



DNA proviral do Vírus da Artrite Encefalite Caprina (CAEV) em sêmen durante infecção aguda e crônica

Kelma Costa de Souza¹; Alice Andrioli²; Raymundo Rizado Pinheiro³; Lucia Helena Sider⁴; Marta Fonseca Martins⁵; Isabela Gomes Barreto da Motta⁶; Renato Mesquita Peixoto⁷; Maria Fátima da Silva Teixeira⁸

¹ Bolsista do Programa Nacional de Pós-Doutorado (PNPD/CAPES) Mestrado Acadêmico em Zootecnia da Universidade Estadual Vale do Acaraú (UVA), Sobral-CE. Email: kelma_zoo@hotmail.com; ² Pesquisadora Embrapa Caprinos e Ovinos, Sobral-CE; ³ Pesquisador Embrapa Caprinos e Ovinos, Sobral-CE; ⁴ Pesquisadora Embrapa Caprinos e Ovinos, Sobral-CE; ⁵ Pesquisadora Embrapa Gado de Leite, Juiz de Fora-MG; ⁶ Estagiária Embrapa Gado de Leite, Juiz de Fora-MG; ⁷ Doutorando do Programa de Pós Graduação em Ciências Veterinárias da Universidade Estadual do Ceará (UECE), Fortaleza-CE; ⁸ Professora Universidade Estadual do Ceará (UECE), Fortaleza-CE

Resumo: Sabe-se que o Vírus da Artrite Encefalite Caprina (CAEV) é transmitido pela via reprodutiva, portanto, faz-se necessário um entendimento da dinâmica do CAEV no sêmen de reprodutores tanto na infecção aguda como em infecção crônica. Para a previsão da magnitude do CAEV no sêmen e o tempo de máximo risco da transmissão sexual do lentivírus. Para tanto, 11 reprodutores caprinos ($n = 5$) recentemente infectados e ($n = 6$) em fase crônica da infecção tiveram sêmen coletado ao longo de três meses. O DNA das amostras foi extraído utilizando QIAamp DNA mini kit (QIAGEN, USA) de acordo com as instruções do fabricante. Dois rounds da reação em cadeia da polimerase *nested* (nPCR) foram realizados para amplificar um fragmento de 185pb do DNA proviral do CAEV com base na região *gag*. Dos cinco animais do grupo na fase aguda em 4/5 foi detectado o provírus no sêmen no primeiro mês de infecção, onde pode-se observar um pico de eliminação do vírus, seguido por um rápido declínio. Dos animais pertencentes ao grupo crônico o provírus foi detectado em 4/6. Numa avaliação individual, verificou-se intermitência entre positividade e negatividade na nPCR de um mesmo animal em todas as fases da infecção. Estes resultados demonstram que machos com infecção recente eliminam o CAEV no sêmen e podem vir a ser infecciosos nos primeiros meses após a infecção.

Palavras-chave: gene *gag*; infecção recente; provírus

Caprine Arthritis Encephalitis Virus (CAEV) proviral DNA in semen during acute and chronic infection

Abstract: That CAEV has been transmitted by the reproductive path, furthermore, the dynamic of the CAEV needs to be understood in the reproducer semen in both the acute and chronic infection stages and to predict the CAEV magnitude in the semen and the maximum risk time for sexual transmission of the lentivirus. Therefore, 11 goat reproducers, ($n = 5$) recently infected and ($n = 6$) in the chronic phase of the infection semen were collected over three months. The DNA was extracted from the semen samples using the QIAamp DNA Mini Kit (QIAGEN, USA) according to the manufacturer's instructions. Two rounds of polymerase chain reaction (nested PCR) were carried out to amplify the final 185pb fragment of the proviral DNA corresponding to the CAEV *gag* gene. Of the five animals with recent infection "acute phase" in 4/5 the provirus has been detected in the first month of infection, that virus elimination peaked in the first month of infection and then declined rapidly. Of the animals belonging to the group chronic the provirus has been detected in 4/6. In an individual assessment, intermittence was observed between positivity and negativity in the nPCR of the same animal in all the phases of infection. The results showed the goats recently infected eliminated the provirus in the semen, may be infectious in the first months after being infected.

Keywords: *gag* gene; provirus; recent infection

INTRODUÇÃO

A transmissão sexual do Vírus da Artrite Encefalite Caprina (CAEV) foi recentemente comprovada através de inseminação artificial (IA) (SOUZA et al., 2013). Demonstrando que reprodutores infectados são importantes fontes de infecção. Os riscos consistem em i) A presença do CAEV no sêmen não é necessariamente concordante as amostras de sangue. Portanto, técnicas de detecção do vírus como a reação em cadeia da polimerase (PCR) quando realizada nas células do sangue pode não ser um método fiável de seleção de animais com sêmen livre de CAEV. ii) Machos com infecção recente podem apresentar o material genético do vírus no sêmen antes da detecção dos anticorpos no soro sanguíneo.

Diante desta realidade, faz-se necessário um entendimento da dinâmica do CAEV no sêmen de reprodutores nas diferentes fases da infecção. Para a previsão da magnitude do CAEV neste meio e o tempo de máximo risco da transmissão sexual do lentivírus.

OBJETIVOS

O objetivo do presente trabalho foi estudar a dinâmica do CAEV no sêmen em reprodutores nas fases aguda e crônica da infecção.

MATERIAIS E MÉTODOS

Foram utilizados onze machos caprinos pertencentes ao rebanho experimental da Embrapa Caprinos e Ovinos. Cada animal foi avaliado no pré-experimento através do teste de *western blotting* (WB) para confirmação do quesito positividade e/ou negatividade para o CAEV. Dois grupos então foram constituídos, G1 (n = 5) composto pelos machos negativos que foram experimentalmente infectados, com 1mL da cepa padrão CAEV-Cork título (10^5 TCID₅₀/mL) via intramuscular, para representar a fase aguda da CAE. E G2 (n = 6) grupo com infecção crônica formado por reprodutores naturalmente infectados.

As coletas de sêmen ocorreram semanalmente no primeiro mês de infecção e quizenalmente até o terceiro mês do experimento. O método de coleta foi por vagina artificial. Sendo as amostras estocadas a -80 °C até o momento da extração do DNA, que foi realizada utilizando QIAamp DNA mini kit (QIAGEN, USA) de acordo com as instruções do fabricante. Utilizou-se a reação em cadeia da polimerase *nested* (nPCR) para amplificar um fragmento de 185pb do DNA proviral do CAEV, com base na região *gag* segundo metodologia de Andrioli et al. (2006).

As análises estatísticas foram realizadas com EpiInfo™ versão 6.0 por meio do qui-quadrado (χ^2) e o teste exato de Fisher. O limite de confiança para os testes foi fixado em 5 % (P > 0,05).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

No presente estudo, detectou-se através da nPCR a presença do DNA proviral do CAEV em amostras de sêmen de machos com infecção recente “fase aguda” e em fases avançadas da CAE “fase crônica”.

Relacionado ao grupo G1 constituído pelos animais recentemente infectados, o produto de 185bp correspondente ao gene *gag* do CAEV foi amplificado no sêmen em 4/5 dos animais pertencentes ao grupo, enfatizando que entre a terceira e quinta semana pós infecção quatro dos cinco bodes já haviam eliminado o provírus no sêmen. Comprovando que machos na fase aguda da infecção excretam o vírus no ejaculado, representando importante fonte de infecção. Em estudo semelhante, Paula et al. (2009) detectaram o DNA proviral do CAEV no sêmen de machos recentemente infectados antes da detecção dos anticorpos no sangue. Estes achados demonstram o risco de reprodutores disseminarem o CAEV nos rebanhos por monta natural (MN) ou IA.

Em todo o período experimental foram coletadas 55 amostras do G1, sendo o provírus detectado em dez (18,1%) das amostras. Destas, 2/10 (20%) detectados na terceira semana após a inoculação e manteve-se até a coleta seguinte. Com cinco semanas de infecção, o percentual de positividade observado foi de 30% (3/10); nas duas coletas seguintes 10% (1/10) de detecção e nas últimas não houve resultado positivo (Tabela 1). Nesse período, como dinâmica do CAEV no sêmen foi observado um pico de eliminação do vírus da terceira a quinta semana após a infecção, seguido por um breve declínio. Todavia pode ser uma característica presente em infecções por lentivírus. Já que, esta mesma dinâmica foi descrita em estudos com o HIV (PILCHER et al. 2007) e em macacos rhesus infectados de forma aguda (PULLIUM et al. 2001).

Em uma avaliação individual, verificou-se intermitência entre positividade e negatividade na nPCR de um mesmo animal. Dos cinco reprodutores em 1/5, o provírus foi detectado no sêmen uma única vez; 3/5 três vezes; e 1/5 em nenhum momento detectou-se o provírus no ejaculado (Tabela 1). Eliminação intermitente também foi constatada em infecções por outros lentivírus, contudo, não está claro se a falta de detecção dos lentivírus no sêmen em diferentes momentos é devido à ausência do material genético, ou ao número de células infectadas em quantidades mínimas não detectáveis pelos testes. Outra hipótese é que os macrófagos possam se encontrar em baixa quantidade no sêmen desses animais.

Tabela 1. Resultado dos testes de reação em cadeia de polimerase *nested* (nPCR) no sêmen dos reprodutores com infecção aguda e infecção crônica.

Semanas	Animais Grupo G1						Animais Grupo G2					
	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K	
1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
3	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	
4	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	
5	-	+	-	+	+	+	-	-	-	-	-	
6	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	
7	-	+	-	-	-	-	+	-	-	+	-	

8	-	-	-	+	-	-	-	+	-	-	-
9	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-
10	-	-	-	-	-	+	-	+	-	-	-
11	-	-	-	-	-	+	+	+	-	-	-

Animais Grupo G1 "infecção aguda"(A, B, C, D, E); Animais Grupo G2 "infecção crônica" (F, G, H, I, J, K); (-) Resultado Negativo; (+) Resultado Positivo.

No grupo G2 constituído pelos reprodutores com infecção crônica, o provírus foi detectado em 4/6 dos animais. Sendo importante ressaltar que nas quatro primeiras semanas de coleta não houve detecção do CAEV no sêmen em nenhum dos machos cronicamente infectados. E em dois animais do grupo não foi constatada qualquer presença do CAEV no sêmen durante o período experimental. Sugerindo que com o tempo de infecção o vírus tende a ficar quiescente nos animais cronicamente infectados, possivelmente com o DNA proviral não integrado ou integrado sem ativação. Das 66 amostras coletas em todo o período experimental 10/66 (15,5%) foram consideradas positivas (Tabela 1).

Na avaliação individual da nPCR 1/6 dos animais apresentou o provírus no sêmen uma única vez; 3/6, três vezes. E 2/6 dos animais não eliminaram o CAEV no sêmen em nenhum momento do período experimental, apresentando intermitência de detecção do CAEV semelhante aos animais do grupo G1 (Tabela 1). Desse modo, fica evidente que eliminação intermitente do vírus ocorre em todas as fases da infecção, e que os resultados podem variar tanto entre os animais quanto nos vários ejaculados de um mesmo animal.

CONCLUSÃO

Machos caprinos na fase aguda da infecção eliminam o CAEV no sêmen e podem vir a ser infecciosos nos primeiros meses após a infecção.

Intermitência na eliminação do provírus no sêmen ocorre em todas as fases da infecção.

Todavia estudos futuros devam confirmar os resultados, e amostras maiores podem ser necessárias para compreender plenamente o papel da dinâmica viral na transmissão sexual do CAEV.

APOIO

Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), Fundação Cearense de Apoio ao Desenvolvimento Científico e Tecnológico (FUNCAP), Embrapa Caprinos e Ovinos, Embrapa Gado de Leite, Universidade Estadual Vale de Acaraú (UVA) e Universidade Estadual do Ceará (UECE).

REFERÊNCIAS

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, p.1313-1319, 2006.

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

PILCHER, C.D.; JOAKI, G.; HOFFMAN, I.F.; MARTISON, F.E.; MAPANJE, C.; STEWART, P.W.; POWERS, K.A.; GALVIN, S.; CHILONGOZI, D.; GAMA, S.; PRINCE, M.A.; FISCUS, S.A.; COHEN, M.S. Amplified transmission of HIV-1: comparison of HIV-1 concentrations in semen and blood during acute and chronic infection. **AIDS**, v.21, p.1723-1730, 2007.

PULLIUM, J.K.; ADAMS, D.R.; JACKSON, E.; KIM, C.N.; SMITH, D.K.; JANSSEN, R.; GOULD, K.; FOLKS, T.M.; BUTERA, S.; OTTEN, R.A. Pig-tailed macaques infected with human immunodeficiency virus (HIV) type 2GB122 or simian/HIV89.6p express virus in semen during primary infection: new model for genital tract shedding and transmission. **The Journal of Infectious Disease**, v.183, n.7, p.1023-1030, 2001.

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