

COMUNICAÇÃO CIENTÍFICA

DETECÇÃO DO VÍRUS DA ARTRITE ENCEFALITE CAPRINA NO SÊMEN ATRAVÉS DAS TÉCNICAS DE PCR E NESTED-PCR

L. Gregory¹, M.C.C.S.H. Lara², M.Y. Hasegawa¹, R.S. Castro³,
J.N.M. Rodrigues⁴, J. Araújo⁴, L.W. Keller⁴, L.K.F. Silva¹, E.L. Durigon⁴

¹Universidade de São Paulo, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Av. Prof. Orlando Marques de Paiva, 87, CEP 05508-000, São Paulo, SP, Brasil. E-mail: gregory@fmvz.usp.br

RESUMO

A Artrite Encefalite Caprina é uma enfermidade de caráter multissistêmico afetando animais de qualquer idade e sexo; causado por um *Lentivirus* caprino pertencente ao grupo de Lentivirus de Pequenos Ruminantes. Os sintomas conhecidos são leucoencefalomielite, pneumonia intersticial crônica, artrite e mastite intersticial enduretiva. Foi descrito que machos soropositivos apresentavam sêmen infectado pelo Lentivirus e processo inflamatório gradual do testículo. A detecção em amostras de sêmen pelas técnicas de PCR e nested-PCR são caracterizadas como métodos de altas especificidade e sensibilidade provendo resultados rápidos. O objetivo do estudo foi detectar, por meio da técnica molecular de PCR e nested-PCR, a presença de DNA pró-viral do Lentivirus caprino em amostras de sêmen de reprodutores criados no Estado de São Paulo. Das 17 amostras, cinco (29,4%) apresentaram a detecção do vírus provando que há a presença de partículas virais no sêmen dos caprinos reprodutores soropositivos a Artrite Encefalite Caprina estudados.

PALAVRAS-CHAVE: Caprino, Artrite Encefalite Caprina, *Lentivirus*, sêmen, nested-PCR.

ABSTRACT

CAPRINE ARTHRITIS ENCEPHALITIS VIRUS DETECTED BY PCR AND NESTED PCR IN GOAT SEMEN. Caprine arthritis encephalitis is a multisystemic infectious disease caused by a lentivirus and may affect animals of any age or sex. The major symptoms are leucoencephalomyelitis, chronic interstitial pneumonia, arthritis and hardening interstitial mastitis. It has been reported that the testicles of infected animals present infected semen and a gradual inflammatory process. For the detection of the agent in semen samples, PCR and nested PCR techniques are characterized as methods with high specificity and sensibility that provide fast results. The objective of this study was to detect the presence of pro-lentiviral DNA in the semen of caprine males in São Paulo State, Brazil, by the PCR and nested PCR molecular techniques. Five (29.4%) of the 17 samples presented positivity for the detection of the virus, proving the presence of viral particles in the semen of male goats seropositive for caprine arthritis encephalitis in this study.

KEY WORDS: Caprine, caprine arthritis encephalitis, lentivirus, semen, nested PCR.

O Brasil possui um rebanho caprino significativo no contexto pecuário nacional, com aproximadamente 9.164.421 de cabeças, sendo que 90,6% encontram-se na região Nordeste (IBGE, 2009). Mesmo tratando-se de um sistema de criação muito antigo em nosso país, a caprinocultura ainda apresenta uma série de problemas que dificultam a produção econômica desses animais e necessitam de urgentes soluções, visando diminuir os grandes prejuízos que causam a essa produção agropastoril. De fundamental importância dentre esses fatores, destacam-se

as enfermidades infecto-contagiosas ainda muito comuns nos rebanhos brasileiros, associadas a outras ainda consideradas como emergentes. Entre elas, merecendo atualmente destaque, a Artrite-Encefalite Caprina (CAE).

A CAE foi definida como uma enfermidade infecciosa, multissistêmica, causada por vírus pertencente ao gênero *Lentivirus* que infecta caprinos de todas as idades, independente do sexo, raça e tipos de produção econômica (LARA, 2002). A doença é de difícil controle, sobretudo pela indisponibilidade de

²Instituto Biológico, Centro de Pesquisa e Desenvolvimento de Sanidade Animal, São Paulo, SP, Brasil.

³Universidade Federal de Pernambuco, Recife, PE, Brasil.

⁴Universidade de São Paulo, Instituto de Ciências Biomédicas, São Paulo, SP, Brasil.

vacinas e pela sua ampla distribuição em plantéis de excelente qualidade zootécnica e grande valor econômico.

A transmissão venérea do vírus da CAE (CAEV) ainda não foi confirmada, apesar da detecção de DNA pró-viral no sêmen de bodes naturalmente infectados (ANDRIOLI *et al.* 2006). Porém, a comprovação da presença do lentivírus no sêmen reforça a possibilidade da transmissão do CAEV pela via sexual. ROWE *et al.* (1992) observaram maiores taxas de soro-conversão em fêmeas cobertas por machos soropositivos do que naquelas cobertas por machos negativos. ANDRIOLI *et al.* (2006) concluíram que a transmissão do CAEV pelo sêmen de reprodutores caprinos é potencializada pela presença de inflamações testiculares, pois os lentivírus infectam monócitos e macrófagos (NASH *et al.*, 1995), e a presença de inflamações poderia desencadear o maior fluxo dessas células, resultando em aumento da carga viral no sêmen. ANDRIOLI *et al.* (2006) relataram ainda que, mesmo realizando a lavagem do sêmen caprino a fim de diminuir a carga viral, não elimina, totalmente, o lentivírus caprino no sêmen.

O sêmen pode ser contaminado por micro-organismos que afetam diretamente os órgãos reprodutores ou pelo sangue e líquidos tissulares que carregam micro-organismos para estes órgãos (ANDRIOLI *et al.* 2006). Em pequenos ruminantes, vários patógenos foram detectados no sêmen, com transmissão potencial ou comprovada, incluindo os lentivírus que infectam caprinos (ANDRIOLI *et al.*, 1999; TRAVASSOS *et al.*, 1999). ALI AL AHMAD *et al.* (2008) demonstraram pela primeira vez a presença do Lentivirus caprino em tecidos do trato genital masculino em machos infectados. Ainda, sugerem que monócitos e macrófagos, que são as principais células alvo do vírus *in vivo* (NARAYAN *et al.* 1983), podem estar presentes no lúmen dos ductos espermático e epididimal em concentrações suficientes para permitir a detecção, entretanto, sem afetar a função desses tecidos ou a fertilidade do esperma.

PETERSON *et al.* (2008) sugeriram que pequenos ruminantes possuem eliminação intermitente de DNA pró-viral de Lentivirus em ejaculado; e também demonstraram que uma única amostra de sêmen PCR-negativa não pode ser usada como uma ferramenta diagnóstica para prever que subsequentes ejaculados também estarão livres do Lentivirus.

A principal via de transmissão do CAEV é a digestiva, seguida pelo contato prolongado com animais infectados (ROWE *et al.*, 1992), porém, nem toda infecção pelo CAEV pode ser atribuída a estas duas vias de transmissão, haja vista que o vírus tem se mantido, por anos, em rebanhos submetidos a rígidos programas de controle da CAE (ANDRIOLI *et al.*, 2006).

Mais recentemente, estudos para a detecção do vírus da CAE pela técnica de PCR têm sido realizados em diversas amostras clínicas como células mononucleares de sangue periférico, explantes de membrana sinovial, leite, pulmão, linfonodo mesentérico, medula óssea e glândula mamária (RIMSTAD *et al.*, 1993; CASTRO *et al.*, 1999; BARLOUGH *et al.*, 1994). Algumas vantagens deste método são a alta sensibilidade e especificidade, a rapidez dos resultados que podem ser obtidos entre um e dois dias, além da possibilidade de detectar proteínas ou ácido nucleico em amostra na qual o vírus não permanece viável (GREGORY *et al.*, 2009).

Desta forma, e tendo em vista a relevância do vírus da CAE como agente causador de doenças em caprinos e de perdas econômicas delas decorrentes, o estudo das técnicas que facilitem o diagnóstico desse agente em animais infectados reveste-se de grande importância. O objetivo deste estudo foi detectar, pela técnica molecular PCR e nested-PCR, a presença de DNA pró-viral do lentivírus de pequenos ruminantes em amostras de sêmen de caprinos.

O experimento está de acordo com os princípios éticos de experimentação animal da "Comissão de Ética no Uso de Animais" da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo protocolado sob o nº 1326/08 e foi aprovado "ad referendum".

Foram colhidas amostras de sêmen de 17 machos da espécie caprina, provenientes de propriedades localizadas em Ibiúna, Itu, São Bernardo do Campo, São Paulo e Tatuí. Os animais foram pesquisados pelo teste de imunodifusão em ágar gel e foram selecionados os sororeagentes. As amostras de sêmen foram colhidas através do método de eletroejaculação, pois foram utilizados machos não condicionados pelo método de colheita com vagina artificial, e então acondicionadas em tubos Eppendorf de 1,5 mL estéreis, sem a adição de qualquer diluente ou conservador, sendo refrigerados durante o transporte. Os materiais foram mantidos a -70° C em freezer até o processamento.

O método utilizado de extração do DNA pró-viral das amostras foi o fenol/clorofórmio/álcool isoamílico (25:24:1). Neste procedimento, foram incubados 20 µL de amostra por 30 minutos a 56° C, em 150 µL de TNE (Tris HCl 10mM, EDTA 10 mM e NaCl 10mM, pH 8,0) acrescidos de 20 µL de SDS 10% (Dodecil Sulfato de Sódio) e 10 µL de pK (Proteinase K). A extração constituiu na realização de três lavagens consecutivas com UltraPure™ Buffer-Saturated Phenol (Invitrogen), UltraPure™ Phenol:Chloroform:Isoamyl Alcohol (25:24:1) (Invitrogen) e Clorofórmio 100%, respectivamente, centrifugadas a 13.500 rpm por quatro minutos cada em temperatura entre 18° C e 22° C. O material da extração foi armazenado a -20° C, até sua utilização

na amplificação. O controle negativo foi feito com água DEPC, enquanto que o controle positivo realizado com amostra padrão de DNA pró-viral CAEV Cork derivada de cultivo de células de membrana sinovial caprina infectadas.

Os cDNAs obtidos foram utilizados para amplificação de uma região conservada do gene *pol*, empregando-se primers senso e anti-senso (P1 - 5' DSA AGA RAA ATT ARA RGG 3' e P2 - 5' ATC ATC CAT RTA TAT BCC AAA TTG 3'), nas posições 2198 - 2215 e 2672 - 2650, respectivamente, para amplificar fragmentos de tamanhos de 475pb na PCR (LEROUX *et al.* 1995); e para a segunda amplificação da região mais interna do gene, empregou-se primers senso e antissenso (PN1 - 5' GGA AAD GCA CCY CCA CAT TG 3' e PN2 5' CAT GGT CCR AYA TTA TTA GG 3' onde D = G, A ou T; Y = C ou T; e R = A ou G), para amplificar fragmentos de tamanhos de 278pb na nested-PCR. Os primers foram sintetizados no DNA synthesizer (Life Technologies, Inc. Gibco BRL, University of Kentucky, CA, USA).

Os cDNAs foram amplificados em um volume total de 50 µL contendo uma mistura de reagentes (50 mM KCl; 10 mM Tris HCl (pH 8,0); 1 mM EDTA; 5 mM MgCl₂; 0,1% Triton X (pH 8,0); 50% glycerol (v/v); 20 µM cada dATP, dGTP, dTTP e dCTP; e 1 U de Taq Polymerase). As amostras foram primeiramente denaturadas a 95° C por 5 minutos e depois sujeitas a 35 ciclos de amplificação. Denaturação foi realizada a 95° C por 45 segundos, hibridização a 55° C por 45 segundos e extensão a 72° C por 45 segundos. A extensão final foi realizada a 72° C por 8 minutos e as amostras foram mantidas a 4° C até a sua retirada do termociclador. Os primers

foram usados a uma concentração de 10 pM cada. A reação de amplificação ocorreu no termociclador Gene Amp® PCR System 9700 (Applied Biosystems).

Os fragmentos de DNA amplificados foram analisados por eletroforese em gel de agarose a 1,2% com tampão TBE (Tris Borato 0,09M e EDTA 0,002M pH 8,0), corados com de brometo de etídio, visualizados em luz ultravioleta com o auxílio de transiluminador e o registro fotográfico foi efetuado no fotodocumentador (BIORAD®). A corrida eletroforética foi desenvolvida a 80 V durante 35 minutos.

Das 17 amostras, 5 (29,4%) apresentaram a detecção do vírus provando que há a presença de partículas virais no sêmen de caprinos reprodutores no Estado de São Paulo.

Do total das cinco amostras positivas, três mostraram-se positivas somente ao PCR, uma amostra mostrou-se positiva somente ao nested-PCR e outra positiva tanto ao PCR quanto ao nested-PCR. Na Figura 1 são demonstradas duas amostras de sêmen positivas somente ao PCR.

Das 17 amostras, cinco (29,4%) apresentaram a detecção do vírus provando que há a presença de partículas virais no sêmen de caprinos reprodutores no Estado de São Paulo. De acordo com a literatura consultada, há indícios que o coito pode ser uma possível via de transmissão da CAEV, porém, no Brasil, são raros os trabalhos sobre este tema. Conclui-se que, devido ao risco de transmissão da CAE pelo sêmen e a sua detecção em machos de rebanhos brasileiros, pesquisas que avaliem a sua possível transmissão devem ser realizadas para prevenir os órgãos competentes a realizar medidas de controle futuras.

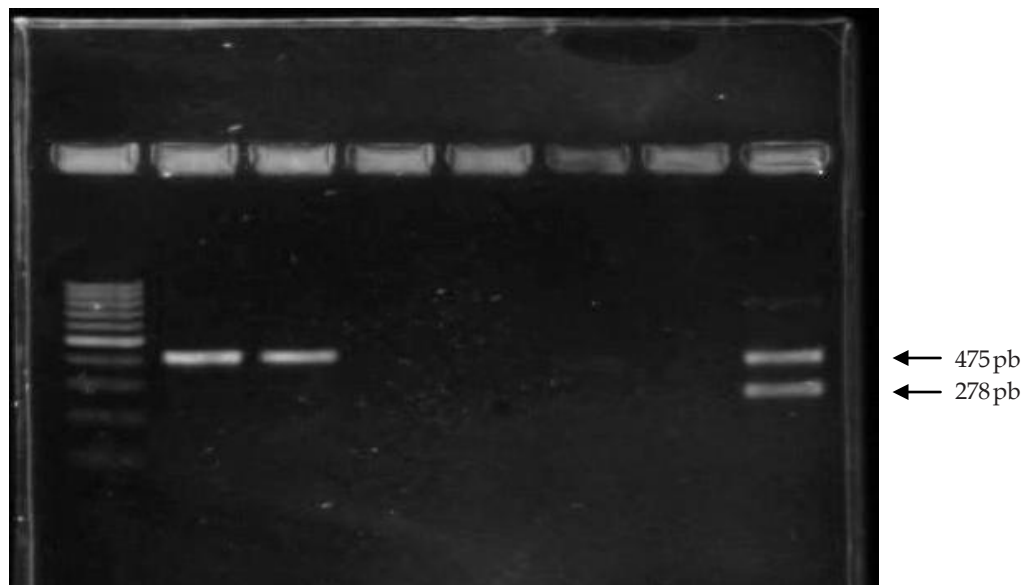


Fig. 1 - Eletroforese em gel agarose 1,2% corado com brometo de etídio e visualizado sob luz ultravioleta. Orifício 1: padrão de peso molecular de 100pb DNA Ladder. Orifício 2 e 3: amostras de sêmen positivas a PCR. Orifício 4 a 6: amostras sêmen negativas. Orifício 7: controle negativo água DEPEC. Orifício 8: controle positivo amostra padrão CAEV Cork 475 pb (PCR) e 278 pb(nested-PCR).

A possibilidade de detecção de material genético do vírus no sêmen pode sugerir um contato prévio com o vírus e ainda apontar um status de eliminação do vírus por essa via.

Sabendo que a transmissão pode ocorrer geralmente por via digestiva através da ingestão de colostro e leite contaminados (PERETZ *et al.*, 1993), sobretudo pelo aleitamento coletivo adotado em criações intensivas sendo como uma forma de manejo que favoreceria a disseminação da infecção viral, ELLIS *et al.* (1986) sugeriram que a via reprodutiva poderia ser outra via de disseminação do vírus da CAE sustentado pelo fato da detecção do vírus nessa secreção.

Apesar dos estudos intensos sobre o CAEV, ainda persistem demandas por pesquisas aplicadas, como o desenvolvimento de protocolos de técnicas de diagnóstico mais eficientes, bem como de pesquisas básicas que possam fornecer subsídios para o conhecimento do CAEV, sua biologia e relação com o hospedeiro na natureza.

O uso da PCR em rotina de diagnóstico deve atender a certos requisitos básicos, como a rigorosa observância dos procedimentos para evitar falso positivos, o barateamento dos testes e simplificação dos protocolos, além da validação de sua capacidade de amplificar fragmentos conservados do genoma de amostras existentes na população alvo (CASTRO, 1998). Segundo RIMSTAD *et al.* (1993) e CHEBLOUNE *et al.* (1996), a PCR tem ainda se apresentado como potencial alternativa na identificação de animais com sorologia negativa ou dúbia. A utilização da PCR pode agregar mais informações quanto ao diagnóstico, porém, sempre associado a outras técnicas diagnósticas.

As bandas do controle positivo localizadas na altura de 475pb e 278pb confirmam a adequação do PCR e do nested-PCR, respectivamente, para detectar o vírus da Artrite e Encefalite dos Caprinos em amostras de sêmen de caprinos infectados pelo referido vírus.

Pode-se suspeitar de que o processo de armazenamento das amostras do sêmen dos animais em freezer a -70° C tenha contribuído para a grande negatividade diagnóstica encontrada, já que é possível a degeneração do material genético do vírus, tornando-o inviável. E, ainda, para concentrar a quantidade de células parasitadas pelo vírus presente no material para extração, poderia ter sido realizado uma separação em gradiente de Percoll das amostras a fim de obter diferentes frações celulares do ejaculado como realizado em PETERSON *et al.* (2008) ou realizado centrifugação e separação em gradiente de Ficoll como realizado em ALI AL AHMAD *et al.* (2008). Porém, segundo ANDRIOLI *et al.* (2006) e PETERSON *et al.* (2008), a variação na detecção do LVC, em ejaculados de um mesmo animal, sugeriram que

a presença do DNA pró-viral no sêmen de caprino não é constante ou pode estar em quantidades mínimas não detectáveis, sendo plausível pela grande negatividade encontrada nesse estudo.

Com a possibilidade de transmissão do Lentivirus caprino por sêmen durante monta ou IA, justifica-se a necessidade de reprodutores livres de CAEV, criados em rebanhos regularmente testados para a doença, a fim de utilizá-los como doadores de esperma para IA em programas de seleção genética (ALI AL AHMAD *et al.* 2008).

A presença do vírus da CAE no sêmen pode ter implicações na disseminação e controle da doença. Mais importante é aumentar o conhecimento sobre a manifestação do vírus e suas implicações também em outras enfermidades de espécies diferentes como a proximidade entre o vírus do Maedi-Visna em ovinos e também em humanos pela reatividade cruzada com HIV tipo 1 (TESORO-CRUZ *et al.* 2003). Além do conhecimento adquirido, os resultados apresentados podem contribuir para um maior entendimento desse organismo e ainda auxiliar nas medidas de controle sanitário que podem ser adotadas.

AGRADECIMENTOS

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico pela bolsa concedida.

REFERÊNCIAS

- ALEXANDER, N.J. Sexual transmission of human immunodeficiency virus: virus entry into the male and female genital tract. *Fertility and Sterility*, v.54, p.1-18, 1990.
- ALI AL AHMAD, M.Z.; FIENI, F.; PELLERIN, J.L.; GUIGUEN, F.; CHEREL, Y.; CHATAGNON, G.; BOUZAR, A.B.; CHEBLOUNE, Y. Detection of viral genomes of caprine arthritis-encephalitis virus (CAEV) in semen and in genital tract tissues of male goat. *Theriogenology*, v.69, p.473-480, 2008.
- ANDRIOLI, A.; GOUVEIA, A.M.G.; PINHEIRO, R.R.; ROCHA, M.A.; MARTINS, A.S.; SANTOS, D.O. Detecção do DNA próviral do lentivírus caprino em sêmen de bodes naturalmente infectados. *Revista Brasileira de Reprodução Animal*, v.23, p.420-421, 1999.
- ANDRIOLI, A.; GOUVEIA, A.M.G.; MARTINS, A.S.; PINHEIRO, R.R.; SANTOS, D.O. Fatores de risco na transmissão do lentivírus caprino pelo sêmen *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, v.41, n.8, p.1313-1319, 2006
- BARLOUGH, J.; EAST, N.; ROWE, J.D.; HOOSEAR, K.V.; DEROCK, E.; BIGORNIA, L.; RIMSTAD, E. Double-nested polymerase chain reaction for detection

- of caprine arthritis-encephalitis virus proviral DNA in blood, milk, and tissues of infected goats. *Journal of Virological Methods*, v.50, p.101-113, 1994.
- CASTRO, R.S. *Lentivirus de pequenos ruminantes: ensaios imunoenzimáticos, perfil sorológico e influência filogenéticas*. 1998. 132f. Tese (Doutorado) - Escola de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 1998.
- CASTRO, R.S.; GREENLAND, T.; LEITE, R.C.; GOUVEIA, A.; MORNEX, J.F.; CORDIER, G. Conserved sequence motifs involving the tat reading frame of Brazilian caprine lentiviruses indicate affiliations to both caprine arthritis-encephalitis virus and visna-maedi virus. *Journal of General Virology*, 80, 1583-1589, 1999.
- CHEBLOUNE, Y.; KARR, B.; SHEFFER, D.; LEUNG, K.; NARAYAN, O. Variation in lentiviral gene expression in monocyte-derived macrophages from naturally infected sheep. *Journal of General Virology*, v.77, p.2037-2051, 1996.
- ELLIS, T.M.; ROBINSON, W.F. Caprine arthritis-encephalitis virus infection: from recognition to eradication. *Australian Veterinary Journal*, v.63, n.8, p.237-241, 1986.
- GREGORY, L.; LARA, M.C.C.S.H.; VILLALOBOS, E.M.C.; HASEGAWA, M.Y.; CASTRO, R.S.; RODRIGUES, J.N.M.; ARAÚJO, J.; KELLER, L.W.; DURIGON, E.L. Detecção do vírus da Artrite Encefalite Caprina em amostras de leite de cabras pela reação em cadeia da polimerase (PCR) e nested-PCR. *Ars Veterinária*, v.25, n.3, p.142-146, 2009.
- IBGE. INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. *Tabelas de resultados 2009*. - Disponível em: <http://www.ibge.gov.br/home/estatistica/economia/ppm/2009/tabelas_pdf/tab04.pdf>. Acesso em: 7 jun. 2011.
- LARA, M.C.C.S.H.; BIRGEL JUNIOR, E.H.; REISCHAK, D.; MOOJEN, V.; GREGORY, L.; OLIVEIRA, J.C.F.; BIRGEL, E.H. Identificação imuno-sorológica de anticorpos anti-vírus da artrite-encefalite dos caprinos: comparação das técnicas de difusão em gel de Agar, ensaio imunoenzimático e imunofluorescência indireta. *Arquivos do Instituto Biológico*, São Paulo, v.69, n.1, p.1-5, 2002.
- LEROUX, C.; VUILLERMOZ, S.; MORNEX, J. F.; GREENLAND, T. Genomic heterogeneity in the *pol* region of ovine lentiviruses obtained from bronchoalveolar cells of infected sheep from France. *Journal of General Virology*, v.76, p.1533-1537, 1995.
- NARAYAN O, KENNEDY-STOSKOPF S, SHEFFER D, GRIFFIN DE, CLEMENTS JE. Activation of Caprine Arthritis-Encephalitis Virus expression during maturation of monocytes to macrophages. *Infection and Immunity*, v.4 p.67-73, 1983.
- NASH, J.W.; HANSON, L.A.; COATS, K.C. Bovine immunodeficiency virus in stud bull semen. *American Journal of Veterinary Research*, v.56, p.760-763, 1995.
- PERETZ, G.; ASSO, J.; DEVILLECHASSE, P. Le C.A.E.V.: revue des connaissances actuelles et conséquences pratiques. *Revue de Médecine Vétérinaire*, v.144, p.93-98, 1993.
- PETERSON, K.; BRINKHOF, J.; HOUWERS, D.J.; COLENBRANDER, B.; GADELLA, B.M. Presence of pro-lentiviral DNA in male sexual organs and ejaculates of small ruminants. *Theriogenology*, v.69, p.433-442, 2008.
- RIMSTAD, E.; EAST, N.E.; TORTEN, M.; HIGGINS, J.; DEROCK, E.; PEDERSEN, N.C. Delayed seroconversion following naturally acquired caprine arthritis-encephalitis virus infection in goats. *American Journal of Veterinary Research*, v.54, p.1858-1862, 1993.
- ROWE, J.D.; EAST, N.E.; THURMOND, M.C.; FRANTI, C.E.; PEDERSEN, N.C. Cohort study of natural transmission and two methods for control of caprine arthritis-encephalitis virus infection in goats on a California dairy. *American Journal of Veterinary Research*, v.53, p.2386-2395, 1992.
- TESORO-CRUZ, E.; HERNANDEZ-GONZALEZ, R.; KRETSCHMER-SCHMIDT, R.; AGUILAR-SETIÉN, A. Cross-reactivity between Caprine Arthritis Encephalitis virus and type 1 Human Immunodeficiency virus. *Archives of Medical Research*, v.34, p.362-366, 2003.
- TRAVASSOS, C.E.; BENOÎT, C.; VALAS, S.; SILVA, A.G. da; PERRIN, G. Caprine arthritis-encephalitis virus in semen of naturally infected bucks. *Small Ruminant Research*, v.32, p.101-106, 1999.

Recebido em 11/8/10

Aceito em 10/6/11