

PAULA MARIA PIRES DO NASCIMENTO PENIDO

**VÍRUS DA ARTRITE ENCEFALITE CAPRINA (CAEV) NO TRATO
REPRODUTIVO DE CABRAS NATURALMENTE INFECTADAS E RISCO DE
TRANSMISSÃO PELA TRANSFERÊNCIA DE EMBRIÕES**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal da Escola de Veterinária da Universidade Federal de Minas Gerais na área de Medicina Veterinária Preventiva, como requisito parcial para obtenção do grau de Doutor em Ciência Animal.

Orientador: Prof. Dr. Rômulo Cerqueira Leite
Co-orientador: Dr. Jeferson Ferreira da Fonseca
Co-orientador: Prof. Dr. Marcos Bryan Heinneman

Belo Horizonte
2015

Nascimento-Penido, Paula Maria Pires do, 1980-
N244v Vírus da artrite encefalite caprina (CAEV) no trato reprodutivo de cabras naturalmente infectadas e risco de transmissão pela transferência de embriões / Paula Maria Pires do Nascimento Penido. – 2015 .
112 p. : il.
Orientador: Rômulo Cerqueira Leite
Co-orientadores: Jeferson Ferreira da Fonseca, Marcos Bryan Heinneman
Tese (doutorado) – Universidade Federal de Minas Gerais. Escola de Veterinária
Inclui bibliografia
1. Caprino – Doenças – Teses. 2. Artrite encefalite caprina – Teses. 3. Imunodifusão – Teses. I. Leite, Rômulo Cerqueira. II. Fonseca, Jeferson Ferreira da. III. Heinneman, Marcos Bryan. IV. Universidade Federal de Minas Gerais. Escola de Veterinária. V. Título.

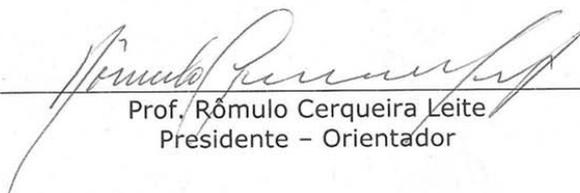
CDD – 636.390 89

FOLHA DE APROVAÇÃO

PAULA MARIA PIRES DO NASCIMENTO PENIDO

Tese submetida à banca examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação em CIÊNCIA ANIMAL, como requisito para obtenção do grau de DOUTOR em CIÊNCIA ANIMAL, área de concentração em Medicina Veterinária Preventiva.

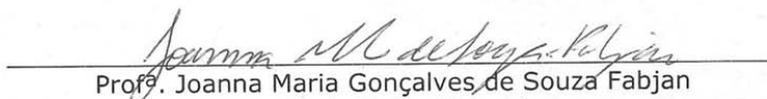
Aprovada em 27 de março de 2015, pela banca constituída pelos membros:



Prof. Rômulo Cerqueira Leite
Presidente - Orientador



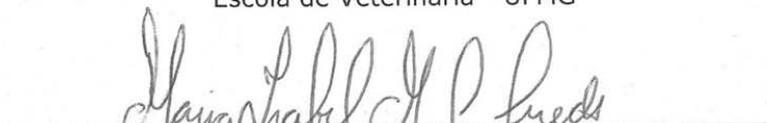
Profª. Sheyla Farhayldes Souza Domingues
Universidade Federal do Pará



Profª. Joanna Maria Gonçalves de Souza Fabjan
Universidade Federal Fluminense



Profª. Zélia Inês Portela Lobato
Escola de Veterinária - UFMG



Drª. Maria Isabel Maldonado Coelho Guedes
Escola de Veterinária - UFMG

Aos que me ensinaram a lutar pelos sonhos e
amar passando do céu: Auxí e Mauro,
Dedico.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente a Deus por me dar saúde, força e fé para seguir sempre em frente.

À São Francisco de Assis e meu anjo da guarda, guias e protetores.

Aos meus pais, Mauro e Auxí, que sempre acreditaram e me incentivaram em todos os momentos dessa longa jornada. Obrigada por cada palavra, bronca, recepção, partida e acima de tudo, força! Amo vocês passa do céu. Mais que tudo dessa vida e para sempre!

Ao meu marido, amigo, companheiro, namorado, confidente: ANDRÉ. Sei que o caminho foi longo, doído em muitos momentos, mas conseguimos. Obrigada!

Aos meus tios Roberto e Maria do Carmo, que escolhi como meus segundos pais e em nenhum momento duvidaram de que eu chegaria até aqui para realizar esse sonho.

Ao meu orientador Rômulo Cerqueira Leite que em sua braveza, possui o maior coração que já conheci. Obrigada por absolutamente tudo. Sempre terá muito de você em mim.

Aos meus irmãos, Nelson e Bruno que são meus terços restantes. Isso é por nós e sempre será. Amo mais que tudo e para sempre!

A minha cunhada Andreia, por quem tenho um orgulho imensurável. Obrigada por me ensinar o que é “luta” e estar sempre ao meu lado.

Aos meus sobrinhos: Victor, Ilka Maria (Picotinha), Ana Clara, Giovana, Gabriel e Sophia. Vocês fazem com que a esperança se renove em mim a cada dia num simples sorriso!

À minha sogra Maria Claret, que foi minha amiga, mãe, confidente e companheira durante todo o doutorado e principalmente por ter me acolhido de forma tão carinhosa.

Aos meus irmãos escolhidos, amigos de uma vida inteira: Patrícia, Juliana, Caroline, Wendell, Roberta e Barroso. Esse é meu trabalho: CIÊNCIA! Obrigada por estarem ao meu lado em todas as decisões e loucuras. Sem vocês, nada disso faria sentido.

Ao meu querido Daniel Sobreira, por todos os momentos de “prolixidade”, amizade e apoio nos momentos mais difíceis.

Ao meu amigo, parceiro, chefe e co-orientador Jeferson Ferreira da Fonseca. Obrigada por ter feito parte da minha história e ter me ensinado todos os dias, profissionalmente e pessoalmente.

À Pricila Estevão, que abriu as portas de sua casa. Obrigada pelo carinho e confiança.

Ao meu co-orientador, Marcos Bryan, pelo apoio durante o doutorado, contribuição na finalização do mesmo e todos os momentos de descontração.

Ao meu orientador francês Pascal Mermillod. O importante do caminho são os sonhos e você me proporcionou vivenciar muitos deles. Minha eterna gratidão.

Ao meu co-orientador francês Yann Locatelli, pelo apoio e amizade desde o primeiro dia.

À minha família francesa: Craig, Rebeca, Pedro, Ribrio, Carol, Vanda e Antoine. O carinho de cada um de vocês foi essencial para minha estada e conclusão de um grande sonho. Saudade sem fim!

Aos funcionários do INRA, que me receberam, tiveram muita paciência e me ensinaram muito: Emily Corbin, Nicolas Duffard e Martine Batailler.

À Joanna (Jojo), por todo apoio, confiança e amizade. Obrigada por ter ajudado a tornar realidade pensamentos tão grandes!

À Grazielle que não só foi minha parceira durante todo o período, mas amiga e ouvinte nos momentos de dúvida e aflição.

À Agda, Eduardo, Lúcia, Luzete, Renata, Graciela, Mirli, Adriana e demais funcionários que se fazem sempre presentes quando precisamos, sempre com boa vontade e disponibilidade.

À “minha” família Retrolab: Cairo, João, Ana Paula, Marcela, Fernanda, Gissandra e Daniel. Com vocês vivenciei os melhores e piores momentos durante o doutorado. Obrigada por cada um desses momentos, por cada palavra, “brain storm”, sorrisos e discussões. Vocês participaram ativamente de quem eu sou.

À família “Retrolabica”: Telissa, Cláudia (que me ajudaram incondicionalmente nessa fase final), Luciana, Steffane, Camila e Rafaela (que aprendi a admirar e ter um carinho grande em tão pouco tempo).

Às minhas IC’s Joana Campolina e Juliana Bicalho, hoje mestranda e mestre, respectivamente. Obrigada por terem me ensinado, quando na verdade a obrigação de ensinar era minha. Aprendemos juntas!

A todos os “Retrolabianos”: aprendemos a amar no dia a dia e levarei vocês dentro do meu coração. Obrigada!

Ao “genioso” e querido Gustavo Bervian, que me ajudou incondicionalmente na fase final do projeto.

À Professora Zélia Lobato que muito contribuiu e me apoiou em momentos difíceis.

À Maria Isabel (Bel) que muito contribuiu para a finalização deste trabalho. Jamais terei palavras suficientes para agradecer-lhe.

Aos proprietários das fazendas que me permitiram realizar os experimentos.

À todos os funcionários das propriedades, sempre tão disponíveis e com sorrisos sinceros, a fim de ajudar.

Ao CNPq pelo financiamento do projeto 553989/2010-4, bolsa de estudos durante todo o período de doutorado e bolsa Ciência sem Fronteiras. Obrigada por acreditarem no futuro da pesquisa e nos jovens do país.

Ao INCT que participou ativamente de todos os estudos realizados, apoiando integralmente os mesmos.

Ao Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal da Escola de Veterinária – UFMG.

Aos animais, que inconscientemente permitiram que realizássemos tantas intervenções.

E a todos que direta e indiretamente influenciaram no meu estudo: MERCI BEAUCOUP!

“O mundo vai girando
Cada vez mais veloz
A gente espera do mundo
O que ele espera de nós
Um pouco mais de paciência”

Lenine

SUMÁRIO

	RESUMO	16	
	ABSTRACT	17	
1.	INTRODUÇÃO	19	
2.	OBJETIVOS	21	
3.	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	22	
3.1	HISTÓRIA DA CAPRINOCULTURA LEITEIRA NO BRASIL.....	22	
3.2.	VÍRUS DA ARTRITE ENCEFALITE CAPRINA (CAEV).....	23	
3.2.1.	<i>Classificação filogenética e estrutura do vírus</i>	23	
3.2.2.	<i>Células hospedeiras do vírus e Replicação Viral</i>	26	
3.3.	ARTRITE ENCEFALITE CAPRINA (CAE).....	27	
3.3.1	<i>Epidemiologia</i>	27	
3.3.2.	<i>Transmissão</i>	31	
3.3.3.	<i>Sinais clínicos</i>	32	
3.3.4.	<i>Diagnóstico</i>	33	
3.3.5.	<i>Perdas econômicas</i>	35	
3.3.6.	<i>Controle e Prevenção</i>	36	
3.4.	BIOTÉCNICAS DA REPRODUÇÃO ANIMAL X RISCO DE TRANSMISSÃO DO VÍRUS DA ARTRITE ENCEFALITE CAPRINA (CAEV).....	38	
3.4.1.	<i>Inseminação artificial – IA</i>	38	
3.4.1.1	<i>Presença do vírus no sêmen</i>	39	
3.4.2.	<i>Produção in vivo de embriões</i>	40	
3.4.2.1.	<i>Transmissão do CAEV por embriões produzidos in vivo</i>	41	
3.4.3.	<i>Produção in vitro X infecção experimental</i>	43	
4.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	44	
CAPÍTULO I - Ocorrência do vírus da artrite encefalite caprina (CAEV) em propriedades leiteiras do estado de Minas Gerais, Brasil			54
	RESUMO	54	
	ABSTRACT	54	
1.	INTRODUÇÃO	55	
2.	MATERIAL E MÉTODOS	56	
3.	RESULTADOS E DISCUSSÃO	58	
4.	CONCLUSÃO	61	
5.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	61	
CAPÍTULO II - Detecção do vírus da artrite encefalite caprina (CAEV) no trato reprodutivo de cabras leiteiras naturalmente infectadas			65
	RESUMO	65	
	ABSTRACT	66	
1.	INTRODUÇÃO	67	

2.	MATERIAL E MÉTODOS	68
2.1.	LOCALIZAÇÃO E CONDIÇÕES EXPERIMENTAIS.....	68
2.2.	SELEÇÃO DOS ANIMAIS.....	68
2.3.	PROTOCOLO HORMONAL E ACASALAMENTO.....	69
2.4.	COLETA DE EMBRIÕES E RECUPERAÇÃO DE AMOSTRAS	69
2.5.	DIAGNÓSTICO POR PCR.....	72
2.6.	ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	72
3.	RESULTADOS	73
4.	DISCUSSÃO	77
5.	CONCLUSÃO	80
6.	BIBLIOGRAFIA CONSULTADA	81
CAPÍTULO III - Risco de transmissão do vírus da artrite encefalite caprina (CAEV) pela técnica de transferência de embriões de doadoras sorologicamente positivas		83
	RESUMO	83
	ABSTRACT	83
1.	INTRODUÇÃO	84
2.	MATERIAL E MÉTODOS	86
2.1.	SELEÇÃO DE ANIMAIS.....	86
2.1.1.	<i>Doadoras de embrião</i>	86
2.1.2.	<i>Receptoras de embrião</i>	86
2.1.3.	<i>Reprodutores</i>	87
2.1.4.	<i>Animais nascidos</i>	87
2.2.	TRATAMENTO HORMONAL, COLETA EMBRIONÁRIA E TRANSFERÊNCIA DE EMBRIÕES.....	87
2.3.	DIAGNÓSTICO DE GESTAÇÃO.....	89
2.4.	AMOSTRAS DE SORO E PAPA DE LEUCÓCITOS.....	89
2.5.	IDGA E PCR NESTED.....	89
3.	RESULTADOS	90
4.	DISCUSSÃO	92
5.	CONCLUSÃO	94
6.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	95
	CONSIDERAÇÕES FINAIS	99
	ANEXO I – COMITÊ DE ÉTICA	100
	ANEXO II – PROTOCOLOS LABORATORIAIS	101

LISTA DE TABELAS

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Tabela 1.	Classificação filogenética de acordo com “International Committee on Taxonomy of Viruses – Virology Division – ICTV” (julho, 2013).....	24
Tabela 2.	Levantamento bibliográfico da presença do vírus da artrite encefalite caprina (CAEV) em rebanhos caprinos no Brasil nos últimos 15 anos.....	29

CAPÍTULO I

Tabela 1.	Medidas estratégicas adotadas para controle da artrite encefalite caprina (CAE) nas propriedades	57
-----------	--	----

CAPÍTULO II

	Tipo de amostra coletada e kit utilizado para a extração de DNA ou	
Tabela 1.	RNA viral.....	72
Tabela 2.	Sequência de primers a partir da região conservada de GAG CAEV – PCR nested.....	72
Tabela 3.	Estruturas recuperadas por animal após lavagem uterina transcervical.....	73
Tabela 4.	Diagnóstico pelo método de PCR nested para detecção de DNA próviral de tecido do trato reprodutivo de cabras naturalmente infectadas.....	75
Tabela 5.	Diagnóstico PCR nested a partir de RNA viral (cDNA)	76

CAPÍTULO III

Tabela 1.	Sequência de iniciadores e peso molecular amplificado para o gene gag do CAEV.....	90
-----------	--	----

LISTA DE FIGURAS

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Figura 1.	Estrutura dos vírions pertencentes à família <i>Retroviridae</i>	25
Figura 2.	Representação esquemática da estrutura do provírus CAEV.....	26
Figura 3.	Identificação de sinais clínicos em animais adultos.....	33

Figura 4. Representação dos resultados dos diagnósticos sorológicos para CAEV.....	34
--	----

CAPÍTULO I

Figura 1. Ocorrência do vírus da artrite encefalite caprina (CAEV) em propriedades produtoras de leite caprino no estado de Minas Gerais.....	59
---	----

CAPÍTULO II

Figura 1. A.Micromanipulador; B.Embrião com zona pelúcida íntegra (aspiração de massa celular interna).....	70
Figura 2. Esfregaço esfregaço de pellet oriundo de líquido de lavado uterino, após centrifugação para concentração de células (1000rpm/10min), corado com panótico rápido. Microscópio óptico, aumento 400 x.	74
Figura 3. Gel de agarose 1,5% - PCR Nested para controle interno β -actina. M- marcador molecular 100pb; N –controle negativo; P- controle positivo; 1 – tuba uterina; ovário córtex; corno uterino; ovária medular; ápice do corno uterino; corpo do útero.....	76

CAPÍTULO III

Figura 1. Gel de agarose 1,5%. PCR Nested para o gene <i>gag</i> CAEV – quinto mês de gestação receptoras.....	91
Figura 2. Gel de agarose 1,5%. PCR Nested para o gene <i>gag</i> CAEV – nascidos com quatro meses de idade.....	91

LISTA DE ABREVIATURAS

AL – Alpina

AN – Anglo nubiano

BA - Bahia

BO – Boer

BoHV1 – herpesvírus tipo 1

BPV – parvovírus bovino

BTV – vírus da língua azul

BVDV – vírus da diarreia viral bovina

C – celsius

CAE – artrite encefalite caprina

CAEV – vírus da artrite encefalite caprina

CCS – contagem de células somáticas

cDNA – ácido desoxirribonucleico complementar

CE – Ceará

CMT – “California Mastitis Test”

CMV – citomegalovírus

CNPq – Conselho Nacional de Pesquisa e Desenvolvimento

DNA – ácido desoxirribonucleico

ECC - escore da condição corporal

ELISA – “Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay”

IA – inseminação artificial

IDGA – Imunosifusão em Ágar Gel

IETS – “International Embryo Transfert Society”

L - litros

IL - interleucina

im – intra muscular

IN – integrase

INCTV – “International Committee Taxonomy of Viruses”

kg – quilogramas

LAMP – “loop - mediated isothermal amplification”

LTR – “long terminal region”

MA – matriz

MG – Minas Gerais

min - minutos

μL - microlitros

mL – mililitros

M MLV – “Moloney Murine Leukemia Virus”

MN – monta natural

NC - núcleoproteína

NaCl – cloreto de sódio

pb – pares de base

PB - Paraíba

PCR – “Polymerase Chain Reaction”

PE – Pernambuco

PI - Piauí

PIVE – produção *in vitro* de embriões

PR - protease

PRV – herpesvírus suíno tipo 1

RJ – Rio de Janeiro

RN – Rio Grande do Norte

RNA – ácido ribonucleico

RNAm – ácido ribonucleico mensageiro

RT – “reverse transcriptase”

SA – Saanen

SP – São Paulo

SRD – sem raça definida

SU - superfície

TE – transferência de embriões

TM - transmembrana

TO – Tocantins

TR – transcriptase reversa

UI – unidades internacionais

WB – “Western Blotting”

ZP – zona pelúcida

RESUMO

Objetivou-se, primeiramente fazer um levantamento sorológico em cinco, das principais propriedades produtoras de leite caprino no estado de Minas Gerais, posteriormente estudou-se a presença do vírus no trato reprodutivo de cabras naturalmente infectadas e o risco de transmissão via transferência de embriões. Cinco propriedades localizadas em cidades distintas no estado de Minas Gerais foram avaliadas, totalizando 1072 animais de diferentes faixas etárias, das raças Toggenburg, Alpina e Saanen. O estudo relativo à presença do vírus no trato reprodutivo e no lavado uterino avaliou os embriões recuperados através das lavagens transcervicais, submetendo-os à punção de massa celular interna e com auxílio de um micromanipulador, as duas partes foram individualizadas. O trato reprodutivo (vagina, cérvix, útero e ovários) dos animais foi recuperado e submetido ao diagnóstico PCR Nested. Finalmente, no terceiro estudo, em um rebanho comercial, cabras positivas para CAEV foram selecionadas como doadoras e cabras negativas para CAEV como receptoras de embriões. Um total de 23 embriões foram coletados, pela técnica transcervical, submetidos às lavagens com tripsina e posteriormente transferidos receptoras também pela via transcervical. Durante todo o período gestacional (cinco meses) e mais quatro meses pós-parto o sangue total foi coletado uma vez ao mês, das receptoras para diagnóstico de CAEV, assim como dos animais nascidos. A ocorrência de anticorpos anti-CAEV nas propriedades estudadas foi de 49,5% (531/1072). De acordo com os resultados, uma alta ocorrência de animais soropositivos foi identificada no estado de Minas Gerais. Os tecidos estudados também demonstraram-se positivos para a presença de pró-vírus e vírus, indicando que pode estar ocorrendo replicação viral no trato reprodutivo. Entretanto os embriões oriundos deste meio, nas duas porções: zona pelúcida e massa celular interna não demonstraram a expressão de DNA ou RNA viral, o que confirma a capacidade de proteção da zona pelúcida nos mesmos. Durante todo o período investigado, não houve identificação de DNA pró-viral no sangue das receptoras. Os recém-nascidos durante os quatro meses de avaliação, também foram negativos. No presente estudo, não houve transmissão do CAEV por embriões oriundos de cabras positivas após tratamento com lavagens de tripsina. A lavagem transcervical demonstrou-se potencialmente auxiliar na eliminação do vírus no trato reprodutivo, uma vez que a quantidade de líquido infundido ajuda na diluição do mesmo. Logo, pode-se inferir que embriões oriundos de cabras naturalmente infectadas, mesmo na presença de pró-vírus e vírus livre no lúmen uterino aparentemente

não são permissivos a infecção pelo CAEV, devido à presença de zona pelúcida íntegra e que a lavagem transcervical é auxiliar na desinfecção dos mesmos.

ABSTRACT

The study was conducted in steps, first a serological survey in five major producing properties of goat milk in the state of Minas Gerais, to identify the occurrence of anti-CAEV antibodies. A second study was to investigate the presence of CAEV in the reproductive tract of naturally infected goats and a third the risk was conducted to evaluate the virus transmission by embryo transfer. Five properties located in different cities in the state of Minas Gerais were evaluated, totaling 1072 animals of different ages and races (Toggenburg, Alpine and Saanen). The study on the presence of the virus in the uterus these being selected as embryo donors. Embryos recovered through transcervical flushing were subjected to inner cell mass puncture using a micromanipulador. The two parties of the embryos were individualized. Where they recovered the reproductive tract (vagina cervix, uterus and ovaries), the recovered material was diagnostic by PCR Nested. Finally, the third study, in a commercial flock positive goat to CAEV was selected as donors and negative goats to CAEV as embryo recipients. 23 embryos were recovery by transcervical flushing from five donors washed with trypsin and subsequently transferred to recipients also through transcervical way. Throughout the gestational period (five months) and four postnatal months total blood was collected once a month of the recipients for CAEV diagnosing by Nested PCR method. The monitoring was also performed by the same method of diagnosis in animals born during the first four months of life. The occurrence of anti-CAEV antibodies in the studied properties was 49.5% (531/1072). According the results, a high occurrence of seropositive animals was identified in the state of Minas Gerais, which has one of the largest herds of dairy goats in Brazil. Therefore to emphasizes the need to adopt new technologies on the properties as the separation of infected and healthy animals. The exclusion of positive breeding in properties is also a measure of control, it has been demonstrated that these are an important route of transmission. Tissues studied also showed positive results for the presence of pro-virus and viruses, indicating that may be occurring viral replication in the reproductive tract. However the embryos from this medium, in two parts: the zone pellucida and inner cell mass have not shown the expression of DNA or RNA, which confirms the zone pellucida protection capacity of

the same. Throughout the period investigated, no proviral DNA was identified in the recipients' blood. Newborns during the four-month evaluation were also seronegative. The present study did not show the transmission of CAEV by embryos from positive goats after trypsin washes. According to the results, a high occurrence of seropositive animals was identified in the state of Minas Gerais, which has one of the largest herds of dairy goats in Brazil. The transcervical washing proved to be a potentially effective method to reduce the virus concentration in the reproductive tract, since the amount of fluid infused in the uterus could reduce the concentration of free virus in the reproductive tract. Therefore, it can be inferred that embryos derived from naturally infected goats, even in the presence of pro-virus and virus-free fluid in the uterine lumen, are apparently not permissive to CAEV infection due to the presence of the intact zona pellucida and transcervical flushing can reduce the risk of virus transmission.

1. INTRODUÇÃO

Os caprinos foram identificados como sendo os primeiros animais a serem introduzidos no país, na época da colonização. Com a entrada dos animais pela Ilha de São Vicente e posteriormente no litoral da Bahia e Pernambuco, esses foram ganhando o interesse das famílias, pois são rústicos e facilmente adaptáveis.

A exploração inicialmente era familiar e ainda hoje é vista para subsistência em muitas regiões do país, como no nordeste brasileiro, onde 90% do efetivo nacional está concentrado. Os estados da Bahia e Pernambuco possuem 50% desse total.

Em Minas Gerais, a partir da década de 70, foram iniciados investimentos em técnica e produção leiteira da caprinocultura, através da importação de animais do Canadá, França e Estados Unidos por parte dos produtores mineiros. Como a importação era onerosa para o pequeno produtor, ocorria o empréstimo de reprodutores entre propriedades para a disseminação de genética, com consequente melhoramento genético das linhagens leiteiras.

Uma ferramenta para a disseminação de genética é a utilização das técnicas de reprodução, que visam acelerar o processo de disseminação, uma vez que é capaz de produzir um número superior de descendentes de um mesmo reprodutor ou matriz. A principal técnica empregada na caprinocultura é a inseminação artificial, porém apenas 2% das propriedades brasileiras fazem uso desta. Outras duas importantes técnicas da reprodução são a superovulação e transferência de embriões *in vivo* e a produção *in vitro* de embriões. Ambas as tecnologias que utilizam embriões não são utilizadas com frequência no cenário comercial, sendo empregadas principalmente em pesquisas.

Um fato que vem gerando preocupação entre pesquisadores, veterinários e produtores é a disseminação de doenças via gametas e embriões, seja pelo empréstimo de animais e/ou pela utilização das técnicas da reprodução.

Uma doença que possui um impacto econômico importante nos rebanhos caprinos é a artrite encefalite caprina (CAE), de caráter crônico e que causa artrite e degeneração articular, pneumonias e mamites severas, com redução de até 10% na produção leiteira.

A principal via de transmissão desta doença é a colostrálica, por meio do aleitamento oferecido aos recém-nascidos. Além da transmissão via ingestão de colostro e/ou leite contaminado, já foi demonstrado que o vírus da artrite encefalite

caprina também pode ser eliminado no sêmen. Uma importante via de disseminação que vem sendo estudada é a embrionária. Entretanto, estes estudos são normalmente referentes à infecção experimental *in vitro*, o que pode gerar resultados que não são observados em infecções naturais, devido à concentração viral utilizada.

Há um aumento crescente do mercado de leite caprino em Minas Gerais, entretanto poucos estudos referentes à ocorrência do vírus da artrite encefalite caprina (CAEV) estão disponíveis na literatura. Esses estudos são de grande importância para o entendimento da epidemiologia da doença nas propriedades de caprinocultura leiteira mineiras. Além disso, o conhecimento sobre a distribuição do CAEV no sistema reprodutivo da fêmea e a possibilidade da sua transmissão via embrionária também são essenciais para entender a epidemiologia da doença, o que irá auxiliar na elaboração de programas de prevenção e controle da doença.

2. OBJETIVOS

- 1) estudar a ocorrência do vírus da artrite encefalite caprina (CAEV) em propriedades do Estado de Minas Gerais;
- 2) estudar a presença do CAEV no trato reprodutivo, líquido das lavagens uterinas e embriões provenientes de cabras naturalmente infectadas e
- 3) avaliar o risco de transmissão do CAEV por embriões produzidos *in vivo* de animais sorologicamente positivos.

3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 HISTÓRIA DA CAPRINOCULTURA LEITEIRA NO BRASIL

Há cerca de 7.000 anos, a cabra foi o primeiro animal domesticado pelo homem, produzindo leite e carne para consumo, servindo também para o fornecimento de couro, pelo e esterco (SENAR – CNA, Brasil, 2014).

A chegada de animais de fazenda no Brasil iniciou-se em 1534 em São Vicente (SP), seguida pelas introduções pelos litorais de Recife (PE) e Salvador (BA). Algumas centenas de cabeças foram introduzidas no Brasil entre os séculos XVI e XVIII, e a partir do século XIX as raças modernas começaram a chegar. Porém, somente a partir do século XX, em torno dos anos 60, foi que as importações sistemáticas de caprinos ocorreram com o intuito de fazer o melhoramento genético dos rebanhos brasileiros. Até o final do século XX, 4.000 caprinos adultos foram importados e introduzidos no Brasil, contando ainda com 4.000 doses de sêmen, sendo principalmente das raças Alpina, Anglo-nubiana, Boer, Saanen e Toggenburg, além de 1000 fetos de fêmeas importadas que estavam em gestação e 439 embriões congelados das raças Alpina, Boer e Saanen (Machado, 2011).

Historicamente o nordeste brasileiro é uma das regiões mais tradicionais para a criação de caprinos no país, detendo 90% do efetivo nacional, sendo que 50% encontram-se nos estados do Pernambuco e Bahia, onde a criação é destinada basicamente para carne (IBGE, 2012). A rusticidade natural desses animais foi preponderante para o sucesso na adaptação às condições da caatinga. Os animais criados no nordeste são, em sua maioria, de raças adaptadas, resultados do cruzamento de raças introduzidas no período colonial pelos portugueses. (SENAR – CNA Brasil, 2014), onde a maioria é direcionada à criação familiar e de subsistência.

No final dos anos 60, houve um grande interesse em produzir leite de cabra, por parte de um pequeno grupo de produtores no estado de Minas Gerais. Entretanto, estes rebanhos não eram tecnificados e nem possuíam animais especializados para a produção leiteira, e não havia organização no setor. Desta forma, na década de 70, mais precisamente em 1975, produtores e veterinários ligados à caprinocultura leiteira em Minas Gerais fundaram a Associação dos Criadores de Cabras Leiteiras (CAPRILEITE) e investiu-se na importação de animais oriundos da Europa, Estados Unidos e Canadá,

para a inserção de animais geneticamente superiores na caprinocultura leiteira mineira (Fonseca e Bruschi, 2009).

Na década de 90, com a criação do Programa Nacional de Alimentação Escolar (PNAE) no nordeste brasileiro, cujo um dos objetivos era a inclusão de leite caprino e seus derivados na merenda escolar, houve um incentivo ao desenvolvimento da caprinocultura no país e no estado de Minas Gerais, até o ano de 1995. Entretanto, no mesmo ano, as importações de animais de outros países foram suspensas, devido ao risco de transmissão da encefalopatia espongiforme bovina (BSE) (Fonseca e Bruschi, 2009). Atualmente a região sudeste é a principal fornecedora de animais de raças leiteiras para outros estados do país (Mussi, 2014).

A maior demanda de leite caprino ainda está associada ao consumo por crianças com alergia ao leite de vaca ou indivíduos que necessitem de leite especial (Guimarães e Cordeiro, 2003) e a produção de derivados, como queijos e cosméticos. O estado de Minas Gerais destaca-se como maior produtor brasileiro de leite caprino, seguido pelos estados de São Paulo e Rio de Janeiro (Silva *et al.*, 2012)

Em 2012, Minas Gerais apresentou um aumento de 1,9% no número de cabeças (114.682 cabeças) de caprinos produzidas quando comparado com 2011 (112.982 cabeças), sendo que a maioria da produção de caprinos no estado é leiteira. As regiões de Campos das Vertentes e Zona da Mata, a qual possui a maior bacia leiteira de caprinos de Minas Gerais, contam com um grupo de 54 criadores de caprinos e ovinos que criaram o Núcleo de Criadores de Caprinos e Ovinos, na cidade de Barbacena, atuando em 44 municípios das regiões (IBEG – 2012; SENAR – CNA Brasil, 2014).

Os desafios e investimentos na cadeia produtiva da caprinocultura leiteira são muitos, porém, devido ao empenho principalmente por parte dos produtores, esses vem sendo superados lentamente. Desta forma, é de extrema importância que haja conscientização e organização do setor, por parte dos produtores, técnicos, pesquisadores e associações estaduais, para que ocorra a inserção do leite caprino na rotina do consumidor brasileiro.

3.2. VÍRUS DA ARTRITE ENCEFALITE CAPRINA (CAEV)

3.2.1. Classificação filogenética e estrutura do vírus

De acordo com O “International Committee on Taxonomy of Viruses – Virology Division – ICTV (Julho, 2013)”, o vírus da artrite encefalite caprina (CAEV) é um *Lentivirus*, pertencente a subfamília *Orthoretrovirinae* e família *Retroviridae* (Tabela 1).

Tabela 1. Classificação filogenética de acordo com “International Committee on Taxonomy of Viruses – Virology Division – ICTV” (julho, 2013)

Família <i>Retroviridae</i>	Subfamília <i>Orthoretrovirinae</i>	Gênero: <i>Alpharetrovirus</i>
		Gênero: <i>Betaretrovirus</i>
		Gênero: <i>Deltaretrovirus</i>
		Gênero: <i>Epsilonretrovirus</i>
		Gênero: <i>Gammaretrovirus</i>
		Gênero: <i>Lentivirus*</i>
	Subfamília <i>Spumaretrovirinae</i>	Gênero: <i>Spumavirus</i>
* <i>Lentivirus</i>	Vírus da Imunodeficiência bovina – BIV	
	Vírus da Artrite Encefalite Caprina – CAEV	
	Vírus da Anemia Infeciosa Equina – AIEV	
	Vírus da Imunodeficiência Felina – FIV	
	Vírus da Imunodeficiência Humana 1 - HIV 1	
	Vírus da Imunodeficiência Humana 2 - HIV 2	
	Lentivirus Puma	
	Vírus da Imunodeficiência do suíno – SIV	
	Visna/ Maedi Vírus	

O CAEV apresenta-se como um vírion envelopado de 80 a 100 nm de diâmetro contendo duas moléculas idênticas de ácido ribonucléico (RNA), um capsídeo de simetria icosaédrica recoberto por um envelope viral, no qual se projetam as glicoproteínas. Apresenta uma grande quantidade de ácido siálico na superfície viral, o qual protege as proteínas virais da digestão por proteases e de uma rápida neutralização viral por anticorpos (Huso *et al.*, 1988; Goff, 2006).

O genoma viral encontra-se altamente condensado e associado com múltiplas cópias da nucleoproteína (NC) e possui a presença de algumas proteínas que desempenham funções catalíticas durante a replicação: protease (PR), transcriptase reversa (TR) e integrase (IN), formando o núcleo ou *core*. Este núcleo está contido em um capsídeo (CA), formado pela associação de cópias múltiplas de proteína. O nucleocapsídeo (*core*

+ capsídeo) é revestido externamente por uma camada formada por centenas ou milhares de cópias de proteína, denominada matriz (MA). Esta é recoberta por um envelope lipoproteico, no qual se encontram as duas glicoproteínas virais, transmembrana (TM) e de superfície (SU). A TM é uma proteína integral de membrana, ou seja, apresenta uma região transmembrana. A SU está localizada externamente no vírion, associada de forma não covalente com a região da TM (Figura 1) (Ravazollo e Costa, 2007).

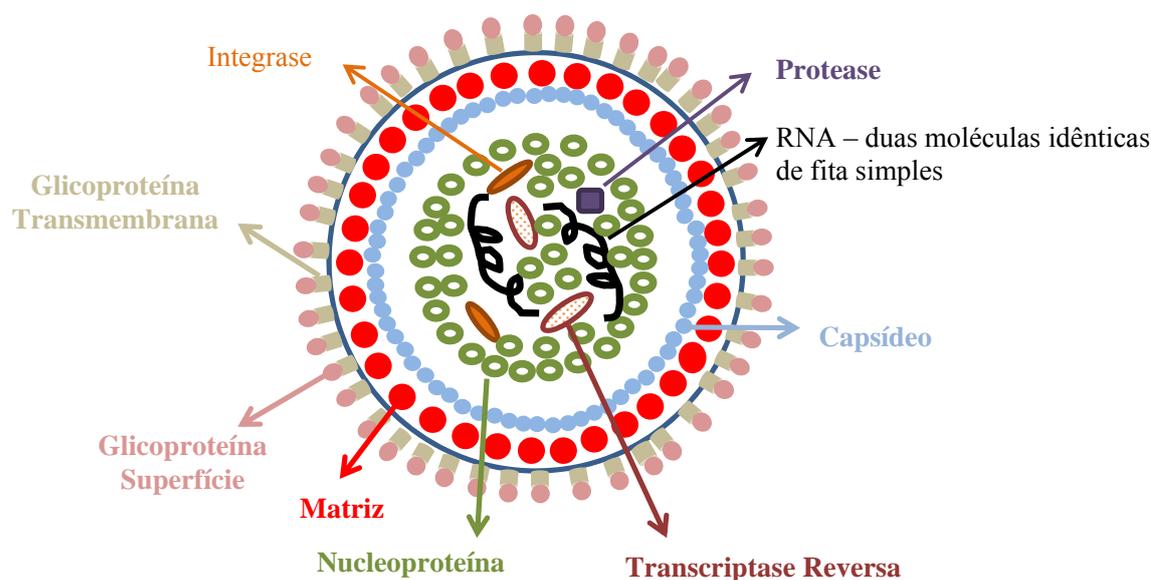


Figura 1. Estrutura dos vírions pertencentes à família *Retroviridae*.

Elaborado pela autora (Nascimento-Penido, P.M.P., 2014 – adaptado de Ravazollo e Costa, 2007.)

Três genes compõem o genoma de todos os retrovírus: o gene *gag* que codifica uma poliproteína que é subsequentemente clivada para formar as proteínas da matriz, do capsídeo e a nucleoproteína; gene *pol* que codifica as enzimas TR e a IN; e o gene *env* que codifica as duas glicoproteínas do envelope viral (glicoproteínas SU e TM) (Murphy *et al.*, 1999; Goff, 2006).

Adicionalmente aos genes *gag*, *env* e *pol*, que são comuns a todos os retrovírus, os vírus pertencentes ao gênero *Lentivirus* codificam vários outros genes, referidos como genes acessórios. Esses incluem o gene *tat*, que codifica um potente transativador que associado a fatores da célula infectada, aprimora a eficiência da transcrição pela RNA

polimerase celular; o gene *rev*, que codifica a proteína que é envolvida na transcrição do RNA viral e seu transporte do núcleo para o citoplasma, corrigindo o RNAm na tradução; o gene *nef*, que é essencial para replicação do vírus em macrófagos, regula a expressão de CD4 e IL-2 e pode também alterar o estado de ativação de células alvo *in vivo*; e o gene *vif*, que está associado com a infectividade viral (Murphy *et al.*, 1999) (Figura 2).

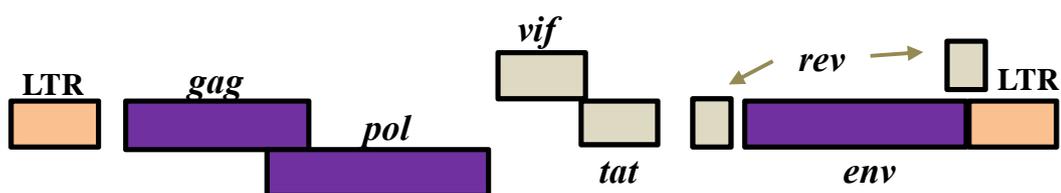


Figura 2. Representação esquemática da estrutura do próvirus CAEV.

Elaborado pela autora (Nascimento-Penido, P.M.P., 2014 – adaptado de Ravazollo e Costa, 2007.)

3.2.2. Células hospedeiras do vírus e replicação viral

As células da linhagem monócito/macrófago são as principais células hospedeiras do CAEV *in vivo*, e é nestas células que o vírus persiste por toda vida do animal (Phelps e Smith, 1993; Murphy *et al.*, 1999).

Os monócitos suportam os estágios iniciais de replicação viral, entretanto, a replicação somente se completa quando os monócitos se diferenciam em macrófagos. Enquanto a montagem do vírion acontece intracelularmente em vacúolos citoplasmáticos, nenhuma alteração celular é visível. Esse fenômeno, conhecido como *restrição da replicação*, permite ao vírus permanecer nos monócitos por períodos prolongados, sendo indetectável para o sistema imune (Gendelman *et al.*, 1986; Zink *et al.*, 1987; Murphy *et al.*, 1999). Os macrófagos são a principal célula infectada pelo vírus, sendo a principal fonte de disseminação viral pelo organismo animal, tanto em animais experimentalmente quanto em animais naturalmente infectados. Os principais tecidos alvo incluem a glândula mamária, sinóvia, pulmões e sistema nervoso central (Narayan *et al.*, 1989; Lerondelle *et al.*, 1999; Sanna *et al.*, 1999). Entretanto, o RNA viral foi detectado em células endoteliais, epiteliais, fibroblásticas (Zink *et al.*, 1990; Brodie *et al.*, 1995; Mselli-Lakhal *et al.*, 1999).

A replicação viral ocorre de maneira seletiva de acordo com o tipo de macrófago, e está directamente relacionada com o curso clínico da doença e tecidos infectados (Narayan *et al.*, 1988).

O ciclo de replicação do CAEV consiste, resumidamente, na ligação do vírus pelas glicoproteínas do seu envelope (GP 135) aos receptores da superfície celular; fusão do envelope à membrana celular; liberação do RNA viral no citoplasma da célula, onde é transcrito em DNA por ação enzimática da TR; trânsito do DNA pró-viral para o núcleo da célula infectada; integração desse DNA em sítios do DNA celular por meio da enzima IN, para a formação do provírus; síntese do RNA viral pela RNA polimerase II celular, utilizando o provírus como molde; transcrição do genoma em RNA-mensageiros (RNAm); síntese das proteínas virais; montagem; construção do capsídeo e brotamento do vírus (Coffin, 1996).

3.3. ARTRITE ENCEFALITE CAPRINA (CAE)

3.3.1. Epidemiologia

A primeira descrição do CAEV ocorreu em 1974, sendo descritas lesões no sistema nervoso central de cabritos jovens. Foram identificadas a presença de linfocitose e posterior ataxia até completa paralisia dos membros dos animais, sendo acompanhado de pneumonia intersticial e hiperplasia pulmonar linfóide (Cork *et al.*, 1974). Entretanto, somente em 1980 em Washington, Estados Unidos da América, o vírus da artrite encefalite caprina, também conhecido como CAEV, foi descrito à comunidade científica (Crawford *et al.*, 1980).

No Brasil, o primeiro relato ocorreu em 1986, no estado do Rio Grande do Sul (Moojen *et al.*, 1986) e, desde então, alguns grupos (tabela 2) vem estudando a doença de forma sistemática em propriedades de produção de caprinos, onde a maioria dos estudos são referentes a animais de corte e não leiteiros.

A partir da década de 70, o estado de Minas Gerais (MG), juntamente com outros estados da região sudeste, foi pioneiro no desenvolvimento da caprinocultura leiteira, importando caprinos de raças especializadas procedentes de alguns países da Europa, assim como Estados Unidos e Canadá e evoluiu tecnicamente nestes 40 anos, não deixando nada a desejar se comparada a outros países onde a atividade caprina leiteira é tradicional (Gouveia *et al.*, 2009). Entretanto, Adams *et al.* (1984) identificaram uma

prevalência de 65% do CAEV no Canadá, França, Noruega, Suíça e Estados Unidos, demonstrando que a doença pode ter sido introduzida no país juntamente com estes animais que foram importados destes países europeus e americano (Gillet *et al.*, 1990).

Um estudo mais recente, realizado por Jones (2014) revelou uma prevalência de 45% do CAEV em rebanhos caprinos oriundos da região Centro-Oeste dos Estados Unidos, entretanto não foram identificados levantamentos soropidemiológicos na França e Canadá, países que possuem genética caprina de interesse para o produtor brasileiro.

No estado de Minas Gerais também não foram identificados estudos soropidemiológicos nos últimos anos, demonstrando a necessidade do mesmo, uma vez que o Estado é um dos maiores produtores de leite caprino em sistema intensivo confinado, sugerindo que a doença está subdiagnosticada (Lilenbaum *et al.*, 2007).

Tabela 2. Levantamento bibliográfico da presença do vírus da artrite encefalite caprina (CAEV) em rebanhos caprinos no Brasil nos últimos 15 anos

Ano	Estado	Origem/ Microrregião	Ocorrência/Prevalência	Proriedades	Raça	Tipo de criação	Referência
2001	BA	Catu	13,4% (215/1605)	23	Alpina	Extensivo	Almeida <i>et al.</i>
		Alagoinhas, Feira de Santana, Itaberaba, Itabuna de Ilhéus, Jequié, Salvador			Anglo-Nubiana		
2001	CE	Senhor do Bonfim, Valença	1%	130	Boer	Intensivo	Pinheiro <i>et al.</i>
		Região metropolitana Fortaleza			Mambrina		
		Norte			Saenen	Extensivo	
		Central Sul			Toggenburg SRD	Intensivo	
2001	MG	Norte e Nordeste	0,3% (4/1294)	167	-	Semi-intensivo	Yorinori <i>et al.</i>
2005	RN	Angicos	2,71% (5/184)	20	-	Semi-intensivo	Silva <i>et al.</i>
2005	RN	Central Potiguar Oeste Potiguar Agreste Potiguar	11% (42/384)	42	Saenen Alpina SA X AL SRD	-	Silva <i>et al.</i>
2005	SP	14 municípios	28% (374/1325)	14	-	-	Lara <i>et al.</i>
2007	RJ	Rio de Janeiro	14,1% (79/541)	-	Saenen Toggenburg	Intensivo	Lilenbaum <i>et al.</i>
2007	SP	Cotia Pindamonhangaba	34,9% (96/275)	8	Saenen Alpina Toggenburg	Intensivo	Madureira <i>et al.</i>

Ano	Estado	Origem/ Microrregião	Ocorrência/ Prevalência	Proriedades	Raça	Tipo de criação	Referência
2009	PB	Cariri	14,5% (87/600)	15	SRD	Extensivo	Bandeira <i>et al.</i>
2009	BA	Juazeiro	0,1% (0/150)	10	SRD	Extensivo	Lima <i>et al.</i>
2009	MG	Patos de Minas	22,8% (13/57)	1	SRD	-	Vinicius <i>et al.</i>
2010	TO	Microrregião do Norte	2,7% (23/843)	-	Saaanen Anglo nubiano SRD	-	Sobrinho <i>et al.</i>
2011	SP	LUPA	15,5% (30/199)	53	-	-	Lara <i>et al.</i>
2011	RJ	Rio de Janeiro	14% (79/562)	28	Saanen	Intensivo	Martins e Lilenbaum
2011	PI	Alto-médio Gurguéia	0,97% (7/723)	30	-	-	Rêgo <i>et al.</i>
2011	PI	Teresina	4,2% (20/480)	6	Anglo nubiano Boer AN X BO SRD	-	Sampaio Junior <i>et al</i>
2011	BA	Sisal	12,05% (135/1120)	52	-	-	Veschi <i>et al.</i>
2013	BA	Baixo médio São Francisco	0,29% (2/663)	46	SRD	Extensivo	Lima <i>et al.</i>
2013	PB	Monteiro	8,1% (85/1047)	110	-	-	Silva <i>et al.</i>

-: não informado.
AL: Alpina.
AS: Saanen.
NA: Anglo nubiano.

BO: Boer.
SRD: sem raça definida.
Propriedades: número de propriedades estudadas.
*Todos os estudos utilizaram o método de diagnóstico de IDGA.

O sistema de criação de caprinos leiteiros também é um fator determinante para a alta ocorrência do vírus. A maioria das propriedades comerciais de Minas Gerais são especializadas na produção de leite (Mussi, 2014) e 99% das propriedades adotam o sistema de confinamento (Gouveia, 2009). A adoção do confinamento está diretamente relacionada a área disponível na propriedade para a criação dos caprinos e terá impacto na produtividade dos mesmos, contribuindo para o ganho de peso dos animais (Gouveia, 2009).

Segundo Mussi (2014) quando adotado o regime intensivo confinado, esta ocorrência é alta. Provavelmente em virtude de fatores como: contato direto entre os animais, problemas na ordenhadeira mecânica provocando lesões no teto, aleitamento em mamadeiras coletivas (Lima, 2013), assim como a transmissão venérea e contato com sangue de animais infectados (Brülisauer *et al.*, 2005).

A longa permanência dos animais em sistema intensivo confinado, devido ao alto valor zootécnico dos mesmos é importante epidemiologicamente. Existe uma relação direta entre o tempo em que ocorre a infecção e produção de anticorpos e manifestação de sinais clínicos, já que a CAE é uma doença de ordem crônica e de evolução lenta (Cork e Narayan, 1980; Mussi, 2014), além de ser uma potencial fonte de transmissão horizontal para animais mais jovens (East *et al.*, 1993).

A presença do vírus em rebanhos leiteiros no país pode representar risco de disseminação do CAEV para os diferentes estados (Pinheiro *et al.*, 2001), devido principalmente ao comércio dos animais, compra, troca ou empréstimo de animais para melhoria da genética no rebanho (Gouveia, 2009).

Poucas propriedades produtoras de leite caprino exigem atestado sanitário para a compra dos animais, assim como a grande maioria das propriedades em Minas Gerais, utilizam de medidas de controle para os reprodutores, demonstrando falhas nos programas de controle da enfermidade (Mussi, 2014).

3.3.2. Transmissão

A principal via de transmissão do CAEV nos animais ocorre principalmente durante os primeiros meses de vida, pela ingestão de leite ou colostro de cabras infectadas (Gouveia *et al.*, 1994). Contudo, a introdução de fêmeas infectadas nos rebanhos acelera a disseminação do vírus.

A transmissão iatrogênica é descrita, devido principalmente a utilização de utensílios coletivos, como tatuadores sem prévia assepsia ou mesmo a reutilização de matérias descartáveis (Narayan *et al.*, 1983).

Há evidências que indicam a transmissão materno fetal do CAEV, mesmo que com baixa frequência, podendo ocorrer por duas possíveis vias: transmissão intrauterina e transmissão no canal vaginal no momento do parto, pela ingestão ou inalação de células infectadas pelas crias (Moojen *et al.*, 1986).

East *et al* (1993) relataram a possibilidade de transmissão transplacentária, entretanto esta via de transmissão ainda não esteja bem esclarecida, devido à fatores relacionados diretamente com o manejo realizado nos rebanhos estudados.

A transmissão via gametas e embriões vem sendo estudada e elucidada recentemente, entretanto será abordada mais especificamente, no subtítulo 3 desta revisão.

3.3.3. Sinais clínicos

A doença é de ordem crônica e lenta com sinais clínicos variados, sendo que em animais jovens (até 6 meses de idade), a encefalomielite é o principal sinal. Pode-se observar desmielinização, aumento do número de leucócitos no líquido cefalorraquidiano, infiltração de células mononucleares e astrocitose na medula e no cérebro (Cork e Narayan, 1980).

Já em animais adultos observa-se aumento de volume das articulações (Figura 3) evoluindo para destruição do colágeno e mineralização das articulações do carpo. A inflamação crônica das articulações é mediada pela deposição de imunocomplexos, uma vez que quanto maior o título de anticorpos no soro e/ou no líquido sinovial, mais abundantes e severas as lesões. Pneumonia intersticial crônica e mamites severas com endurecimento da glândula mamária (“hard ubber”) (Figura 3) (Cork e Narayan, 1980), com perda de peso progressiva e diminuição da produção leiteira também podem ser observados.

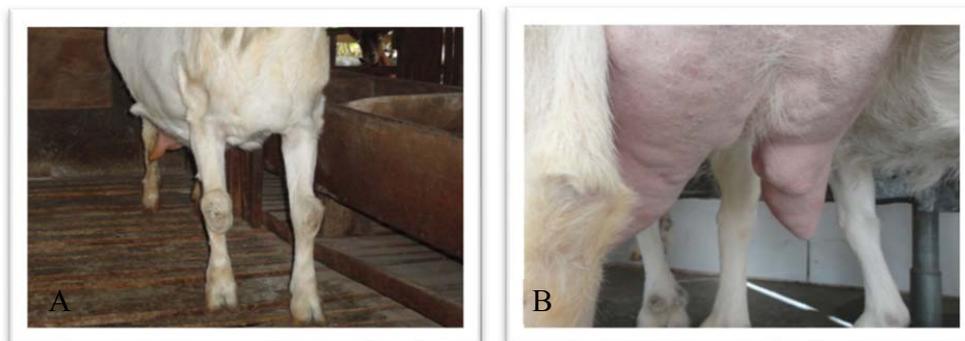


Figura 3. Identificação de sinais clínicos em animais adultos. A – aumento de volume na região do carpo; B – mamite crônica, com formação de nódulos (“hard ubber”).
Fotos: Nascimento-Penido, P.M.P. (2015).

O vírus é capaz de mascarar-se para não sofrer danos pela resposta imune devido à alguns mecanismos, sendo eles: a) por infectar células de linhagem monócito-macrófago, neutralizando um dos mecanismos de defesa não específico; b) infectando células tronco na medula óssea e limitando a expressão de genes virais nestas células, o reconhecimento destas não ocorre pelas células citotóxicas, tornando-se um reservatório do vírus no organismo; c) DNA viral integrado nas células hospedeiras podem permanecer sem serem expressos por prolongados períodos, em estado de latência e d) CAEV não induz a produção de anticorpos neutralizantes durante a infecção. Estes fatores que levam a latência, persistência e eventual disseminação do vírus no organismo também são os responsáveis pelos sinais clínicos de dor debilitante nos animais positivos (Narayan *et al.*, 1988; Perk, 1995).

3.3.4. Diagnóstico

O diagnóstico da CAE inicia-se com a observação dos sinais clínicos sugestivos da infecção (Peretz *et al.*, 1993).

O diagnóstico sorológico, através do teste de imunodifusão em ágar gel (IDGA – figura 4) é a técnica mais utilizada e é preconizada pela OIE – “World Organization for Animal Health”, para identificar animais positivos para CAEV. A técnica baseia-se na formação de complexos antígeno-anticorpo (Ag-Ac) que se precipitam no gel, sob uma base rígida, onde se desenvolve a linha de precipitação visível entre os orifícios no ponto em que ocorre a relação ótima entre Ag-Ac (Figura

4). Possui fácil aplicabilidade e alta especificidade (Varea *et al.*, 2001), mas detecta somente altos níveis de imunoglobulinas, o que permite a ocorrência de falsos-negativos (McConnell *et al.*, 1998).

Uma alternativa para o diagnóstico mais sensível que o IDGA é o ELISA indireto (ELISA-i), devido principalmente à qualidade do Ag adsorvido na placa (Madruga *et al.*, 2001), além de viabilizar a análise de um maior número de amostras (Figura 4). Por outro lado, é um teste mais caro para o produtor, uma vez que há a necessidade da utilização de antígenos mais purificados do que os empregados no IDGA (Pinheiro *et al.*, 2010).

Outra opção para o diagnóstico sorológico do CAEV é o teste de “Western Blotting” (WB), que tem como princípio a formação do complexo Ag-Ac, sendo visualizado por aplicação de um conjugado enzimático, ao qual se adiciona um substrato que reage com a enzima, gerando a reação (Pinheiro *et al.*, 2010) (Figura 4).

Ambos os testes foram padronizados e apresentaram-se mais sensíveis quando comparados com o IDGA. Entretanto o WB demonstrou 100% de sensibilidade e 72,6% de especificidade na detecção de anticorpos para anti-CAEV. Já o Elisa-i apresentou 84,6% e 76,5%, respectivamente, embora seja mais dispendioso (Rodrigues *et al.*, 2014).



Figura 4. Representação dos resultados dos diagnósticos sorológicos para CAEV. A – IDGA (poços 1, 2 e 3: soros testados e positivos para CAEV, poços sem identificação: soro controle e seta: antígeno para CAEV - Foto: Nascimento-Penido, P.M.P., 2015); B – ELISA (seta: controle positivo - Foto: cedido por Pinheiro, R.R., 2015) e C – Western Blotting (+: controle positivo, -: controle negativo, 1 e 2: soros testados e positivos para CAEV - Foto: cedido por Pinheiro, R.R., 2015).

A PCR (“polímerase chain reaction”) também pode ser usada e é relatada como sendo a mais fidedigna aos resultados, uma vez que identifica a presença de DNA pró-viral e RNA (Peterson *et al.*, 2008), sendo descrita por todos os autores que trabalham com a identificação do vírus em gametas, embriões e sistema reprodutivo. Contudo, esta técnica é complexa e onerosa, sendo

utilizada somente para pesquisas até o momento. O princípio da técnica baseia-se na capacidade de identificação e mensuração de quantidades de ácidos nucleicos na vasta gama de inúmeras fontes, sendo uma tecnologia diagnóstica molecular utilizada na ciência, na agricultura e medicina, tendo uma combinação de rapidez nos resultados e alta sensibilidade em amostras homogêneas (Bustin *et al.*, 2009).

Recentemente, outra técnica molecular, denominada “loop-mediated isothermal amplification” (LAMP) foi padronizada para a detecção de DNA proviral do CAEV. Resumidamente a técnica utiliza 6 primers espécie específicos que amplificam gene gag da p25. A reação é realizada em uma simples etapa, onde ocorre a mistura da amostra, dos primers, DNA polimerase, onde é mantido numa temperatura constante entre 63°C, durante 30 minutos. No final da reação adiciona-se SYBR green e a mesma é visualizada em gel de agarose na eletroforese. A técnica LAMP possui vantagens sobre a PCR convencional ou nested, como: custo inferior e fácil execução, por não necessitar da etapa utilizando o termociclador, pois a mesma é realizada em termobloco (Huang *et al.*, 2012; Balbin *et al.*, 2014).

3.3.5. Perdas econômicas

Poucos estudos descrevem claramente quais as reais perdas econômicas causadas pelo CAEV dentro de uma propriedade produtora de leite caprino. Essas perdas econômicas são mais evidentes em propriedades com maior prevalência do CAEV e animais com mais idade, caracterizando-se pela queda na produtividade e na qualidade do leite e emagrecimento (Brito, 2009).

Segundo Peterhans *et al.* (2004) a perda na produção leiteira está em torno de 10%, aproximadamente. As perdas estão diretamente relacionadas à inflamação da glândula mamária, descrita na literatura como mamite, uma vez que desencadeia um processo inflamatório. A inflamação crônica causada pelo CAEV é conhecida por causar redução na função do alvéolo mamário e lise de vários componentes do leite (Leitner *et al.*, 2004). Como consequência, os animais soropositivos têm uma diminuição na duração da lactação (204 vs. 218 dias para soronegativos), apresentam menor produção de leite (374L vs 446L) e menor concentração de gordura, extrato seco e lactose do que fêmeas soronegativas (Carneiro *et al.*, 2010; Martínez-Navalón *et al.*, 2013).

A relação entre a contagem de células somáticas (CCS) e a baixa produção de leite não está bem clara, e outras formas de avaliar a mamite, assim como a saúde do úbere devem ser estudadas para facilitar mais precisamente o impacto do CAEV na produção leiteira caprina (Martínez-Navalón *et al.*, 2013). Testes como cultura bacteriológica e o “California mastitis test” (CMT) vêm sendo usados ao longo dos anos, para identificação de animais com úberes infectados ou não por diversos patógenos. Entretanto, em cabras, a maioria das infecções intra-mamárias são causadas por patógenos menos importantes, os quais normalmente induzem a um pequeno aumento de CCS, e raramente são causadores de mamite clínica e demonstram ter baixa influência na diminuição da produção leiteira da cabra (Koop *et al.*, 2013).

Um fator importante a ser considerado é a dificuldade de locomoção dos animais infectados com CAEV, devido às lesões nas articulações, pois podem levar a um menor consumo de alimento, influenciando diretamente na produção de gordura no leite. Com a redução da gordura, tem-se também a redução dos sólidos totais (Carneiro *et al.*, 2010).

Perdas econômicas indiretas importantes também podem ser observadas, como a desvalorização de rebanhos, aumento da taxa de reposição de animais, despesas com medidas de controle e barreiras comerciais para produtos (matrizes, reprodutores, sêmen e embriões) (Pinheiro *et al.*, 2001).

3.3.6. Controle e Prevenção

Com a crescente ocorrência da CAE dentro dos sistemas de produção caprina no Brasil, faz-se necessária uma discussão continuada e a implementação de programas de controle e prevenção (Martinez *et al.*, 2011).

A detecção precoce de animais positivos dentro do rebanho é importantíssima, uma vez que está relacionada diretamente ao sucesso dos programas de controle (Gouveia *et al.*, 1994).

A eficiência de programas de controle de CAE depende da sensibilidade e especificidade do teste diagnóstico, da frequência de sua utilização em animais e no manejo utilizado. Testes com maior sensibilidade e especificidade (Western Blotting e ELISA) devem ser utilizados (Pinheiro *et al.*, 2010). Nestes casos, o emprego combinado de testes de alta especificidade e sensibilidade é uma boa opção (Reina *et al.*, 2009).

A prevenção é baseada em estratégias de manejo sanitário, já que não há vacinas disponíveis no mercado (Reina *et al.*, 2009). Segundo Adams *et al.* (1983) deve-se seguir cinco passos importantes: separação dos filhotes no momento do parto, antes de receberem colostro (Peretz *et al.*, 1993; Silva, *et al.*, 2005); isolamento e separação de animais infectados por, pelo menos, 2m do restante dos animais; fornecimento de colostro oriundos de animais CAEV negativos ou após tratamento térmico do mesmo (56°C/ 1h) (Silva, *et al.*, 2005); fornecimento de leite oriundo de cabras negativas, pós-pasteurização ou sucedâneo (Gouveia *et al.*, 2009) e testes sorológicos dos nascidos com intervalo de 6 meses, separando os animais negativos dos positivos.

Uma opção para o controle da doença em rebanhos com baixa prevalência é o descarte de animais positivos (Reina *et al.*, 2009), mas é uma medida onerosa para o produtor (Leite *et al.*, 2013).

Animais recém adquiridos devem ser mantidos em isolamento e testes sorológicos devem ser realizados até a confirmação do *status* sorológico dos animais. Instrumentos de uso coletivo, como tatuadores, devem ser submetidos à desinfecção e materiais descartáveis inviabilizados (Gouveia *et al.*, 2009).

Deve-se realizar a linha de ordenha onde as cabras negativas são ordenhadas antes das cabras positivas. Posteriormente, deve-se fazer a descontaminação de todo o equipamento, no caso de ordenha automatizada. Já para a ordenha manual, indica-se a descontaminação das mãos entre um animal e outro com água clorada e utilização de pré e pós-*dipping* (Leite *et al.*, 2013).

Reprodutores infectados, porém assintomáticos, podem eliminar o vírus de forma intermitente no sêmen (Cruz *et al.*, 2009). Logo, é de extrema importância manter nos rebanhos somente reprodutores negativos, assim como evitar o trânsito dos mesmos entre propriedades (Leite *et al.*, 2013).

Uma aliada na prevenção da disseminação do vírus nos sistemas de produção é a implementação das biotecnias da reprodução, como a utilização da inseminação artificial, com sêmen oriundo de animais sorologicamente negativos ou sêmen comprovadamente negativo pelo teste de PCR. A coleta de embriões *in vivo* e transferência dos mesmos, até o momento, vem sendo observada como uma boa ferramenta para evitar-se a disseminação do CAEV, pois não foi observada a infecção dos embriões após a utilização da técnica (Andrioli *et al.*, 2002; Ali Al Ahmad *et al.*, 2008).

O acompanhamento técnico é decisivo para o sucesso da produção, pois atuam no monitoramento de programas de prevenção das principais doenças, bem como no manejo nutricional, reprodutivo e intervenções curativas. Entretanto, a capacitação técnica, por vezes, é questionável quanto às medidas de controle para a CAE. Logo, é de extrema importância a capacitação de técnicos da iniciativa pública e privada no que se refere ao manejo sanitário (prevenção e controle) de enfermidades dos rebanhos (Leite *et al.*, 2013; Mussi, 2014).

3.4. BIOTÉCNICAS DA REPRODUÇÃO ANIMAL X RISCO DE TRANSMISSÃO DO VÍRUS DA ARTRITE ENCEFALITE CAPRINA (CAEV)

3.4.1. Inseminação Artificial (IA)

A inseminação artificial (I.A.) é uma poderosa ferramenta de genética populacional, responsável pela elevação da produtividade, através da seleção de reprodutores geneticamente superiores, que usados como doadores de sêmen, aceleram o ganho genético na população caprina (Solano *et al.*, 1999). É uma técnica reprodutiva importante, de baixo custo, segura, e uma das mais eficientes (Fonseca *et al.*, 2010a).

As vantagens da técnica são: melhoramento genético advindo do uso e da multiplicação de sêmens qualificados como superiores em testes de desempenho ou progênie; preservação de germoplasma de raças sob risco de extinção; controle de doenças sexualmente transmissíveis; programação da exploração com eventual controle do ciclo de produção; incremento no número de animais geneticamente superiores; redução dos custos com a manutenção de reprodutores machos nas propriedades; permite a utilização de sêmen de animais inutilizados para a monta natural por defeitos físicos adquiridos; permite a adoção de outras biotécnicas reprodutivas referentes à indução de estro e reprodução fora da estação reprodutiva, permitindo a programação dos partos, facilitando o manejo e oferecendo cabritos na melhor época ao mercado (Traldi *et al.*, 1994; Machado e Simplício, 1995; Neves *et al.*, 2008).

No Brasil, as primeiras inseminações em caprinos foram realizadas em 1954 (Machado e Simplício, 1995). Apesar do seu potencial no incremento à produtividade e por representar a primeira linha de biotecnologias da reprodução, a inseminação artificial nesta espécie ainda é pouco aplicada no Brasil em rebanhos de caprinos leiteiros e rebanhos de elite (Fonseca *et al.*, 2010a). Isto

ocorre, em parte, devido às dificuldades e peculiaridades da técnica da reprodução de pequenos ruminantes. O pequeno número de reprodutores com disponibilidade de sêmen à venda e, em sua grande maioria, a disponibilidade de sêmen de animais não submetidos a testes apropriados que comprovem sua aptidão (teste de progênie) agravam o quadro (Fonseca *et al.*, 2010b), além da falta de mão de obra qualificada e investimento inicial pelo produtor em material e sêmen de centrais.

No final de 2014 a Embrapa Caprinos e Ovinos divulgou dados referentes ao “Teste de Progênie em Caprinos Leiteiros do Brasil” - “Programa de Melhoramento Genético da Embrapa de Caprinos Leiteiros” - Capragene[®]. O Programa visa a promoção do uso do sêmen via inseminação artificial e o fomento da comercialização e da valorização dos animais, traduzindo este investimento inicial em aumento da renda para os produtores (Embrapa, 2014).

O número de inseminadores especializados vem crescendo nos últimos anos, graças ao “Programa de Melhoramento Genético da Embrapa de Caprinos Leiteiros” - Capragene[®] que vem promovendo cursos de inseminação aos funcionários das propriedades, aumentando o número de mão de obra treinada para realização da técnica, o que, em associação aos manejos sanitário e nutricional adequados, boa qualidade do sêmen e momento ideal para a inseminação, pode levar a uma taxa de prenhez de 70% - 75% (Nascimento, 2009; Esteves, 2011) em programas de inseminação artificial.

3.4.1.1. Presença do vírus no sêmen

A presença do CAEV no sêmen foi descrita pela primeira vez por Travassos *et al.*, (1999), usando a técnica de PCR nested. Resumidamente, o estudo descreve a detecção do CAEV (DNA pró-viral ou RNA) em amostras de sêmen oriundas de animais soropositivos. Posteriormente, demonstrou-se a presença do CAEV em tecidos do trato genital masculino de bodes, naturalmente infectados, confirmando que a infecção é acompanhada pela presença do DNA pró-viral e RNA viral no plasma seminal e em outros elementos celulares do sêmen (Ali Al Ahmad *et al.*, 2008). Ainda em 2008, Peterson *et al.*, descreveram que em animais CAEV soropositivos também houve detecção de DNA pró-viral no ejaculado e no sêmen epididimal, assim como em tecidos (testículo e glândulas bulbo uretrais). A liberação do vírus no sêmen é intermitente e sem relação com a viremia dos animais (Cruz *et al.*, 2009).

As células epiteliais do epidídimo são importantes para a capacidade de fertilização e motilidade do espermatozoide. Durante o trânsito seminal, o espermatozoide recebe proteínas das células epiteliais do epidídimo que estabilizam a membrana plasmática e previnem a reação acrossomal prematura (Charles *et al.*, 2001). Esta interação íntima entre o espermatozoide e as células epiteliais do epidídimo pode aumentar a probabilidade da infecção seminal, desde que haja a infecção do tecido epididimário, resultando na secreção do patógeno dentro do ducto (Lamara *et al.*, 2013).

Não há a descrição de uma quantidade de carga viral mínima presente no sêmen capaz de causar infecção. Alguns estudos demonstram que o estresse causado pelo aumento na atividade sexual durante a estação reprodutiva e durante os períodos com altas temperaturas do ambiente podem influenciar na presença do CAEV no sêmen no momento da coleta ou cópula (Andrioli *et al.*, 2006; Peterson *et al.*, 2008; Paula *et al.*, 2009).

Souza *et al.* (2013), ao inseminarem cabras sorologicamente negativas com sêmen oriundo de reprodutores também sorologicamente negativos e infectados com concentrações baixas e altas de CAEV, relataram que houve a soroconversão das fêmeas com ambas concentrações virais, porém as que receberam altas concentrações do vírus soroconverteram mais rapidamente.

3.4.2. *Produção in vivo de embriões*

O primeiro registro de sucesso da transferência de embriões (TE) foi relatado em coelhos, por Heape, em 1890, e desde então várias espécies de animais domésticos foram submetidas a esta tecnologia (Betteridge, 2003). Em 1934, Warwick *et al.*, relataram a primeira transferência de embriões em pequenos ruminantes. No entanto, seu uso comercial foi relatado apenas na década de 1970, na América do Norte (Jainudeen *et al.*, 2004). No Brasil, o sucesso da TE em caprinos foi descrito, pela primeira vez, por Jaume e Bruschi (1985). Todos os relatos de tal tecnologia em caprinos até 1990, envolveram o uso de procedimentos cirúrgicos de coleta, que têm sido restringidos em alguns países até que sejam desenvolvidas técnicas não cirúrgicas eficientes para este propósito (Embryo..., 1994).

Em caprinos, novas perspectivas surgiram com o registro da possibilidade de recuperação de embriões pela via cervical (Pereira *et al.*, 1998). Atualmente, quase 100% das coletas de embriões caprinos no Brasil são realizadas pela via transcervical não cirúrgica (Fonseca *et al.*, 2010a).

A dilatação cervical é um ponto indispensável para a realização da lavagem uterina não cirúrgica. Em cabras, a administração de 0,5g de d-cloprostenol ou de 10mg de dinoprost, por via intramuscular, é recomendada entre 16 e oito horas antes da lavagem, respectivamente (Fonseca *et al.*, 2011). Em caso de não ocorrer dilatação cervical, a mesma pode ser obtida em ovelhas por meio da administração de 200 g de misoprostol no fundo do saco vaginal, cinco horas antes da coleta de embriões (Gusmão *et al.*, 2009).

A técnica de lavagem uterina pela via transcervical é segura e eficiente para recuperação de embriões produzidos *in vivo* em cabras. O procedimento descrito é simples, consome pouco tempo e possibilita ser repetido sucessivas vezes com relativamente poucos riscos e sequelas ao animal (Fonseca *et al.*, 2011).

3.4.2.1. Transmissão do vírus da artrite encefalite caprina (CAEV) por embriões produzidos *in vivo*

O DNA pró-viral e o RNA viral já foram identificados em líquido do lavado uterino, provenientes de coletas embrionárias cirúrgicas (Andrioli *et al.*, 2002; Fieni *et al.*, 2002; Cavalcante *et al.*, 2013) de animais infectados, usando a técnica de PCR nested, entretanto nenhum embrião oriundo dessa técnica de coleta foi avaliado para a presença do CAEV.

Para determinar o risco de transmissão de CAEV na transferência de embriões (*in vivo/ in vivo*), foi feita a transferência de embriões de cabras soropositivas para CAEV, para receptoras soronegativas, após lavagens dos embriões com a utilização de tripsina (Ali Ahmad *et al.*, 2008), seguindo as recomendações da “International Embryo Transfer Society (IETS)”: (1) embriões com zona pelúcida (ZP) intacta, (2) 10 lavagens com meio, trocando as ponteiras entre as lavagens e (3) lavagem representando uma diluição de 1/100 de tripsina. Os cabritos nascidos das fêmeas soronegativas foram submetidos a protocolo imunossupressivo aos 30 dias de idade. Nenhum dos animais originados de embriões oriundos de fêmeas soropositivas e transferidos para cabras receptoras soronegativas, submetidos ao protocolo imunossupressivo até os quatro meses de idade, demonstraram soroconversão, assim como as receptoras após quatro meses de paridas, em nenhum dos métodos de diagnósticos utilizados (PCR nested, RT -PCR) (Andrioli, 2001). Foi demonstrado que os embriões oriundos de cabras soropositivas quando lavados adequadamente podem ser transferidos para cabras soronegativas para CAEV, sem risco de haver transmissão.

Ali Al Ahmad *et al.*, (2012) investigaram a localização celular do CAEV em tecido uterino de cabras soropositivas, utilizando a hibridização *in situ* e imunofluorescência com análise de laser confocal. A infecção do tecido uterino pelo CAEV foi confirmada pela presença de células com efeito citopático específico na hibridização. A imunomarcagem dupla para p28 e citoqueratina, analisados por meio da imunofluorescência e análise confocal, demonstrou claramente que células epiteliais uterinas foram infectadas por CAEV *in vivo*.

A presença de células epiteliais infectadas pelo CAEV no tecido do trato genital pode ter impacto na epidemiologia da doença, pois as células podem manter uma infecção latente sem uma reação inflamatória associada. O embrião ou feto poderia entrar em contato com o vírus durante a gestação e se infectar em diferentes fases do desenvolvimento. Isso explicaria a presença detectável do CAEV em lavagens uterinas de animais superovulados (Fieni *et al.*, 2002; Ali Al Ahmad *et al.*, 2008) e nas secreções do pós-parto de cabras reprodutoras (Rowe *et al.*, 1993).

A habilidade da zona pelúcida (ZP) em proteger os embriões de infecções, como no caso do CAEV, também já foi descrita para o herpesvírus bovino tipo 1 (BoHV1) (Vanroose *et al.* 1997) e para o vírus da diarréia viral bovina (BVDV) (Vanroose *et al.* 1998). A capacidade de infecção pelos vírus BoHV1 e BVDV em embriões de oito células, livres de ZP, foi demonstrada nos mesmos estudos (Vanroose *et al.*, 1997; Vanroose *et al.*, 1998). Além disso, a capacidade de infecção pelo vírus da língua azul (BTV) no estágio de mórula e blastocisto também já foi demonstrada (Bowen *et al.*, 1982; Penido *et al.*, 2014). Entretanto, embriões jovens de bovinos, ratos e suínos, com zona pelúcida íntegra, demonstraram ser resistentes ao parvovírus bovino (BPV); citomegalovírus (CMV) e herpesvírus suíno tipo 1 (PRV), respectivamente (Neighbour, 1978; Bowen, 1979; Bolin *et al.*, 1981). Estes relatos sugerem uma susceptibilidade diferente à infecção viral em embriões jovens, que podem ocorrer devido a: (1) expressão de receptores funcionais na superfície destas células; (2) fatores de transcrição e (3) ausência de repressores anti-virais (Ali Al Ahmad *et al.*, 2006).

O risco de alterar a ZP de embriões jovens produzidos *in vivo* é mínimo, enquanto que o mesmo é aumentado quando os embriões são manipulados para a transferência ou na produção *in vitro*, o que, por consequência, aumenta o risco de infecção por CAEV. Alguns estudos tem demonstrado que a infecção de embriões bovinos jovens pelo BVDV (Booth *et al.*, 1998; Vanroose *et al.*, 1998) ou BoHV1 (Vanroose *et al.*, 1997) interfere no desenvolvimento dos mesmos.

Entretanto, esta interferência parece ser dependente da virulência das amostras de BVDV. Não foi demonstrado nenhum efeito negativo do CAEV sobre o desenvolvimento de embriões com ZP intacta ou ZP livres em cabras jovens (Lamara *et al.*, 2002), e nem nas ovulações (Souza *et al.*, 2013) ou na produção embrionária (Ali Al Ahmad *et al.*, 2006).

3.4.3. Produção *in vitro* de embriões X infecção experimental

A produção *in vitro* de embriões (PIVE) vem sendo gradativamente incorporada nos programas de melhoramento animal como técnica de multiplicação, sendo que seu uso tem aumentando significativamente no país. De fato, o Brasil hoje ocupa uma posição de destaque no cenário mundial com consequente reconhecimento internacional, sendo responsável por quase 50% da produção mundial de embriões bovinos produzidos *in vitro* (Viana & Camargo, 2007). Entretanto esta técnica não é de grande expressão em caprinos, seja na produção comercial ou em estudos científicos. Somente um grupo de pesquisadores no Brasil vem utilizando a PIVE caprina e a mesma é aplicada principalmente para produção de animais transgênicos, visando a produção de proteínas recombinantes (Freitas *et al.*, 2014).

O CAEV está presente em células do complexo *cumulus* oócito quando infectadas *in vitro* e avaliados pela técnica de imunohistoquímica (Lamara *et al.*, 2001), bem como pela presença de DNA pró-viral nas células do *cumulus* oriundos de animais naturalmente infectados. Entretanto, nenhum dos oócitos após a remoção das células foi positivo na detecção de DNA pró-viral (Ali Al Ahmad *et al.*, 2005), indicando que poderia haver resistência à infecção viral pelos oócitos. Por outro lado, Cavalcante *et al.* (2013) identificaram RNA viral em oócitos desnudos, possivelmente aderido à zona pelúcida.

Estudos referentes à produção *in vitro* de embriões reportam que pode haver a disseminação do CAEV dependendo do sistema de cultivo embrionário. A utilização de monocamada oriunda de células epiteliais do oviduto infectadas experimentalmente é capaz de suportar a replicação viral (Lamara *et al.*, 2002a) e infectar embriões jovens sem ZP (Ali Al Ahmad *et al.*, 2006), assim como em embriões infectados *in vitro* com remoção da ZP também pode haver infecção da monocamada pelo CAEV (Lamara *et al.*, 2002b). A utilização de células epiteliais de oviduto provenientes de animais comprovadamente negativos para o CAEV é extremamente importante, devido à possibilidade de multiplicação do vírus em sistemas de cultivo de monocamada embrionário

(Lamara *et al.*, 2002a) ou pode-se optar pelo uso de sistemas de cultivo embrionário livres de células somáticas.

Os meios utilizados na PIVE, como soro de animal em estro, também podem ser fontes de contaminação viral, em função do contato direto com o embrião até o momento da transferência (Stringfellow e Givens, 2000).

4. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADAMS, D.S.; KLEVJER-ANDERSON, P.; CARLSON, J.L., *et al.* Transmission of control of caprine arthritis-encephalitis virus. *Am J Res*, v. 44, p. 1670 - 1675, 1983.

Adams DS, Oliver RE, Ameghino E, Demartine JC, Vermwoerd DW, Houwers DJ, *et al.* Global survey of serological evidence of caprine arthritis-encephalitis infection *Vet Rec*, v. 115, p. 49-95, 1984.

ALI AL AHMAD, M.Z.; FIENI, F.; MARGINAT, L.; *et al.* Proviral DNA of caprine arthritis encephalitis virus (CAEV) is detected in cumulus oophorus cells but not in oocytes from naturally infected goats. *Theriogenology*, v. 64, p.1656–66, 2005.

ALI AL AHMAD, M.Z.; FIENI, F.; GUIGUEN, F.; *et al.* Cultured early goat embryos and cells are susceptible to infection with caprine encephalitis virus. *Virology*, v.353, p.307–315, 2006.

ALI AL AHMAD, M.Z.; CHEBLOUNE, Y.; BOUZAR, B.A.; *et al.* Lack of risk of transmission of caprine arthritis-encephalitis virus (CAEV) after an appropriate embryo transfer procedure. *Theriogenology*, v.69, p. 408–415, 2008.

ALI AL AHMAD, M.Z.; DUBREIL, L.; CHAYAGNON, G.; *et al.* Goat uterine epithelial cells are susceptible to infection with Caprine Arthritis Encephalitis Virus (CAEV) in vivo. *Veter Res*, v.43, p.1- 5, 2012.

ALMEIDA, M.G.A.R.; ANUNCIAÇÃO, A.V.M.; FIGUEIREDO, A.; *et al.* Dados sorológicos sobre a presença e distribuição da artrite-encefalite caprina (CAE) no Estado da Bahia, Brasil. *Ver Bras Saúde Prod Na*, v.3. p. 78, 2001.

ANDRIOLI, A. Vírus da artrite encefalite caprina: PCR e isolamento viral em amostras de sêmen, fluido uterino e embriões. 2001. 68f. Tese (Doutorado em Ciência Animal) – Escola de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, MG.

ANDRIOLI, A.; GOUVEIA, A.M.G.; ANDRADE, J.S.; *et al.* Diagnostico f the caprine arthritis encephalitis vírus in uterine fluid and embryos of goats by vírus isolation in cell culture and PCR Nested. *Theriogenology*, v. 57, p. 567-567a, 2002.

- ANDRIOLI, A.; GOUVEIA, A.M.G.; MARTINS, A.S.; *et al.* Fatores de risco na transmissão do lentivirus caprino em sêmen de bodes naturalmente infectados. *Pesq Agropec Bras*, v. 41, p. 1313-1319, 2006.
- BALBIN, M.M.; BELOTINDOS, L.P.; ABES, N.S.; *et al.* Caprine arthritis encephalitis virus detection in blood by loop-mediated isothermal amplification (LAMP) assay targeting the proviral gag region. *Dig Microb Infec Dis*, v.79, p. 37-42, 2014.
- BANDEIRA, D.A.; CASTRO, R.S.; AZEVEDO, E.O.; *et al.* Seroprevalence of caprine arthritis-encephalitis virus in goats in the Cariri region, Paraíba state, Brazil. *The Vet J*, v.180, p. 399-401, 2009.
- BETTERIDGE, K.J. A history of farm animal embryo transfer and some associated techniques. *Anim Reprod Sci*. v.79, p.203-204, 2003.
- BOLIN, S.R.; RUNNELS, L.J.; SAWYER, C.A.; *et al.* Resistance of porcine preimplantation embryos to pseudorabies virus. *Am. J. Vet. Res*, v. 42, p. 1711–1712, 1981.
- BOOTH, P.J.; COLLINS, M.E.; JENNER, L.; *et al.* Noncytopathogenic bovine viral diarrhea virus (BVDV) reduces cleavage but increases blastocyst yield of in vitro produced embryos. *Theriogenology*, v. 50, p. 769–777, 1998
- BOWEN, R.A. Viral infections of mammalian preimplantation embryos. *Theriogenology*, v. 11, p. 5 – 15, 1979.
- BOWEN, R.A.; HOWARD, T.H.; PICKETT, B.W. Interaction of bluetongue virus with preimplantation embryos from mice and cattle. *Am. J. Vet. Res*, v. 43, p. 1907–1911, 1982.
- BRITO, R.L.L. Implicações da artrite-encefalite caprina na reprodução, produção e na qualidade do leite de cabras. Dissertação de mestrado, Centro de Ciências Agrárias e Biológicas, Universidade Estadual do Vale do Acaraú, Sobral, 2009, 109p.
- BRODIE, S.; PEARSON, L.; ZINK, M. Ovine lentivirus expression and disease. Virus replication, but no entry, is restricted to macrophages of specific tissues. *Am. J. Path.*, v.146, p. 250-263, 1995.
- BRULISAUER, F.; PERLER, H.-R. ; RUFENACHT, L. ; *et al.* Risk factors for the infection of Swiss goat herds with small ruminant lentivirus: A case-control study. *Vet Record*, v.157, p.229-233, 2005.
- BUSTIN, S.A.; BENES, V.; GARSON, J.A.; *et al.* The MIQE Guidelines: Minimum information for publication of quantitative Real-time PCR experiments. *Clin Chem*, v. 55, p. 611 – 62, 2009.
- CAVALCANTE, F.R.A.; ANDRIOLI, A.; PINHEIRO, R.R.; *et al.* Detecção do vírus da Artrite Encefalite Caprina por nested PCR e nested RT-PCR em ovócitos e fluido uterino. *Arq Inst Biol*, v.80, p. 381-386, 2013.

CARNEIRO, F.F.D.; BRITO, R.L.L.; SANTOS, V.W.S.; *et al.* Perdas econômicas decorrentes da artrite-encefalite caprina na produção de gordura e sólidos totais de leite. In: VI CONGRESSO NORDESTINO DE PRODUÇÃO ANIMAL. 2010.

CHARLES, T.; MARIE-CLAIRE, L. La reproduction chez les mammifères et l'homme. France: Edition INRA, 2001.

COFFIN, J. M. Retroviridae: the virus their of replication. In: Fields Virology. 3eds. Philadelphia: Lippincott-Raven, 1996. cap.5, p. 1767-1847.

CORK, L.C.; HADLOW, W.J.; CRAWFORD, T.B.; *et al.* Infections leukoencephalomyelitis of young goats. *J Infect Dis*, v. 129, p. 134-141, 1974.

CORK, L.C. e NARAYAN, O. The pathogenesis of viral leukoencephalomyelitis-arthritis of goats. *Labo Invest*, v. 42, p. 596 – 602, 1980.

CRAWFORD, T.B.; ADAMS, D.S.; SANDE, R.D.; *et al.* The connective tissue component of the caprine arthritis-encephalitis syndrome. *Am J Pathol.*, v.100, p.443-454, 1980.

CRUZ, J. C. M.; Gouveia, A.M.G.; *et al.* Caprine arthritis-encephalitis virus (CAEV) detection in semen of endangered goat breeds by nested polymerase chain reaction. *Sm Rumin Res*, v. 85, p. 149-152, 2009.

EAST, N. E.; ROWE, J.D.; DAHLBERG, J. E. *et al.* Modes of transmission of caprine arthritis encephalitis virus infection. *Small Ruminant Res.*, v.10, n. 3, p.251-262, 1993.

EMBRAPA Caprinos e Ovinos. 2014. Programa de Melhoramento Genético de Caprinos Leiteiros Capragene® Ano 2014 – Raça Saanen Sumário de Avaliação Genética, 17p.

EMBRYO TRANSFER IN SMALL RUMINANT. *Norsk Veterinaertidsskr*, v.106, p.750-753, 1994.

ESTEVES, L.V. Dissertação de mestrado. Parâmetros ovarianos e comportamentais de cabras leiteiras submetidas à sincronização de estro com prostaglandina associado ou não ao uso de hCG no início do estro. Universidade Federal Fluminense – UFF, Rio de Janeiro, 107pg, 2011.

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

FONSECA, J.F.; BRUSCHI, J.H. A caprinocultura leiteira no Brasil - uma visão histórica. 2009. Disponível em: <http://www.caprileite.com.br/conteudo.php?id_conteudo=172&id_links=4&id_sub_links=26>. Acesso em: 03 de dezembro de 2014.

FONSECA, J.F.; CRUZ, R.C.; OLIVEIRA, M.E.F.; *et al.* Técnicas Aplicadas à Reprodução de Ovinos e Caprinos. 13p, I Workshop sobre Ciência Animal na Bahia, Ilhéus, 2010a.

FONSECA, J.F.; CRUZ, R.C.; PINTO, P.H.N.; *et al.* Inseminação Artificial em Ovinos e Caprinos. In: I workshop sobre ciência animal da bahia, Ilhéus. ANAIS DO I WORKSHOP SOBRE CINÊNCIA NA BAHIA, 2010b.

FONSECA, J.F.; OLIVEIRA, M.E.F.; VIANA, J.H.M. Uso de procedimentos não cirúrgicos para a produção, recuperação e inovulação de embriões em pequenos ruminantes. *Rev Bras Reprod Anim*, v.35, p.113-117, 2011.

FREITAS, V.J.F.; MELO, L.M.; BATISTA, R.I.P.; *et al.* Trangênese em caprinos. In: ANAIS DO VII CONERA. 2014. *Acta Vet Bras*, v.8, p. 402-406, 2014.

GENDELMAN, H.E.; NARAYAN, O.; KENNEDY-STOSKOPF, S.; *et al.* Tropism of sheep lentiviruses for monocytes: susceptibility to infection and virus gene expression increased during maturation of monocytes to macrophages. *J. Virol.*, v.58, p.67-74, 1986.

GILLET, T. Brésil: les chèvres de la “caatinga”. *La chevre*, n. 178, p. 40-46, 1990.

GOUVEIA, A.M.G., SANTA ROSA J.; PINHEIRO, R.R. *et al.* Implantação de um programa de controle da CAEV em sistemas epidemiológicos distintos. In: ANAIS DO 23º CONGRESSO BRASILEIRO DE MEDICINA VETERINÁRIA; 1994, Recife. Recife, PE: SPEMVE; 1994. p.102.

GOFF, S.P. Retroviridae: the retruviruses and their replication 2. ed, p. 1999 – 2069 – In: *Fields Virology*, B.N., KNIPE, D.M., HOWLEY, P.N., 5.ed, 2006.

GOUVEIA, A.M.G.; GIMARÃES, A.S; HADDAD, J.P.A; *et al.* Características zoossanitárias da caprinocultura leiteira em Minas Gerais, Brasil. <<http://www.accomig.com.br>>, 2009.

GUIMARÃES, M.P. L.M.P.; CORDEIRO, P.R.C. Conheça o destino do leite de cabra produzido no Brasil, 2003. <<http://www.caprileite.com.br>>. Acesso em 22 de fevereiro de 2015.

GUSMÃO, A.L.; SILVA, J.C.; BITTENCOURT, T.C.C.; *et al.* Coleta transcervical de embriões em ovinos da raça Dorper no semiárido do Nordeste brasileiro. *Arq Bras Med Vet Zootec*, v.61, p.313-318, 2009.

HUNG, J.; SUN, Y.; LIU, Y., *et al.* Development of a loop-mediated isothermal amplification method for rapid detection of caprine arthritis-encephalitis virus proviral DNA. *Arch Virol*, v. 157, p. 1463–1469, 2012.

HUSO, L.D., NARAYAN, O., HART, W.G. Sialic acids on the surface of caprine arthritisencephalitis virus define the biological properties of the virus. *J. Virol.*, v.62, p.1974-1980, 1988.

INTERNATIONAL COMMITTEE ON TAXONOMY OF VIRUSES - ICTV online.ictv.org/virus-taxonomy.asp, acesso em 08 de janeiro de 2015.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA - IBGE. Produção da Pecuária Municipal, 68p, v. 40, 2012.

JAINUDEEN, M.R.; WAHID, H.; HAFEZ, E.S.E. Indução da ovulação, produção e transferência de embriões. In: HAFEZ, E.S.E. HAFEZ, B. Reprodução animal. 7.ed. Barueri, SP: Manole, 2004. p.409-434.

JAUME, C.M.; BRUSCHI, J.H. Cabras sem limites. O Estado de Minas, Belo Horizonte, 26 out. 1985. p.6-7.

JONES, B.T. Thesis. The current prevalence of caprine arthritis encephalitis virus in Midwestern goats herds. University of Nebraska, Lincoln, USA, 178p, 2014.

KOOP, G; COLLAR, C.A.; TOFT, N.; *et al.*, Risk factors for subclinical intramammary infection in dairy goats in two longitudinal field studies evaluated by Bayesian logistic. *Prev Vet Med*, v. 108, p. 304-312, 2013.

LAMARA A.; FIENI, F.; CHEBLOUNE, Y., *et al.* Efficient replication of caprine arthritis encephalitis virus in goat granulosa cells. *Virus Res*, v. 1201; p. 165–72, 2001.

LAMARA, A.; FIENI, F.; MSELLI-LAKAL, L.; *et al.* Early embryonic cells from in vivo-produced goat embryos transmit the caprine arthritis-encephalitis virus (CAEV). *Theriogenology*, v. 58, p. 1153–1163, 2002a.

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

LAMARA, A.; FIENI, F.; CHATAGNON, G.; *et al.* Caprine arthritis encephalitis virus (CAEV) replicates productively in cultured epididymal cells from goats. *Comparativ Immun, Microb and Infecti Disea*, 2013.

LARA, M.C.C.S.H; BIRGEL JUNIOR, E.H.; GREGORY, L. Aspectos clínicos da artrite-encefalite dos caprinos. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.*, v.57, p. 737-740, 2005.

LARA, M.C.C.S.H.; VILLALOBOS, E.M.C.; CUNHA, E.M.S.; *et al.* Inquérito sorológico de lentivirose de pequenos ruminantes (Maedi-Visna e artrite-encefalite caprina) no estado de São Paulo. *Braz. J Vet Res Ani Sci*, v. 50, p. 18-25, 2011.

LEITE, R.C.; REIS, J.K.P.; NASCIMENTO, P.M.P.; *et al.* Artrite encefalite caprina. In: *RETROVIROSES DOS ANIMAIS DOMÉSTICOS*. Vet. e Zootec.; v. 20 (Edição Comemorativa), p. 73- 92, 2013.

LEITNER, G.; MERIN, U.; SILANIKONE, N.; *et al.* Effect of subclinical intramammary infection on somatic cells counts, NAGase activity and gross composition of goats milk. *Jour of Dair Resear*, v. 71, p. 311 – 315, 2004.

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

LILENBAUM, W.; SOUZA, G.N.; RISTOW, P; *et al.* A serological study on Brucella abortus, caprine-encephalitis vírus and Leptospira in dairy goats in Rio de Janeiro, Brazil. *The Veter Jorn*, n.173, p.408-412, 2007.

LIMA, C.C.V.; SOUZA, T.S.; MARTINEZ, P.M.; *et al.* Prevalência sorológica da artrite-encefalite caprina em rebanhos caprinos do município de Juazeiro – Bahia, Brasil. In: ANAIS DO VII CONGRESSO BRASILEIRO DE BUIATRIA, 2009, p. 551-556.

LIMA, C.C.V.; COSTA, J.N.; SOUZA, T.S.; *et al.* Inquérito soroepidemiológico do lentivírus caprino e perfil das criações de caprinos na região do Baixo Médio São Francisco (BA). *Arq Inst Biol*, v. 80, p. 288-296, 2013.

MACHADO, R.; SIMPLÍCIO, A. Inseminação artificial em caprinos no Brasil: estágio atual. *Vet Bras Rep Anim*, v.19, p. 61-72, 1995.

MACHADO, T.M.M. História das raças caprinas no Brasil. p. 27-74, 2011. In: Produção de caprinos e ovinos de leite, Embrapa Caprinos e Ovinos.

MADRUGA, C.R.; ARAÚJO, F.R.; SOARES, C.O. Imunodiagnóstico em Medicina Veterinária. Campo Grande: Embrapa Gado de Corte, 2001, 360p.

MADUREIRA, K.M.; GOMES; V. Prevalência da artrite encefalite caprina (CAE) em propriedades leiteiras do Estado de São Paulo. *Rev. Ciênc. Vet.*, v.5, n. 5, p. 86-90, 2007.

MARTINS, G.; LILENBAUM, W. Possible effect of association with cooperatives in the control of caprine arthritis-encephalites in Rio de Janeiro, Brazil. *Vet Record*, v.15, p. 169, 2011.

MARTINEZ, P.M.; COSTA, J.N.; SOUZA, T.S, *et al.* Prevalência sorológica de maesi-visna em rebanhos ovinos da Microrregião de Juazeiro – Bahia, por meio do teste de imunodifusão em agar gel. *Cienc Na Bra*, p. 12, 2011.

MARTÍNEZ-NAVALÓN, B.; PERIS, C.; GÓMEZ, E.A.; *et al.* Quantitative estimation of the impact caprine arthritis encephalitis virus infection on milk production by dairy goats. *The Vet Journ*, v.197, p. 311-317, 2013.

MCCONNELL, I.; PETERHANS, E.; ZANONI, R.G. Concordance with reference sera of a recombinant protein Elisa for maedi-visna antibody detection. *Vet Res*, v. 142, p. 431-433, 1998.

MELO, A.C.M. e 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. *Cienc Rur*, v.27, p. 113-117, 1997.

MOOJEN, V.; SOARES, H.C.; RAVAZZOLO, A.P.; *et al.* Evidência de infecção pelo Lentivírus (maedi/visna e artrite encefalite caprina) em caprinos no Rio Grande do Sul, Brasil. *Arq Facul Med Vet.*, v.14, p.77-78, 1986.

MSELLI-LAKHAL, L.; GUIGUEN, F.; FORNAZERO, C.; *et al.* Goat milk epithelial cells are highly permissive to CAEV infection in vitro. *Virology*. v. 259, n. 1, p. 67- 73, 1999.

MURPHY, B.G.; HOTZEL, I.; JASMER, D.P.; *et al.* TNFalpha and GM-CSF-induced activation of the CAEV promoter is independent of AP-1. *Virology*, v. 352, p.188–199, 2006.

MUSSI, J.M.S. Dissertação de mestrado. Perfil das propriedades comerciais com caprinos em Minas Gerais e sua relação com a soroprevalência do lentivírus de pequenos rumimantes. Universidade Federal de Minas Gerais – UFMG, Minas Gerais, 83 p, 2014.

NARAYAN, O.; KENNEDY-STOSKOPF, S.; SHEFFER D.; *et al.* Activation of caprine arthritis-encephalitis virus expression during maturation of monocytes to macrophages. *Infect. Immun*, v. 41, n. 1, p. 67-73, 1983.

NARAYAN, O.; KENENEDY-STOSKOPF, S.; ZINK, M.C. Lentivirusl-Host Interactions: Lessons from Visna and Caprine Arthritis-Encephalitis Viruses. *Ann Neurol*, v. 23, p. 95- S100, 1988.

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

NASCIMENTO, P.M.P. Dissertação de mestrado. Indução de estro sincronizado em cabras da raça Toggenburg com protocolos de curta, média e longa duração durante o anestro estacional e acasalamento natural. Universidade Federal Fluminense – UFF, Rio de Janeiro, 85 p, 2009.

NEIGHBOUR, P.A. Studies on the susceptibility of the mouse preimplantation embryo to infection with cytomegalovirus. *J. Reprod. Fertil*, v.54, p. 15–20, 1978.

NEVES, J.P.; NUNES, J.F.; MORAES, J.C.F; *et al.* Inseminação artificial em pequenos ruminantes. In: GONÇALVES, P.B.D.; FIGUEIREDO, J.R.; FREITAS, V.J.F. Biotécnicas aplicadas à reprodução animal. 2ª ed. São Paulo: Ed. Roca. 395p, 2008.

PAULA, R.N.O.; ANDRIOLI, A.; CARDOSO, J.F.S.; *et al.* Profile of the Caprine arthritis-encephalitis virus (CAEV) in blood, semen from bucks naturally and experimentally infected in the semi-arid region of Brazil. *Sm Rum Res*, v.85, p. 27-33, 2009.

- PENIDO, A.O.; De CLEARK, K.; HAEGEMAN, A.; *et al.* Failure to remove Bluetongue Serotype 8 (BTV-8) from in vitro proced bovine embryos. *Reprod Fertil. Dev.* Vol 26, 66, 2014.
- PEREIRA, R.J.T.A.; SOHNREY, B.; HOLTZ, W. Nonsurgical embryo collection in goats treated with prostaglandin F2-alpha and oxytocin. *J Anim Sci*, v.76, p.360-363, 1998.
- PERETZ, G.; ASSO, J.; DEVILLECJAISE, P. Le CAEV: Revue des connaissances actuelles et conséquences pratiques. *Rev Méd Vét*, v. 144, p. 93 – 98, 1993.
- Perk K. Characteristics of Ovine and Caprine Lentivirus Infections. *Leukemia*, v.9, p.98-100, 1995.
- PETERHANS, E.; GREENLAND, T.; BADIOLA, J.J.; *et al.* Routes of the transmission and consequences of small ruminant lentiviruses (SRLs) infection and eradication schemes. *Vet Resea*, v. 35, p. 257-274, 2004.
- PETERSON, K.; BRINKNHOF, J.; HOUWERS, D.; *et al.* Presence of pro-lentiviral DNA in male sexual organs and ejaculates of small ruminants. *Theriogenology*, v. 69, p. 433-442, 2008.
- PHELPS, S.L.; SMITH, M. Caprine arthritis-encephalitis virus infection. *J. Am. Vet. Med. Assoc.*, v. 203, p. 1663-1666, 1993.
- PINHEIRO, R.R.; GOUVEIA, A.M.G.; ALVES, F.S.F. Prevalência da infecção pelo vírus da artrite encefalite caprina no estado do Ceará, Brasil. *Cienc Rural*, v.31, p. 449-454, 2001.
- PINHEIRO, R.R.; ANDRIOLI, A.; GOUVEIA, A.M.G.; *et al.* Avaliação de antígenos para odiagnóstico de lentivírus em rebanhos caprino sob programa de controle. *Arq Inst Biol*, v. 77, p. 133 – 137, 2010.
- RAVAZOLLO, A.P.; COSTA, U. *Retroviridae*. In: Eduardo Furtado Flores Cap. 31, Virologia Veterinária. 2ª ed. Santa Maria: editora UFSM, 2007, cap. 31, p. 811 – 819.
- REINA, R.; BERRIATUA, E.; LUJÁN, L.; *et al.* Prevention strategies against small ruminant lentiviruses. *The Vet J*, v. 182, p. 31 – 37, 2009.
- RÊGO, W.M.F.; PAULA, N.R.O.; DINIZ, B.L.M. *et al.* Soroprevalência do vírus da artrite encefalite caprina (CAEV) nas cidades de Itaueira, Floriano, São Francisco do Piauí e São José do Peixe, no sul do estado do Piauí. XXI SEMANA DE IC DO SEMIÁRIDO, 2012. Teresina.
- RODRIGUES, A.S.; BRITO, R.L.L.; PINHEIRO, R.R.; *et al.* Padronização do Elisa indireto e Western Blot para diagnóstico da artrite-encefalite caprina. *Arq Bras Med Vet Zoo*, v. 66, p. 417 – 424, 2014.
- ROWE, J.D.; VAN HOSOOSEAR, K.; EAST, N.; *et al.* The presence of caprine arthritisencephalitis virus proviral DNA in postpartum genital secretion of dairy goat does. In: PROCEEDINGS OF THE 26th WORLD VETERINARY CONGRESS, WVA. Sept 23-26; Lyon, France, 1993.

SAMPAIO JÚNIOR, A.; BATISTA, M.C.S.; CRUZ, M.S.P. *et al.* Prevalência da infecção por lentivírus de pequenos ruminantes em caprinos em Teresina, Piauí. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.*, v.63, n.3, p.757-760, 2011.

SANNA, E.; SANNA, M. P.; VITALI, C. G.; *et al.* Proviral DNA in the brains of goats infected with caprine arthritis-encephalitis virus. *Jour of Comp Path.* v. 121, n. 3, p. 271-276, 1999.

SENAR – CNA Brasil. Evolução da caprino e ovinocultura. Ativos ovinos e caprinos, ano 1, ed 1, 2014.

SILVA, J.B.A.; NETO, C.F.; DANTAS, M.I.C.; *et al.* Presença da artrite-encefalite caprina em rebanhos da microrregião de angicos no estado do Rio Grande do Norte. *Cien Na*, v.53, p. 53-56, 2005.

SILVA, H.W.; GUIMARÃES, C.R.B.; OLIVEIRA, T.S. Aspectos da exploração da caprinocultura leiteira no Brasil. *RBAS*, v.2, n. 2, p.121-125, 2012.

SILVA, M.L.C.R; CASTRO, R.S.; MAIA, R.C. *et al.* Lentivírus em caprinos leiteiros do semiárido paraibano: prevalência de anticorpos, fatores de risco e detecção molecular. *Pesqui Vet Bras*, v.33, n.4, p.453-458, 2013.

SOBRINHO, P.A.M.; RAMOS, T.R.R.; FERNANDES, C. H. C. *et al.* Prevalência e fatores associados à infecção por lentivírus de pequenos ruminantes em caprinos no estado do Tocantins. *Ciênc Anim Bras*, v. 11, n. 1, p. 117-124, 2010.

SOLANO, R. F.; MARTO, R.; PEREIRA, H.S. Inseminação artificial em cabras: Avaliação da colocação do sêmen. *Rev Bras Reprod An*, v. 23, p. 365-67, 1999.

SOUZA, K.C.; PINHEIRO, R.R.; SANTOS, D.O.; *et al.* Transmission of the caprine arthritis-encephalitis vírus through artificial insemination. *Sm Rum Res*, v. 109, p. 193-198, 2013.

STRINGFELLOW, D.A. e SEIDEL, S.M. Manual da International Embryo Transfer Society. Savoy: IETS, 3 ed, 1998.

STRINGFELLOW, D.A.; GIVENS, M.D. Infectious agents in bovine embryo production: Hazards and Solutions. *Theriogenology*, v. 53, p. 85-94, 2000.

TRALDI, A.S. Tópicos em reprodução e I.A. em caprinos – Manual técnico, USP, São Paulo 1994.

TRAVASSOS, C.E.; BENOIT, S.; VALAS, S.; DA SILVA, A.G.; PERRIN, G. Caprine arthritis-encephalitis vírus in sêmen of naturally infected bucks. *Small Rur Res*, v.32, p.101-106, 1999.

VAREA, R.; MONLEON, E.; PACHECO, C. Early detection of maedi-visna (ovine progressive pneumonia) virus seroconversion in field sheep samples. *J Vet Diag Invest*, v. 13, p. 301-307, 2001.

VANROOSE, G.; NAUWYNCK, H.; VAN SOOM, A.; *et al.* Replication of cytopathic and noncytopathic bovine viral diarrhea virus in zona-free and zona-intact in vitro-produced bovine embryos and the effect on embryo quality. *Biol. Reprod.* v.58, p. 857–866, 1998.

VANROOSE, G.; NAUWYNCK, H.; SOOM, A.V.; *et al.* Structural aspects of the zona pellucida of in vitro-produced bovine embryos: a scanning electron and confocal laser scanning microscopic study. *Biol of Reprod*, v. 62, p. 463-469, 2000.

VESCHI, J.L.; MARTINS, R.J.; ZAFALON, L.F.; *et al.* Soroprevalência da CAE em caprinos leiteiros do território do Sisal, Bahia. II ENDESA – Encontro Nacional de Defesa Sanitária Animal. In: CRMV-SP, p. 32, 2011.

VIANA, J.H.M.; CAMARGO, L.S.A. A produção de embriões bovinos no Brasil: uma nova realidade. *Acta Scie Vet*, v.3, p.915-924, 2007.

VINICIUS, M.A.S.; SALABERRY, S.R.S.; PINHEIRO, R.R.; *et al.* Ocorrência da infecção pelo vírus da artrite encefalite caprina em Patos de Minas, Minas Gerais, Brasil. 2009. Porto Seguro, BA. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE MEDICINA ETERINÁRIA, Porto Seguro, BA, p.36.

YORINORI, E.H.; PINHEIRO, R.R.; GOUVEIA, A.M.G.; *et al.* Estudo epidemiológico da artrite encefalite caprina nas regiões norte e nordeste de Minas Gerais. *Rev Univ Rur*, v. 23, p. 259-260, 2003.

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

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

CAPÍTULO I

Ocorrência do vírus da artrite encefalite caprina (CAEV) em propriedades leiteiras do estado de Minas Gerais, Brasil

Nascimento-Penido, P.M.P.; Penido, A.O.; Galinari, G.C.F.; Leite, R.C.

RESUMO

Objetivou-se no presente estudo identificar a ocorrência de infecção pelo vírus da artrite encefalite caprina (CAEV) em propriedades produtoras de leite caprino com sistema intensivo no estado de Minas Gerais. Foram avaliadas cinco propriedades, localizadas em cidades distintas, totalizando 1072 animais, sendo 48 machos e 1024 fêmeas de diferentes faixas etárias, das raças Toggenburg, Alpina e Saanen. O método de diagnóstico utilizado foi o de imunodifusão em ágar gel (IDGA), para detecção de anticorpos anti-CAEV, por ser o diagnóstico preconizado pela OIE medidas estratégias sanitárias para o controle da CAE, como a realização de exames roti. A ocorrência de anticorpos anti-CAEV nas propriedades estudadas foi de 49,5% (531/1072), entretanto a mesma variou de acordo com a propriedade. Foram observados os seguintes resultados por propriedade: propriedade 1 - 69,6% (156/224); propriedade 2 - 41,5% (47/113); propriedade 3 - 40,3% (63/156); propriedade 4 - 24,6% (18/73) e propriedade 5 - 48,8% (247/506). Do total de machos avaliados, 14,5% (7/48) apresentaram sorologia positiva. De acordo com os resultados, uma alta ocorrência de animais soropositivos foi identificada no estado de Minas Gerais, o qual possui um dos maiores rebanhos de cabras leiteiras do Brasil. Portanto, salienta-se a necessidade de se adotar neiros nas propriedades e a separação de animais infectados dos sadios. A exclusão de reprodutores positivos nas propriedades também é uma medida de controle, pois já foi demonstrado que estes são uma via de transmissão importante.

ABSTRACT

The objective of the present study was to identify the occurrence of caprine arthritis encephalitis virus (CAEV) infection in dairy goat farms with intensive system in Minas Gerais State. Five properties were evaluated, totaling 1072 animals, being 48 males and 1024 females of different ages and breeds (Toggenburg, Saanen and Alpine). The diagnostic method used was the agar gel

immunodiffusion (AGID) test, to detect antibodies anti-CAEV, which is the diagnostic test recommended by OIE. The occurrence of anti-CAEV antibodies in the properties was 49.5% (531/1072). The anti-CAEV antibodies detection varied according to the property: property 1 - 69.6% (156/224); property 2 - 41.5% (47/113); property 3 - 40.3% (63/156); property 4 - 24.6% (18/73) and property 5 - 48.8% (247/506). Of the total sampled males, 14.5% (7/48) were serologically positive. According to the results, there is a high occurrence rate of CAEV-seropositive animals in Minas Gerais, which has one of the largest Brazilian dairy goat herds. Therefore, it is essential to adopt strategies for CAE control, such as a routine of diagnostics tests in the properties and the separation of healthy from infected goats. The elimination of positive breeding animals in the properties is also a measure of control because it has been shown that these are an important route of CAEV transmission in dairy farms.

1. INTRODUÇÃO

O vírus da artrite encefalite caprina (CAEV) é um *Lentivírus*, pertencente à subfamília *Orthoretroviridae* e família *Retroviridae* (International Committee on Taxonomy of Viruses, 2013). O vírus causa uma doença crônica de evolução lenta com sinais clínicos variados. Em animais jovens, a encefalomielite é o principal sinal. Já em animais adultos observa-se o aumento de volume das articulações, principalmente do carpo, pneumonia intersticial crônica e mamites severas com perda de peso progressiva e diminuição da produção leiteira (Cork e Narayan, 1980).

A principal via de transmissão do CAEV nos animais ocorre principalmente durante os primeiros meses de vida, pela ingestão de leite ou colostro de cabras infectadas (Gouveia *et al.*, 1994). Contudo, a introdução de fêmeas infectadas nos rebanhos (Lima, 2013); a utilização de tatuadores sem desinfecção prévia; a deficiência na higienização das ordenhadeiras; a reutilização de material descartável (Gouveia *et al.*, 2009); a presença de gametas (Lamara *et al.*, 2001; Paula *et al.*, 2009) e/ou embriões (Lamara *et al.*, 2002) infectados, também são potenciais disseminadores da doença, bem como o sistema de manejo empregado. Mussi (2014) descreveu que a maioria dos sistemas de produção de leite no estado de Minas Gerais é do tipo intensivo confinado, o que pode favorecer a transmissão de agentes infecciosos, como o CAEV, pelo íntimo contato entre os animais.

Poucos são os estudos referentes as perdas econômicas causadas pela CAE. Entretanto Peterhans *et al.* (2004) descreveram pode haver uma diminuição de 10%, aproximadamente. A queda na produção de leite ocorre devido à inflamação da glândula mamária, levando a uma redução na função do alvéolo mamário e lise de vários componentes do leite (Leitner *et al.*, 2004).

Estudos soropidemiológicos demonstram que o CAEV está disseminado em muitos estados do território nacional (Almeida *et al.*, 2001; Pinheiro *et al.*, 2001; Yorinori *et al.*, 2003; Lara *et al.*, 2005; Silva *et al.*, 2005; Lilenbaum *et al.*, 2007; Bandeira *et al.*, 2009; Lima *et al.*, 2009; Vinicius *et al.*, 2009; Sobrinho *et al.*, 2010; Lara *et al.*, 2011; Lima *et al.*, 2011; Martins e Lilenbaum, 2011; Sampaio Junior *et al.*, 2011; Rêgo *et al.*, 2011; Veschi *et al.*, 2011; Lima *et al.*, 2013). Entretanto, a grande maioria destes estudos está concentrada na região nordeste do país, onde está a maior população caprina do Brasil, sendo 50% desta concentrada nos estados da Bahia e Pernambuco (IBGE, 2012).

De acordo com pesquisas realizadas pelo IBGE (2012) no estado de Minas Gerais, houve aumento na população caprina leiteira, o que, conseqüentemente, enfatiza a importância de estudos sobre ocorrência do CAEV nas propriedades. Portanto, o objetivo do presente trabalho foi identificar a ocorrência de animais soropositivos para CAEV em propriedades produtoras de leite caprino, com sistema de criação intensivo confinado, no estado de Minas Gerais.

2. MATERIAL E MÉTODOS

Foram analisadas amostras de soro de 1072 animais, sendo 1024 fêmeas com idade entre seis meses e nove anos e 48 machos na mesma faixa etária, das raças Saanen, Alpina e Toggenburg, nos anos de 2012 e 2013. Os animais encontravam-se em cinco propriedades com sistema de criação intensivo confinado, estando localizadas em três regiões produtoras de leite distintas no estado de Minas Gerais, sendo selecionadas por serem as propriedades maiores e mais tradicionais na produção leiteira caprina. As cinco propriedades utilizavam pelo menos uma estratégia de controle para a CAE (tabela 1).

As fêmeas eram mantidas em sistema intensivo confinado de produção e separadas de acordo com o “status” de produção (pluríparas lactantes, pluríparas não lactantes e nulíparas), assim como os reprodutores.

Tabela 1. Medidas estratégicas para controle da CAE adotadas nas propriedades.

Prop.	Medidas de controle					
	Separação por idade	*Linha de ordenha	**Tratamento térmico	Mamadeira individual	****Diag. sorológico	****MN
1	-	-	-	-	-	-
2	-	-	+	-	-	-
3	+	-	-	-	-	-
4	+	+	+	+	+	+
5	-	-	+	-	-	+

Prop: Propriedade.

*Linha de ordenha e higienização correta do equipamento utilizado

**Tratamento térmico do leite e colostro.

***Diagnóstico sorológico realizado a cada seis meses.

****Monta natural com reprodutores negativos para CAEV.

O sangue foi coletado em tubos de 10 mL, através de venopunção da jugular externa com o auxílio do sistema Vacutainer[®] sem EDTA, após prévia limpeza da região com algodão embebido em álcool 70%. Logo após a coleta, o sangue foi centrifugado (1200 xg/ 10 min) e os soros oriundos das amostras foram armazenados em microtubos de 1,5 mL e mantidos congelados (-20° C) até o momento da realização do diagnóstico sorológico.

O diagnóstico utilizado foi o teste de imunodifusão em ágar gel (IDGA) comercial (Biovetech[®], Recife – Brasil). As amostras de soro foram distribuídas em três poços alternados no volume de 30µL. Em outros três poços, também alternados, adicionou-se os soros controles, no volume de 10 µL e no centro da roseta, o antígeno foi adicionado. A primeira leitura foi realizada após 48 horas de incubação e foi confirmada após 72 horas de incubação, com o auxílio de luz artificial proveniente de uma câmara escura. Foram considerados positivos os soros que formaram uma linha de precipitação (linha de identidade) nas regiões de contato antígeno-anticorpo.

O método de análise estatística utilizado foi o Teste de Fisher (p<0,05).

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Todas as propriedades possuíam histórico da doença e alguns animais demonstravam sinais clínicos sugestivos de CAE, como aumento da região do carpo e nódulos nas glândulas mamárias, relacionados com quadros de artrite e mamite.

A ocorrência de animais com anticorpos anti-CAEV nas cinco propriedades avaliadas foi de 49,5% (531/1072), em animais de idades entre seis meses a nove anos de idade. Esta ocorrência é superior à demonstrada pela literatura consultada: Almeida *et al.*, 2001 – 13,4% (215/1605); Pinheiro *et al.*, 2001- 1% (40/4019); Yorinori *et al.*, 2003 – 0,3% (4/1294); Lara *et al.*, 2005 - 15,5% (30/199); Silva *et al.*, 2005 – 2,71% (5/184) ; Lilenbaum *et al.*, 2007 – 14,2% (79/541); Madureira *et al.* 2007 – 34,9% (96/275); Bandeira *et al.*, 2009 – 14,5% (87/600); Lima *et al.*, 2009 – 0,1% (0/150); Vinicius *et al.*, 2009 – 22,8% (13/57); Sobrinho *et al.*, 2010 – 2,7% (23/843); Lara *et al.*, 2011 – 15,5% (30/199); Lima *et al.*, 2011 - 0,87% (6/693); Sampaio Junior *et al.*, 2011 – 4,2% (20/480); Rêgo *et al.*, 2011 - 0,97% (7/723); Veschi *et al.*, 2011 - 12,05% (135/1120); Lima *et al.*, 2013 - 0,29% (2/663). Todos os trabalhos citados utilizaram o IDGA como método de diagnóstico, porém, a maioria refere-se a sistemas de produção extensivo ou semi-intensivo, diferindo das propriedades avaliadas no presente estudo.

Os resultados obtidos no presente estudo demonstraram que a ocorrência de animais soropositivos para CAEV é elevada em criações de caprinos leiteiros criados em sistema de produção intensivo confinado no Estado de Minas Gerais. Entretanto, a ocorrência da soropositividade variou de acordo com a propriedade: propriedade 1 – 69,6% (156/224); propriedade 2 – 41,5% (47/113); propriedade 3 - 40,3% (63/156); propriedade 4 – 24,6% (18/73) e propriedade 5 – 48,8% (247/506) (figura 1). A ocorrência de animais soropositivos para CAEV na propriedade 1 diferiu ($p < 0,05$) das propriedades 2, 3, 4 e 5, assim como a ocorrência de animais soropositivos para CAEV na propriedade 4 diferiu estatisticamente ($p < 0,05$) das propriedades 2, 3 e 5, de acordo com o Teste de Fisher.

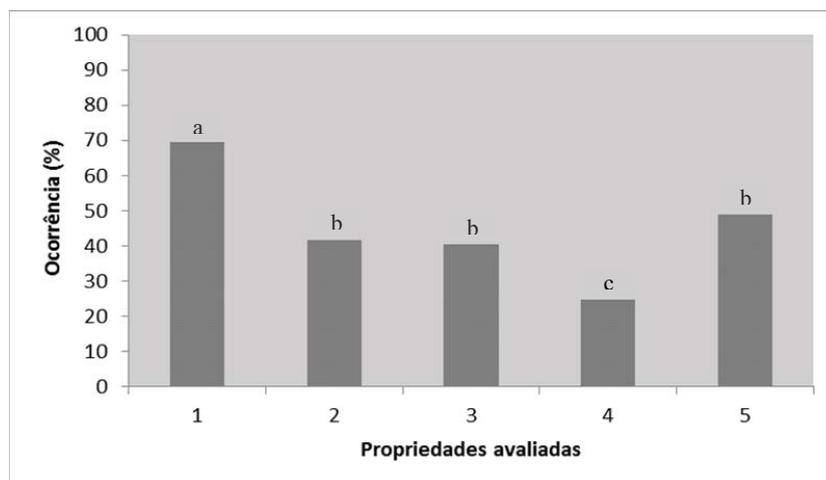


Figura 1. Ocorrência de animais soropositivos para CAEV em propriedades produtoras de leite caprino no Estado de Minas Gerais (letras diferentes, diferem-se entre si ($p < 0,05$)).

Os estudos realizados no estado de Minas Gerais, demonstraram uma baixa ocorrência quando comparado com os resultados no presente estudo: Yorinori *et al.*, 2003 (0,3% - 4/1294) e Vinicius *et al.*, 2009 (22,8% - 13/57). Entretanto, ambos trabalhos utilizaram animais sem raça definida e em sistema extensivo de criação.

A prevalência do CAEV é mais alta em animais puros do que em animais mestiços ou sem raça definida (Melo e Franke, 1997; Almeida *et al.*, 2001; Sampaio Junior *et al.*, 2011), bem como em sistema intensivo confinado. Este tipo de sistema funciona como um dos fatores que aumentam a frequência de infecção dos animais, devido ao estreito contato entre os animais em rebanhos leiteiros com criação intensiva confinada (Yorinori *et al.*, 2003; Lima *et al.*, 2013; Mussi, 2014). Esse fato pode explicar essa divergência nos resultados, uma vez que todas as propriedades avaliadas possuíam sistema intensivo confinado e todos os animais eram puros. Martins e Lilenbaum (2011) ao trabalharem com animais puros criados em um sistema de criação intensivo confinado, obtiveram uma ocorrência de 40,73% (101/248) no Estado do Rio de Janeiro, dados mais próximos aos encontrados neste estudo.

Sinais clínicos relacionados à doença, como aumento do carpo causando problemas de locomoção dos animais, mamites severas com nodulações nas glândulas mamárias e pneumonias com secreções purulentas foram observadas em todas as propriedades, entretanto esses achados não foram avaliados isoladamente.

O diagnóstico sorológico deve ser empregado a cada seis meses, afim de identificar os animais positivos e separá-los do restante do rebanho, ou mesmo eliminá-los (Pinheiro *et al.*, 2001). Esta não é uma estratégia empregada pela maioria dos produtores. Apenas a propriedade 4 realizava este tipo de diagnóstico e empregava o tratamento térmico do leite e colostro oferecidos aos recém nascidos em mamadeiras individualizadas (tabela 1). A separação dos animais positivos e por idade também eram estratégias utilizadas, podendo justificar a menor ocorrência de animais soropositivos (24,6%) nesta propriedade, entre as cinco avaliadas.

As propriedades 1, 2, 3, e 5 empregavam algum tipo de estratégia de controle da CAE isoladamente ou às vezes duas estratégias, tais como: separação dos animais por idade; ou tratamento térmico do leite; ou banco de colostro; ou linha de ordenha para animais com sinais clínicos; e higienização das ordenhadeiras (tabela 1). Por outro lado, todas elas reutilizavam materiais descartáveis e não higienizavam os tatuadores, demonstrando a necessidade de adoção de medidas de controle e prevenção para a doença.

Do total de machos avaliados, 14,5% (7/48) apresentaram sorologia positiva para CAEV. O CAEV é liberado no sêmen de forma intermitente (Cruz *et al.*, 2009) e independentemente da época em que ocorre a soroconversão (Paula *et al.*, 2009), sendo uma provável fonte de transmissão do vírus. A monta natural e a inseminação artificial eram empregadas nas propriedades 1, 2, 3 e 5. Porém, não era feito o diagnóstico para CAE nos reprodutores utilizados, os quais eram do próprio rebanho ou muitas vezes eram oriundos de empréstimos de reprodutores entre produtores, com o objetivo de melhorar a genética. Somente a propriedade 4 utilizava a inseminação artificial e monta natural com reprodutores soronegativos para CAEV.

A desinformação dos produtores em relação à CAE e às vias de transmissão da mesma, assim como a falta de técnicos qualificados para a implementação de medidas estratégicas de prevenção e controle da doença são fatores determinantes para o insucesso de um programa de controle sanitário da CAE.

A alta ocorrência da CAE em sistemas de produção de leite caprino tem um impacto negativo, afetando em até 10% a produção leiteira (Peterhans *et al.*, 2004). Logo, é de extrema importância que estratégias de prevenção e controle sejam implementadas nos rebanhos, tais como: testes sorológicos a cada seis meses, com a separação de animais positivos e negativos; tratamento térmico do leite oferecido aos recém nascidos e banco de colostro oriundo de cabras

comprovadamente negativas; desinfecção de utensílios comuns, como tatuadores e teteiras das ordenhas; inutilização de materiais descartáveis; utilização de reprodutores negativos em cabras negativas e a utilização da inseminação artificial em cabras positivas.

4. CONCLUSÃO

No presente trabalho, uma alta ocorrência de animais soropositivos para CAEV em rebanhos caprinos leiteiros que utilizavam sistema de produção intensivo confinado no Estado de Minas Gerais foi observada, o que pode ter um impacto negativo direto na produção leiteira, podendo causar grandes perdas econômicas. Desta forma, salienta-se a necessidade de implementação de programas de controle e prevenção da doença.

AGRADECIMENTOS

Gostaríamos de agradecer ao CNPq pelo financiamento do projeto (553989/2010-4); INCT Pecuária pelo apoio durante toda a realização do estudo e aos proprietários que nos permitiram coletar as amostras sanguíneas.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALMEIDA, M.G.A.R.; ANUNCIACÃO, A.V.M.; MARTINEZ, T.C.N., *et al.* Dados sorológicos sobre a presença e distribuição da artrite-encefalite caprina (CAE) no Estado da Bahia. *Ver Bras Saude Prod Na*, v.3, p. 78-83, 2001.

BANDEIRA, D.A.; CASTRO, R.S.; AZEVEDO, E.O.; *et al.* Seroprevalence of caprine arthritis-encephalitis virus in goats in the Cariri region, Paraíba state, Brazil. *The Vet J*, v.180, p. 399-401, 2009.

CORK, L.C. e NARAYAN, O. The pathogenesis of viral leukoencephalomyelitis-arthritis of goats. *Labo Invest*, v. 42, p. 596 – 602, 1980.

CRUZ, J. C. M.; Gouveia, A.M.G.; *et al.* Caprine arthritis-encephalitis virus (CAEV) detection in semen of endangered goat breeds by nested polymerase chain reaction. *Sm Rumin Res*, v. 85, p. 149-152, 2009.

GOUVEIA, A.M.G., SANTA ROSA J.; PINHEIRO, R.R. *et al.* Implantação de um programa de controle da CAEV em sistemas epidemiológicos distintos. In: ANAIS DO 23º CONGRESSO BRASILEIRO DE MEDICINA VETERINÁRIA, 1994, Recife. Recife, PE: SPEMVE; 1994. p.102.

- GOUVEIA, A.M.G.; GIMARÃES, A.S; HADDAD, J.P.A; *et al.* Características zoossanitárias da caprinocultura leiteira em Minas Gerais, Brasil. <<http://www.accomig.com.br>>, 2009.
- INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA - IBGE. Produção da Pecuária Municipal, 68p, v. 40, 2012.
- INTERNATIONAL COMMITTEE ON TAXONOMY OF VIRUSES – ICTV. <[online.prg/ virus Taxonomy.asp](http://online.prg/virus/Taxonomy.asp)> acesso em 08 de janeiro de 2015.
- LAMARA A.; FIENI, F.; CHEBLOUNE, Y., *et al.* Efficient replication of caprine arthritis encephalitis virus in goat granulosa cells. *Virus Res*, v. 1201; p. 165–72, 2001.
- LAMARA, A.; FIENI, F.; MSELLI-LAKAL, L.; *et al.* Early embryonic cells from in vivo-produced goat embryos transmit the caprine arthritis-encephalitis virus (CAEV). *Theriogenology*, v. 58, p. 1153–1163, 2002.
- LARA, M.C.C.S.H; BIRGEL JUNIOR, E.H.; GREGORY, L. Aspectos clínicos da artrite-encefalite dos caprinos. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.*, v.57, p. 737-740, 2005.
- LARA, M.C.C.S.H.; VILLALOBOS, E.M.C.; CUNHA, E.M.S.; *et al.* Inquérito sorológico de lentivíroses de pequenos ruminantes (Maedi-Visna e artrite-encefalite caprina) no estado de São Paulo. *Braz. J Vet Res Ani Sci*, v. 50, p. 18-25, 2011.
- LEITNER, G.; MERIN, U.; SILANIKONE, N.; *et al.* Effect of subclinical intramammary infection on somatic cells counts, NAGase activity and gross composition of goats milk. *Jour of Dair Resear*, v. 71, p. 311 – 315, 2004.
- LILENBAUM, W.; SOUZA, G.N.; RISTOW, P; *et al.* A serological study on *Brucella abortus*, caprine-encephalitis vírus and *Leptospira* in dairy goats in Rio de Janeiro, Brazil. *The Veter Jorn*, n.173, p.408-412, 2007.
- LIMA, C.C.V.; SOUZA, T.S.; MARTINEZ, P.M.; *et al.* Prevalência sorológica da artrite-encefalite caprina em rebanhos caprinos do município de Juazeiro – Bahia, Brasil. In: ANAIS DO VII CONGRESSO BRASILEIRO DE BUIATRIA, 2009, p. 551-556.
- LIMA, C.C.V.; COSTA, T.N.; SOUZA, T.S.; *et al.* Seroepidemiological survey for *Brucella ovis* infection in sheep flocks of semi-arid region in Bahia State, Brazil. Goiás, Brasil. *Vet e Zoot*, v. 18, p. 697-700, 2011.
- LIMA, C.C.V.; COSTA, J.N.; SOUZA, T.S.; *et al.* Inquérito sorológico do lentivírus caprino e perfil das criações de caprinos na região do Baixo Médio São Francisco (BA). *Arq Inst Biol*, v. 80, p. 288-296, 2013.

- MARTINS, G.; LILENBAUM, W. Possible effect of cooperatives in the control of caprine arthritis-encephalitis in Rio de Janeiro, Brazil. *Vet Recor*, v. 9, p. 169, 2011.
- MELO, A.C.M. e 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. *Cienc Rur*, v.27, p. 113-117, 1997.
- MUSSI, J.M.S. Dissertação de mestrado. Perfil das propriedades comerciais com caprinos em Minas Gerais e sua relação com a soroprevalência do lentivírus de pequenos ruminantes. Universidade Federal de Minas Gerais – UFMG, Minas Gerais, 83 p, 2014.
- PAULA, N.R.O.; ANDRIOLI, A.; CARDOSO, J.F.S., *et al.* Profile of the caprine arthritis-encephalitis virus (CAEV) in blood, semen from bucks naturally and experimentally infected in the semi-arid region Brazil. *Sm Rum Res*, v. 85, p. 27-33, 2009.
- PETERHANS, E.; GREENLAND, T.; BADIOLA, J.J.; *et al.* Routes of the transmission and consequences of small ruminant lentiviruses (SRLs) infection and eradication schemes. *Vet Resea*, v. 35, p. 257-274, 2004.
- PINHEIRO, R.R.; GOUVEIA, A.M.G.; ALVES, F.S.F. Prevalência da infecção pelo vírus da artrite encefalite caprina no estado do Ceará, Brasil. *Cienc Rur*, v.31, p. 449-454, 2001.
- RÊGO, W.M.F.; PAULA, N.R.O.; DINIZ, B.L.M. Soroprevalência do vírus da artrite encefalite caprina (CAEV) nas cidades de Iatueira, Floriano, São Francisco do Piauí e São José do Peixe, no sul do Estado do Piauí. In: XXI SEMINÁRIO DE IC, 2011. Teresina, PI.
- SAMPAIO JÚNIOR, A.; BATISTA, M.C.S.; CRUZ, M.S.P. *et al.* Prevalência da infecção por lentivírus de pequenos ruminantes em caprinos em Teresina, Piauí. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.*, v.63, n.3, p.757-760, 2011.
- SILVA, J.S.; CASTRO, R.S.C.B.; MELO, C.B.; *et al.* Infecção pelo vírus da artrite encefalite caprina no Rio Grande do Norte. *Arq Bras Med Vet Zoo*, v. 57, p. 726-731, 2005.
- SOBRINHO, P.A.M.; RAMOS, T.R.R.; FERNANDES, C. H. C. *et al.* Prevalência e fatores associados à infecção por lentivírus de pequenos ruminantes em caprinos no estado do Tocantins. *Ciênc. Anim. Bras.*, v. 11, n. 1, p. 117-124, 2010.
- VESCHI, J.L.; MARTINS, R.J.; ZAFALON, L.F.; *et al.* Soroprevalência da CAE em caprinos leiteiros do território do Sisal, Bahia. II ENDESA – Encontro Nacional de Defesa Sanitária Animal. In: CRMV-SP, p. 32, 2011.
- VINICIUS, M.A.S.; SALABERRY, S.R.S.; PINHEIRO, R.R.; *et al.* Ocorrência da infecção pelo vírus da artrite encefalite caprina em Patos de Minas, Minas Gerais, Brasil. In: ANAIS DO CONGRESSO BRASILEIRO DE MEDICINA VETERINÁRIA, 2009, p. 36, Porto Seguro, BA.

YORINORI, E.H.; PINHEIRO, R.R.; GOUVEIA, A.M.G.; *et al.* Estudo epidemiológico da artrite encefalite caprina nas regiões norte e nordeste de Minas Gerais. *Rev Univ Rur*, v. 23, p. 259-260, 2003.

CAPÍTULO II

Detecção do vírus da artrite encefalite caprina (CAEV) no trato reprodutivo de cabras leiteiras naturalmente infectadas

Nascimento-Penido, P.M.P.; Fonseca, J.F.; Santos, G.B.; Prates, T.J.; Kassar, T.C.; Fideles, C.R.; Leite, R.C.

RESUMO

Objetivou-se avaliar a presença do vírus da CAE (DNA e RNA) em amostras oriundas de líquido do lavado uterino, embriões e tecidos uterino e ovariano de fêmeas caprinas leiteiras naturalmente infectadas. Oito cabras pluríparas, sorologicamente positivas no teste de “Western Blotting” foram selecionadas como doadoras de embriões. Durante as coletas embrionárias, todo o líquido proveniente foi recuperado e centrifugado (800 x g), o pellet identificado foi submetido a esfregaço e o restante do material uma parte foi adicionada a RNA later e outra congelada a -20° C. Os embriões recuperados através das lavagens transcervicais foram submetidos à punção de massa celular interna, com auxílio de micromanipulador e duas partes foram individualizadas, sendo: massa celular interna e zona pelúcida. Ao final do experimento quatro das cabras doadoras foram enviadas para o abatedouro, onde se recuperou o trato reprodutivo (vagina, cervix, útero e ovários). O material foi transportado em NaCl 0,9% à 35°C e processado no laboratório no período de até duas horas após o abate. Todas as amostras foram submetidas ao diagnóstico por PCR Nested. Os resultados não revelaram células do sistema imune no esfregaço do pellet, entretanto após a concentração viral foi possível identificar DNA pró-viral assim como RNA viral, demonstrando que o vírus estava presente no líquido do lavado. Os tecidos estudados também demonstraram-se positivos para a presença de pró-vírus e vírus, indicando que pode estar ocorrendo replicação viral no trato reprodutivo. Este fato demonstra que a via uterina poderia ser uma rota de transmissão do CAEV podendo gerar um impacto epidemiológico. Entretanto, os embriões oriundos deste meio, nas duas porções: zona pelúcida e massa celular interna não foram positivas para DNA ou RNA viral, o que confirma a capacidade de proteção da zona pelúcida nos mesmos. A lavagem transcervical demonstrou-se auxiliar na eliminação do vírus no trato reprodutivo, uma vez que a quantidade de líquido infundido ajuda na diluição do mesmo. Logo, pode-se sugerir que embriões

oriundos de cabras naturalmente infectadas, mesmo na presença de pró-vírus e vírus livre no lúmen uterino aparentemente não são permissivos a infecção pelo CAEV, devido à presença de zona pelúcida íntegra e que a lavagem transcervical é auxiliar na desinfecção dos mesmos.

ABSTRACT

The objective of the study was to evaluate the presence of the CAEV (DNA and RNA) in samples from the uterine lavage fluid, embryos and uterine and ovarian tissue of naturally infected dairy goats. Eight pluriparous goats, serologically positive in "Western blotting" test were selected as embryo donors. During embryonic collections from all liquid was recovered and centrifuged (800 x g), the identified pellet was subjected to smear staining and was added to one part and another RNA later frozen at -20 °C for pro -viral DNA and viral RNA extraction. Embryos recovered through the transcervical washes underwent inner cell mass puncture was performed by a micromanipulator and two parties were individualized, the inner cell mass and zona pellucida. At the end, four of the donor goats were sent to the slaughterhouse, where the reproductive tract (vagina cervix, uterus and ovaries) was recovered. The material was transported in 0.9% NaCl at 35 ° C and processed in the period up to two hours after slaughter. All samples were tested by nested PCR. Results showed no immune cells in the pellet. However, after viral concentration, proviral DNA and viral RNA were identified, demonstrating that the virus was present in the lavage fluid indicating viral replication in the reproductive tract might be occurring. This fact demonstrates that the uterus could be a route of transmission, which could have an epidemiological impact. However, the two parts: of the embryo the zona pellucida and inner cell mass did not demonstrated the expression of DNA or RNA, which confirms the protection of zone pellucida. The transcervical flushing is a potentially aid in the elimination of virus in the reproductive tract, due to the amount of liquid infused in the reproductive tract. Therefore, embryos derived from naturally infected goats, even with the presence of pro-virus and free virus in uterine lumen are apparently non-permissive to CAEV infection due to the presence of intact zone pellucida and transcervical flushing might disinfect them.

1. INTRODUÇÃO

O vírus da artrite encefalite caprina (CAEV) é um RNA vírus, do gênero *Lentivirus*, da família *Retroviridae* (Cork *et al.*, 1974) e causa em animais adultos artrites crônicas, pneumonia intersticial e mamites com a redução da produção leiteira (Cheevers *et al.*, 1988) e em em animais jovens, leucoencefalomielites (Cork *et al.*, 1974). A CAE possui tropismo por monócitos e macrófagos, conseqüentemente todas as excreções e secreções do corpo podem estar infectadas (Narayan *et al.*, 1993; Fieni *et al.*, 2003).

O controle da CAE baseia-se no teste sorológico dos animais, seguido de medidas de manejo que visam a separação entre mães e crias precocemente, acompanhada de alimentação artificial com colostro e leite tratados termicamente ou sucedâneos (Peretz *et al.*, 1993; EMBRAPA, 1994; Gouveia *et al.*, 1994; Rowe e East, 1997). Entretanto, com a propagação de genética de alto valor entre países, estados e cidades, a prevenção torna-se mais complexa, uma vez que a transferência de genética, seja por embriões ou gametas, pode ser uma via de transmissão, levando à disseminação do vírus (Leite *et al.*, 2013).

A principal via de transmissão do CAEV nos animais ocorre pela ingestão de leite ou colostro de cabras infectadas (Gouveia *et al.*, 1994). Contudo, a introdução de fêmeas infectadas nos rebanhos acelera a disseminação do vírus (Lima, 2013), assim como a transmissão venérea e contato com sangue de animais infectados (Brülisauer *et al.*, 2005). Nos últimos anos, muito se evoluiu em relação às biotecnologias da reprodução, seja na comercialização de sêmen para os programas de inseminação artificial ou na transferência de embriões *in vivo* e produção embrionária *in vitro*, gerando uma preocupação inerente à transmissão vertical via gametas e embriões (Leite *et al.*, 2013).

A infecção pelo CAEV em células do *cumulus* (Ali Al Ahmad, *et al.* 2005) e da granulosa (Lamara *et al.*, 2001) assim como oviduto uterino e lavado oriundo de coletas embrionárias (Fieni *et al.*, 2003; Lamara *et al.*, 2002), através da identificação do DNA pró-viral, já foi descrita por outros autores.

Células epiteliais do útero, também demonstraram-se susceptíveis à infecção pelo CAEV (Ali Al Ahmad *et al.*, 2012). Porém, a maioria dos estudos foram realizados com embriões e sêmen de sistemas de produção *in vitro* (Lechat *et al.*, 2005; Ali Al Ahmad *et al.*, 2006; Cruz *et al.*, 2009;

Ali Al Ahmad *et al.*, 2012; Fieni *et al.*, 2012), onde a carga viral para a infecção das estruturas é conhecida e normalmente alta, o que em animais naturalmente infectados é desconhecido.

Estudos relatando a produção de embriões de origem *in vivo* de animais naturalmente infectados no Brasil e a presença do vírus em animais oriundos de propriedades com sistemas intensivos de produção leiteira são escassas. Estes estudos são de extrema importância para a compreensão da distribuição viral no trato reprodutivo dos animais infectados, uma vez que não há a identificação do vírus no interior de embriões com zona pelúcida íntegra (Fieni, *et al.* 2002) ou oócitos (Ali Al Ahmad, *et al.* 2005).

Neste estudo, objetivou-se identificar a presença do CAEV na forma de DNA pró-viral e RNA no útero e ovário, bem como no líquido do lavado uterino e embriões (massa celular interna e zona pelúcida) provenientes de cabras naturalmente infectadas.

2. MATERIAL E MÉTODOS

Todos os procedimentos realizados neste estudo foram aprovados pelo Comitê de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal de Minas Gerais (CEUA) sob o protocolo de n. 09/2013 (Anexo 1).

2.1. LOCALIZAÇÃO E CONDIÇÕES EXPERIMENTAIS

O experimento foi realizado na Região da Zona da Mata Mineira, microrregião de Juiz de Fora, durante a estação de anestro estacional. A microrregião apresenta 21° 35' S (latitude), 43° 15' W (longitude), 435 metros de altitude e segundo a classificação de Köppen o clima da região é do tipo Cwa, caracterizado por invernos secos e verões chuvosos, temperatura média anual entre 18,0 °C a 23,0 °C e precipitação pluviométrica anual média de 1581mm³.

2.2. SELEÇÃO DOS ANIMAIS

Os animais foram selecionados segundo o diagnóstico sorológico de “Western Blotting” positivo para CAEV, disponibilizado pelo proprietário. O diagnóstico havia sido realizado dois meses antes do início do estudo.

Oito cabras da raça Toggenburg, com média de peso 56,4 ± 13,6Kg, escore da condição corporal 3,5 ECC ± 0,85 e idade de cinco a sete anos de idade foram selecionadas como doadoras de

embriões. As fêmeas foram mantidas em sistema intensivo confinado de produção, onde os mesmos recebiam concentrado comercial, silagem, feno e sal mineral no cocho e água *ad libitum*.

As fêmeas foram submetidas a exame clínico ginecológico e ultrassonografia para a confirmação da ausência de patologias uterinas e ovarianas. As fêmeas identificadas como positivas frente ao diagnóstico sorológico de “Western Blotting” e sem patologias no sistema reprodutivo foram inseridas no estudo.

Dois bodes da raça Toggenburg com idade de seis e sete anos, respectivamente, foram utilizados como reprodutores. Os mesmos foram considerados negativos para o CAEV, após a realização do diagnóstico de PCR – nested.

2.3. PROTOCOLO HORMONAL E ACASALAMENTO

As doadoras de embriões foram submetidas ao protocolo de sincronização e superovulação (ANEXO 2 – Protocolo 9). Vinte e quatro horas após a retirada das esponjas iniciou-se a detecção do estro, seguida do acasalamento por monta natural pelos machos, a cada 12 horas (duas vezes ao dia), até o momento em que as fêmeas não aceitassem mais a cópula. Após oito dias realizou-se a coleta embrionária por meio da técnica transcervical.

2.4. COLETA DE EMBRIÕES E RECUPERAÇÃO DE AMOSTRAS

Para a coleta de embriões foi utilizada a técnica de coleta transcervical, descrita por Fonseca *et al.* (2013). Os animais foram tranquilizados com acepromazina 1% (um mL/100kg) i.m. (Acepran, Vetnil, Louveira, Brasil) e realizou-se anestesia na região sacrococcígea (epidural) com lidocaína sem vasodilatador (dois mL/animal). Os mesmos foram mantidos em troncos próprios para contenção.

Os embriões recuperados das lavagens uterinas foram mantidos em meio “Holding” (Vitrocell Embriolife, Campinas, Brasil) e enviados para o laboratório de Reprodução Animal – Embrapa Gado de Leite, onde foi realizada a aspiração do material do interior da zona pelúcida (massa celular interna) com o auxílio de micromanipulador (Zeiss® - Axiovert 135M, Califórnia, EUA). Para evitar a contaminação da massa celular interna pela possível presença do vírus na zona pelúcida, após a retirada do material, o mesmo foi adicionado a uma segunda gota com meio específico para produção embrionária (Figura 1). Somente embriões com zona pelúcida íntegra foram aspirados.

Logo, foram identificadas duas amostras para cada pool de embrião, oriundo da mesma cabra (massa celular interna e zona pelúcida). Estes foram submergidos em RNA Later Stabilization Reagent (Qiagen, Hilden, Alemanha), na proporção de 1:10, afim de manter a integridade do vírus.

Embriões eclodidos também foram mantidos em RNA Later Stabilization Reagent (Qiagen, Hilden, Alemanha) até o momento da extração do DNA pró-viral e RNA viral e posterior realização de PCR Nested.

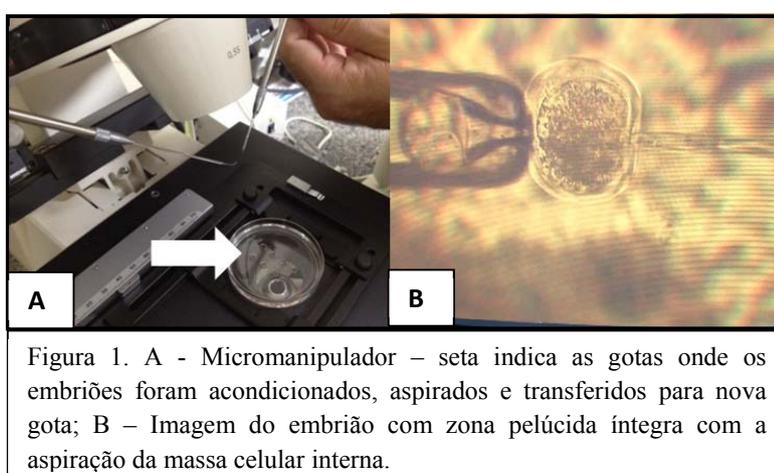


Figura 1. A - Micromanipulador – seta indica as gotas onde os embriões foram acondicionados, aspirados e transferidos para nova gota; B – Imagem do embrião com zona pelúcida íntegra com a aspiração da massa celular interna.

Durante as lavagens uterinas, todo o líquido oriundo da infusão foi recuperado em becker esterilizado e tampado, de modo que somente a ponta do filtro coletor permanecesse dentro do recipiente.

Logo após a coleta e seleção dos embriões, o líquido foi centrifugado em tubo tipo Falcon de 50 mL (800 x g/ 10 min). O líquido recuperado de dentro do filtro juntamente com células de descamação do endométrio, após à seleção embrionária, também foi adicionado ao tubo tipo Falcon e centrifugado. Subsequentemente à centrifugação, realizou-se esfregaço do pellet sobre lâmina comum e o mesmo corado com panótico rápido, com o objetivo de visualizar células do sistema imune que pudessem ser relacionadas com a presença do vírus. A leitura foi realizada em microscópio (Microscópio Óptico Leica® Microsystems – DM4000, Alemanha) no aumento de 400 x.

O restante do pellet foi dividido em duas partes: uma armazenada em microtubo a -20° C e a outra adicionada em RNA Later Stabilization Reagent (Qiagen, Hilden, Alemanha) (1:10) para posterior extração de genoma viral e pró-viral. O líquido uterino também foi armazenado -20° C e posteriormente realizou-se o protocolo de concentração viral (Anexo 2 – Protocolo 5).

Quatro dos oito animais submetidos às coletas embrionárias foram enviados ao abatedouro, seguindo-se as normas do abate humanitário. Recuperou-se o trato reprodutivo (vagina, cervix, útero e ovários) dos mesmos, utilizando-se luvas individuais para cada animal e os acondicionados em NaCl 0,9% à 35°C, também de forma individualizada. O material foi transportado até o laboratório e processado no mesmo dia, no período de duas horas após o abate. O material foi acondicionado em sacos estéreis, os quais foram mantidos a temperatura de -20°C, até o momento da extração de DNA.

No momento do processamento dos tecidos, o fluido folicular foi aspirado e enviado para a identificação do vírus na forma de pró-vírus e vírus livre.

2.5. DIAGNÓSTICO POR PCR

Todas as amostras recuperadas foram enviadas para a extração de DNA, RNA ou ambos, de acordo com a origem. Para a extração de DNA pró-viral foram utilizados dois kits: DNA mini kit[®] (Qiagen[®], Hilden, Alemanha) e Cador Pathogen[®] (Qiagen[®], Hilden, Alemanha), assim como para RNA viral RNA mini kit[®] (Qiagen[®], Hilden, Alemanha) e Cador Pathogen[®] (Qiagen[®], Hilden, Alemanha). Embriões são amostras extremamente pequenas, logo para a extração de DNA pró-viral e RNA viral dos embriões adotou-se o mini kit Cador Pathogen[®], pois tem a característica de extrair ambos ao mesmo tempo. (Anexo 2 – Protocolos 2, 3 e 4). Após a extração realizou-se PCR Nested de todas as amostras. A relação tipo da amostra e mini kit utilizado encontra-se na tabela 1.

Tabela 1. Tipo de amostra coletada e kit utilizado para a extração de DNA ou RNA viral

Amostra	DNA mini kit [®]	RNA mini kit [®]	Cador Pathogen [®]
Pellet centrifugação após coleta	X		
Pellet após clarificação			X
Após concentração viral		X	
Tecido uterino e ovariano	X		
Fluido folicular			X
Embriões			X

Após a extração de RNA, foi realizada a síntese de cDNA no mesmo dia, utilizando a enzima MML V, segundo as recomendações do fabricante (Promega – EUA) (Anexo 2 – Protocolo 8).

A integridade do DNA ou cDNA foi avaliada pela amplificação dos primers do gene β -actina caprina (Ali Al Ahmad *et al.*, 2008 - Anexo 2 – Protocolo 7) . Como controle positivo foi utilizada amostras de membrana sinovial caprina infectadas com o vírus CORK.

A presença de DNA pró-viral e RNA viral foi determinadass utilizando-se PCR nested, descrita por Fieni (2010, protocolo cedido – Anexo 2 – Protocolo 6).

Os primers foram selecionados a partir da região conservada de GAG CAE (Tabela 2).

Tabela 2. Sequência PRIMERS a partir da região conservada de GAG CAEV – PCR nested

Primer Externo	Primer interno	Amplificado (pares de base)
EX5 (393) GAA GTC TTG CTG CGA GAG GTC TTG	IN5 (524) GAT AGA GAC ATG GCG AGG CAA GT	989 pb
EX3(1291) TGC CTG ATC CAT GTT AGC TTG TGC	IN3 (1036) GAG GCC ATG CTG CAT TGC TAC TGT	512 pb

A amplificação do produto final foi visualizado em gel de agarose 1,5% acrescido de brometo de etídeo na eletroforese.

2.6. ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os resultados foram analisados com estatística simples descritiva.

3. RESULTADOS

Foram identificadas 46 estruturas (5,8 estruturas/animal) oriundas dos lavados uterinos, sendo 28 embriões viáveis (média de 3,5 embriões/ doadora), onde 23 embriões se encontravam em estágio de blastocisto (n=17), blastocisto expandido (n=6) e blastocisto eclodido (n=5) (Tabela 3), em uma média de 5,75 estruturas/ doadora. Sete cabras doadoras produziram embrião, pois uma cabra demonstrou ligeira endometrite, com espessamento da mucosa uterina e presença de líquido no útero no exame ultrassonográfico, não se identificando estruturas após o lavado uterino após a colheita.

Os embriões recuperados (n=23 embriões) e submetidos à separação de massa celular interna e zona pelúcida com o auxílio do micromanipulador (Zeiss® - Axiovert 135M, Califórnia, EUA) foram negativos para a presença de DNA pró-viral na PCR Nested, mesmo os que se encontravam em estágio de blastocisto eclodido (tabela 3).

Tabela 3. Estruturas recuperadas por animal após lavagem uterina transcervical

Animal	Embrião/ Estrutura			Total
	ZP íntegra	Não fecundado	Eclodido	
8746	3	2	0	5
8756	9	3	0	12
7714	2	4	0	6
8763	0	2	1	3
7650	2	1	3	6
7703	5	2	1	8
5504	2	4	0	6
7600	0	0	0	0
Total	23	18	5	46

As lâminas dos esfregaços não demonstraram a presença de células do sistema imune, apenas células de descamação do endométrio (Figura 2). O pellet proveniente da centrifugação (800 x g/10min) após a coleta embrionária também foi examinado pela PCR Nested para DNA pró-viral, não sendo identificada nenhuma amostra positiva. Porém, após a primeira etapa da concentração viral (centrifugação 8000 x g/ 30min), quatro amostras foram positivas, bem como ao final do

procedimento de concentração utilizando PEG 40% (Anexo 2 – Protocolo 5), onde dois animais demonstraram-se positivos, sendo um positivo na primeira etapa da concentração viral (tabela 3).

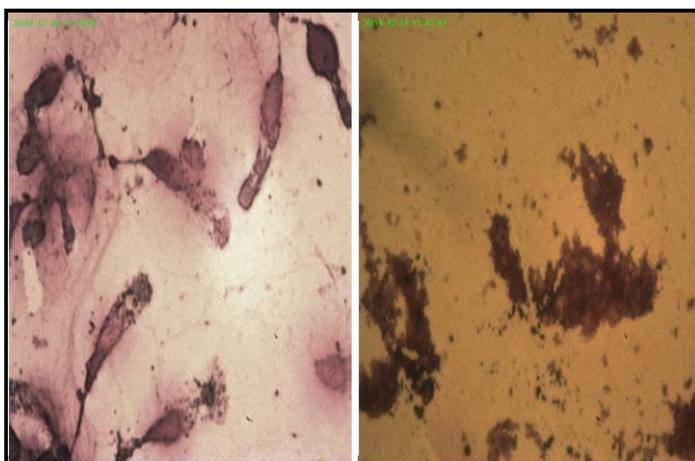


Figura 2. Esfregaço de pellet oriundo de líquido de lavado uterino após centrifugação para concentração de células (1000rpm/10min) corado com panótico rápido. Microscópio óptico, aumento 400 x.

Amostras de todos os tecidos revelaram a presença de DNA pró-viral, ou seja, nos tecidos provenientes de útero (tuba uterina, ápice do corno uterino, cornos uterinos e corpo do útero) e ovário (córtex e medula) e em apenas uma amostra de fluido folicular, porém não nas amostras embrionárias (Tabela 4).

Tabela 4. Diagnóstico pelo método de PCR nested para detecção de DNA pró-viral de tecido do trato reprodutivo de cabras naturalmente infectadas: útero (tuba uterina, ápice do corno uterino, corno uterino, corpo do útero) e ovários (ovário medular e ovário córtex); concentração viral de lavado uterino; fluido folicular e embriões (zona pelúcida e massa celular interna)

Animal	PCR Tecido Trato Reprodutivo						PCR [] viral		PCR Liq Fol		PCR embriões	
	Ov med	Ov cor	Tuba ute	Ap cor ute	Cor ute	Corpo ute	1 ^a etapa	Final conc		ZP	MCI	
8750	+	-	-	+	-	-	-	+	-	-	-	
8746	-	-	+	-	-	+	+	-	-	-	-	
7703	-	-	+	-	+	+	-	-	+	-	-	
7650	+	+	-	+	+	-	-	-	-	-	-	

*PCR tecido: ovário medular (ov med), ovário córtex (ov cor), tuba uterina (tuba ute); ápice do corno uterino (ap cor ute), corno uterino (cor ute), corpo do útero (corpo ute); PCR concentração viral: depois clarificação (depois clari); final concentração (final conc);

*PCR fluido folicular

*PCR embriões: zona pelúcida (ZP); massa celular interna (MCI).

- não foi realizado diagnóstico, pois os animais não foram enviados ao abate.

Da mesma forma, foi identificada a presença de RNA viral em quatro amostras de líquido do lavado uterino após a primeira etapa da concentração viral, duas positivas no final da concentração e duas amostras no fluido folicular (Tabela 5).

Tabela 5. Diagnóstico PCR Nested a partir de RNA viral (cDNA) de concentração viral; fluido folicular e embriões

Animal	PCR concentração viral		PCR Liq Fol	PCR embriões	
	1 ^a etapa	Final conc		ZP	MCI
8750	-	-	-	-	-
8746	+	+	+	-	-
7703	-	-	+	-	-
7650	-	-	-	-	-
7651	+	-	-	-	-
8763	-	-	-	-	-
5504	+	-	-	-	-
7714	+	-	-	-	-

* PCR concentração viral: depois de clarificação; final da concentração; PCR fluido folicular; PCR embriões: zona pelúcida (ZP) e massa celular interna (MCI).

As reações para controle interno com β -actina para verificação da qualidade das amostras demonstrou boa eficiência em todas as amostras (Figura 3).

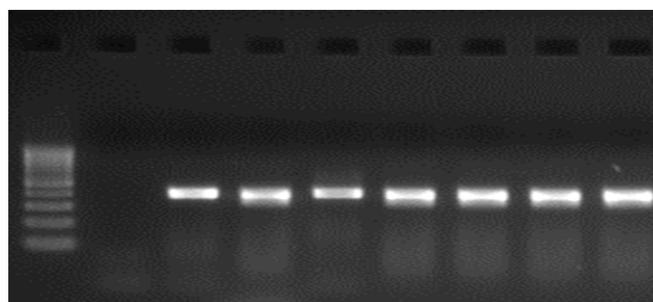


Figura 3. Gel de agarose 1,5% - PCR nested para controle interno β -actina caprina. M- marcador molecular 100pb; N- controle negativo; P- controle positivo de membrana sinovial caprina infectada com vírus CORK CAEV; 1- tuba uterina; 2- ovário cortex; 3- corno uterino; 4- ovário medular; 5- ápice do corno uterino; 6- corno uterino (amostras oriundas do mesmo animal).

4. DISCUSSÃO

A recuperação embrionária foi de 5,8 estruturas/ doadora ou 3,5 embrião viável/doadora no estudo. Outros trabalhos demonstram taxas de $8,75 \pm 6$, e $6,7 \pm 4,6$ embriões/doadora (Fieni *et al.*, 2002 e Ali Al Ahmad *et al.*, 2008, respectivamente) utilizando cabras naturalmente infectas. A técnica para a colheita transcervical pode ter influenciado nos resultados, pois o método de colheita transcervical utilizado difere dos demais trabalhos, onde todos utilizam a técnica cirúrgica para a recuperação de embriões.

Nenhuma das amostras de pellets oriundas da centrifugação de lavado uterino foi positiva na PCR Nested. Fieni *et al.* (2002; 2003) identificaram o vírus em pellets dos lavados uterinos oriundos de coletas embrionárias, após trabalharem com animais naturalmente infectados. Essa discordância entre os resultados pode ter ocorrido devido à metodologia empregada na recuperação dos embriões. A técnica utilizada usualmente é cirúrgica, onde se realiza a laparotomia, o útero é exposto, manipulado e uma pequena quantidade de PBS (40 mL) é infundida para a recuperação dos embriões. Neste estudo as doadoras foram submetidas à técnica transcervical para a recuperação embrionária, onde o sistema é fechado, sem a exposição do útero e uma grande quantidade de PBS (400mL) é infundida, facilitando a diluição do vírus presente no lúmen uterino e menor quantidade de células de descamação nos lavados.

Um maior número de amostras positivas provenientes da primeira etapa da concentração viral foi identificado quando comparado com a segunda etapa (etapa final). Isto pode ter ocorrido devido à metodologia empregada, uma vez que na segunda etapa (final) não se observou a formação de pellet. Desta forma, quando a técnica utilizada for a transcervical, a melhor opção é realizar somente o procedimento da primeira etapa para a concentração viral, ou seja, centrifugação ($8000 \times g/30\text{min}$), seguido de extração de DNA ou RNA para a identificação do vírus.

No animal que apresentou ligeira endometrite no momento das coletas embrionárias, foi identificada a presença do DNA pró-viral nas duas etapas da concentração viral, o que sugere maior concentração do vírus, devido à presença de células, do que nos animais que não possuíam a possível infecção.

O presente estudo revela pela primeira vez a presença de RNA viral e DNA pró-viral em amostras de lavados uterinos, utilizando a técnica transcervical para a recuperação embrionária em

animais naturalmente infectados. Este fato sugere que pode estar ocorrendo replicação viral no sistema reprodutivo.

A PCR Nested de tecido uterino revelou a presença do pró-vírus em todas as regiões do sistema reprodutivo estudadas em amostras provenientes de animais diferentes. A presença do CAEV já foi descrita em células epiteliais do trato reprodutivo de caprinos (Ali Al Ahmad *et al.*, 2012), através da técnica de imunofluorescência e hibridização *in situ* e também pela identificação de DNA pró-viral de útero e oviduto (Lamara *et al.*, 2002; Fieni *et al.*, 2003). Fieni *et al.* (2003) observaram que infecção pelo CAEV ocorre paralelamente entre o lavado uterino e oviduto. No presente estudo foi identificada a presença do genoma pró-viral e viral oriundos do lavado uterino e genoma pró-viral em oviduto, corno uterino e corpo do útero em um animal, corroborando com a literatura.

A identificação dos genomas pró viral e viral nestes tecidos pode ser explicada, pois durante todo o processo de formação embrionária até a formação e desenvolvimento do feto, o útero e a placenta tornam-se imuno privilegiados, pois a atividade imunológica é diminuída (Streilein, 1995). Células dendríticas desempenham um papel importante na resposta imune e serve de interface entre a imunidade inata e adaptativa (Chen *et al.*, 2006). Após a ovulação observa-se o aumento progressivo da progesterona pela formação do corpo lúteo. Esta progesterona possui ação regulatória na função de células dendríticas, fazendo com que as mesmas apresentem-se de forma imatura, influenciando diretamente no aumento das taxas de infecção do trato reprodutivo e queda no sistema imunológico para patógenos (Butts *et al.*, 2010). Entretanto, o aporte destas células é aumentado juntamente com os macrófagos, que aparentemente cumprem a função junto às respostas inatas contra agentes patogênicos (Blockle *et al.*, 2008). Logo, a progesterona juntamente com as células do sistema imune (dendríticas e macrófagos) desempenham um papel fundamental no momento da infecção dos embriões e desenvolvimento do feto durante a gestação.

Um animal apresentou DNA pró-viral em tecido de tuba uterina, mas não em líquido do lavado uterino. Por outro lado, foi o único animal a demonstrar o genoma pró-viral e viral em líquido folicular. Pode-se inferir que a irrigação ovariana juntamente com a foliculogenese pode estar influenciando na detecção do vírus, uma vez que a cada ciclo estral, o complexo vascular ovariano, sofre mudanças completas, permitindo que os folículos ovarianos e o corpo lúteo recebam nutrientes, oxigênio, hormônios e fatores de crescimentos necessários para o seu desenvolvimento

(Arashiro, 2012). Esta irrigação poderia carrear células infectadas para os folículos, mantendo-se presente até o momento da ovulação.

Os embriões recuperados com zona pelúcida íntegra, mesmo quando divididos em duas porções, seja do material oriundo de massa celular interna ou zona pelúcida, não expressaram vírus ou pró-vírus, demonstrando que não há infecção embrionária, mesmo quando os mesmos são oriundos de um meio onde há presença viral.

A morfologia da zona pelúcida é descrita como contendo poros em sua superfície e que os mesmos poderiam facilitar a infecção viral nos embriões de acordo com o tamanho do vírus (menores que 40nm – Vanroose *et al.*, 2000). Porém, segundo Meterns (2006) citado por Van Soom *et al.* (2010) que ao estudar embriões produzidos *in vivo* e *in vitro*, relatou que a superfície destes embriões é diferente, pois embriões oriundos da produção *in vitro* possuem camada externa mais fina e com mais poros (Abe *et al.*, 1999). Já em embriões produzidos *in vivo* esta camada possui menos poros em sua estrutura e é completamente recoberta com material granular, possivelmente proteína, após a fertilização (Meterns, 2006, citado por Van Soom *et al.*, 2010), tornando a zona pelúcida uma barreira consistente nos embriões contra o vírus (Van Soom *et al.*, 2010).

Os embriões que se apresentavam no estágio de blastocisto eclodido neste estudo também não expressaram os genomas viral ou pró-viral do CAEV. Entretanto, para que ocorra a infecção pelo vírus são necessários receptores específicos mútuos na superfície da membrana celular e intracelular, o que não ocorre no caso de embriões (Van Soom *et al.*, 2010).

Amostras de tecido ovariano (córtex e medular) também foram positivas para CAEV. A irrigação ovariana se dá principalmente na região medular, acompanhada de tecido conjuntivo frouxo e nervos. Já o córtex ovariano é composto por folículos em diferentes fases. Além de permitir o desenvolvimento do folículo, a vascularização presente na camada de células da teca participa ativamente na composição do fluido folicular (Rodgers e Irving-Rodgers, 2010), consequentemente passando a ter influência direta sobre o desenvolvimento do oócito (Arashiro, 2012) e presença do vírus no tecido.

Não foram observadas células do sistema imune (monócitos, macrófagos e linfócitos), nas lâminas do esfregaço do pellet das lavagens uterinas, apenas células do epitélio de descamação do endométrio. A baixa rotação empregada na centrifugação após as lavagens uterinas foi preconizada

a fim de evitar o rompimento das células do sistema imune, entretanto aparentemente a mesma não foi eficaz.

5. CONCLUSÃO

Os resultados demonstrados no estudo demonstram a presença dos genomas virais e pró-virais do CAEV no líquido oriundo de lavados uterinos, bem como nos tecidos de útero e ovário, indicando que pode haver replicação viral e uma possível infecção dos embriões. Por outro lado, embriões provenientes deste sistema, na presença ou ausência de zona pelúcida não se mostraram permissivos ao vírus.

A técnica via transcervical para recuperação de embriões produzidos *in vivo* parece ser uma aliada no controle da disseminação do vírus, uma vez que a quantidade de líquido infundido nos lavados uterinos é maior do que na técnica cirúrgica, fazendo com que o CAEV não se fixe na zona pelúcida. Porém, novos estudos devem ser conduzidos, para que se possa afirmar a eficácia da técnica como método de controle na transmissão do CAEV.

AGRADECIMENTOS

Ao CNPq - Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico pelo financiamento do projeto (553989/2010-4); INCT Pecuária e Embrapa Gado de Leite pelo apoio durante toda a realização do estudo e ao proprietário do capril que nos permitiu realizar o estudo.

6. BIBLIOGRAFIA CONSULTADA

ABE, H.; OTOI, T.; TACHIKAWA, S.; *et al.* *Fine structure of bovine morulae and blastocysts in vivo and in vitro.* Anat. Embryol., v. 199, p. 519–527, 1999.

ALI AL AHMAD, M.Z.; FIENI, F.; MARGINAT, L.; *et al.* *Proviral DNA of caprine arthritis encephalitis virus (CAEV) is detected in cumulus oophorus cells but not in oocytes from naturally infected goats.* Theriog , v. 64, p.1656–66, 2005.

ALI AL AHMAD, M.Z.; FIENI, F.; GUIGUEN, F.; *et al.* *Cultured early goat embryos and cells are susceptible to infection with caprine encephalitis virus.* Virol, v.353, p.307–315, 2006.

ALI AL AHMAD, M.Z.; CHEBLOUNE, Y.; BOUZAR, B.A.; *et al.* *Lack of risk of transmission of caprine arthritis-encephalitis virus (CAEV) after an appropriate embryo transfer procedure* Theriog , v.69, p. 408–415, 2008.

ALI AL AHMAD, M.Z.; DUBREIL, L.; CHAYAGNON, G.; *et al.*. Goat uterine epithelial cells are susceptible to infection with Caprine Arthritis Encephalitis Virus (CAEV) *in vivo*. *Veter Res*, v.43, p.1- 5, 2012.

ARASHIRO, E.K.N. Tese de doutorado. *Adequação de metodologia para o estudo in vivo da vascularização, da esteroidogênese e da expressão gênica em folículos antrais bovinos*. Universidade Federal de Minas Gerais – UFMG, Minas Gerais, 105p, 2012.

BLOCKLE, B.C.; SOLDER, E.; KIND, S.; *et al.*. DC sign + CD 163 + macrophages expressing hyaluronan receptor LYVE-1 are located within chorion vili of the placenta. *Placenta*, v. 29, p. 187-192, 2008.

BUTTS, C.L.; CANDANDO, K.M.; WARFEL, J.; *et al.*. Progesterone regulation of uterine dendritic cell function in rodents is dependent on the stage of estrous cycle. *Nature*, v. 5, p. 496-505, 2010.

CHEEVERS, W.P.; KNOWLES, D.P.; MCGUIRE, T.C.; *et al.*. Chronic disease in goats orally infected with two isolates of the caprine arthritis-encephalitis lentivirus. *Lab Invest*, v. 58, p. 510-517, 1988.

CHEN, M.; *et al.*. Dendritic cells apoptosis in the maintenance of immune tolerance. *Scie*, v. 311, p. 1160-1164, 2006.

CORK, L.C.; HADLOW, W.J.; CRAWFORD, T.B.; *et al.*. Infections leukoencephalomyelitis of young goats. *J Infect Dis*, v. 129, p. 134-141, 1974.

CRUZ, J. C. M.; GOUVEIA, A.M.G.; *et al.*. Caprine arthritis-encephalitis virus (CAEV) detection in semen of endangered goat breeds by nested polymerase chain reaction. *Sm Rumin Res*, v. 85, p. 149-152, 2009.

EMBRAPA. Programa de controle da Artrite Encefalite Caprina a Vírus (PCAEV). Subprojeto n. 06.0.94.102-01. Relatório de consultoria. Sobral: Embrapa/ Centro Nacional de Pesquisa de Caprinos e Ovinos, 1994,125 p.

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

FIENI, F.; ROWE, J.; VAN HOOSEAR, K.; *et al.*. Presence of caprine arthritis-encephalitis virus (CAEV) proviral DNA in genital tract tissues of superovulated dairy goat does. *Theriog*, v.59, p. 1515-1523, 2003.

FIENI, F.; PELLERIN, J.L.; POULIN, N.; *et al.*. Can caprine arthritis encephalitis virus (CAEV) be transmitted by *in vitro* fertilization with experimentally infected semen?. *Theriog*, v. 77, p. 644-651, 2012.

- FONSECA, J.F. *Alguns aspectos da transferência de embriões em caprinos*. Act Scie Vet, v. 34, (Supl 1), p. 65-70, 2006.
- FONSECA, J.F.; ZAMBRINI, F.N.; ALVIM, G.P.; *et al.* *Embryo production and recovery in goats by non-surgical transcervical technique*. Sm Ruim Res, v.111., p.96-99, 2013.
- GOUVEIA, A.M.G., SANTA ROSA J.; PINHEIRO, R.R. *et al.* *Implantação de um programa de controle da CAEV em sistemas epidemiológicos distintos*. In: Anais do 23º Congresso Brasileiro de Medicina Veterinária; Recife, PE: SPEMVE; 1994. p.102.
- LAMARA, A.; FIENI, F.; MSELLI-LAKHAL, L. ; *et al.* *Efficient replication of caprine arthritis-encephalitis virus in goat granulosa cells*. Vir Res, v. 79, p. 165-12, 2001.
- LAMARA, A.; FIENI, F.; MSELLI-LAKHAL, L.; *et al.* *Epithelial cells from goat oviduct are highly permissive for productive infection with caprine arthritis-encephalitis virus (CAEV)*. Vir Res, v. 87, p. 69-77, 2002.
- LECHAT, E.; MILHAU, N.; BRUN, P.; *et al.* *Goat endothelial cells may be infected in vitro by transmigration of caprine arthritis-encephalitis virus-infected leucocytes*. Vet immunol and immunopat, v.104, p.257-263, 2005.
- MERTENS, E. M.. Der Einfluss der in vitro Kultur boviner Embryonen auf die Struktur der extraembryonalen Matrix (Zona pellucida):ine rasterelektronen- und lichtmikroskopische Studie. Ph.D. Thesis, 2006, Tierärztliche Hochschule Hannover, Germany.
- NARAYAN, O.; ZINK, M.; CRANE, D., *et al.* The lentiviruses of sheep and goat: In Levy, J.A. Editora. The Retroviridae. Nova York, NY. 1993.
- PERETZ, G.; ASSO, J.; DEVILLECJAISE, P. Le CAEV: *Revue des connaissances actuelles et conséquences pratiques*. Rev Méd Vét, v. 144, p. 93 – 98, 1993.
- ROWE, J.D. e EAST, N.E. *Risk factors for transmission and methods for control of caprine arthritis-encephalitis virus infection*. The Vet Clin of Nort Ame. Food Animal Praticce, v. 13, p. 35-53, 1997.
- SOUZA, K.C.; PINHEIRO, R.R.; SANTOS, D.O.; *et al.* *Trasmission of the caprine arthritis-encefalites vírus through artificial insemination*. Sm Rumin Res, v.109. p. 193-198, 2013.
- STREILEIN, J.W. *Unravelling immune privilege*. Scie, v. 270, p. 1158-1159, 1995.
- VAN SOOM, A; WRATHALL, A.E.; HERRLER, B.A.; *et al.* *Is the zona pellucida an efficient barrier to viral infection?*. Reprod, Fertil and Develop, v. 22, p.21–31, 2010.

CAPÍTULO III

Risco de transmissão do vírus da artrite encefalite caprina (CAEV) pela técnica de transferência de embriões de doadoras sorologicamente positivas

Nascimento-Penido, P.M.P.; Oliveira, A.P.; Campolina, J.P.D.; Bicalho, J.D.; Galinari, G.C.F; Fonseca, J.F.; Leite, R.C.

RESUMO

Objetivou-se avaliar o risco de transmissão do vírus da artrite encefalite caprina (CAEV) através de embriões coletados de doadoras naturalmente infectadas e transferidos para receptoras comprovadamente negativas. Em um rebanho comercial, nove cabras positivas para CAEV através da técnica de IDGA foram selecionadas como doadoras e 62 cabras negativas para CAEV pela técnica de PCR nested foram selecionadas como receptoras no presente estudo. Após o protocolo hormonal de superovulação, 23 embriões foram coletados de cinco doadoras por via transcervical, e foram submetidos às lavagens com tripsina e posteriormente transferidos para 23 receptoras também pela via transcervical. Quarenta e cinco dias após as transferências foi realizado diagnóstico de gestação via transretal, obtendo-se oito receptoras positivas para gestação. Durante todo o período gestacional (cinco meses) e mais quatro meses pós-parto o sangue total foi coletado uma vez ao mês, das receptoras para diagnóstico de CAEV pela técnica de PCR nested. O acompanhamento também foi realizado pelo mesmo método de diagnóstico nos animais nascidos durante os quatro primeiros meses de vida. Durante todo o período investigado, não houve identificação de DNA pró-viral no sangue das receptoras. Os recém-nascidos durante os quatro meses de avaliação, também foram negativos. No presente estudo, não houve transmissão do CAEV por embriões oriundos de cabras positivas após tratamento com lavagens de tripsina.

ABSTRACT

The objective of the study was to evaluate the risk of caprine arthritis encephalitis virus (CAEV) transmission through embryos transfer from naturally infected donors to negative recipients. Nine

CAEV-AGID positive donors does and 62 nested-PCR CAEV-negative recipients does were selected for the study. After the superovulation protocol, 23 embryos were collected from the donors does by transcervical flushing and then washed using trypsin and subsequently transferred to 23 recipients does also by transcervical method. Forty-five days after the transfer, a pregnancy diagnosis was carried out by transrectal ultrasonography, yielding eight of the 23 recipients does positive for pregnancy. During the pregnancy (five months) and for four months postpartum, blood samples were collected from the recipients does for CAEV identification by nested PCR test. The tests were also performed by the same method on the newborn animals and during the first four months of life of the kids. Throughout the period of investigation (five months of gestation plus four months of postpartum period), no proviral DNA was identified in blood samples of the recipients. The newborns kids also tested negative for four months. In the present study, there was no transmission of CAEV by embryos originated from CAEV positive donors, after trypsin washing treatment.

1. INTRODUÇÃO

O vírus da artrite encefalite caprina (CAEV) causa perdas econômicas consideráveis e segundo Peterhans *et al* (2004) a perda na produção leiteira pode chegar até cerca de 10%. Essas perdas econômicas são mais evidentes em propriedades com maior prevalência de CAEV e animais com mais idade, caracterizando-se pela queda na produtividade e na qualidade do leite, além de emagrecimento (Brito, 2009).

A artrite encefalite caprina (CAE) é uma doença de ordem crônica, caracterizada pela degeneração progressiva das articulações, principalmente as articulações do carpo, assim como quadros de mamites severas, pneumonias em animais adultos e mais raramente leucoencefalomielite em animais recém-nascidos (Cork *et al.*, 1974; Russo, 1984; Callado *et al*, 2001). As mamites podem ser severas, gerando redução na função do alvéolo mamário e lise de vários componentes do leite (Leitner *et al.*, 2004). Entretanto, somente 10% a 25% dos animais infectados desenvolvem sinais clínicos da doença (Vitu e Russo, 1988).

No Brasil, a presença da CAE nas propriedades é subdiagnosticada (Lilenbaum *et al.*, 2007). A maioria dos estudos apresentam dados referentes à produção extensiva, que nada se assemelha à produção em sistemas intensivos.

O método de diagnóstico indicado pela OIE (Organização Mundial de Saúde Animal) é o IDGA (imunodifusão em ágar gel) que possui fácil aplicabilidade e alta especificidade (Varea *et al.*, 2001), porém permite a ocorrência de falso-negativos, por detectar somente altos níveis de imunoglobulinas (McConnell *et al.*, 1998). A utilização da PCR (*polymerase chain reaction*) é uma boa alternativa para as pesquisas, uma vez que é relatada como mais fidedigna aos resultados, pois identifica e mensura quantidades de ácidos nucleicos de inúmeras amostras clínicas (Bustin *et al.*, 2009).

Com o aumento na produção leiteira de origem caprina no Estado de Minas Gerais (IBGE, 2012), evidencia-se a necessidade na melhoria da genética relativa à produção leiteira. Uma opção rápida para a disseminação de genética é a utilização das biotecnologias da reprodução, tais como inseminação artificial, superovulação e transferência de embriões, e produção *in vitro* de embriões. As duas primeiras técnicas são uma realidade no cenário da caprinocultura, e a produção *in vitro*, a passos lentos, vem mostrando grande potencial. Porém, estudos conduzidos com embriões produzidos *in vitro* demonstram o risco de transmissão de doenças veiculadas por gametas e embriões (Lamara *et al.*, 2001; Lamara *et al.*, 2002; Ali Al Ahmad *et al.*, 2006; Fieni *et al.*, 2012; Ali Al Ahmad *et al.*, 2012; Lamara *et al.*, 2013), diferentemente de embriões produzidos *in vivo* (Freitas *et al.*, 1999; Andrioli 2001).

A alta prevalência da infecção pelo CAEV em países industrializados e tecnificados (Rowe *et al.*, 1992) e exportadores de genética, vem gerando grande preocupação no cenário internacional, pois além de disseminar genética estaria possivelmente transmitindo a doença. Logo, objetivou-se avaliar o risco de transmissão do CAEV por embriões produzidos *in vivo*, oriundos de cabras pluríparas positivas e reprodutores negativos e posteriormente transferidos para cabras nulíparas negativas com o acompanhamento da detecção de DNA pró-viral pela técnica de PCR nested e IDGA durante o período gestacional e quatro meses pós-parto.

2. MATERIAL E MÉTODOS

Todos os procedimentos realizados neste estudo foram aprovados pelo Comitê de Ética no Uso de Animais – UFMG (CEUA) sob o protocolo de n. 09/2013 (anexo 1).

2.1 SELEÇÃO DOS ANIMAIS

O estudo foi realizado em uma propriedade localizada na região sul de Minas Gerais, durante o mês de maio de 2012. O rebanho era composto por animais das raças Alpina e Saanen, sendo 488 fêmeas e 18 machos. Os animais eram mantidos em sistema intensivo confinado, recebiam feno, ração e sal mineral no cocho e água *ad libitum*.

Histórico prévio da doença no rebanho foi relatado pelo proprietário. Entretanto para a seleção dos animais, realizou-se o levantamento sorológico para o CAEV em todos os animais pelo teste de imunodifusão em ágar gel (IDGA) comercial (Biovetech[®], Recife-PE).

2.1.1. Doadoras de embrião

Foram selecionadas nove cabras pluríparas das raças Saanen e Alpina, lactantes e não lactantes, com idade entre quatro e seis anos, escore da condição corporal (ECC) $3 \pm 0,5$ Kg, peso $76,46 \pm 8,45$ e sorologicamente positivas como doadoras.

2.1.2. Receptoras de embrião

Todas as receptoras eram nulíparas, com idade entre sete e nove meses e com ECC não inferior a 2,5, além de serem negativas no teste de IDGA. Para a confirmação dos animais negativos, realizou-se PCR nested em amostras de papa de leucócitos sanguíneos.

As receptoras selecionadas foram isoladas em baias coletivas, distante do resto do rebanho, em sistema intensivo, recebendo silagem e sal mineral misturado ao feno e água *ad libitum*. As mesmas foram mantidas neste recinto até quatro meses após o parto. Realizou-se exame clínico ginecológico para a identificação de patologias inerentes ao sistema reprodutivo. Apenas um embrião foi transferido para cada receptora.

2.1.3. Reprodutores

Os reprodutores foram selecionados pelo proprietário de acordo com o interesse genético do mesmo. Entretanto todos os animais foram submetidos à PCR nested de sangue, para confirmar a ausência do provirus no animal.

2.1.4. Animais nascidos

Os animais nascidos das receptoras de embriões foram separados de suas mães logo após o momento do parto, recebendo colostro caprino, leite caprino tratado termicamente (56°C/1h) e separados em baias do restante do rebanho.

2.2. TRATAMENTO HORMONAL, COLETA EMBRIONÁRIA E TRANSFERÊNCIA DE EMBRIÕES

Nove cabras pluríparas foram submetidas ao protocolo hormonal de sincronização e superovulação (adaptado de Fonseca *et al.* 2006). Resumidamente, os animais permaneceram com implante intravaginal de 60mg de medroxirogestrona (Progespon[®] – MSD Saúde Animal, Brasil) durante sete dias. No momento da inserção do implante, foi administrado 37,5µg de D-cloprostenol (Prolise[®] – Arsa, Buenos Aires, Argentina) via paravulvar. A partir do quarto dia, 5 UI/kg de FSH/LH (Pluset[®] - Hertape Calier Saúde Animal, – Juatuba, Brasil) i.m. foram administrados, em seis doses decrescentes. Cerca de 24 horas antes da retirada da esponja outra dose de D-cloprostenol, na mesma concentração foi administrada e 48 horas após a retirada do implante, 500 UI de gonadotrofina coriônica humana foi administrada (hCG – Vetecor 5000[®] UI – Hertape Calier Saúde Animal – Juatuba, Brasil) i.m. Três doses (0,750 mg) de flunexim meglumine (Banamine[®] – MSD Saúde Animal, Brasil) i.m. foram administradas durante três dias consecutivos, para evitar a regressão luteal precoce.

A detecção do estro e cobertura das fêmeas foram realizadas duas vezes ao dia com intervalo de 12 horas, a partir de 24 horas após a retirada do implante intravaginal. Foram utilizados três reprodutores das raças Saanen e três da raça Alpina. As fêmeas foram acasaladas por monta natural, até o dia em que permitiram a cobertura pelos reprodutores.

Sete dias após a cobertura das doadoras, os embriões foram recuperados através da técnica transcervical (Fonseca *et al.*, 2013). Previamente à coleta, administrou-se um indutor para a

dilatação cervical (12 horas antes). No momento da coleta, os animais foram devidamente contidos em tronco próprio, sedados com acepromazina 1% (1mg/100kg), realizando-se bloqueio anestésico (lidocaína 10% sem vasoconstritor) no volume de 1 a 2mL por animal, na região sacrococcígea. Foi introduzido um espéculo vaginal para a dilatação vaginal e com o auxílio da pinça Allis, um botão anestésico (gaze embebida com 5mL de lidocaína sem vasoconstritor) foi colocado ventralmente ao orifício cervical. Posteriormente, com o auxílio de uma fonte de luz, fixou-se o primeiro anel cervical com a pinça de Allis modificada, para transposição da cervix com sonda para coleta embriões caprinos/ ovinos, desenvolvida pela Embrapa, (Brasília - DF), acoplando-se à um sistema completamente fechado em Y para coleta de embriões. Uma das vias do circuito comunica-se com o filtro coletor de embriões, e a outra se liga à mangueira do meio de lavagem (similar ao sistema bovino). O circuito possui também um dispositivo de três vias próximo à extremidade conectada ao meio de lavagem. Uma seringa de 60 ml foi conectada a este dispositivo para controlar o volume de líquido inserido em cada corno uterino. A quantidade de líquido inserida por sua vez incluiu frações de 15mL. Os cornos uterinos foram lavados individualmente.

Após o procedimento de recuperação embrionária, o líquido restante no copo coletor foi vertido em placa de petri e foi realizado o rastreamento dos embriões. Os mesmos foram submetidos ao procedimento de lavagem com auxílio de tripsina (Stringfellow e Seidel, 1998 - Anexo 2 – Protocolo 10) e transferidos por via transcervical (Fonseca *et al.*, 2014).

Assim como as doadoras, as cabras receptoras também foram induzidas e sincronizadas com o auxílio de protocolo hormonal, onde 60mg de acetato de medroxiprogesterona (MAP) (Progespon® - Intervet, Cotia, Brasil) foram introduzidos via intravaginal no dia sete do protocolo de superovulação juntamente com a administração de 37,5 µg de D-cloprostenol i.m. Após sete dias, as esponjas foram retiradas e o estro detectado com a presença de reprodutores.

A técnica utilizada para a transferência de embriões foi descrita recentemente por Fonseca *et al.* (2014). Com o auxílio do ultrassom via transretal, detectou-se a presença do corpo lúteo (CL) um dia antes das transferências. As fêmeas que apresentavam um CL no ovário, foram consideradas como receptoras. Uma seringa (3mL) contendo 2mL de PBS foi acoplada a um cateter modelo *tom cat*, sendo o embrião aspirado para o centro da coluna do cateter. Inseriu-se um espéculo vaginal tipo Collins na vagina, realizando a abertura e com auxílio de fonte de luz a entrada da cérvix foi identificada, imobilizando a mesma com a utilização de pinça Allis modificada. Um cateter uretral

de número seis juntamente com um mandril foi umidificado com PBS e inserido na cervix, transpondo todos os anéis. Depois da identificação da perda de resistência, o mandril foi direcionado ao corpo uterino em que foi identificada a presença do CL no ovário. Retirou-se o mandril e rapidamente acoplou-se o *tom cat* juntamente com a seringa ao cateter uretral, fazendo a deposição do embrião no corpo uterino. Cada receptora recebeu apenas um embrião.

2.3. DIAGNÓSTICO DE GESTAÇÃO

O diagnóstico de gestação foi realizado no quadragésimo quinto dia pós-transferência embrionária, uma vez que nos primeiros 30 dias pode ocorrer absorção embrionária de até 10% em animais de produção leiteira (Nascimento, 2009). Foi utilizado aparelho ultrassonográfico Chison Veterinário Digital D600 Vet, transdutor linear multifrequencial de 5, 0/6, 0/7, 5/9 Mhz para diagnóstico transretal de gestação, 45 dias após as transferências. Para facilitar a execução do diagnóstico, foi acoplado, com o auxílio de fita crepe ao transdutor, um cano de PVC de uma polegada de diâmetro. Cinco mililitros de gel carboximetilcelulose foram introduzidos com seringa de 60 mL no reto para a melhor visualização do aparelho reprodutivo, assim como para evitar lesões no reto dos animais.

2.4. AMOSTRAS DE SORO E PAPA DE LEUCÓCITOS

Durante os cinco meses de gestação das receptoras e quatro meses após o parto das mesmas, uma vez ao mês, dois tubos de sangue foram coletados, pela técnica de venopunção de pressão negativa. O primeiro tubo coletado continha EDTA e outro sem EDTA, para a coagulação sanguínea e obtenção de soro. Os tubos foram centrifugados a 1200 xg durante 10 minutos e amostras de papa de leucócitos, plasma e soro foram acondicionados em microtubos individuais e armazenados em freezer - 20°C até o momento da execução dos testes.

Os animais nascidos foram submetidos ao mesmo procedimento durante quatro meses.

2.5. IDGA e PCR NESTED

O diagnóstico sorológico realizado empregado foi o IDGA comercial (Biovetech® - Pernambuco – Brasil). As amostras de soro foram distribuídas em três poços alternados no volume de 30µL. Em outros três poços, também alternados, adicionou-se os soros controles, no volume de

10 µL e no centro da roseta, o antígeno foi adicionado. A primeira leitura foi realizada após 48 horas de incubação e foi confirmada após 72 horas de incubação, com o auxílio de luz artificial proveniente de uma câmara escura. Foram considerados positivos os soros que formaram uma linha de precipitação (linha de identidade) nas regiões de contato antígeno-anticorpo.

A extração do DNA oriundo de 200 µL de papa de leucócitos foi realizado utilizando QIAamp DNA Blood Mini Kit® (Qiagen, Mainz, Alemanha), de acordo com as especificações do fabricante (ANEXO 2 – Protocolo 1).

A presença de DNA pró-viral e RNA viral foi pesquisada utilizando PCR nested, (Ali Al Ahmad, *et al.*, 2008 - Anexo 2 – Protocolo 6). A sequência dos iniciadores e peso molecular do alvo amplificado utilizados estão descritos na tabela 1. A amplificação do produto final foi visualizada por eletroforese em gel de agarose 1,5% acrescido de brometo de etídeo.

Tabela 1. Sequência dos iniciadores e peso molecular do amplificado para o gene *gag* do CAEV

Sequência CAEV GAG	Amplificado
GAG EX5 (393) GAA GTC TTG CTG CGA GAG GTC TTG	989pb
GAG EX3 (1291) TGC CTG ATCCAT GTT AGC TTG TGC	
GAG IN5 (524) GAT AGA GAC ATG GCG AGG CAA GT	512pb
GAG IN5 (1036) GAG GCC ATG CTG CAT TGC TAC TGT	

3. RESULTADOS

A ocorrência da CAE nos animais na propriedade foi de 48,8% (247/506), entre machos e fêmeas pluríparas lactantes, pluríparas não lactantes e nulíparas, de idades variando entre três meses e oito anos, de acordo com o diagnóstico de IDGA.

Após a realização de diagnóstico ultrassonográfico, observou-se que das nove doadoras, cinco responderam ao tratamento superovulatório. Um total de 23 embriões viáveis foram recuperados (4,6 embrião viável/animal). No mesmo dia da coleta, os embriões foram transferidos para 23 cabras nulíparas via transcervical.

Dos 23 embriões transferidos, oito receptoras demonstraram-se gestantes no momento do diagnóstico ultrassonográfico.

Durante os cinco meses de gestação, as receptoras não foram soro-reagentes no teste de IDGA e tão pouco foram positivas pelo diagnóstico de PCR nested. Nos quatro meses subsequentes ao parto, as receptoras mantiveram-se negativas em ambos os diagnósticos (Figura 1).

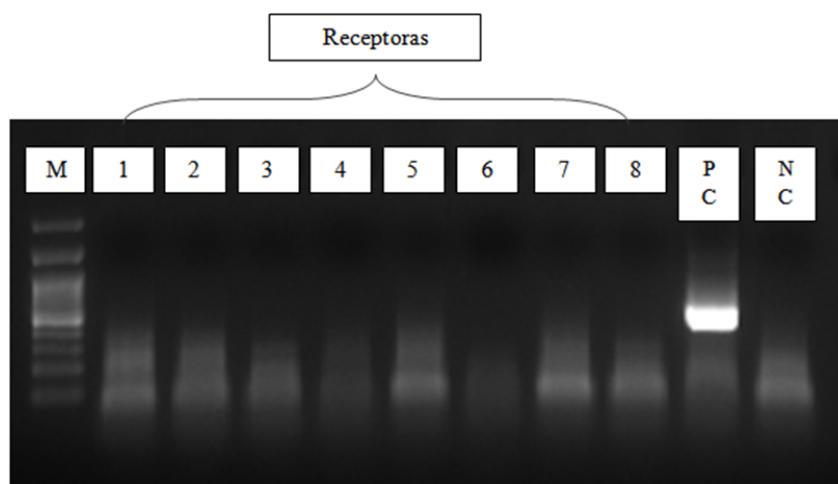


Figura 1. Gel de agarose 1,5% - PCR nested para o gene *gag* de CAEV, quinto mês de gestação. M – marcador molecular 100pb; amostras, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 provenientes das receptoras de embrião no quinto mês de gestação; PC – controle positivo; NC – controle negativo (branco)

Os animais nascidos das receptoras, durante os quatro primeiros meses de vida, também não apresentaram soroconversão ou presença de DNA pró-viral no sangue (Figura 2). Portanto, todos os animais foram negativos durante toda a fase experimental, após as transferências embrionárias.

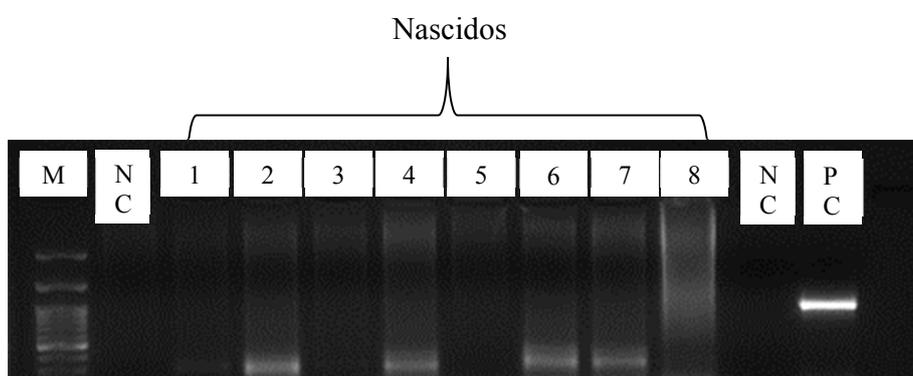


Figura 2. Gel de agarose 1,5% - PCR nested para o gene *gag* de CAEV, nascidos com quatro meses de idade. M – marcador molecular 100pb; amostras, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 provenientes dos animais provenientes de receptoras de embrião no quarto mês após o nascimento; PC – controle positivo; NC – controle negativo (branco)

4. DISCUSSÃO

A ocorrência da CAE nos animais na propriedade estudada foi de 48,8% (247/506), demonstrando-se elevada quando comparada a relatos anteriores [Bandeira *et al.*, 2009 - 14,5% (87/600); Lima *et al.*, 2009 - 0,1% (0/150); Lara *et al.*, 2011 - 15,5% (30/199); Lima *et al.*, 2011 - 0,87% (6/693); Rêgo *et al.*, 2011 - 0,97% (7/723); Veschi *et al.*, 2011 - 12,05% (135/1120); Lima *et al.*, 2013 - 0,29% (2/663)]. Porém, os estudos referem-se a levantamentos soroepidemiológicos em sistemas extensivos de animais de corte, onde o tempo de permanência dos animais é mais curto e não se encontram em contato direto uns com os outros, como nos sistemas intensivos.

As inovulações transcervicais demonstraram ser potencialmente eficazes, uma vez que a taxa de gestação foi de 35% (8/23). Fonseca *et al.* (2014) relataram pela primeira vez a transferência via transcervical em quatro animais gerando duas gestações (50%). Esta técnica é de fácil aplicabilidade, facilitando as inovulações em sistemas de produção e pesquisa, uma vez que o método utilizado é a via semi laparoscópica, que é mais laboriosa a quem executa.

Não foi detectada a soroconversão, nem a detecção de DNA pró-viral no sangue das receptoras durante a gestação, bem como nos quatro meses subsequentes ao parto. Os animais nascidos das receptoras tão pouco apresentaram a soroconversão e nem a detecção de DNA pró-viral. Freitas *et al.* (1999) também descreveram a ausência da soroconversão das duas categorias de animais (receptoras e nascidos). Porém, a técnica utilizada para diagnóstico foi a sorológica (IDGA), a qual, segundo Pinheiro *et al.* (2010), mostra-se pouco sensível na detecção de anticorpos quando os mesmos estão em baixa concentração, não traduzindo a realidade do “status” sanitário do animal. No presente estudo foi utilizado o IDGA, assim como a técnica de PCR nested, a qual demonstra maior sensibilidade do que qualquer outro método de diagnóstico de CAE, uma vez que detecta o genoma pró-viral (Yeh *et al.*, 2009).

A presença de DNA pró-viral e RNA do CAEV foi identificada em líquido de lavado uterino, tecido uterino e ovariano e tuba uterina (Nascimento-Penido *et al.*, dados não publicados), o que poderia ser uma possível via de transmissão entre doadoras e receptoras. O embrião ou feto poderia, portanto, estar em contato com o CAEV durante a gestação e ser infectado durante diferentes estágios do desenvolvimento embrionário (Ali Al Ahmad *et al.*, 2012). Por outro lado, estudos em humanos relatam os interferons (IFN) da subfamília tipo I e III como sendo mediadores potentes na atividade antiviral e no controle da proliferação celular, bem como na resposta da

imunidade inata ao vírus (Caraglia *et al.*, 2005; Li *et al.*, 2009; Brantis de Carvalho *et al.*, 2011). Uma resposta celular tipo IFN I foi associada à indução da proteína Mx em diversas espécies, a qual também está envolvida na resposta contra um grande número de vírus RNA (Horisberger *et al.*, 1991). O processo de reconhecimento materno em ruminantes é acompanhado pela alta produção de IFN tipo I (IFN tau) pelo trofoblasto do concepto. A produção de IFN tau em ovelhas ocorre entre 11 e 21 dias de gestação (Bazer *et al.*, 1996), induzindo uma abundante concentração da proteína Mx (Ott *et al.*, 1998). Consequentemente esta ação antiviral poderia levar à proteção do feto durante todo o período gestacional.

Relatos anteriores descrevem uma possível infecção embrionária, pois os embriões demonstraram a expressão de genoma viral quando cultivados em sistemas de monocamada infectada *in vitro* (Lamara *et al.*, 2001; Ali Al Ahmad *et al.*, 2002; Ali Al Ahmad *et al.*, 2006), o que pode não ocorrer *in vivo*, uma vez que a zona pelúcida de embriões produzidos *in vitro* é mais fina e possui mais poros, mesmo após a fertilização (Mertens, 2006 citado por Van Soom *et al.*, 2010).

A zona pelúcida confere ao embrião uma barreira natural e para que ocorra a infecção do embrião pelo vírus são essenciais quatro etapas: 1) alta concentração do vírus no trato reprodutivo; 2) aderência do vírus à membrana celular embrionária ou passar através da zona pelúcida, que pode ter sido perdida, removida ou lesionada no momento da infecção; 3) receptor específico para o vírus deve estar presente nas superfícies da membrana externa do embrião (Spear, 2004), uma vez que a ausência de um ou mais receptores nas células embrionárias previnem a entrada do vírus; 4) o vírus necessita de um mecanismo intracelular ativo para que ocorra a replicação no genoma embrionário e produção de proteínas virais (Van Soom *et al.*, 2010).

O risco de ruptura da zona pelúcida é mínimo em embriões jovens produzidos *in vivo*, mesmo quando submetidos ao procedimento de lavagem com o auxílio da tripsina (Van Soom *et al.*, 2010). Segundo Stringfellow e Seidel (1998) somente a presença da zona pelúcida nos embriões e as 10 lavagens com PBS e troca de ponteiras a cada lavagem seriam eficientes na remoção de vírus não imunogênicos. Por outro lado, para determinados tipos virais faz-se necessário a utilização da tripsina em duas gotas, durante o procedimento. A tripsina é muito efetiva para a inativação de vírus como o herpesvírus bovino tipo 1 (BoHV1) (Marley *et al.*, 2008) e herpesvírus suíno tipo 1 (Medveczky *et al.*, 1996). A ação da tripsina provavelmente é de digestão de certas

proteínas do envelope viral, desta forma prevenindo a aderência do vírus e/ou a ligação à zona pelúcida. Outra possibilidade é que a tripsina pode mudar a conformação dos receptores virais na zona pelúcida (Vam Soom *et al.*, 2010). Nesta pesquisa preconizou-se a utilização da tripsina, pois os embriões foram transferidos para receptoras de rebanho comercial, procedimento indicado pela International Embryo Transfer Society (IETS) (Stringfellow e Seidel, 1998), gerando maior confiabilidade para o produtor.

A coleta embrionária transcervical mostra-se potencialmente auxiliar no que se refere à eliminação do vírus, pois Nascimento-Penido (2014), ao tentar identificar o vírus no lavado uterino, não obteve sucesso, uma vez que o mesmo foi diluído no meio da infusão uterina. Somente após o procedimento de concentração viral, identificou-se a presença do vírus. Fieni *et al.* (2002), ao trabalhar com coletas cirúrgicas embrionárias, detectaram o genoma viral do CAEV. Entretanto, com esta técnica há um volume pequeno de líquido proveniente das lavagens e maior manuseio uterino, o que estaria aumentando o contato vírus/embrião, conseqüentemente o risco de transmissão.

A separação das receptoras e dos animais nascidos em baias específicas e isoladas do restante do rebanho foi eficiente em relação à transmissão horizontal, já que a ocorrência da doença na propriedade era alta.

5. CONCLUSÃO

Os resultados sugerem que o risco de transmissão do CAEV por embriões produzidos *in vivo* provenientes de cabras naturalmente infectadas e transferidos para receptoras comprovadamente negativas é baixo ou inexistente, Entretanto, estes embriões devem ser submetidos às lavagens com tripsina e possuir zona pelúcida íntegra. Desta forma, estes embriões serão viáveis em programas de melhoramento genético, sem risco de transmissão do CAEV.

AGRADECIMENTOS

Ao CNPq - Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico pelo financiamento do projeto (553989/2010-4); INCT Pecuária e Embrapa Gado de Leite pelo apoio durante toda a realização do estudo e ao proprietário do capril que nos permitiu realizar o estudo.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALI AL AHMAD, M.Z.; Fieni, F.; Guiguen, F.; Larrat, M.; Pellerin, J.L.; Roux, C.; Chebloune, Y. 2006. *Cultured early goat embryos and cells are susceptible to infection with caprine encephalitis virus*. *Virology*, v.353, p.307–315, 2006.
- ALI AL AHMAD, M.Z.; CHEBLOUNE, Y.; BOUZAR, B.A.; *et al.* Lack of the transmission of caprine arthritis-encephalitis virus (CAEV) after an appropriate embryo transfer procedure. *Theriogenology*, v. 9, p. 408-415, 2008.
- ALI AL AHMAD, M.Z.; DUBREIL, L.; CHATAGNON, G.; *et al.* Goat uterine epithelial cells are susceptible to infection with Caprine Arthritis Encephalitis Virus (CAEV) in vivo. *Vet Res*, v. 43, p. 43-45, 2012.
- ALI AL AHMAD, M.Z.; CHEBLOUNE, Y.; CHATAGNON, G.; *et al.* Is caprine arthritis encephalitis virus (CAEV) transmitted vertically to early embryo development stages (morulae or blastocyst) via in vitro infected frozen semen? *Theriogenology*, v. 77, p. 1673-1678, 2012.
- BANDEIRA, D.A.; CASTRO, R.S.; AZEVEDO, E.O.; *et al.* Seroprevalence of caprine arthritis-encephalitis virus in goats in the Cariri region, Paraíba state, Brazil. *The Vet J*, v.180, p. 399-401, 2009.
- BAZER, F.W.; SPENCER, T.E.; OTT, T.L. Interferon tau: a novel pregnancy recognition signal. *Am J Reprod Immunol*, v. 37, p. 412-420, 1996.
- BRANTIS DE CARVALHO, C.E.; BOLDRIN, P.E.G.; SILVA-JÚNIOR, W.A.; *et al.* Papel da proteína Mx1 na resposta a interferons e no processo neoplásico. *Rev Ciênc Farm Básica Apl.*, v. 32, p.287-295, 2011.
- BRITO, R.L.L. Implicações da artrite-encefalite caprina na reprodução, produção e na qualidade do leite de cabras. Dissertação de mestrado, Centro de Ciências Agrárias e Biológicas, Universidade Estadual do Vale do Acaraú, Sobral, 2009, 109p.
- BUSTIN, S.A.; BENES, V.; GARSON, J.A.; *et al.* The MIQE Guidelines: Minimum information for publication of quantitative Real-time PCR experiments. *Clin Chem*, v. 55, p. 611 – 62, 2009.
- CALLADO, A.K.C.; Castro, R.S.; Teixeira, M.F.S. Lentivírus de pequenos ruminantes (CAEV e Maedi-Visna): revisão e perspectivas. *Pesq Vet Bras.*, v.21, p. 87-97, 2001.
- CARAGLIA, M.; MARRA, M.; PELAIA, G.; *et al.* Alpha-interferon and its effects on signal transduction pathways. *J Cell Physiol*. v.202, p.323–35, 2005.
- CORK, L.C.; HADLOW, W.J.; CRAWFORD, T.B.; *et al.* Infections leukoencephalomyelitis of young goats. *J Infect Dis*, v. 129, p. 134-141, 1974.

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

FIENI, F.; ROWE, J.; VAN HOOSEAR; *et al.* Presence of caprine arthritis-encephalitis virus (CAEV) proviral DNA in genital tracts tissues of superovulated dairy goat does. *Theriogenology*, v. 59, p. 1515-1523, 2003.

FIENI, F.; PELLERIN, J.L.; POULIN, N. ; *et al.* Can caprine arthritis encephalitis virus (CAEV) be transmitted by in vitro fertilization with experimentally infected semen? *Theriogenology*, v. 77, p. 644-651, 2012.

FREITAS, V.J.F.; CAVALCANTE, T.V.; SALLES; *et al.* Embryo transfer from seropositive goats for caprine arthritis-encephalitis virus (CAEV) with birth of seronegative kid. *Cienc Rur*, v. 9, p. 5-9, 1999.

FONSECA, J.F.; ZAMBRINI, F.N.; ALVIM, G.P.; *et al.* Embryo production and recovery in goats by non-surgical transcervical technique. *Sma Rumi Res*, v. 111, p. 96-99, 2013.

FONSECA, J.F.; ESTEVES, L.V.; ZAMBRINI, F.N.; *et al.* Viable offspring after successful non-surgical embryo transfer in goats. *Arq Bra Med Vet Zoo*, v. 66, p. 613-616, 2014.

HORISBERGER, M.A.; GUNST, M.C. Interferon induced proteins: indication of Mx protein in various mammalian species. *Virology*, v. 180, p. 185-190, 1991).

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA - IBGE. Produção da Pecuária Municipal, 68p, v. 40, 2012.

LAMARA, A.; FIENI, F.; MSELLI-LAKHAL, L.; *et al.* Efficient replication of caprine arthritis encephalitis virus in goat granulosa cells. *Vir Resea*, v. 79, p. 165-172, 2001.

LAMARA, A.; FIENI, F.; MSELLI-LAKHAL, L.; *et al.* Early embryonic cells from in vivo produced goat embryos transmit the caprine arthritis-encephalitis virus (CAEV). *Theriogenology*, v. 58, p. 1153-1163, 2002.

LAMARA, A.; FIENI, F.; GÉRARD, C.; *et al.* Caprine arthritis encephalitis virus (CAEV) replicates productively in cultured epididymal cells from goat. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis*, v.36, p. 397 – 404, 2013.

LARA, M.C.C.S.H.; VILLALOBOS, E.M.C.; CUNHA, E.M.S.; *et al.* Inquérito sorológico de lentivirose de pequenos ruminantes (Maedi-Visna e artrite-encefalite caprina) no estado de São Paulo. *Braz. J Vet Res Ani Sci*, v. 50, p. 18-25, 2011.

LEITNER, G.; MERIN, U.; SILANIKONE, N.; *et al.* Effect of subclinical intramammary infection on somatic cells counts, NAGase activity and gross composition of goats milk. *Jour of Dair Resear*, v. 71, p. 311 – 315, 2004.

LI, M.; LIU, X.; ZHOU, Y.; *et al.* Interferon- γ : the modulators of antiviral, antitumor, and immune responses. *J Leukoc Biol*, v. 86, p.23–32, 2009.

LILENBAUM, W.; SOUZA, G.N.; RISTOW, P; *et al.* A serological study on Brucella abortus, caprine-encephalitis virus and Leptospira in dairy goats in Rio de Janeiro, Brazil. *The Veter Jorn*, n.173, p.408-412, 2007.

LIMA, C.C.V.; SOUZA, T.S.; MARTINEZ, P.M.; *et al.* Prevalência sorológica da artrite-encefalite caprina em rebanhos caprinos do município de Juazeiro – Bahia, Brasil. In: Anais do VII Congresso Brasileiro de Buiatria, 2009, p. 551-556.

LIMA, C.C.V.; COSTA, T.N.; SOUZA, T.S.; *et al.* IX Congresso Brasileiro Buiatria. Goiânia - Goiás, Brasil, 2011.

LIMA, C.C.V.; COSTA, J.N.; SOUZA, T.S.; *et al.* Inquérito soropidemiológico do lentivírus caprino e perfil das criações de caprinos na região do Baixo Médio São Francisco (BA). *Arq Inst Biol*, v. 80, p. 288-296, 2013.

MAELEY, M. S.; GIVENS, M. D., GALIK, P. K.; *et al.* Efficacy of a recombinant trypsin product against bovine herpesvirus 1 associated with in vivo- and in vitro- derived bovine embryos. *Theriogenology*, v. 69, p. 746–757, 2008.

MCCONNELL, I.; PETERHANS, E.; ZANONI, R.G. Concordance with reference sera of a recombinant protein Elisa for maedi-visna antibody detection. *Vet Res*, v. 142, p. 431-433, 1998.

MEDVECZKY, I., SOLTÍ, L., HARASZTI, J.; *et al.* Transmission of Aujeszky's disease (pseudorabies) virus is blocked by trypsin treatment of transferred embryos. *Theriogenology*, v. 46, p.1357–1365, 1996.

MERTENS, E. M. Einfluss der in vitro Kultur boviner Embryonen auf die Struktur der extraembryonalen Matrix (Zona pellucida) e rasterelektronen- und lichtmikroskopische. Studie. Ph.D. Thesis, 2006, Tierärztliche Hochschule Hannover, Germany.

NASCIMENTO, P.M.P. Dissertação de mestrado. Indução de estro sincronizado em cabras da raça Toggenburg com protocolos de curta, média e longa duração durante o anestro estacional e acasalamento natural. Universidade Federal Fluminense – UFF, Rio de Janeiro, 85 p, 2009.

NASCIMENTO-PENIDO, P.M.P.; FONSECA, J.F.; SANTOS, G.B.; *et al.* Detecção do vírus da artrite encefalite caprina (CAEV) no sistema reprodutivo de cabras leiteiras naturalmente infectadas. 2015. **Aguardando para submissão.**

- OTT, T.L.; YIN, J.; ANNE, A.; *et al.* Effects of the estrous cycle and early pregnancy on uterine expression of Mx protein in sheep (*Ovis aries*). *Biol of Reprod*, v. 59, p. 784-794, 1998.
- PETERHANS, E.; GREENLAND, T.; BADIOLA, J.J.; *et al.* Routes of the transmission and consequences of small ruminant lentiviruses (SRLs) infection and eradication schemes. *Vet Resea*, v. 35, p. 257-274, 2004.
- PINHEIRO, R.R.; ANDRIOLI, A.; GOUVEIA, A.M.G.; *et al.* Avaliação de antígenos para diagnóstico de lentivírus em rebanhos caprino sob programa de controle. *Arq Inst Biol*, v. 77, p. 133 – 137, 2010.
- RÊGO, W.M.F.; SOUSA, M.S.; FARIAS, D.A.; *et al.* Soroprevalência dos lentivírus de pequenos ruminantes em caprinos explorados no micro-região do alto-médio Gurguéia no sul do Estado do Piauí, Brasil. 38 Congresso Brasileiro de Medicina Veterinária, Florianópolis, 2011.
- ROWE, J.D.; VAN HOSSEAR, K.; EAST, N.; *et al.* The presence of caprine arthritis-encephalitis virus proviral DNA in postpartum genital secretion of dairy goat does. In Proceedings of the 26th World veterinary Congress, WVA. Sept 23-26; Lyon, France, 1992.
- RUSSO, P. Caprine arthritis-encephalitis virus (CAEV). Short review. *Ann Rech Vet.*, v. 15, p. 3-6, 1984.
- SPEAR, P.G. Herpes simplex virus: receptors and ligands for cell entry. *Cell. Microbiol.*, v. 6, p. 401–410, 2004.
- STRINGFELLOW, D. A. (1998). Recommendation for the sanitary handling of in vivo-derived embryos. In 'Manual of the International Embryo Transfer Society'. (Eds D.A. Stringfellow and S.M. Seidel.) p. 79–84 (IETS: Savoy, IL.).
- VAN SOOM, A; WRATHALL, A.E.; HERRLER, B.A.; *et al.* Is the zona pellucida an efficient barrier to viral infection? *Reprod, Fertil and Develop*, v. 22, p.21–31, 2010.
- VAREA, R.; MONLEON, E.; PACHECO, C. Early detection of maedi-visna (ovine progressive pneumonia) virus seroconversion in field sheep samples. *J Vet Diag Invest*, v. 13, p. 301-307, 2001.
- VESCHI, J.L.; MARTINS, R.J.; ZAFALON, L.F.; *et al.* Soroprevalência da CAE em caprinos leiteiros do território do Sisal, Bahia. II ENDESA – Encontro Nacional de Defesa Sanitária Animal. In: CRMV-SP, p. 32, 2011.
- VITU, C.; RUSSO, P. L'arthritis-encéphalite caprine en France: recherches épidémiologiques et expérimentales. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis*, v. 11, p. 227-34, 1988.
- YEH, H.Y.; YATES, M.V.; CHEN, W. Real-time molecular methods to detect infectious viruses. *Semin. Cell Dev. Biol.*, v. 20, p. 49-54, 2009.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

O estudo do vírus da artrite encefalite caprina no trato reprodutivo de cabras naturalmente infectadas e o risco de transmissão pela transferência de embriões elucidou três pontos importantes:

- 1) A alta ocorrência de animais soropositivos para CAEV em rebanhos caprinos leiteiros que utilizavam sistema de produção intensivo confinado no Estado de Minas Gerais;
- 2) A presença dos genomas virais e pró-virais do CAEV no líquido oriundo de lavados uterinos e tecidos de útero e ovário, indicando que pode haver replicação viral. Porém, os embriões provenientes deste sistema, na presença ou ausência de zona pelúcida não se demonstraram permissividade ao vírus;
- 3) O risco de transmissão do CAEV por embriões produzidos *in vivo* provenientes de cabras naturalmente infectadas e transferidos para receptoras comprovadamente negativas é baixo ou inexistente.

Todavia, é de extrema importância a implementação de programas de erradicação e controle em sistemas de produção, principalmente de leite, pois os animais permanecem por mais tempo em contato direto uns com os outros, disseminando o CAEV.

A técnica via transcervical para recuperação de embriões produzidos *in vivo* parece ser uma aliada no controle da disseminação do vírus. Porém, novos estudos devem ser conduzidos, para que se possa afirmar a eficácia da técnica como método de controle na transmissão do CAEV.

De qualquer forma, os embriões recuperados pela técnica transcervical, assim como pela cirúrgica devem ser submetidos às lavagens com tripsina e possuir zona pelúcida íntegra, tornando-os aptos para o comércio em programas de melhoramento genético, sem risco de transmissão do CAEV.

ANEXO 1

 UFMG	<p>UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS</p> <p>CEUA COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS</p>
<p>CERTIFICADO Certificamos que o Protocolo n.º 9 / 2013, relativo ao projeto intitulado “Identificação e desinfecção do vírus da artrite encefalite caprina em sêmen e embriões caprinos produzidos in vivo e in vitro”, que tem como responsável Rômulo Cerqueira Leite, está de acordo com os Princípios Éticos da Experimentação Animal, adotados pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA/UFMG), tendo sido aprovado na reunião de 02/07/2013. Este certificado expira-se em 02/07/2018.</p>	
<p>CERTIFICATE We hereby certify that the Protocol n.º 9 / 2013, related to the Project entitled “Identification and disinfection of CAEV in semen and embryos caprine produced in vivo and in vitro”, under the supervision of Rômulo Cerqueira Leite, is in agreement with the Ethical Principles in Animal Experimentation, adopted by the Ethics Committee in Animal Experimentation (CEUA/UFMG), and was approved in 02/07/2013. This certificate expires in 02/07/2018.</p>	
<p>FRANCISNETE GRACIANE ARAUJO MARTINS Coordenador(a) da CEUA/UFMG Belo Horizonte, 02/07/2013.</p>	
<p>Atenciosamente.</p>	
<p>Sistema CEUA-UFMG https://www.ufmg.br/bioetica/cetea/ceua/</p>	
<p>Universidade Federal de Minas Gerais Avenida Antônio Carlos, 6627 – Campus Pampulha Unidade Administrativa II – 2º Andar, Sala 2005 31270-901 – Belo Horizonte, MG – Brasil Telefone: (31) 3499-4516 – Fax: (31) 3499-4592 www.ufmg.br/bioetica/cetea - cetea@prpq.ufmg.br</p>	

ANEXO 2. PROTOCOLOS LABORATORIAIS

Protocolo 1

QIAamp® DNA Mini Kit (250) - Extração de DNA sangue e fluidos corporais - Qiagen®

Notas: - Todas as etapas de centrifugação deverão ser realizadas a temperatura 15 – 25 °C.

- Equilibrar as amostras a temperatura ambiente.
- Ligar termomix a 56 °C para a quarta etapa do protocolo.
- Equilibrar Buffer AE ou água destilada a temperatura ambiente para a décima primeira etapa.
- Observar se os reagentes AW1, AW2 e Protease foram preparados de acordo com as indicações do fabricante.
- Caso haja a presença de precipitação no Buffer AL, dissolve-lo em banho maria a 56 °C.

Procedimento:

1. Pipetar 20µL de Protease (ou Proteinase K) no microtubo de 1,5mL;
2. Adicionar 200µL da amostra;

Nota: Utilizar 200µL para sangue, plasma, soro e fluidos corpóreos. Caso o volume da amostra seja inferior a 200µL, adicionar PBS até alcançar o volume necessário para 200µL.

3. Utilizar o vortex durante 15 segundos para misturar amostra à prótese. Centrifugar brevemente para retirar as gotas da tampa;
4. Adicionar 200µL do Buffer AL na amostra e vortexizar durante 15 segundos;
5. Encubar durante 10 minutos à 56 °C;
6. Centrifugar rapidamente para retirar as gotas da tampa;
7. Adicionar 200µL de etanol (96-100%) no microtubo, vortexizar novamente durante 15 segundos. Centrifugar rapidamente para retirar as gotas da tampa;

Nota: O etanol deve estar gelado para melhorar a eficiência da extração.

8. Cuidadosamente, aplique a mistura do passo 7 na coluna com tudo de coleta de 2mL (collection tube). Feche a tampa e centrifugue a 600x g ou 800rpm durante 1 minuto. Transferir a coluna para um novo tubo coletor de 2mL descartando o outro contendo o filtrado;

9. Cuidadosamente abra a tampa e adicione 500 μ L de Buffer AW1 sem encostar a ponteira na borda. Feche a tampa e centrifugue novamente a 600x g ou 800rpm durante 1 minuto. Troque novamente o tubo coletor, descartando o outro contendo o filtrado;
10. Adicionar 500 μ L de Buffer AW2 na coluna, centrifugar 20000x g ou 14000rpm durante 3 minutos;
11. Transferir a coluna novamente para um microtubo de 1,5mL (n \tilde{a} o oferecido) e centrifugar novamente a 20000x g ou 14000rpm durante 1 minuto para que todo o conte \acute{u} do do Buffer seja filtrado;
12. Transferir a coluna novamente para um microtubo de 1,5mL (livre de RNA e DNA) e descartar o filtrado;
13. Adicionar 50 – 150 μ L do Buffer AE ou \acute{a} gua destilada e aguardar durante 5 minutos;
14. Centrifugar em velocidade de 600x g ou 800rpm durante 1 minuto.

Protocolo 2

QIAamp® Viral RNA Mini kit (250 amostras) - Qiagen®

Nota: todas as etapas de centrifugação devem ser executadas a temperatura ambiente (15-25°C).

- Equilibrar as amostras a temperatura ambiente (15-25°C);
- Equilibrar Buffer AE a temperatura ambiente para a etapa 11;
- Checar se os Buffers AW1 e AW2 foram preparados de acordo com as indicações do fabricante;
- Adicionar RNA carrier reconstituído no Buffer AVE para AVL de acordo com as instruções do fabricante.

Procedimento:

1. Pipetar 560µL da solução Buffer AVL contendo RNA carrier em microtubo de 1,5mL;
2. Adicionar 140µL da amostra no microtubo. Misturar por pulso de vortex durante 15seg;
3. Incubar a temperatura ambiente (15-25°C) durante 10 min;
4. Centrifugue brevemente o tubo para remover as gotas de dentro da tampa;
5. Adicionar 560µL de etanol (96-100%) da amostra e misturar por pulso de vortex durante 15seg. Depois de misturar, centrifugue brevemente o tubo para remover as gotas de dentro da tampa;
6. Cuidadosamente aplique 630µL da solução da etapa 5 na coluna QIAamp Mini spin oferecida pelo fabricante, sem tampa. Feche a tampa e centrifugue a 6000 x g (8000 rpm) durante 1 minuto. Transfira a coluna para um novo tubo de coleta, descartando o outro com o filtrado;
7. Cuidadosamente abra a coluna e repita o passo 6;
8. Cuidadosamente abra a coluna e adicione 500µL do Buffer AW1. Feche a tampa e centrifugue a 6000 x g (8000 rpm) durante 1 min. Transfira a coluna para um tubo limpo e descarte o outro contendo o filtrado;
9. Cuidadosamente, abra a coluna e adicione 500µL do Buffer AW2. Feche a tampa e centrifugue na velocidade rápida (20.000 x g ou 14.000 rpm) durante 3 min.

10.Recomendado: transfira a coluna para um tubo novo (não fornecido) e descarte o antigo com o filtrado. Centrifugue novamente a velocidade rápida durante 1 min;

11.Transfira a coluna para um microtubo de 1,5mL (não fornecido). Descarte o tubo contendo o filtrado. Cuidadosamente abra a coluna e adicione 60 μ L de Buffer AVE equilibrado a temperatura ambiente. Feche a tampa e incube a temperatura ambiente por 1 min. Centrifugue a 6000 x g (8000 rpm) durante 1 min.

Nota: - RNA viral é estável mais de um ano quando armazenado a -80 °C.

- Indica-se a síntese de cDNA no mesmo dia da extração, pois o RNA é pouco estável.

Protocolo 3

QiAamp[®] DNA Mini kit para tecidos (250 amostras) - Qiagen[®]

Pontos importantes antes de iniciar:

- Todas as etapas de centrifugação devem ser realizadas em temperatura ambiente (15-25 °C);
- Evite repetir o congelamento e descongelamento das amostras;
- Tecidos como fígado e rim, contém altos níveis de RNA que interferirão no DNA genômico. RNA pode ser inibido com alguma reação enzimática, mas não inibirá a PCR. Se houver necessidade de genoma livre de RNA, adicionar RNase A, como descrita no protocolo.
- Equilibrar as amostras a temperatura ambiente (15-25 °C);
- Aquecer 2 banhos maria ou termobloco: um a 56 °C para a etapa 3 e um para 70 °C para a etapa 5;
- Equilibrar Buffer AE ou água destilada a temperatura ambiente para etapa 11;
- Garantir que os Buffers AW1 e AW2 estejam preparados de acordo com as instruções do fabricante;
- Se ocorrer dos Buffers ATL ou AL precipitarem, dissolver em incubação a 56 °C.

Procedimento:

1. Retire a amostra de tecido do armazenamento. Determinar a quantidade de tecido. Não utilizar mais do que 25mg;
2. Corte em pequenos pedaços e macere mecanicamente a amostra do tecido. Coloque em um microtubo de 1,5mL e adicione 180µL do Buffer AL;
3. Adicione 20µL de proteinase K, misture no vortex, e incube a 56 °C até que o tecido esteja completamente lizado. Vortexar algumas vezes durante a incubação, para facilitar a lise das amostras. As amostras tornam-se transparentes;
4. Centrifugue rapidamente os tubos de 1,5mL para remover as gotas das tampas;
5. Caso haja a necessidade de DNA puro, adicionar RNase A;
6. Adicionar 200µL de etanol (96-100%) nas amostras e misturar utilizando o vortex durante 15 segundos. Após a mistura, centrifugar rapidamente para retirar as gotas das tampas;

7. Cuidadosamente aplique a mistura da etapa 6 (incluindo o precipitado) na coluna QIAamp Mini spin (no tubo de coleta de 2mL) sem encostar na borda. Feche a tampa, centrifugue a 6000xg (8000rpm) durante 1 minuto. Transfira para um novo tubo coletor e descarte o que contém o filtrado;
8. Cuidadosamente adicione na coluna 500uL do Buffer AW1 sem encostar na borda. Feche a tampa e centrifugue novamente a 6000xg (8000rpm) durante 1 minuto. Transfira a coluna para um novo tubo coletor e descarte o que contém o filtrado;
9. Cuidadosamente, adicione 500µL do Buffer AW2 sem encostar na borda. Feche a tampa e centrifugue a alta rotação (20000xg; 14000rpm) durante 3 minutos;
- 10.Recomendado: transferir a coluna para um microtubo de 2mL (não oferecido) e descartar o antigo com o filtrado. Centrifugar em alta rotação durante 1minuto;
- 11.Transfira a coluna QIAamp Mini spin para um tubo de microcentrifuga de 1,5mL (não oferecido) e descarte o tubo de coleta com o filtrado. Cuidadosamente abra a coluna QIAamp Mini spin e adicione 200uL do Buffer AE ou água destilada. Encubar a temperatura ambiente durante 1 minuto e centrifugar a 6000xg (8000rpm) durante 1 minuto.

Nota: As amostras devem ser armazenadas até o momento das análises em temperatura -20 °C ou -80 °C.

Protocolo 4

QIAamp® Cador® Pathogen Mini Kit (50 amostras) - Qiagen®

1. Pipetar 20µL de proteinase K em um tubo de 2mL (não oferecido);
2. Adicionar 200µL de fluido da amostra na solução de proteinase K;
Nota: para volume inferior ajustar para 200µL de PBS ou 0,9% de cloreto de sódio.
3. Adicionar 100µL Buffer VXL. Feche a tampa e leve ao vortex durante 15 segundos;
Nota: para amostras “cell-free”, assegure-se da concentração 1µg carrier RNA foi adicionado a 100µL do Buffer VXL.
4. Encubar durante 15 minutos à 20-25°C;
5. Centrifugar rapidamente o tubo para remover as gotas da tampa;
6. Adicionar 350µL Buffer ABC na amostra e misture exaustivamente por pulso de vortex;
7. Centrifugar rapidamente para remover as gotas da tampa;
8. Transferir a solução lizada para uma coluna Qiaamp® Mini Kit de 2mL com tubo. Feche a tampa e centrifugue a 6000x g (8000rpm) durante 1 minuto. Transferir a coluna para um novo tubo coletor e descarte o primeiro coletor contendo o filtrado;
9. Adicionar 600µL Buffer AW1 e centrifugue a 6000x g (8000rpm) durante 1 minuto. Transfira a coluna para um terceiro tubo coletor, dispensando o que contém o filtrado;
10. Adicionar 600µL AW2 e siga o passo 9;
11. Centrifugar a coluna com um novo tubo coletor durante 2 minutos a 20000x g ou 14000rpm;
Nota: certifique-se que toda a solução foi filtrada
12. Transfira a coluna para um tubo de microcentrífuga de 1,5mL e descarte o tubo coletor oriundo do passo 11. Adicionar 50 – 150µL Buffer AVE no centro da membrana. Feche a tampa e encube durante 1 minuto a temperatura ambiente;
Nota: para melhor concentração final de DNA/RNA pode-se encubar durante 5 minutos a temperatura ambiente antes da centrifugação final
13. Centrifugar a 20000x g (14000rpm) durante 1 minuto;
Nota: para melhorar a concentração final de DNA/RNA pode-se centrifugar 2 vezes o mesmo material.

Proto colo 5

Concentração viral de líquido do lavado uterino – PEG 40%

Material:

- Pool de sobrenadante de células ED infectadas com vírus;
- Solução PEG 40%;
- Solução sacarose 10% em tampão TRIS-HCl 75mM + EDTA 1mM 7,4;
- Solução tampão fosfato 10mM pH 7,2;
- Éter etílico;
- Tampão fosfato 10mM pH 7,2 +EDTA 10 mM + PMSF 1mM (inibidor de protease);
- Centrífuga Sorvall rotor 5534;
- Ultracentrífuga

Nota: Transformar unidade g para rpm de acordo com o raio dos rotores que serão utilizados.

Procedimento:

- 1- Congelar e descongelar a amostra 3 x em temperatura -80°C;
- 2- Centrifugar o sobrenadante a 8000g durante 30 minutos (clarificação);
- 3- 480mL de sobrenadante é acrescido de 120mL de solução PEG 40% e deixado a 4C durante 18horas. A concentração final de PEG deve ser 8%;

Nota: Usar béquer ou erlenmeyer tampado.

- 4- Centrifugar a 12000g durante 1hora;
- 5- Ressuspender o sedimento em Tampão fosfato 10mM pH 7,4 (mais ou menos 10mL);
- 6- Depositar a suspensão em colchão de sacarose 10% (mais ou menos 1:10);

Nota: Cuidado para não misturar, deve escorrer pelas paredes do tubo.

- 7- Centrifugar a 3600g durante 2horas a 4 °C;

Nota: verificar capacidade dos tubos e rotor.

- 8- Ressuspender o sedimento em Tampão fosfato de sódio 10mM pH 7,4 + EDTA + PMSF (mais ou menos 4mL) e misturar com 10 volumes de éter etílico (40mL);
- 9- Incubar durante 2horas a 4C sob agitação;
- 10- Remover o éter com auxílio de pipeta;
- 10-Armacenar a suspensão resultante a -20C até a realização dos testes.

Protocolo 6

PCR Nested – “double round”

Fieni, 2010

Duas etapas para a amplificação de PCR foram utilizadas para detectar a sequência do gene GAG da CAE. Na primeira etapa, a detecção viral foi realizada via a amplificação do fragmento localizado entre o nucleotídeo 393 e nucleotídeo 1291, utilizando o par de “primers” externo GAG EX5 (5'- GAA GTG TTG CTG CGA GAG GTC TTG -3') e GAG EX 3 (5'- TGC CTG ATC CAT GTT AGC TTG TGC - 3'). Imediatamente após a primeira etapa iniciou-se a segunda, amplificando o fragmento localizado entre o nucleotídeo 524 e nucleotídeo 1036, com o uso do “primer” GAG IN5 (5'- GAT AGA GAC ATG GCG AGG CAA GT - 3') e GAG IN3 (5'- GAG GCC ATG CTG CAT TGC TAC TGT - 3').

Para a primeira etapa, 10 µL de DNA foi adicionado a 40 µL da solução de amplificação ou “Mix 1”: 5 µL de tampão de reação (10X) (670 mM Tris-HCl (pH 8.8), 160mM (NH₄)₂SO₄, 0,1% TWEEN-20); 5 µL de MgCl₂ (50 mM); 1 µL de dNTP (25mM de cada oligonucleotídeo trifosfato: dATP, dGTP, dCTP, dTTP); 0,25 µL TAQ Polymerase (Promega); 1,0 µL de cada primer GAG EX5 e GAG EX3 e 26,75 µL de água livre de DNase e RNase. Para a segunda etapa, 5 µL da primeira reação foi adicionada a 45 µL do “Mix 2”, contendo os mesmos reagentes do “MIX 1”, exceto o 10 µL tampão de reação (5X) contendo o tampão “loading”, primers GAG IN5 e GAG IN3.

Para cada round, seguiu-se a desnaturação inicial à temperatura de 94°C durante 5 min, as amostras foram submetidas a uma série de 35 ciclos compreendendo, 30 seg da fase de desnaturação a 94°C, a fase de hibridização 55 °C durante 30seg e da fase de extensão a 72 °C por um min e meio. A fase de extensão final foi realizada a 72 °C durante 5 min.

Produtos amplificados foram visualizados usando gel de agarose 1,5% na eletroforese contendo brometo de etídeo em tampão TBE (1x): 15 µL da fração amplificada foi adicionada por poço no gel. Dois poços foram utilizados como controle negativo (água) e controle positivo (membrana sinovial caprina), assim como 5 µL do marcador de peso molecular “DNA ladder” 100pb (Jena Bioscience – Jena, Alemanha). As bandas marcadas foram entre 1000 e 200pb, sendo que o controle amplificado foi de 512pb. Após a separação através da eletroforese, as bandas foram visualizadas usando transluminador L Pix (Loccus Biotecnologia – Cotia, Brasil) com luz ultravioleta.

Protocolo 7

Controle interno - β actina

Ali Al Ahmad *et al.*, 2008

Para a confirmação da presença de DNA ou cDNA foi realizada uma PCR Nested, utilizando-se β -actina como controle interno. Para o primeiro “round” 5 μ L de DNA ou cDNA foi adicionado a 45 μ L da solução “Mix 1”: 10 μ L de tampão de reação (5X); 3 μ L de $MgCl_2$ (25 mM); 1 μ L de dNTP (10 mM); 0,25 μ L TAQ Polymerase (Promega); 1,5 μ L de cada primer ES30 (5' - TCA TGT TTG AGA CCT TCA ACA CCC AG - 3') e ES32 (5' - CCA GGG GAA GGC TTG AAG AGT GCC - 3') e 27,75 μ L de água livre de DNase e RNase. Para o segundo “round” 2 μ L da primeira reação foi adicionada a 48 μ L do “Mix 2”, contendo os mesmos reagentes do “MIX 1”, exceto o H₂O DNase e RNase no vol de 30,75 μ L e os primers ES 31 (5' - CC CAG CCA TGT ACG TTG CTA TTC - 3') e ES 33 (5' - GCC TCA GGG CAG CGG AAC CGC TCA - 3') (Ali Al Ahmad *et al.*, 2008).

Protocolo 8

Síntese de cDNA - Promega®

Para a primeira etapa adicionou-se 10 µL da amostra de RNA juntamente com 1 µL de random primer, incubou-se a 70°C/5min. Subsequentemente acondicionou-se o microtubo em gelo e adicionou-se o “Mix” de 5 µL MML V Buffer 5X + 5 µL DNT0 10mM + 1 µL Rnasin + 1 µL MML V + 2 µL H₂O Dnase e Rnase free, incubou-se 65°C/ 10min.

Protocolo 9

Superovulação

Protocolo adaptado

O protocolo utilizado foi: esponjas contendo 60mg de acetato de medroxiprogesterona (MAP) (Progespon® - Intervet, Cotia, Brasil) foram inseridas no dia 0 (D0) por via intravulvar, permanecendo por sete dias. Após quatro dias (D4), FSH/LH (Pluset® - Hertape Calier Saúde Animal – Juatuba, Brasil) na concentração de 5UI/kg (dose máxima 400 UI) foram administradas i.m. em seis doses decrescentes, duas vezes ao dia. No dia seis (D6) do protocolo, 37,5 mg de D-cloprostenol (Prolise® - Arsa, Buenos Aires, Argentina) foi administrado via paravulvar. Quarenta e oito horas após, 500UI de hCG (gonadotrofina coriônica humana - Vetecor® 5000UI – Hertape Calier Saúde Animal – Barcelona, Espanha) i.m. foi administrada. No dia 10 após o início do tratamento hormonal, 0,750 mg de flunexim meglumine (Banamine® - Schering-Plough Veterinária - Alemanha) foi administrado i.m. uma vez ao dia, durante três dias, para evitar a regressão luteal precoce. Administrou-se 37,5 mg de D-cloprostenol i.m., seis horas antes da colheita embrionária para auxiliar na dilatação cervical das fêmeas.

Protocolo 10

Lavagem de embriões com tripsina

Stringfellow, D.A. e Seidel, S.M., 1998

Recomendações para o manuseio sanitário de embriões obtidos in vivo

1. Fazer cinco banhos com PBS + 50 μ L de ATB + 0,4% BSA
2. Duas lavagens com tripsina 0,25% + Hank's sem Ca e Mg (pH 7,6 ou 7,8)
3. E por último 5 (cinco) banhos com PBS + 0,4% de ATB + 2% SFB ou 0,4% BSA (para inativar a tripsina)

Obs. 1) A tripsina + Hank's devem ser preparados no momento do uso

2) Tripsina deve ser armazenada em alíquotas e congeladas

3) Cada gota de lavagem deve conter 200 μ L

4) De acordo com a terceira edição do Manual da IETS a tripsina por até 5 minutos não diminui a viabilidade do embrião.