctea, perda de peso dos adultos devido a dificuldades de locomoção, além de contribuir para o aumento das perdas genéticas, uma vez que, matrizes e reprodutores acometidos pela enfermidade, são retirados de programas de melhoramento genético.

Os sinais clínicos da CAE podem ser evidenciados na sintomatologia nervosa, mamária, pulmonar e articular.

A sintomatologia nervosa normalmente é observada em cabritos, que apresentam leucoencefalomielite, e eventualmente em animais adultos. De acordo com Lara et al. (2005) e Radostits et al. (2002), os sintomas são fraqueza muscular, dificuldades de abdução dos membros posteriores, que progridem para movimentos limitados (paresia) ou falta de coordenação dos movimentos (ataxia), andar em círculos, balanceios da cabeça, paralisia facial, cegueira e nistagmo, ou seja, oscilações repetidas, involuntárias e rítmicas de um ou ambos os olhos.

A forma mamária é considerada marcante e de ocorrência mais frequente em rebanhos leiteiros. De acordo com Pereira (1995), essa manifestação clínica se caracteriza pelo endurecimento difuso do parênquima mamário, aumento da sensibilidade e presença de nódulos e diminuição da produção leiteira. Em estudo realizado por Lara (2002), constatou-se o endurecimento gradativo das glândulas mamárias (mamite indurativa) em 6,83 % (17/249) das fêmeas. Em relação à produção leiteira, Brito (2009), ao comparar grupos soropositivos e soronegativos para o CAEV identificou que fêmeas infectadas pelo CAEV apresentavam uma redução de 26% na produção leiteira.

O curso clínico da forma pulmonar é caracterizado por lesões no parênquima e interstício pulmonar, o que leva ao quadro de pneumonia intersticial progressiva. Os sintomas comumente observados são insuficiência respiratória, dispnéia, tosse seca e emagrecimento (Cork e Narayan, 1980 e Lara et al., 2005).

Contudo, as principais alterações observadas em caprinos acometidos pelo CAEV se referem às articulares, sendo as mais evidentes o inchaço das articulações cárpicas e do jarrete. Segundo Pinheiro et al. (2005), animais soropositivos para a CAE, geralmente, apresentavam aumento significativo das articulações carpometacarpianas. Todas as articulações podem ser afetadas, entretanto, quando o animal apresenta somente um membro acometido a claudicação não é grave, o caprino pode ter um período de vida normal, mas com o avançar da enfermidade perde peso, devido à dificuldade de locomoção para se alimentar (Brito, 2009).

4.3. EPIDEMIOLOGIA E TRANSMISSÃO

Segundo Crawford et al. (1980), o CAEV foi isolado pela primeira vez nos Estados Unidos da América (EUA), em 1979, da membrana sinovial e do líquido cefalorraquidiano de caprinos infectados.

No Brasil, a primeira descrição foi feita por Moojen et al. (1986), no Rio Grande do Sul. Nos estados do Rio Grande do Norte, Silva (2006), constatou que 2,71% das propriedades que aplicavam o sistema de criação semi-intensivo e intensivo, para produção leiteira, apresentavam animais soropositivos para o CAEV.

No Estado da Bahia foi constatado soroprevalência de 26,1% para o CAEV, em estudo realizado a partir de células mononucleares do sangue periférico, co-cultivadas em monocamadas de membrana sinovial caprina (Tigre et al., 2006).

Já no Ceará, o primeiro registro dessa enfermidade ocorreu em animais de raças leiteiras no município de Sobral (Pinheiro et al., 1989). Na região metropolitana de Fortaleza, em rebanhos leiteiros, verificou-se soroprevalência de 40,7% de animais positivos (Melo & Franke, 1997).

Em outros estados brasileiros também foram diagnosticado o vírus da CAE, entre eles: Maranhão, Minas Gerais e Rio de Janeiro (Assis & Gouveia, 1994), Pernambuco (Castro et al., 1994) e Piauí (Batista et al., 2004), dentre outros.

Estudos relatam maior prevalência dessa enfermidade em propriedades que utilizam sistemas de exploração intensiva e tecnificada, principalmente para produção leiteira, deduzindo que o sistema de confinamento coletivo e utilização de mamadeira coletiva facilitavam a transmissão do CAEV (Pinheiro et al., 2004; Silva, 2006).

Animais infectados pelo CAEV, porém assintomáticos atuam como fontes de infecção e disseminação da enfermidade nos rebanhos caprinos, o que leva a inúmeras perdas econômicas da caprinocultura. Segundo Cruz (2009), o CAEV replica-se preferencialmente em células do sistema monocítico-fagocitário. Portanto, animais infectados podem transmitir o agente infeccioso por meio de secreções ou excreções que contenham essas células, tais como secreções oriundas do sistema respiratório, urinário, salívia, fezes e glândula mamária. Essa disseminação é facilitada, principalmente, após contato por período prolongado entre animais sadios e enfermos, pois facilita a disseminação por meio da contaminação de água e alimentos. De acordo com Pugh (2004), não existe evidência de transmissão por insetos.

A principal via de infecção é através da ingestão de colostro ou leite de cabras infectadas. O que segundo Paula (2008), ocorre devido à absorção direta dos macrófagos infectados pelas vilosidades intestinais ou pela infecção das células intestinais pelo vírus liberados dos macrófagos.

A utilização de materiais perfuro-cortantes, sem os devidos cuidados de esterilização, como lâminas de bisturi, tatuadores, agulhas, tesouras, entre outros também podem contribuir para a disseminação do vírus no plantel (Gouveia et al., 1996).

A transmissão por via transplacentária ainda não está bem elucidada, pois East et al. (1993), observaram que cabritos separados logo após o nascimento e alimentados com colostro e leite bovino pasteurizado soroconverteram. Já Lara et al. (2005) estudaram a capacidade do CAEV infectar o feto ou cabritos neonatos por via transplacentária e no parto, respectivamente, de 26 animais, observaram que nenhum cabrito nasceu soro reagente aos antígenos do vírus, indicando que a possibilidade de transmissão vertical transplacentária da infecção foi menor do que 3,8%.

Em testes sorológicos, realizados em rebanhos onde foram implantados programas de melhoramento genético, verificou-se que a infecção foi significativamente maior nos machos, puros ou mestiços, indicando que esta categoria pode ser a fonte de infecção do rebanho (Pinheiro et al., 2001). Segundo Ali Al Ahmad et al. (2008), para que ocorra a transmissão do CAEV por via sexual é necessário que haja a presença e o derramamento de células infectadas no trato genital e secreções de animais infectados, respectivamente. Peterson et al. (2008), realizando estudos em amostras teciduais oriundas dos testículos, epidídimo e das glândulas sexuais acessórias: as ampolas, a próstata, as glândulas vesiculares e as bulbouretrais, constataram a presença do DNA pró-viral, indicando que vários órgãos sexuais masculinos podem contribuir diretamente para o derramamento de DNA pró-viral no ejaculado caprino. Já Ali Al Ahmad et al. (2007) e Oliveira et al. (2009), constataram a presença do vírus em sua forma livre, RNA genômico, no sêmen de caprinos infectados.

Segundo Souza et al. (2013), o vírus pode ser transmitido por inseminação artificial, desta forma, a transmissão também é possível por monta natural.

4.4. DIAGNÓSTICO

O diagnóstico da CAE não poder ser realizado apenas pela observação de sinais clínicos, uma vez que estes podem ser confundidos com outras enfermidades. Desta forma, torna-se imprescindível o uso de diagnóstico laboratorial.

Segundo Pinheiro et al. (2001), o diagnóstico laboratorial pode ser realizado por exames indiretos, que se baseiam na detecção da presença de anticorpos por técnicas imunossorológicas, além de exames diretos pela detecção do vírus em sua forma livre (RNA) ou sua forma integrada a célula hospedeira (DNA pró-viral).

O teste de imunodifusão em gel de ágar (IDGA) assim como outros testes sorológicos baseia-se na detecção de anticorpos contra o antígeno viral. Essa detecção ocorre através da difusão do anticorpo presente no soro do animal, em um meio semi-sólido (ágar-gel), com a formação de uma linha de precipitação visível a olho nu, que ocorre quando o anticorpo encontra com o antígeno formando com este um complexo insolúvel específico (Motta, 2007). A desvantagem desse teste é que ele necessita de um nível determinado de anticorpos, de forma que, se o mesmo estiver abaixo do detectável o animal será falso negativo ao teste (Andrioli et al., 2006b). Os níveis de anticorpos variam de acordo com o estado fisiológico do animal e entre animais, uma vez que alguns podem apresentar soroconversão tardia.

O teste de *Western Blot* (WB) segundo Souza (2010), baseia-se na detecção de pequenas quantidades de proteínas imobilizadas em uma membrana de nitrocelulose pela reação com anticorpo específicos para o antígeno. De acordo com Pinheiro (2001), esse teste apresenta como vantagem a menor ocorrência de reações inespecíficas, o que reduz o aparecimento de resultados falso positivos, além de poder ser aplicado em amostras de soro sanguíneo ou outras secreções que possuam os anticorpos específicos. De acordo com Pinheiro et al. (2009), o WB é mais sensível que o IDGA na detecção de anticorpos contra o CAEV.

O teste de Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA) têm apresentado uma maior sensibilidade comparado ao teste de IDGA, como constatado por Torres et al. (2009), que ao comparar os dois testes verificou que o número de soros positivos para o CAEV detectados pela técnica ELISA foi maior (72/313) que o detectado pela técnica de IDGA (30/313). O ELISA baseia-se nas reações que ocorrem entre antígeno e anticorpo, sendo um deste marcado por uma enzima insolubilizado sobre um suporte,

que posteriormente age sobre um substrato específico produzindo uma coloração, que pode ser detectada visualmente ou mensurada por espectrofotometria (Madruga et al., 2001 e Abbas & Lichtman, 2003).

Dentre os métodos de diagnóstico direto para a detecção do CAEV as técnicas moleculares para detectar o material genético viral são as mais utilizadas. Como todo organismo possui sequência de nucleotídeos que são únicas e específicas para cada espécie, a reação em cadeia pela ação da polimerase (PCR) desenvolvida por Kary B. Mullis, se baseia na amplificação enzimática, no laboratório, de um fragmento de DNA específico (alvo) pela extensão de oligonucleotídeos (*primers* ou iniciadores) que hibridam com as fitas complementares da sequência alvo e após vários ciclos, o seguimento limitados pelos iniciadores, é multiplicado de forma exponencial, de forma a serem detectáveis em géis de agarose submetidos à eletroforese pela coloração com brometo de etídio (Carvalho et al., 2010).

A PCR apresenta alta sensibilidade e especificidade para amplificação do ácido nucléico viral, o que garante uma maior segurança para o diagnóstico do CAEV (Riet-Corrêa, 2001). A vantagem dessa técnica é que ela é capaz de identificar pequenas quantidades de DNA viral presentes no material, além de microorganismos em estado de latência ou integrados ao genoma do hospedeiro, ou mesmo microorganismos mortos (Andrioli et al., 2006b).

Diversos protocolos tem sido desenvolvidos para o diagnóstico das lentivirose de pequenos ruminantes, sendo que esses protocolos variam de acordo com o que se objetiva detectar o RNA genômico viral pela transcrição reversa (RT-PCR) ou o DNA pró-viral utilizando diferentes metodologias (Sider et al, 2010; Andrioli et al. 2006b), sendo que diversos autores já utilizaram a técnica da PCR para demonstrar a presença do CAEV em amostras teciduais, no sêmen e sangue (Andrioli et al., 2006a e Peterson et al., 2008), além de fluidos uterinos de cabras infectas pelo vírus (Andrioli, 2001).

4.5. CONTROLE

Diversos estudos têm enfatizado algumas recomendações para controlar e evitar a disseminação da CAE. De acordo com Alves (1999) e Oliveira (2006), durante a aquisição de novos animais é recomendado à realização de testes sorológicos, indicado para o diagnóstico dessa enfermidade, além de exames periódicos no rebanho uma vez

que essa doença não pode ser diagnosticada apenas por sintomatologia clínica, o que poderia levar ao confundimento com outras enfermidades.

O sacrifício de animais soropositivos também é utilizado como forma de controle da disseminação do CAEV, o que gera grande preocupação dos caprinocultores. Dessa forma, a identificação e a segregação de animais soropositivos fazem-se necessária para evitar a disseminação da CAE no plantel levando, assim, a uma melhoria no saneamento da propriedade por meio de um rigoroso manejo sanitário, com conseqüente diminuição das perdas econômicas.

Nos rebanhos de animais suspeitos ou soropositivos para o CAEV devem-se separar os cabritos imediatamente após o parto, para que não entre em contato com as secreções e excreções maternas, e alimentá-los com colostro termizado a 56°C por 60 minutos para que haja a inativação do vírus, contudo as imunoglobulinas permanecem integras (Callado et al., 2001 e Brito, 2009).

Torna-se imprescindível a separação e esterilização de materiais como os tatuadores, as tesouras, as lâminas de bisturi e as agulhas, por grupo sorológico, para diminuir a probabilidade de disseminação do CAEV por essas vias (Gouveia et al., 1996).

Devido ao fato da CAE poder ser transmitida por via reprodutiva (Souza et al., 2013), faz-se necessário o controle da monta natural entre animais em condições sorológicas desconhecidas, além de um controle biológico de agentes infecciosos, sobretudo do CAEV, presentes em amostras seminais comercializadas em centrais de processamento de sêmen, para impedir a disseminação por essa via.

Em decorrência dos fatores observados, o delineamento de medidas de controle e a futura erradicação dessa enfermidade, são altamente demandadas pelos produtores, visto ser cada vez mais exigido apresentar rebanhos livres da CAE, para o comércio nacional e internacional de germoplasma (Andrioli et al., 2003).

5. FORMAS DE DESINFECÇÃO DO SÊMEN

Com o passar dos anos várias técnicas de “lavagem de sêmen” para humanos e animais tem sido desenvolvidas com o intuito de controlar a disseminação de microorganismos. Estes procedimentos consistem basicamente, na separação de

espermatozoides que são retirados do plasma seminal e ressuspensos em meio de cultura (Marti et al., 2006).

Técnicas de filtração, procedimentos de centrifugação em gradiente de densidade, migração do espermatozoide para um meio de cultura (*swim-up*), dentre outras técnicas de reprodução assistida, são comumente utilizadas em programas que utilizam fertilização *in vitro* (Cisale et al., 2001; Martí et al., 2006).

Entretanto, essas técnicas de seleção podem afetar os espermatozoides durante o desenvolvimento do processo, reduzindo viabilidade ou motilidade espermática (Drobnis et al., 1991). Para a avaliação do sêmen, o Colégio Brasileiro de Reprodução Animal (CBRA, 1997), preconiza a análise de alguns parâmetros espermáticos como motilidade, vigor, concentração e morfologia para que os espermatozoides presentes no ejaculado tenham viabilidade de fertilização.

De acordo com Jameel (2008), a técnica de *swim-up* é a mais antiga, mais simples, e de baixo custo, sendo comumente utilizada em casos de normozoospermia e subfertilidade feminina. Sua metodologia é baseada no movimento dos espermatozoides ativos para um meio de sobreposição, sendo aspirados e então lavados por centrifugação.

Algumas técnicas de lavagem de sêmen que envolve etapas de centrifugação extra têm sido criticadas devido ao aumento da possibilidade de danos que podem ocorrer aos espermatozoides (Drobnis et al., 1991 e Tucker & Jasen, 2002). No entanto, alguns autores relatam ser possível a obtenção, acima de 90%, de espermatozoides móveis e morfologicamente normais, por meio da técnica de *swim-up*. A eficiência desse procedimento baseia-se na motilidade dos espermatozoides presentes no ejaculado (Wainer et al., 2004 e Jameel, 2008), mas também sobre a força adicional de uma centrifugação suave para isolar espermatozoides de maior motilidade de outras amostras de células (Tucker & Jasen, 2002).

Com o passar dos anos casais sorodiscordantes para o vírus do HIV demonstraram o desejo por terem filhos sem recorrer a gametas doados por bancos de esperma ou desistir do sexo seguro. Kim et al. (1999), após separar amostras de sêmen de pacientes HIV-positivos em espermatozoides, células não espermáticas e frações de plasma, para verificar a presença de RNA viral e DNA pró-viral e a capacidade dos espermatozoides serem infectados por meio da presença de receptores de membrana celular para o HIV, observaram que o vírus foi restringido ao plasma e / ou células não espermáticas. De acordo com Quayle et al. (1997), o reservatório principal de HIV parece ser as

populações de linfócitos e macrófagos, mas não as células germinativas imaturas e espermatozoides.

Baseado nesses achados a única opção disponível para casais sorodiscordantes seria recorrer a técnicas de lavagem seminal, associados a testes de biologia molecular de alta sensibilidade e especificidade para garantir que as amostras de sêmen estariam livres do vírus, portanto aptas para serem utilizadas em procedimentos de reprodução assistida sem o risco de transmissão do vírus. Kato et al. (2006) e Persico et al (2006), demonstraram que é possível recolher espermatozoides com evidência de ausência de RNA e DNA pró-viral para o HIV, em amostras de sêmen de homens infectados, por meio da técnica de lavagem seminal que incluem processamento por gradiente de densidade e migração ascendente. Esses achados estão de acordo com os relatados por Hanabusa et al. (2000).

Partindo-se do pressuposto que é possível remover o vírus que tem tropismo por células do sistema monocítico-fagocitário e não por células germinativas, o estudo de técnicas de lavagem de sêmen reveste-se de grande importância para viabilizar o comércio seguro de germoplasma, principalmente devido às perdas econômicas e genéticas decorrentes da CAE nos rebanhos caprinos.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABBAS, A.K.; LICHTMAN, A.H. **Cellular and molecular immunology**. 5.ed. U.S.A.: Saunders Comp., 2003. 469p.
- AISEN, E.G.; VENTURINO, A. Coleta e avaliação do sêmen. In: AISEN, E.G. (Ed.). **Reprodução ovina e caprina**. 1.ed. São Paulo: Medvet, 2008. p.57-73.
- 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, 2007.
- 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.
- ALVES, F.S.F. **Fatores de risco e transmissão da artrite encefalite caprina a vírus**. Sobral: Embrapa Caprinos e Ovinos, 1999, 15p. (Embrapa Caprinos e Ovinos. Documentos, 29).
- ANDRIOLI, A. **Vírus da artrite encefalite caprina: PCR e isolamento em amostras de sêmen, fluido uterino e embriões**. 2001. 68 f. Tese (Doutorado em Ciência Animal) – Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte. 2001.
- ANDRIOLI, A.; GOUVEIA, A.M.G.; PINHEIRO, R.R. **Seleção do sêmen de reprodutores portadores do vírus da Artrite Encefalite Caprina através da técnica de Reação em Cadeia da Polimerase**. Sobral: Embrapa Caprinos e Ovinos, 2003, 23p. (Embrapa Caprinos e Ovinos. Documentos, 50).
- ANDRIOLI, A.; GOUVEIA, A.M.G.; MARTINS, A.S.; PINHEIRO, R.R.; SANTOS, D.O. Fatores de risco na transmissão do lentivírus caprino pelo sêmen. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.41, n.8, p.1313 - 1319, 2006a.
- ANDRIOLI, A.; SOUZA, K.C.; PINHEIRO, R.R.; SOUSA, F.M.L. **Protocolo para extração do DNA – proviral e PCR do lentivírus caprino em sangue**. Sobral, CE: Embrapa Caprinos, 2006b. 5 p. (Comunicado Técnico, 72).

- ARAÚJO, S.A.C. **Avaliação in vitro da atividade antiviral de produtos sintéticos e naturais contra lentivírus de pequenos ruminantes.** 2008. 149f. Tese (Doutorado em Ciência Veterinária). Universidade Estadual do Ceará, Fortaleza. 2008.
- ARRUDA, R.P.; CELEGHINI, E.C.C.; ALONSO, M.A.; CARVALHO, H.F.; OLIVEIRA, L.Z.; NASCIMENTO, J.; SILVA, D.F.; AFFONSO, F.J.; LEMES, K.M.; JAIMES, J.D. Métodos de avaliação da morfologia e função espermática: momento atual e desafios futuros. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v.35, n.2, p.145-151, 2011.
- ASSIS, A. P.M.V.; GOUVEIA, A.M.G. Evidência sorológica de Lentivírus (Maedi-Visna/ Artrite-Encefalite Caprina) em rebanhos nos estados de MG, RJ, BA e CE. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE MEDICINA VETERINÁRIA, 23^o., 1994, Olinda. **Anais...** Olinda, 1994. p.104.
- AX, R.L.; DALLY, B.A.; DIDION, R.W.; LENZ, C.C.; LOVE, D.D.; VARNER, B.; HAFEZ, M.; BELLIN, E. Avaliação do sêmen. In: HAFEZ, B.; HAFEZ, E.S.E. (Ed.). **Reprodução Animal**. 7.ed. Kiawah Island: Manole, 2004. p.369 -379.
- BATISTA, M.C.S.; CASTRO, R.S.; CARVALHO, F.A.A.; CRUZ, M.S.P.; SILVA, S.M.M.S.; REGO, E.W.; LOPES, J.B. Anticorpos anti-Lentivírus de pequenos ruminantes em caprinos integrantes de nove municípios Piauienses. **Ciência Veterinária nos Trópicos**, v.7, n.2 e 3, p.75 – 81, 2004.
- BEZERRA, M.J.G.; SANTOS, A.S.; CRUZ, J.A.L.O.; KUNG, E.S.; SÁ, S.G.; JABOUR, F.F.; BRITO, M.F.; MOTA, R.A. Epididimite ovina por *Actinobacillus seminis* no Estado de Pernambuco. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v.32, n.5, p.369-373, 2012.
- BRITO, L.F.C.; SILVA, A.E.D.F.; BARBOSA, R.T.; KASTELIC, J.P. Testicular thermoregulation in *Bos indicus*, crossbred and *Bos taurus* bulls: relationship with scrotal, testicular vascular cone and testicular morphology, and effects on semen quality and sperm production. **Theriogenology**, v.61, p.511-528, 2004.
- BRITO, R.L.L. **Implicações da Artrite-Encefalite Caprina na reprodução, produção e na qualidade do leite de cabras.** 2009. 107 f. Dissertação (Mestrado em zootecnia) – Universidade Estadual Vale do Acaraú, Sobral. 2009.
- CALLADO, A.K.C.; CASTRO, R.S.; TEIXEIRA, M.F.S. Lentiviruses of small ruminants (CAEV and Maedi-Visna): a review and perspectives. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v.21, n.3, p.87-97, 2001.

- CAPUCCHIO, M. T.; SANNA, E.; SANNA, M.P.; FARIGU, S.; MINELLI, R.; GUARDA, F. Maedi-Visna Virus detection in ovine third eyelids. **Journal of Comparative Pathology**, v.129, p.37-43, 2003.
- CARVALHO, C.V.; RICCI, G.; LEAL, M.F.; AFONSO, R. Reação em cadeia de polimerase (PCR) e eletroforese. In: CARVALHO, C.V.; RICCI, G.; LEAL, M.F.; AFONSO, R. (Ed.). **Guia de práticas em biologia molecular**. 1.ed. São Caetano do Sul: Yendis, 2010. p.35-60.
- CASCIERI, M.; AMANN, R.P.; HAMMERSTEDT, R.H. Adenine nucleotide changes at initiation of bull sperm motility. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 251, p. 787-793, 1976.
- CASTRO, R.S.; NASCIMENTO, S.A.; ABREU, S.R.O. Evidência sorológica de infecção pelo vírus da artrite-encefalite caprina em caprinos leiteiros do estado de Pernambuco. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, Belo Horizonte, v.46, n.5, p.571 – 572, 1994.
- COLÉGIO BRASILEIRO DE REPRODUÇÃO ANIMAL – CBRA. **Manual para exame andrológico e avaliação de sêmen animal**. 2.ed. Belo Horizonte, MG, 1997. 35p.
- CISALE, H.; FISCHMAN, M.; BLASI, C.; FERNANDEZ, H.A.; GLEDHILL, B.L. Enrichment of high-quality spermatozoa in bovine semen: relative effectiveness of three filtration matrixes. **Andrologia**, v.3, p.143–150, 2001.
- COELHO, L.A.; SASA, A.; BICUDO, S.D.; BALIEIRO, J.C.C. Concentrações plasmáticas de testosterona, triiodotironina (T3) e tiroxina (T4) em bodes submetidos ao estresse calórico. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.60, n.6, p.1338-1345, 2008.
- CORK, L.C.; NARAYAN, O. The pathogenesis of viral leukoencephalomyelitisarthritis of goats. 1. Persistent viral infection with progressive patologic changes. **Laboratory Investigation**, v.42, p.596-602, 1980.
- CLEMENTINO, I.J.; ALVES, C.J.; AZEVEDO, S.S.; PAULIN, L.M.; MEDEIROS, K. A. Inquérito soro-epidemiológico e fatores de risco associados à infecção por *Brucella ovis* em carneiros deslanados do semi-árido da Paraíba. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, n.27, v.4, p.137-143, 2007.

- CRAWFORD, T.B.; ADAMS, D.S.; SANDE, R.D.; GORHAM, J.R.; HENSON, J.B. The connective tissue component of the caprine arthritis-encephalitis syndrome. **The American Journal of Pathology**, v.100, n.2, p.443-454, 1980.
- CRUZ, J.C.M. **Monitoramento sorológico e da presença do DNA pró-viral do lentivírus caprino (CAEV) no sangue e sêmen de reprodutores infectados**. 2009. 35f. Tese (Doutorado em Ciência Animal). Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte. 2009.
- DALAPRIA, T.R.; XIMENES NETO, F.R.G. PRÁTICAS SEXUAIS E ESCOLHAS REPRODUTIVAS DE CASAIS SORODIFERENTE PARA O HIV. DST – **Jornal Brasileiro de Doenças Sexualmente Transmissíveis**, v.16, n.4, p.19-26, 2004.
- DIAS, C.P.; CASTAGNA, C.D.; REIS, R.G.; SIMONETTI, R.; BORTOLOZZO, F.P.; WENTZ, IVO.; CARDOSO, M. Grau de contaminação bacteriana no ejaculado de suínos submetidos a dois métodos de higienização de coleta. **Arquivo da Faculdade de Veterinária do Rio Grande do Sul**, v.28, n.1, p.32- 40, 2000.
- DONIN, D.S.; HEINEMANN, R.; MOREIRA, N. Estresse térmico e suas conseqüências sobre as características do sêmen de machos suínos. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v.31, n.4, p.456-461, 2007.
- DROBNIS, E.; ZHONG, C.; OVERSTREET, J. Separation of cryopreserved human sperm using Sephadex columns, washing, or Percoll gradients. **Journal of Andrology**, v. 12, n.3, p.201–208, 1991.
- EAST, N. E.; ROWE, J. D.; DAHLBERG, J. E.; THEILEN, G. H.; PEDERSEN, N. C. Modes of transmission of Caprine Arthritis-Encephalitis Virus infection. **Small Ruminant Research**, v.10, p.251 – 262, 1993.
- FREITAS, V. J. F. Influência da nutrição para o sucesso da biotécnicas reprodutivas utilizadas em caprinos e ovinos In: CONGRESSO BRASILEIRO DE NUTRIÇÃO ANIMAL, 1, 2008, Fortaleza. **Anais...** Fortaleza, 2008.
- FRENEAU, G.E. Aspectos da morfologia espermática em touros. **Revista Brasileira de reprodução animal**, v.35, n.2, p.160-170, 2011.
- GLARNER, D.L; HAFEZ, E.S.E. Espermatozoides e plasma seminal. In: HAFEZ, E.S.E; HAFEZ, B. (Ed.). **Reprodução animal**. 7.ed. Kiawah Island: Manole, 2004. p.33-53.

- GOUVEIA, A.M.G.; SANTA ROSA, J.; PINHEIRO, R.R.; ALVES, F.S.; VIEIRA, L. S.; SILVA, E.R.; CAVALCANTE, A.C.R. Soroepidemiological study on Caprine Arthritis-Encephalitis on dairy goats. In: CONGRESSO PANAMERICANO DE CIÊNCIAS VETERINÁRIAS/ PANVET, 15°, 1996, Campo Grande. **Anais... Campo Grande**, 1996.
- GREGORY, L.; RIZZO, H.; MEIRA JUNIOR, E.B.S.; LINS, G.J.V.; LINS, G.P.V.; SCARCELLI, E.A. The first isolation of *Actinobacillus semnis* in ovine Dorper breed with unilateral epididymitis in the state of São Paulo. **Reproduction in Domestic Animals**, v.43, n 3, p.77-78, 2008.
- HAASE, A.T. Pathogenesis of lentivirus infections. **Nature**, v.322, n.10, p.130-136, 1986.
- HANSEN,P.J. Imunologia da reprodução. In: HAFEZ, B.; HAFEZ, E.S.E. (Ed.). **Reprodução Animal**. 7.ed. Kiawah Island: Manole, 2004. p.345 -357.
- HANABUSA, H.; KUJI, N.; KATO, S.; TAGAMI, H.; KANEKO, S.; TANAKA, H.; YOSHIMURA, Y. An evaluation of semen processing methods for eliminating HIV-1. **AIDS**, v.14, n.11, p.1611-1616, 2000.
- INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA – IBGE. [2009]. **Censo Agropecuário**. Disponível em: <www.ibge.br/sidra>. Acessado em: 22 ago. 2011.
- JAMEEL, T. Sperm swim-up: a simple and effective technique of semen processing for intrauterine insemination. **Journal of the Pakistan Medical Association**, v.58, n.2, p.71-74, 2008.
- JONES, T.C.; HUNT, R.D.; KING, N.W. **Patologia veterinária**. São Paulo: Manole. 2000. p.1424.
- KATO, S.; HANABUSA, H.; KANEKO, S.; TAKAKUWA, K.; SUZUKI,M.; KUJI,N.; JINNO, M.; TANAKA, R.; KOJIMA, K.; IWASHITA, M.; YOSHIMURA, Y.; TANAKA, K. Complete removal of HIV-1 RNA and proviral DNA from semen by the swim-up method: assisted reproduction technique using spermatozoa free from HIV-1. **AIDS**, v.20, p 4-7, 2006.

- KIM, L.U.; JOHNSON, M.R.; BARTON, S.; NELSON, M.R.; SONTAG, G.; Smith, J. R.; Gotch, F.M.; GILMOUR, J.W. Evaluation of sperm washing as a potential method of reducing HIV transmission in HIV-discordant couples wishing to have children. **AIDS**, v.13, n.6, 1999.
- LAGERLOF, N. Morphologische Untersuchungen uber. Veranderim spermabild und in den Hoden bei Bulle mit Verminderter oder auf gehobe ver Fertilitat. **Acta Pathol Microbiol Scand**, v.1, p.254, 1934.
- LARA, M.C.C.S.H. **Artrite Encefalite dos Caprinos – aspectos clínicos e epidemiológicos**. 2002. 247f. Tese (Doutorado). Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo. São Paulo, 2002.
- LARA, M.C.C.S.H.; BIRGEL JUNIOR, E.H.; GREGORY, L.; BIRGEL, E.H. Aspectos clínicos da artrite-encefalite dos caprinos. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.57, n.6, p.736-740, 2005.
- MADRUGA, C.R.; ARAÚJO, F.R.; SOARES, C.O. Princípios, padronização e validação de provas sorológicas. In: MADRUGA, C.R., ARAÚJO, F.R., SOARES, C.O (Ed.). **Imunodiagnóstico em medicina Veterinária**. 1.ed. EMBRAPA gado de corte, 2001. p.145-175.
- MATOS, D.L.; ARAÚJO, A.A.; ROBERTO, I.G.; TONIOLLI, R.I. Análise computarizada de espermatozoides: revisão de literatura. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v.32, p.225-232, 2008.
- MARTÍ, E.; PÉREZ-PÉ, R.; MUIÑO-BLANCO, T.; CEBRIÁN-PÉREZ J.A. Comparative Study of Four Different Sperm Washing Methods Using Apoptotic Markers in Ram Spermatozoa. **Journal of Andrology**, v.27, n.6, p.746-753, 2006.
- MELO, A.C.M., FRANKE, C.R. Soroprevalência da infecção pelo vírus da Artrite-Encefalite Caprina (CAEV) no rebanho de caprinos leiteiros da região da grande Fortaleza, Ceará, Brasil. **Ciência Rural**, v.27, n.1, p.113-117, 1997.
- MORELLO, H.H.; CHEMINEAU, P. **Características anatômicas e funcionais do sistema reprodutor da fêmea**. In: AISEN, E.G. (Ed). **Reprodução Ovina e Caprina**. 1.ed. São Paulo, 2008. p.11-25.

- MOOJEN, V.; SOARES, H.C.; RAVAZZOLO, A.P.; PIZZOL, M.; GOMES M. Evidência de infecção pelo lentivírus (Maedi/Visna-Artrite-Encefalite Caprina) em caprinos no Rio Grande do Sul, Brasil. **Arquivo da Faculdade de Medicina Veterinária do Rio Grande do Sul**, v.14, n.1, p.77-78, 1986.
- MOTTA, P.M.C. **Comparação da IDGA, ELISA E “NESTED” PCR no diagnóstico da Anemia Infecciosa Equina em eqüinos, asininos e muares.** 2007. 29f. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal) - Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte. 2007.
- OLIVEIRA, A.N.; VERAS, A.K.A.; KADRI, S.M.; FRANCO, M. M.; PINHEIRO, R. R.; ANDRIOLI, A.; SIDER, L.H. Padronização das técnicas de processamento e extração de RNA viral de amostras de sêmen caprino. In: Encontro de Iniciação Científica da Universidade Estadual Vale do Acaraú, 11, 2009, Sobral, **Anais...** Sobral, 2009.
- OLIVEIRA, A.A.F. Sanidade Animal. In: CHAPAVAL, L.; OLIVEIRA, A.A.F.; ALVES, F.S.; ANDRIOLI, A.; ARAÚJO, A.M.; OLIVINDO, C.S. (Ed.). **Manual do Produtor de Cabras Leiteiras.** 1.ed. Visoça: Aprenda Fácil, 2006. p.128-155.
- PAULA, N.R.O. **Parâmetros clínicos, hematológicos, sorológicos e reprodutivos em reprodutores natural e experimentalmente infectados com CAEV.** 2008. 193f. Tese (Doutorado em Ciência Animal) – Universidade Estadual do Ceará, Fortaleza. 2008.
- PEREIRA, M.F. **Artrite-encefalite caprina (CAE) – estudo anatomopatológico e estudo imuno-histoquímico em cabras naturalmente infectadas.** 1995. 65f. Dissertação (Mestrado em medicina veterinária) - Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 1995.
- PERSICO, T.; SAVASI, V.; FERRAZZI, E.; ONETA, M.; SEMPRINI, A.E.; SIMONI, G. Detection of human immunodeficiency virus-1 RNA and DNA by extractive and *in situ* PCR in unprocessed semen and seminal fractions isolated by semen-washing procedure. **Human Reproduction**, v.21, n.6, p.1525–1530, 2006.
- 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.

- PINHEIRO, R. R. **Vírus da Artrite-Encefalite Caprina: Desenvolvimento e padronização de ensaios imunoenzimáticos (ELISA e Dot-blot) e estudo epidemiológico no Estado do Ceará.** 2001. 115f. Tese (Doutorado em Ciência Animal). Escola de Veterinária – Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2001.
- PINHEIRO, R.R.; EGITO, A.S.; SANTA ROSA, J. **Artrite Encefalite Caprina viral (CAEV).** Sobral: Embrapa Caprinos e Ovinos, 1989, 5p. (Embrapa Caprinos e Ovinos. Comunicado técnico, 19).
- PINHEIRO, R.R.; GOUVEIA, A.M.G.; ALVES, F.S.F.; ANDRIOLI, A. Perfil de propriedades no estado do Ceará relacionado à presença do lentivírus caprino. **Ciência Animal**, v.14, n.1, p.29-37, 2004.
- PINHEIRO, R.R.; GOUVEIA, A.M.G.; ALVES, F.S.F.; ANDRIOLI, A. Medidas carpo-metacarpianas como índice articular clínico em caprinos. **Revista Brasileira de Medicina Veterinária**, v.27, n.4, p.170-173, 2005.
- PINHEIRO, R.R.; GOUVEIA, A.M.G.; ALVES, F.S. Prevalência da infecção pelo vírus da artrite encefalite caprina no estado do Ceará, Brasil. **Revista do Centro de Ciências Rurais**, v.31, n.3, p.449-454, 2001.
- PINHEIRO, R. R.; SOUSA, A. R.; BRITO, R. L. L.; SANTOS, V.W.; ANDRIOLI, A.; DIAS, R.P.; FURTADO, J.R.; ALVES, F.S.F. Métodos sorológicos indiretos para diagnóstico da Artrite-Encefalite Caprina. In: SIMPÓSIO EMBRAPA LABEX DE SANIDADE ANIMAL, 1, 2009, Campo Grande. **Anais...** Campo Grande, 2009.
- PUENTE-REDONDO, D. A.; GARCÍA DEL BLANCO, N.; PÉREZ-MARTÍNEZ, C.; GONZÁLEZ-RODRÍGUEZ, M.C.; RODRÍGUEZ-FERRI, E.F.; GUTIÉRREZMARTÍN, C. B. Isolation of *Actinobacillus seminis* from the Genital Tract of Rams in Spain. **Journal of Comparative Pathology**, v.122, p.217-222, 2000.
- PUGH, D. C. **Clínica de caprinos e ovinos.** São Paulo: ROCA, 2004. p. 513.
- QUAYLE, A.J.; XU, C.; MAYER, K.H.; ANDERSON, D.J. Tlymphocytes and macrophages, but not motile spermatozoa, are a significant source of human immunodeficiency virus in semen. **The Journal of Infectious Diseases**, v.176 p.960–968, 1997.

- RADOSTITS, O. M.; GAY, C. C.; BLOOD, D. C.; HINCHCLIFF, K.W. **Clínica veterinária: Um tratado de doenças dos bovinos, ovinos, suínos, caprinos e eqüinos.** Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2002. 1770 p.
- RIET-CORRÊA, F. **Doenças de Ruminantes e Eqüinos.** São Paulo: Varela, 2001. v.1.
- RODRÍGUEZ, H.A.M.; ÁLVAREZ, H.R.; PÉREZ, J.T. et al. Efecto del virus de artritis encefalitis caprina en el aparato reproductor de machos caprinos. **Veterinaria México**, v.36, n.2, p.159-176, 2005.
- SARAIVA NETO, A.O. **Soroprevalência da artrite-encefalite caprina em plantéis caprinos leiteiros criados no estado de Pernambuco.** Recife, 1993. 64f. Tese (Mestrado em Clínica Médica) - Universidade Federal Rural de Pernambuco, 1993.
- SETCHELL, B.P. The effects of heat on testes of mammals. **Animal Reproduction**, v.3, p.81-91, 2006.
- SIDER, L.H.; OLIVEIRA, A.N.; VERAS, A.K.A.; KADRI, S.M.; FRANCO, M.M.; PINHEIRO, R.R.; ANDRIOLI, A. Processamento de sêmen para extração de RNA genômico do vírus da Artrite-Encefalite Caprina e diagnóstico molecular por RT-nested PCR. Sobral: Embrapa Caprinos, 2010. (Comunicado técnico, 113).
- SILVA, J.H.M. **Artrite-Encefalite Caprina – CAE.** 2005. 32f. Monografia. (Graduação em Medicina Veterinária). Centro Regional Universitário de Espírito Santo do Pinhal, Espírito Santo do Pinhal. 2005.
- SILVA, J.B.A. **Vírus da Artrite Encefalite Caprina (CAEV) em folículos pré-antrais de cabras naturalmente infectadas.** 2006. 148f. Tese (Doutorado em Ciências Veterinárias – Área de Reprodução e Sanidade Animal) – Universidade Estadual do Ceará, Fortaleza, 2006.
- SOUZA, K.C. Artrite-Encefalite Caprina: **Infecção experimental via inseminação artificial e acompanhamento clínico e sorológico.** 2010. 100f. Dissertação (Mestrado em Zootecnia). Universidade Estadual Vale do Acaraú, Sobral. 2010.
- SOUZA, K.C.; PINHEIRO, R.R.; SANTOS, D.O.; BRITO, R.L.L.; RODRIGUES, A.S.; SIDER, L.H.; PAULA, N.R.O.; ÁVILA, A.A.; CARDOSO, J.F.S.; ANDRIOLI, A. Transmission of the caprine arthritis-encephalitis virus through artificial insemination. **Small Ruminant Research**, v.109, p.193–198, 2013.

- SOUZA, A.F.; GUERRA, M.M.P.; COLETO, Z.F.; MOTA, R.A.; SILVA, L.B.G.; LEÃO, A.E.D.S.; SOBRINHO, E.S.N. Avaliação microbiológica do sêmen fresco e congelado de reprodutores caprinos. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, v.43, n.3, p.329-336, 2006.
- TEST, D.M.E.D. **Desarrollo y aplicación de técnicas de diagnóstico serológico y molecular para el estudio de la transmisión calostrual y horizontal del virus Maedi-Visna (VMV) en ovino**. 2006. 137f. Tese. (Doutorado em Ciências Veterinárias). Universidad de Zaragoza, Espanha. 2006.
- THIBIER, M.; GUÉRIN, B. Hygienic aspects of storage and use of semen for artificial insemination. **Animal Reproduction Science**, v.62, p.233-251, 2000.
- TIGRE, D.M.; CAMPOS, G.S.; SARDI, S.I. Isolamento e identificação do Vírus da Artrite Encefalite Caprina, a partir do co-cultivo de células mononucleares do sangue com células de membrana sinovial de cabra. **Revista de Ciências Médicas e Biológicas**, Salvador, v. 5, n. 2, p.124-131, 2006.
- TORRES, J.A.; CAMPOS, G.S.; FREITAS, M.M.; BRANDÃO, C.F.L.; SARDI, S.I. Produção de antígeno viral para o sorodiagnóstico da Artrite encefalite caprina utilizando um teste imunoenzimático (ELISA). **Revista de Ciências Médicas e Biológicas**, v.8, p.107- 114, 2009
- TRALDI, A.S. **Tópicos em reprodução e inseminação artificial em caprinos**. São Paulo, 1994. 54p.
- TUCKER, K.E.; JANSEN, C.A.M. [2002]. **Sperm separation techniques: comparison and evaluation of gradient products**. Disponível em: <<http://www.ivf.nl/Articles/pdf/SpermSeparationTechniques.pdf>>. Acessado em: 18 Ago. 2011.
- VARGES, R.; MEDEIROS, L.; LILENBAUM, W. Sororreatividade para Brucella abortus em rebanho caprino no estado do Rio de Janeiro, Brasil: relato de caso / Seroreactivity for Brucella abortus in a goat herd. **Revista brasileira de ciências veterinárias**, v.15, n.2, p 103-104, 2008.
- VERSTEGEN, J.; IGUER-OUADA, M.; OCLIN, K. Computer assisted sêmen analyzers in andrology research and veterinary practice. **Theriogenology**, v.57, p.149-179, 2002.

VIJAYARAGHAVAN, S.; SEPHENS, D.T.; TRAUTMAN, K.; SMITH, G.D.; KHATRA, B.C.; SILVA, E.F.; GREENGARD, P. Sperm motility development in the epididymis is associated with decreased glycogen synthase Kinase-3 and protein phosphatase 1 activity. **Biology of Reproduction**, v.54, p.709-718, 1996.

WAINER, R.; ALBERT, M.; DORION, A.; BAILLY, M.; BERGÈRE, M.; LOMBROSO, R.; GOMBAULT, M.; SELVA, J. Influence of the number of motile spermatozoa inseminated and of their morphology on the success of intrauterine insemination. **Human Reproduction**, v.19, n.9, p.2060-2065, 2004.

**CAPÍTULO 2 - USO DA TÉCNICA DE *SWIM-UP* PARA A REMOÇÃO DO
VÍRUS DA ARTRITE ENCEFALITE CAPRINA E OBTENÇÃO DE
ESPERMATOZOIDES VIÁVEIS**

RESUMO

Objetivou-se com o presente trabalho determinar a influência da técnica de *swim-up* sobre a viabilidade espermática e sua eficiência na remoção de partículas virais de amostras de sêmen de reprodutores caprinos portadores do CAEV. Nesse estudo, 67 ejaculados foram avaliados antes da técnica de *swim-up*, quanto ao volume, concentração, motilidade individual progressiva (MIP), vigor e a presença do DNA pró-viral do CAEV por *Nested* PCR. Após essa etapa, as amostras foram submetidas ao teste de *swim-up* seguido da retirada do sobrenadante, contendo os espermatozoides, para avaliação quanto à MIP e ao vigor, como também presença de formas pró-viral e RNA viral livre do CAEV pela *Nested* PCR e RT-*nested* PCR, respectivamente, para avaliar a influência do procedimento de lavagem seminal nos parâmetros seminais. Das 67 amostras testadas por *Nested* PCR, antes do *swim-up*, 47 (70,15%) foram positivas para o DNA pró-viral. Além disso, quatro amostras adicionais foram positivas ao RT-*nested* PCR após o *swim-up*, o que permite dizer que pelo menos 76,12% (51/67) delas estavam infectadas antes da lavagem. Todavia, em 23,88% (16/67) das amostras não foram detectados a presença do CAEV antes do *swim-up*. Após a aplicação da técnica de *swim-up* constatou-se, pela *Nested* PCR e RT-*nested* PCR, que houve uma redução significativa ($\chi^2= 9,078$; $p < 0,001$) da presença do CAEV nas amostras seminais, onde 28 de 51 amostras positivas resultaram livres do vírus (54,90%) tanto para DNA pró-viral quanto para o vírus livre. Ao demonstrar os resultados dos dois testes moleculares e avaliá-los individualmente, observou-se que em relação aos resultados da *Nested* PCR, o procedimento de *swim-up* foi capaz de remover de forma significativa ($\chi^2 = 0,1965$, $p < 0,002$), a maioria das células infectadas, uma vez que 30 amostras, de um total de 47 (63,83%) positivas para a presença de DNA pró-viral pré *swim-up*, obtiveram resultado negativo após lavagem espermática. No que diz respeito aos resultados da RT-*nested* PCR, foi possível constatar que nove amostras ainda continham o vírus em sua forma livre, sendo que quatro dessas eram negativas quanto à presença de DNA pró-viral antes do *swim-up*. Em relação à análise das respostas obtidas, antes e depois da técnica de *swim-up*, sobre a MIP e vigor espermático observou-se que houve uma diminuição, significativa na média das variáveis estudadas sendo o MIP 86,42% e 4,16 para vigor antes do *swim-up*, e após o procedimento as variáveis estudadas obtiveram média de 71,49% para a MIP e de 3,93 para o vigor. Além disso, todos os animais tiveram pelo menos um ejaculado negativo para a presença do vírus. Desta forma, conclui-se que a eliminação do CAEV no sêmen é de caráter intermitente. Finalmente, o monitoramento da presença do CAEV no sêmen não pode se basear apenas na presença de DNA pró-viral, pois pode conter o vírus em sua forma livre, RNA viral. Portanto, a associação da *Nested* PCR e RT-*nested* PCR é uma opção segura para a certificação sanitária individual das amostras seminais quanto à presença ou ausência do CAEV. A técnica de *swim-up* promove uma redução na infectividade de amostras de sêmen contaminadas, entretanto deve ser associada a outros protocolos de processamento seminal para alcançar melhores resultados. Mesmo, com a aplicação do *swim-up* é possível promover a recuperação de espermatozoides de alta motilidade individual progressiva e vigor espermático.

Palavras-chave: lavagem seminal, caprino, vírus, *Nested* PCR, RT-*nested* PCR

ABSTRACT

Thus, the aim of the present work was to determine the influence of the swim-up technique on sperm viability and efficiency in the removal of viral particles in semen samples from male CAEV carries goats. In this study, 67 samples were evaluated before the swim-up technique, for volume, sperm concentration, individual progressive motility (MIP), vigor and the presence of CAEV proviral DNA by *Nested* PCR. After this step, samples were subjected to the swim-up test followed by removal of the supernatant, containing the spermatozoa in order to be evaluated for MIP and vigor and also the presence of CAEV's proviral and free forms of the virus by *nested* PCR and RT-*nested* PCR, respectively, as well as to evaluate the influence of the washing procedure in seminal parameters. the 67 samples tested by *Nested* PCR, before *swim-up*, 47 (70.15%) were positive for viral DNA. Furthermore, four additional samples were positive for RT-*nested* PCR after *swim-up*, which allows us to say that at least 76.12% (51/67) were infected by CAEV. However, 23.88% (16/67) of the samples did not detect the presence of CAEV before the *swim-up*. After application of the *swim-up* technique was verified by *Nested* PCR and RT-*nested* PCR, there was a significant decrease ($\chi^2 = 9.078$, $p < 0.001$) in the presence of CAEV in semen samples, once 28 of 51 positive samples resulted free from the virus (54.90%) for both DNA proviral and the free form of the virus. Taking apart the results of the two molecular tests and evaluating them individually, it was observed that concerning results of the nested PCR, the *swim-up* procedure was able to significantly remove ($\chi^2 = 0.1965$, $p < 0.002$) most infected cells, as 30 samples, from a total of 47 (63.83%), previously shown as positive for the presence of the proviral DNA pre *swim-up*, were negative after sperm washing. Concerning the RT-*nested* PCR results, it was determined that nine samples still contained the virus in its free form, and four of these were negative for the presence of proviral DNA. Regarding the analysis of the responses obtained before and after swim-up technique on MIP and spermatic vigor, it was observed that there was a decrease, in the average of significant variables, being the IPM 86.42% and 4.16 to vigor before the swim-up, and after the procedure the studied variables had an average of 71.49% for MIP and rate of 3.93 for the vigor. Besides, all animals had at least one ejaculate negative for the presence of virus. Thus, it is concluded that the removal of CAEV in semen has an intermittent character. Finally, the monitoring of CAEV presence in semen cannot be based only on *nested* PCR, once negative samples for the presence of DNA proviral may contain the virus in its free form, viral RNA. Therefore, the combination of PCR-nested and RT-nested PCR is a safe option for health certification of individual semen samples for the presence or absence of CAEV. The *swim-up* technique promotes a reduction in the infectivity of contaminated semen samples, however it should be associated with other sperm processing protocols to achieve better results. Even, with the implementation of the *swim-up* it is possible to promote the recovery of high individual progressive motility sperm and sperm vigor.

Key-words: seminal washing, caprine, virus, *Nested* PCR, RT-*nested* PCR

1. INTRODUÇÃO

A inseminação artificial (IA) torna possível o intercâmbio de germoplasma de melhor qualidade no âmbito nacional e internacional, o que acelera os programas de melhoramento genético na caprinocultura. Todavia, o Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) e os órgãos de defesa sanitária de outros países impõem barreiras ao comércio de germoplasma para evitar a disseminação de patógenos.

De acordo com Hare (1985), alguns patógenos podem ser encontrados no sêmen em associação com células sanguíneas infectadas, aderidos à superfície dos espermatozoides ou mesmo livres no plasma seminal. O sêmen é composto por uma mistura de plasma seminal, espermatozoides maduros e imaturos, células não reprodutivas, debris não específicos e microorganismos (Jameel, 2008).

Em caprinos, Andrioli (2001), observou que reprodutores acometidos pela Artrite Encefalite Caprina (CAE), após sofrerem injúria testicular apresentaram um aumento de amostras de sêmen portando o DNA pró-viral, supostamente causado pelo maior fluxo de monócitos e macrófagos, por quem o vírus da CAE apresenta tropismo.

A CAE é uma enfermidade infecto-contagiosa crônica, que tem como agente etiológico um vírus pertencente à família *Retroviridae*, subfamília *Lentivirinae* e ao gênero *Lentivirus*, que segundo Souza et al. (2013), é transmitida pela inseminação artificial.

De acordo com Piccolomini (2010), diversas técnicas de lavagem do sêmen, como o gradiente descontínuo de Percoll® e o *swim-up* foram desenvolvidas com o intuito de separar os espermatozoides de alta mobilidade, além de reduzir contaminantes microbianos associados ao sêmen. Estes procedimentos consistem basicamente, na separação de espermatozoides que são retirados do plasma seminal e ressuspensos em meio de cultura próprio para gametas (Marti et al., 2006). Entretanto, o desenvolvimento dos procedimentos de lavagem podem reduzir a viabilidade ou motilidade espermática (Drobnis et al., 1991).

Baseados em estudos na área de reprodução humana assistida, os quais conseguiram promover a remoção eficaz e segura do vírus da imunodeficiência adquirida (HIV), que também pertencente ao gênero *Lentivirus*, após procedimentos de lavagem para ser utilizado em inseminação intra-uterina em casais sorodiscordantes (Semprini et al., 2007 e Queiroz et al., 2008), é que visando o mesmo objetivo, de

remoção do vírus de amostras seminais, novas pesquisas na área de reprodução animal, vem sendo desenvolvidas para preservar a genética de reprodutores caprinos, de alto valor zootécnico, acometidos pela CAE. Dentro desta realidade, os procedimentos de lavagem de sêmen associados a teste de biologia molecular altamente sensível para o diagnóstico do vírus da CAE, como a Reação em Cadeia de Polimerase (PCR) e a PCR precedida pela transcrição reversa (RT-PCR), podem apresentar um impacto significativo na prevenção da transmissão de enfermidades por via reprodutiva.

A técnica de lavagem de sêmen por *swim-up* é a mais antiga, simples, e de baixo custo (Jameel, 2008), no entanto, pouco se sabe sobre sua eficácia na remoção do vírus da Artrite Encefalite Caprina (CAEV). Desta forma, objetivou-se com o presente trabalho determinar a influência da técnica de *swim-up* sobre a viabilidade espermática e sua eficiência na remoção de partículas virais de amostras de sêmen de reprodutores caprinos portadores da Artrite Encefalite Caprina.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. LOCAL E PERÍODO EXPERIMENTAL

O experimento foi conduzido nos laboratórios de Andrologia e Tecnologia de sêmen e no laboratório de Virologia da Embrapa Caprinos e Ovinos, situada em Sobral, Ceará (latitude 3°45'0,5'' sul, longitude 40° 20'45,8'' oeste, 11 metros de altitude), nos meses de março a dezembro de 2012.

2.2. GRUPO EXPERIMENTAL

Foram selecionados cinco reprodutores caprinos, naturalmente infectados pelo CAEV, das raças Moxotó, Canindé e Anglo Nubiano com idade entre dois a sete anos, que foram doadores de alíquotas seminais. Para avaliação, pré-experimento, quanto a presença de anticorpos para o CAEV no sangue, foi feito o *Western Blot* (WB) segundo metodologia de Rodrigues et al. (2009) adaptada de Pinheiro (2001).

2.3. MANEJO ALIMENTAR

O manejo alimentar consistiu na oferta de feno de Leucena (*Leucaena Leucocephala*) e capim Elefante picado (*Pennisetum Purpureum schun*), sal mineral à vontade, concentrado 400g/animal/dia, uma vez ao dia e água *ad libitum*, além de acesso a área de pastejo.

2.4. COLETAS DE SÊMEN E AVALIAÇÃO ESPERMÁTICA ANTES DA TÉCNICA DE *SWIM-UP*

Os reprodutores foram submetidos, semanalmente, à coleta e avaliação qualitativa do sêmen, totalizando 67 ejaculados. Para as coletas de sêmen utilizava-se o método da vagina artificial (Mies Filho, 1962), tendo como manequim uma fêmea ovariectomizada, positiva para o CAEV, com estro induzido pela aplicação de 1,0mg de benzoato de estradiol.

Todos os materiais utilizados para coleta de sêmen (acopladores, copos coletores graduados e vagina artificial) foram mantidos em estufa a 37°C para evitar choque térmico dos espermatozoides em contato com os instrumentos.

Imediatamente após a coleta, o sêmen era encaminhado para o laboratório de biotecnologia de sêmen onde permanecia em banho maria a 37°C. Em seguida realizava-se verificação do volume, aspecto, concentração espermática e avaliação da motilidade individual progressiva (MIP) e do vigor espermático. Esses parâmetros foram observados através de uma gota de sêmen colocada entre lâmina e lamínula, com leitura feita em microscópio óptico, sobre placa aquecedora, com aumento de 400x.

O volume foi expresso em mililitro (mL), determinado em copo coletor graduado, já a concentração espermática ($\times 10^9$ espermatozoides/mL), foi realizada, após diluição de 50 μ L de sêmen em 5mL de citrato de sódio a 3%, sendo a leitura realizada em transmitância com o auxílio do espectrofotômetro com comprimento de onda de 535nm.

A classificação da MIP foi de acordo com a porcentagem de espermatozoides com movimento de progressão direcional, de forma retilínea, no campo do microscópio recebendo nota de 0 a 100%. Já o vigor foi avaliado conforme a velocidade que os espermatozoides se deslocavam no campo do microscópio, esses classificados numa escala de 0 a 5 pontos onde os valores mais elevados indicam sêmen de melhor qualidade (CBRA, 1997, Ax et al., 2004 e Aisen & Venturino, 2008).

2.5. DETECÇÃO DO DNA PRÓ-VIRAL EM AMOSTRAS DE SÊMEN ANTES DA TÉCNICA DE *SWIM-UP*

Com o intuito de verificar a eficiência do tratamento com a técnica *swim-up* para a remoção do CAEV, foi realizado um teste molecular para constatar a presença ou ausência do DNA pró-viral do CAEV nos 67 ejaculados a serem tratados. Para tanto, as amostras de sêmen foram submetidas ao teste molecular baseado na Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) em duas rodadas de amplificação (*Nested*).

2.5.1. EXTRAÇÃO DE DNA

As amostras de sêmen (100 μ L) foram previamente filtradas em coluna de Sephacryl S-400, para retirada das impurezas segundo Santurde et al. (1996).

Após a filtração 3 μ L das amostras foram transferidas para um tubo tipo eppendorf® e adicionado 200 μ L de solução de Chelex 100 a 5%, 2 μ L de proteinase K (10 μ g/ μ L) e 7 μ L de Dithiothreitol (DTT) 1M, sendo então incubadas em banho Maria a 56°C por 60 minutos. Em seguida as amostras foram submetidas ao vortex por 10 segundos, seguidas de banho de água fervente por 8 minutos, para desnaturação da Proteínase K, e agitados no vortex por 10 segundos. As amostras foram centrifugadas por três minutos a 13.000xg e acondicionadas em freezer -20°C até sua utilização na prova de amplificação, sendo que no momento do uso as amostras eram novamente centrifugadas, como descrito acima, e utilizado o sobrenadante.

2.5.2. AMPLIFICAÇÃO POR *NESTED* PCR

Para a amplificação do DNA foram utilizados dois pares de iniciadores derivados de sequências das regiões *gag* da amostra padrão CAEV-Cork (Saltarelli et al., 1990), sendo os iniciadores externos P1 (5' CAAGC AGCAGGAGGGAGAAGCTG-3', nucleotídeos 953 à 975) e P2 (5'TCCTACCCCC ATAATTTGATCCAC -3', nucleotídeos 1249 à 1226) descritos por Barlough et al. (1994) resultando na amplificação de um fragmento de DNA de 297pb, pois esse fragmento não é visualizado na eletroforese.

O produto desta amplificação foi então submetido a uma segunda rodada de amplificação com os iniciadores internos direcionados para o mesmo gene, P3 (5'GTTCCAGCAACTGCAAACAGTAGCAATG-3' nucleotídeos 997-1024) e P4 (5' ACCTTTCTGCTTCTTCATTTAATTTCCC 3' - nucleotídeos 1181 à 1154), resultando num fragmento final de 187pb (Rimstad et al., 1993).

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

As amostras amplificadas e os controles positivos e negativos, juntamente com o marcador de peso molecular (DNA ladder), foram submetidos à eletroforese em gel de agarose 1% em TBE (Tris, borato e EDTA 0,5X), corado com brometo de etídio adicionado ao gel (0,5 μ g/mL), conforme Andrioli et al. (2006). Cada amostra (10 μ L) juntamente com 2 μ L de tampão de corrida, foi submetida à eletroforese em cuba

horizontal, com TBE (0,5X), por 40 minutos (2A e 90 volts). A visualização das bandas de DNA foi realizada em transiluminador de luz ultravioleta e registrada fotograficamente.

2.6. TÉCNICA DE *SWIM-UP*

Para realização da técnica, 100 μ L de sêmen fresco foram colocados ao fundo de um tubo falcon® de 15mL, seguido da deposição lenta pela parede do tubo, de 2mL de meio de cultura para gametas, sp-TALP, e mantidos com inclinação de 45° à temperatura de 37°C, em estufa de CO₂ à 5% por 60 minutos (figura 1).

Após o tempo de incubação, 600 μ L do sobrenadante de cada amostra foi retirado e dividido em dois eppendorfs, sendo 300 μ L em cada. Em seguida, esses foram centrifugados a 200xg por 10 minutos à temperatura de 37°C (Batista, 2009, com modificações).

Após a centrifugação o sobrenadante foi descartado e o pélete espermático, formado após centrifugação, ressuspenso em 200 μ L de nova solução de sp-TALP, que também era mantida à temperatura de 37°C para evitar morte dos espermatozoides por choque térmico. Em seguida, uma gota da amostra, contendo os espermatozoides, foi submetida à avaliação da MIP e vigor espermáticos, como descritos anteriormente.

Cada amostra oriunda do *swim-up* teve que ser dividida em dois eppendorfs, pois ao fim do procedimento de lavagem seminal essas foram analisadas por duas técnicas moleculares, *Nested* PCR e *RT-nested* PCR, sendo um eppendorf destinado para cada um dos testes.



Fonte: Arquivo pessoal

Figura 1. Tubos contendo sêmen e sp. TALP inclinados a 45° em estufa de CO₂ (37°C).

2.7. DETECÇÃO DO CAEV EM AMOSTRAS DE SÊMEN APÓS A TÉCNICA DE SWIM-UP

Para o diagnóstico do material genético do vírus, presente nas amostras oriundas da técnica de *swim-up*, foram realizadas duas técnicas moleculares baseadas na Reação em Cadeia da Polimerase em duas rodadas de amplificação (*Nested PCR*) e *RT-nested PCR* que é precedida pela transcrição reversa, permitindo assim, a detecção do DNA pró-viral e RNA genômico livre, respectivamente, portanto, sendo utilizada até nos casos de diagnóstico precoce do vírus (Sider et al., 2010).

Os dois eppendorf contendo a amostra seminal de cada animal, oriundos do *swim-up*, tiveram que ser previamente submetidos à extração de DNA e RNA, sendo que antes da extração propriamente dita esses foram centrifugados a 13.000 xg a fim de formar péletes espermáticos, para remover completamente o meio de cultura sp-TALP em que se encontravam.

Em seguida, as amostras foram ressuspendidas em 200µL de PBS 1X estéril e novamente centrifugadas a 13.000 xg, a 4°C, por 10 minutos. Este procedimento de lavagem foi repetido até a obtenção de um pélete pequeno e transparente, sendo ao final novamente ressuspendido em 200µL de PBS 1X.

2.7.1. EXTRAÇÃO DE DNA

Para extração do DNA 3µL da amostra foram adicionadas a uma solução de 200µL de Chelex 100 a 5%, além de 2µL de proteinase K (10 mg/mL) e 7µL de Dithiothreitol (DTT) 1M, sendo em seguida homogeneizadas gentilmente e incubadas à 56°C por 60 minutos.

Em seguida as amostras foram agitadas no vortex por 10 segundos e colocadas em banho de água fervente por 8 minutos, para desnaturação da Proteinase K, e agitadas no vortex por 10 segundos. As amostras foram novamente centrifugadas por três minutos a 13.000 xg. Por fim acondicionadas em freezer -20°C até sua utilização na prova de amplificação, sendo que no momento do uso as amostras eram novamente centrifugadas, por três minutos a 13.000 xg, e utilizado o sobrenadante.

2.7.2. EXTRAÇÃO DE RNA

O protocolo do fabricante do kit baseado em coluna de sílica (NucleoSpin® RNA II -Marcherey-Nagel) foi adaptado ao procedimento de extração de RNA das amostras de sêmen e aplicados aquelas oriundas do procedimento de *swim-up* (Sider et al., 2010). As extrações de RNA foram feitas a partir de 200µL de cada amostra já ressuspensa em PBS 1X.

Ao tubo contendo os 200µL de amostra, adicionou-se 350µl de tampão RA1 (fornecido no kit de extração) acrescido de 3,5µL de mercapto etanol (ME). Em seguida foram incubadas a 60°C por 30 minutos em banho Maria. Este procedimento constitui o primeiro passo do processo de extração do RNA, como descrito pelo manual do fabricante mencionado anteriormente.

A partir do RNA totalmente extraído foi sintetizado o DNA complementar (cDNA) com o kit Improm II™ Reverse Transcription System (Promega) segundo as instruções do fabricante.

2.7.3. AMPLIFICAÇÃO POR NESTED PCR

As amostras oriundas do processamento de extração de DNA e RNA foram submetidas à reação de amplificação por *Nested PCR*, realizada conforme descrito anteriormente à avaliação do DNA pró-viral antes do *swim-up*.

2.8. DELINEAMENTO EXPERIMENTAL E ANÁLISE ESTATÍSTICA

Para comparação dos resultados obtidos para os valores de MIP e vigor espermáticos antes e depois da técnica de *swim-up* os dados foram submetidos ao teste de Wilcoxon, a fim de verificar se houve ou não alteração dos parâmetros espermáticos, considerando o nível de significância de 5%. O software estatístico utilizado para as análises foi o SAS 9.2.

Já para comparar os dados referentes à presença ou ausência do vírus antes e depois a técnica de *swim-up*, foi utilizado o teste de Fisher com o nível de significância adotado de 5%.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Das 67 amostras avaliadas por *Nested* PCR antes do *swim-up* (Tabela 1), 47 (70,15%) foram positivas para o DNA pró-viral (Figura 2). Além disso, observou-se que quatro amostras, adicionais negativas ao PCRn, foram positivas ao RT-*nested* PCR após o *swim-up*, o que permite dizer que no mínimo 76,12% (51/67) delas estavam infectadas pelo CAEV. Esses resultados estão acima dos relatados por Andrioli et al. (2006) e Paula et al. (2009), que também detectaram a presença de partículas virais no sêmen *in natura* de reprodutores caprinos infectados pelo CAEV, em 35,7% e 10,98% das amostras avaliadas, respectivamente.

Em 23,88% (16/67) das amostras de sêmen não foi detectado a presença do material genético do CAEV, embora os animais fossem positivos no soro por WB, o que indica que a frequência de eliminação de células infectadas no sêmen pode ter caráter intermitente, uma vez que todos os animais apresentaram pelo menos uma amostra negativa e outra positiva para a presença do vírus (Tabela1), o que também foi observado por outros autores (Andrioli et al., 2006; Paula et al., 2009 e Cruz, 2009), todavia, não se descarta a possibilidade da presença do vírus em sua forma livre, uma vez que a técnica utilizada pré *swim-up*, PCRn, detectava apenas a presença de DNA pró-viral. O genoma do CAEV é constituído por RNA, que uma vez introduzido na célula, é integrado ao genoma do hospedeiro na forma de DNA pró-viral (Sider et al., 2010).

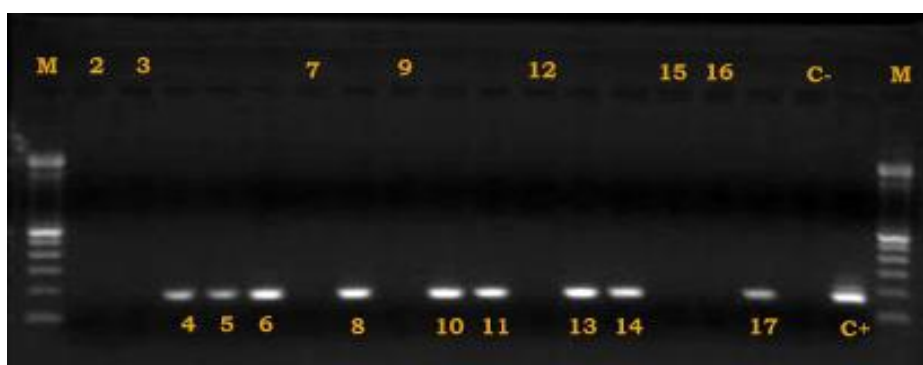


Figura 2 - Gel de agarose a 1% corado com brometo de etídio. Amplificação do DNA pró-viral de amostras de sêmen de caprinos infectados com o CAEV antes do *swim-up*. **M**: marcador de peso molecular, DNA ladder; **canaletas 2, 3, 7, 9, 12, 15 e 16**: amostras negativas; **canaletas 4, 5, 6, 8, 10, 11, 13, 14 e 17**: amostras positivas; **C-**: controle negativo; **C+**: controle positivo (187pb); **M**: marcador de peso molecular, DNA ladder.

Segundo Andrioli et al. (2006), a frequência de aparecimento do CAEV no sêmen pode ser mais elevada em animais que sofreram algum trauma testicular, o que desencadearia um maior fluxo de células inflamatórias, consequentemente do sistema monocítico-fagocitário, para o trato genital. Além disso Peterson et al. (2008), constataram a presença de DNA pró-viral em amostras teciduais oriundas dos testículos, epidídimo e glândulas sexuais acessórias, indicando que vários órgãos sexuais masculinos podem contribuir diretamente para o derramamento do CAEV no ejaculado caprino.

Gupta et al. (2000), ao avaliarem o perfil de eliminação viral no sêmen de pacientes portadores do HIV, também observaram um caráter intermitente de eliminação que poderia estar relacionado com uma variedade de reservatórios possíveis existentes no tecido reprodutivo masculino. Segundo Kim et al. (1999), os principais reservatórios virais no sêmen de portadores do HIV são o plasma seminal, os leucócitos e as células epiteliais.

Outro fator que pode ter contribuído com o grande número de amostras infectadas seria o estresse térmico durante a estação reprodutiva, pois o período do experimento segundo o Instituto Nacional de Meteorologia (INMET, 2012), correspondeu a uma época chuvosa de pouca precipitação pluviométrica, média de 37,44 mL no ano, precedida de época seca de altas temperaturas, média de 35,6°C no ano, indicando que os animais podem ter sofrido estresse térmico. De acordo com Peterson et al. (2008) e Paula et al. (2009), o estresse pode reativar a multiplicação viral e subsequente excreção.

A associação de duas técnicas moleculares, *Nested* PCR e *RT-nested* PCR, permitiu constatar que após a aplicação da técnica de *swim-up* houve uma redução significativa ($\chi^2= 9,078$; $p < 0,001$), na presença do CAEV nas amostras seminais, onde 28 de 51 (54,90%) amostras positivas resultaram livres do vírus (Figura 3). Porém, esses achados foram inferiores aos encontrados por Ricarte et al. (2010), que não detectaram, por meio de imunohistoquímica amostras de sêmen positivas para o CAEV após teste de *swim-up* de animais naturalmente infectados. No entanto, no mesmo trabalho os autores observaram uma amostra positiva após o *swim-up* de animais experimentalmente infectados pelo CAEV. Os resultados encontrados pelos autores podem ter sido influenciados pelo baixo número de amostras positivas, para o CAEV, antes de serem submetidas à técnica de *swim-up*.

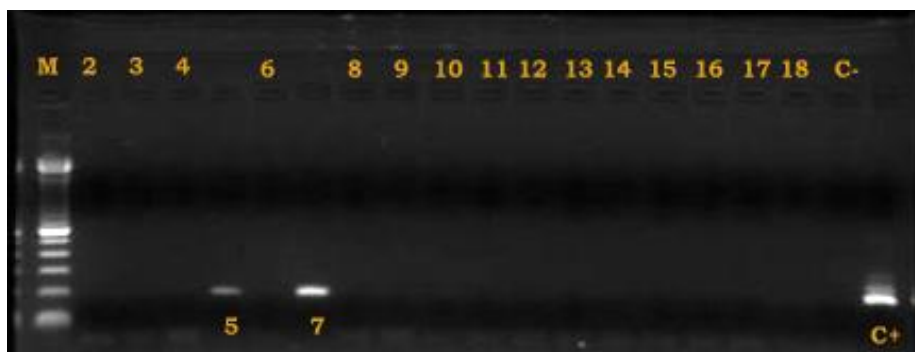


Figura 3 - Gel de agarose a 1% corado com brometo de etídio. Amplificação do DNA pró-viral de amostras de sêmen de caprinos infectados com o CAEV após o *swim-up*. **M**: marcador molecular, DNA ladder; **canaletas 2, 3, 4, 6 e 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17 e 18**: amostras negativas; **canaletas 5 e 7**: amostras positivas; **C-**: controle negativo; **C+**: controle positivo (187pb).

Há vários métodos de separação dos espermatozoides do plasma seminal como o *swim-up*, a centrifugação com gradientes de densidade, coluna de lã de vidro, dentre outros. Em humanos, sorodiscordantes para o vírus do HIV, os procedimentos de lavagem seminal sucessivos tem por objetivo eliminar o vírus contido no sêmen, para ser utilizado em programas de reprodução assistida, visando a não infecção da mãe e consequentemente da criança (Dalapria & Ximenes Neto, 2004). Bujan et al. (2007), estudando a probabilidade de contaminação da receptora, após lavagem de sêmen, verificaram que essa foi igual à zero.

Embora os programas voltados para a área de reprodução humana tenham obtido sucesso nos protocolos de lavagem para remoção do vírus do HIV (Queiroz et al., 2008), em caprinos esses procedimentos ainda precisam ser otimizados. Andrioli et al. (2006), ao comparar amostras de sêmen antes e após procedimento de lavagem seminal, observaram que 35,7% das amostras não lavadas eram positivas e após lavagem notaram que houve diminuição, não significativa, das amostras positivas para 7,1%. Os mesmos autores observaram que após causar injúria testicular a porcentagem de amostras positivas submetidas à lavagem seminal diminuiu, significativamente, de 71,4% para 28,6%. Ferraz (2009), também observou uma redução na quantidade de amostras que se mantiveram positivas para o vírus após lavagem. Essas informações estão em consonância com os achados da presente pesquisa.

Os procedimentos de avaliação quanto à presença do vírus, foram realizados por dois testes moleculares, *Nested PCR* e *RT-nested PCR*, que permitiram verificar a

influência do *swim-up* sobre a remoção tanto de células infectadas na forma de DNA pró-viral, quanto no RNA genômico livre, respectivamente.

Quando avaliada individualmente o resultado da *Nested* PCR esse demonstrou que o procedimento conseguiu remover, significativamente ($\chi^2= 0,1965$; $p<0,002$), grande parte das células infectadas, uma vez que 30 amostras, de um total de 47 (63,83%) positivas para a presença de DNA pró-viral, obtiveram resultado negativo após lavagem espermática. O grande número de amostras negativas provavelmente está relacionado com a concentração das células não espermáticas, infectadas pelo CAEV, ao fundo do tubo em que foram incubadas. Segundo Marti et al. (2006) e Jameel (2008), o procedimento de *swim-up* é baseado no movimento dos espermatozoides que migram para um meio de cultura sobreposto ao sêmen, deixando para trás espermatozoides imaturos, aqueles sem velocidade de progressão direcional, além de células não reprodutivas e redução de agentes microbianos.

Hanabusa et al. (2000), ao avaliarem duas etapas do procedimento de lavagem espermática, centrifugação em gradiente de Percoll e *swim-up*, visando a eliminação do RNA e DNA pró-viral do HIV, observaram que a centrifugação em gradiente de Percoll deixou detectáveis a presença de RNA e DNA pró-viral do HIV em uma das 12 amostras (8%) de pacientes com infecção. Já após a utilização do procedimento de migração ascendente, esses foram diminuídos para níveis não detectáveis. Portanto, o *swim-up* serve como complemento para eliminação do vírus existente nas amostras de sêmen.

Já avaliando os resultados da RT-*nested* PCR, foi possível constatar que nove amostras ainda continham o vírus em sua forma livre, sendo que quatro dessas eram negativas quanto à presença de DNA pró-viral antes do *swim-up* (Tabela 1). Esses resultados sugerem que amostras seminais negativas, para a presença de células infectadas, podem não estar livres da presença do vírus. Portanto, caracterizam um risco na disseminação da enfermidade se utilizadas. Desta forma, conclui-se que o procedimento de lavagem não foi suficiente para promover a desinfecção completa das amostras.

Pode-se suspeitar de degradação do RNA extraído das amostras seminais uma vez que a água utilizada para preparar as soluções não foi previamente tratada com Dietil pirocarbonato (DEPC) que é o inibidor de RNAase. Esse fato pode ter contribuído para a grande negatividade diagnóstica encontrada, já que é possível a degradação do material genético do vírus tornando-o indetectável e inviável.

Estudos realizados com homens portadores do vírus HIV tem demonstrado que a retirada do plasma seminal por gradiente de densidade, antes do *swim-up*, permite a eliminação de partículas virais do sêmen, porém não separa os espermatozoides dos outros tipos celulares (Oliveira et al., 2012). Além disso, a associação de pelo menos duas técnicas de processamento seminal e o uso de terapia antiretroviral potente apresentam excelentes resultados na eliminação das fontes ativas de transmissão do vírus e obtenção de gametas seguros (Queiroz et al., 2008). Essas informações estão de acordo com Canto et al. (2006), que não detectaram em nenhuma das frações seminais analisadas, após associação das mesmas técnicas descritas anteriormente para o processamento seminal, o RNA do HIV.

Em relação à técnica de *swim-up* não ter alcançado 100% de desinfecção almejada, se deve provavelmente a utilização de apenas uma técnica de processamento seminal, além da falta de tratamento dos reprodutores com drogas antivirais para reduzir a carga viral. Todavia, devido ao risco comprovado de infecção por inseminação artificial (Souza et al., 2013), faz-se necessário um controle rigoroso nas centrais de comercialização de germoplasma, por meio da utilização de testes moleculares de alta sensibilidade.

Em relação à média dos parâmetros espermáticos verificados pré *swim-up*, tais como volume seminal (0,89mL), concentração espermática ($3,97 \times 10^9$ sptz/mL), MIP (86,42%) e vigor (4,16) foram considerados normais e de boa qualidade para a espécie caprina (CBRA, 1997 e Aisen & Venturino, 2008). Essas informações corroboram com os achados de Rodríguez et al. (2005), onde observaram que reprodutores caprinos portadores do CAEV, não tiveram sua qualidade seminal afetada pela enfermidade.

Para a escolha das variáveis avaliadas após *swim-up* optou-se pela MIP e o vigor espermático, já que o movimento dos espermatozoides de acordo com Sozńska et al. (2005), representa uma das características mais importantes associadas ao potencial de fertilização de uma amostra seminal. Uma vez que Correa et al. (1997), encontraram relação de 0,59 entre fertilidade e morfologia espermática e Olds-Clarke (1996), reportou uma clara associação entre a ausência de movimento e os quadros de infertilidade.

Tabela 1. Resultados do diagnóstico por *Nested* PCR e *RT-nested* PCR em amostras de sêmen de reprodutores caprinos soropositivos para o CAEV

Animal / amostra	Detecção do CAEV em amostras de sêmen (n=67) de reprodutores positivos por WB		
	PCRn antes do swim-up	PCRn após swim-up	RT-nested PCR após swim-up
1 / 1	positivo	positivo	positivo
1 / 2	negativo	negativo	negativo
1 / 3	negativo	negativo	negativo
1 / 4	positivo	negativo	negativo
1 / 5	negativo	negativo	negativo
1 / 6	positivo	negativo	negativo
1 / 7	negativo	negativo	negativo
1 / 8	positivo	negativo	negativo
1 / 9	positivo	positivo	negativo
1 / 10	negativo	negativo	negativo
1 / 11	positivo	positivo	negativo
1 / 12	negativo	negativo	positivo
2 / 1	positivo	positivo	negativo
2 / 2	positivo	negativo	positivo
2 / 3	negativo	negativo	positivo
2 / 4	positivo	positivo	negativo
2 / 5	positivo	negativo	negativo
2 / 6	positivo	negativo	negativo
2 / 7	negativo	negativo	negativo
2 / 8	positivo	negativo	negativo
2 / 9	negativo	negativo	negativo
2 / 10	positivo	negativo	negativo
2 / 11	positivo	negativo	negativo
2 / 12	positivo	positivo	negativo
2 / 13	positivo	negativo	negativo
2 / 14	positivo	positivo	negativo
3 / 1	positivo	positivo	negativo
3 / 2	negativo	negativo	negativo
3 / 3	positivo	positivo	negativo
3 / 4	positivo	negativo	negativo
3 / 5	positivo	negativo	negativo
3 / 6	negativo	negativo	negativo
3 / 7	negativo	negativo	negativo
3 / 8	positivo	negativo	negativo
3 / 9	positivo	negativo	negativo
3 / 10	positivo	negativo	negativo
3 / 11	positivo	positivo	negativo
3 / 12	positivo	negativo	negativo
3 / 13	positivo	positivo	negativo
3 / 14	positivo	negativo	negativo
4 / 1	positivo	positivo	negativo
4 / 2	negativo	negativo	positivo
4 / 3	positivo	negativo	negativo
4 / 4	positivo	negativo	negativo
4 / 5	negativo	negativo	positivo
4 / 6	positivo	negativo	negativo
4 / 7	positivo	negativo	negativo
4 / 8	positivo	negativo	negativo
4 / 9	positivo	negativo	positivo
4 / 10	positivo	negativo	negativo
4 / 11	positivo	negativo	negativo
4 / 12	positivo	positivo	negativo
4 / 13	positivo	positivo	negativo
4 / 14	positivo	positivo	positivo
5 / 1	negativo	negativo	negativo
5 / 2	positivo	negativo	negativo
5 / 3	positivo	positivo	negativo
5 / 4	positivo	positivo	positivo
5 / 5	positivo	negativo	negativo
5 / 6	negativo	negativo	negativo
5 / 7	positivo	negativo	negativo
5 / 8	negativo	negativo	negativo
5 / 9	negativo	negativo	negativo
5 / 10	negativo	negativo	negativo
5 / 11	positivo	negativo	negativo
5 / 12	negativo	negativo	negativo
5 / 13	positivo	negativo	negativo

De acordo com Siqueira et al. (2007), a motilidade espermática e a velocidade com que se deslocam, são fundamentais para que os espermatozoides alcancem o ambiente uterino e o local de fertilização. Além do que, são os critérios mais usados na avaliação de sêmen antes e depois do processamento em laboratório.

A análise das respostas obtidas, antes e depois da técnica de *swim-up*, sobre a MIP e o vigor espermático no sêmen caprino (Tabela 2), revelou que houve uma diminuição, significativa na média das variáveis estudadas, MIP e vigor. Esses resultados foram semelhantes aos relatados por Jameel (2008), que obteve valores médios, após *swim-up*, para a MIP de 72% e vigor de 3,7. Entretanto, valores superiores foram encontrados por Ng et al. (1992), que obtiveram uma recuperação de espermatozoides com motilidade média 89% .

Tabela 2. Movimento individual progressivo (MIP) e vigor de espermatozoides antes e depois da técnica de *swim-up*

Características seminais	Amostras seminais analisadas (n=67)		
	Antes da técnica de <i>swim-up</i>	Após a técnica de <i>swim-up</i>	Valor da diferença obtida
MIP % (0-100)	86,42	71,49**	-14,93
Vigor (0-5)	4,16	3,93*	-0,24

*Valores marcados com apenas um asterisco diferem estatisticamente ($P < 0,05$), antes e depois da técnica de *swim-up*, pelo teste de Wilcoxon,

**Valores marcados com dois asteriscos diferem estatisticamente ($P < 0,001$) antes e depois da técnica de *swim-up*, pelo teste de Wilcoxon.

A diminuição observada para esses parâmetros, provavelmente, estaria relacionada com o procedimento de centrifugação as quais as amostras foram submetidas. Além do que segundo Correa et al., (1997), o estresse relacionado ao tempo necessário para recuperação dos espermatozoides também pode contribuir para a elevada taxa de mortalidade e perda de capacitação dos mesmos.

Apesar da diminuição significativa encontrada nesse estudo, os valores obtidos ainda são satisfatórios e compatíveis para utilização em inseminação intra-uterina e fertilização *in vitro*, demonstrando que o método *swim-up* é confiável para a recuperação de espermatozoides viáveis. Além do que, diversos autores relatam que a técnica de *swim-up*, promove a recuperação e seleção dos melhores espermatozoides, já que apenas os mais capacitados se movimentam para a parte superior do tubo (Ng et al., 1992; Jameel, 2008).

Segundo Arruda et al (2011), a motilidade e vigor espermático são estimados de forma subjetiva e utilizados rotineiramente em laboratórios. No entanto, continuam tendo grande valor, principalmente para diferenciar sêmen de baixa e alta qualidade (Matos et al., 2008).

4. CONCLUSÃO

Baseado nos resultados obtidos podemos concluir que:

- A eliminação do CAEV no sêmen possui caráter intermitente.
- A associação da *Nested* PCR e da RT-*nested* PCR é uma opção mais segura para a certificação sanitária das partidas seminais quanto à presença ou ausência do CAEV, pois amostras negativas quanto à presença de DNA pró-viral podem conter o vírus em sua forma livre, RNA viral.
- A técnica de *swim-up* reduz a infectividade do sêmen de reprodutores portadores do CAEV e permite a obtenção de espermatozoides viáveis.

5. PERSPECTIVAS

Espera-se, com esse trabalho, que novas pesquisas sejam realizadas, para obter índices satisfatórios de desinfecção das partidas seminais positivas para o CAEV, tanto em sua forma livre (RNA) quanto DNA pró-viral.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AISEN, E.G.; VENTURINO, A. Coleta e avaliação do sêmen. In: AISEN, E.G. (Ed.). **Reprodução ovina e caprina**. 1.ed. São Paulo: Medvet, 2008. p.57-73.
- ANDRIOLI, A. **Vírus da artrite encefalite caprina: PCR e isolamento em amostras de sêmen, fluido uterino e embriões**. 2001. 68 f. Tese (Doutorado em Ciência Animal) – Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte. 2001.
- ANDRIOLI, A.; GOUVEIA, A.M.G.; MARTINS, A.S.; PINHEIRO, R.R.; SANTOS, D.O. Fatores de risco na transmissão do lentivírus caprino pelo sêmen. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.41, n.8, p.1313 - 1319, 2006.
- ARRUDA, R.P.; CELEGHINI, E.C.C.; ALONSO, M.A.; CARVALHO, H.F.; OLIVEIRA, L.Z.; NASCIMENTO, J.; SILVA, D.F.; AFFONSO, F.J.; LEMES, K.M.; JAIMES, J.D. Métodos de avaliação da morfologia e função espermática: momento atual e desafios futuros. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v.35, n.2, p.145-151, 2011.
- AX, R.L.; DALLY, B.A.; DIDION, R.W.; LENZ, C.C.; LOVE, D.D.; VARNER, B.; HAFEZ, M.; BELLIN, E. Avaliação do sêmen. In: HAFEZ, B.; HAFEZ, E.S.E. (Ed.). **Reprodução Animal**. 7.ed. Kiawah Island: Manole, 2004. p.369 -379.
- BARLOUGH, J.; EAST, N.; ROWE, J.D. Double-nested polymerase chain reaction for detection of caprine arthritis-encephalitis virus proviral DNA in blood, milk and tissues of infected goats. **Journal of Virology Methods**, v.50, p.101-114, 1994.
- BATISTA, A.M. **Influência das técnicas de seleção *Swim-up* e gradiente de densidade (Percoll® e CapriPure®) na viabilidade espermática de amostras criopreservadas de sêmen caprino**. 2009. 54f. Dissertação (Mestrado em Ciência Veterinária) - Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife, 2009.
- BUJAN, L.; HOLLANDER, L.; COUDERT, M.; GILLING-SMITH, C.; VUCETICH, A.; GUIBERT, J.; VERNAZZA, P.; OHL, J.; WEIGEL, M.; ENGLERT, Y.; SEMPRINI, A.E. Safety and efficacy of sperm washing in HIV-1-serodiscordant couples where the male is infected: results from the European CREAThE network. **AIDS**, v.21, n.14, p.1909-1914, 2007.
- COLÉGIO BRASILEIRO DE REPRODUÇÃO ANIMAL – CBRA. **Manual para exame andrológico e avaliação de sêmen animal**. 2.ed. Belo Horizonte, MG, 1997. 35p.

- CANTO, C.L.M.; SEGURADO, A.C.; PANNUTI, C.; CEDENHO, A.; SROUGI, M.; SPAINE, D.; FERNANDES, S.; CARRETIERO, N.; BERNAL, M.C.; LEVI, J.E. Detection of HIV and HCV RNA in semen from Brazilian coinfecting men using multiplex PCR before and after semen washing. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v.48, n.4, p 201-206, 2006.
- CORREA, J.R.; PACE, M.M.; ZAVOS, P.M. Relationships among frozen-thawed sperm characteristics assessed via the routine semen analysis, sperm functional tests and fertility of bulls in an artificial insemination program. **Theriogenology**, v.48, p.721-731, 1997.
- CRUZ, J.C.M. **Monitoramento sorológico e da presença do DNA pró-viral do lentivírus caprino (CAEV) no sangue e sêmen de reprodutores infectados**. 2009. 35f. Tese (Doutorado em Ciência Animal). Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte. 2009.
- DALAPRIA, T.R.; XIMENES NETO, F.R.G. Práticas sexuais e escolhas reprodutivas de casais sorodiferente para o HIV. **DST – Jornal brasileiro de Doenças Sexualmente Transmissíveis**, v.16, n.4, p.19-26, 2004.
- DROBNIS, E.; ZHONG, C.; OVERSTREET, J. Separation of cryopreserved human sperm using Sephadex columns, washing, or Percoll gradients. **Journal of Andrology**, v. 12, n.3, p.201–208, 1991.
- FERRAZ, R.E.O. **Deteção do vírus da Artrite Encefalite Caprina em sêmen tratado de reprodutores soropositivos**. 2009. 72f. (Mestrado em Ciências Veterinárias). Universidade Estadual do Ceará, Fortaleza. 2009.
- GUPTA, P.; C. LEROUX; B. K. PATTERSON; L. KINGSLEY; C. RINALDO; M. DING; Y. CHEN; K. KULKA; W. BUCHANAN; B. MCKEON; R. MONTELARO. Human immunodeficiency virus type 1 shedding pattern in semen correlates with the compartmentalization of viral Quasi species between blood and semen. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 182, n. 1, p. 79-87, 2000.
- HANABUSA, H.; KUJI, N.; KATO, S.; TAGAMI, H.; KANEKO, S.; TANAKA, H.; YOSHIMURA, Y. An evaluation of semen processing methods for eliminating HIV-1. **AIDS**, v.14, n.11, p.1611-1616, 2000.
- HARE, W.C.D. Diseases transmissible by semen and embryo transfer techniques. **OIE Technical Bulletin**, v. 4, p.1–117, 1985.

INSTITUTO NACIONAL DE METEOROLOGIA – INMET. **Monitoramento climático.** Disponível em: <WWW.inmet.gov.br/portal/index.php?r=bdmep/bdmep>. Acessado em: 27 març. 2013.

JAMEEL, T. Sperm swim-up: a simple and effective technique of semen processing for intrauterine insemination. **Journal of the Pakistan Medical Association**, v.58, n.2, p. 71-74, 2008.

KIM, L.U.; JOHNSON, M.R.; BARTON, S.; NELSON, M.R.; SONTAG, G.; Smith, J. R.; Gotch, F.M.; GILMOUR, J.W. Evaluation of sperm washing as a potential method of reducing HIV transmission in HIV-discordant couples wishing to have children. **AIDS**, v.13, n.6, 1999.

MARTÍ, E.; PÉREZ-PÉ, R.; MUIÑO-BLANCO, T.; CEBRIÁN-PÉREZ J.A. Comparative study of four different sperm washing methods using apoptotic markers in ram spermatozoa. **Journal of Andrology**, v.27, n.6, p.746-753, 2006.

MATOS, D.L.; ARAÚJO, A.A.; ROBERTO, I.G.; TONIOLLI, R. Análise computadorizada de espermatozoides: revisão de literatura. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v.32, p.225-232, 2008.

MIES FILHO, A. Novo modelo de vagina artificial para ovinos. **Revista da Faculdade de Agronomia do Rio Grande do Sul**, v.5, p.187-193, 1962.

NG, F.L.; LIU, D.Y.; BAKER, H.W. Comparison of Percoll, mini-Percoll and swim-up methods for sperm preparation from abnormal semen samples. **Human Reproduction**, v.7, n.2, p-261-266, 1992.

OLIVEIRA, M.R.A.; PATRÍCIO, D.O.; SILVA, A.B.C.; SANTOS, KJ.M. Utilização das Técnicas de Reprodução Assistida em Casais Sorodiscordantes para a Obtenção de Gametas Seguros. **NewsLab**, v.114, p.130-138, 2012.

OLDS-CLARKE, P. How does poor motility alter sperm fertilizing ability? **Journal of Andrology**, v.17, n.3, p.183-186, 1996.

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, p. 27-33, 2009.

- 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.
- PICCOLOMINI, M.M. **Alterações na morfologia e na viabilidade no desenvolvimento de embriões bovinos fecundados in vitro com sêmen exposto experimentalmente à *Escherichia coli* produtora da toxina Shiga Stx2 (STEC)**. 2010. 57f. Dissertação (Mestrado em Sanidade, Segurança Alimentar e Ambiental no Agronegócio). Instituto biológico - Agência Paulista de Tecnologia dos Agronegócios, São Paulo, 2010.
- PINHEIRO, R. R. **Vírus da Artrite-Encefalite Caprina: Desenvolvimento e padronização de ensaios imunoenzimáticos (ELISA e Dot-blot) e estudo epidemiológico no Estado do Ceará**. 2001. 115f. Tese (Doutorado em Ciência Animal). Escola de Veterinária – Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2001.
- QUEIROZ, P.; TANIL, C.T.; MADASCHI, C.; LOPES, D.R.; JUNIOR, A.I.; PASCOALOTTO, F.F.; JUNIOR, E.B. Obtenção de gametas seguros por meio de associação de técnicas de processamento seminal para casais sorodiscordantes para HIV. **Revista Brasileira de Ginecologia e Obstetrícia**, v.30, n.4, p.171-176 2008.
- RICARTE, A.R.F.; ANDRIOLI, A.; PINHEIRO, R.R.; BÁO, S.N.; SILVA, J.S.; BRAZ, S.V.; NAME, K.P.O.; LIMA-VERDE, I.L.; BRITO, I.F.; DIAS, R.P.; FREITAS AGUIAR, T.D.; DANTAS, T.V.M.; ARAÚJO, S.A.C.; CAVALCANTI, D.M.L.P.; PAULA, N.R.O.; TEIXEIRA, M.F.S. Avaliação imunohistoquímica e ultraestrutural de gametas e embriões caprinos infectados com o CAEV. **Arquivo do Instituto Biológico**, v.77, n.2, p.217-223, 2010.
- RIMSTAD, E.; EAST, N.E.; TORTEN, M. Delayed seroconversion following naturally acquired Caprine Arthritis-Encephalitis virus using recombinant gag proteins. **American Journal Veterinary Research**, v.54, n.11, p.1858-1862, 1993.
- RODRIGUEZ, H.A.M.; ÁLVAREZ, H.R.; PÉREZ, J.T.; CRESPO, J.A.M.; FARIÑA, G.I.G.; MARTINEZ, H.A.R. Efecto del virus de Artritis Encefalitis Caprina en el aparato reproductor de machos caprinos. **Veterinaria México**, v.36, n.2, p.159-176, 2005.
- RODRIGUES, A.S.; SANTOS, V.W.S.; BRITO, R.L.L.; DIAS, R.P.; BRITO, I.F.; ANDRIOLI, A.; PINHEIRO, R.R. Comparação de dois testes sorológicos na evolução natural de caprinos leiteiros com o vírus da Artrite-Encefalite Caprina - dados preliminares. In: SINCORTE, 4, João Pessoa. **Anais...** Paraíba: Sociedade brasileira de zootecnia, [2009]. (CD-ROM).

SALTARELLI, M.; QUERAT, G.; KONINGS, D.A.M. Nucleotide sequence and transcription analysis of molecular clones of CAEV which generate infectious virus. **Virology**, v.179, n.1, p.347-364, 1990.

SANTURDE, G.; DA SILVA, N.; VILLARES, R.; TABARES, E.; SOLANA, A.; BAUTISTA, J.M.; CASTRO, JM. Rapid and high sensitivity test for direct detection of bovine herpesvirus-1 genome in clinical samples. **Veterinary Microbiology**, v.49, n.1, p.81-92, 1996.

SAS 9.2: STATISTICAL ANALYSIS SYSTEMS - SAS Institute Inc. 2009. SAS OnlineDoc. 9.2. Cary, NC: SAS Institute Inc.

SEMPRINI, A.E.; BUJAN, L.; ENGLERT, Y.; SMITH, G.; GUIBERT, J.; HOLLANDER, L.; OHL, J.; VERNAZZA, P. Establishing the safety profile of sperm washing followed by ART for the treatment of HIV discordant couples wishing to conceive. **Human Reproduction**, v.22, n.10, p. 2793 - 27934, 2007.

SIDER, L.H.; OLIVEIRA, A.N.; VERAS, A.K.A.; KADRI, S.M.; FRANCO, M.M.; PINHEIRO, R.R.; ANDRIOLI, A. **Processamento de sêmen para extração de RNA genômico do vírus da artrite-encefalite caprina e diagnóstico molecular por RT-nested PCR**. Sobral: Embrapa Caprinos e Ovinos, 2010, 4p. (Embrapa Caprinos e Ovinos. Comunicado técnico, 113).

SIQUEIRA, J.B.; GUIMARÃES, J.D.; COSTA, E.P.; HENRY, M.; TORRES, C.A.A.; SILVA, M.V.G.B.; SILVEIRA, T.S. relação da taxa de gestação com sêmen bovino congelado e testes de avaliação espermática *in vitro*. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.36, n.2, p.387-395, 2007.

SOUZA, K.C.; PINHEIRO, R.R.; SANTOS, D.O.; BRITO, R.L.L.; RODRIGUES, A.S.; SIDER, L.H.; PAULA, N.R.O.; ÁVILA, A.A.; CARDOSO, J.F.S.; ANDRIOLI, A. Transmission of the Caprine Arthritis–Encephalitis virus through artificial insemination. **Small Ruminant Research**, v.109, p.193–198, 2013.

SOZÁNSKA, A.; KOLWAS, K.; GALAS, J.; BLOCKI, N.; CZYZEWSKI, A. Simple optical method of qualitative assessment of sperm motility: preliminary results. **American Association of Equine Practitioners Proceedings**, v.59, p.176-184, 2005.