



VI CONGRESSO NORDESTINO DE PRODUÇÃO ANIMAL



Hotel Thermas - de 29 de Novembro a 02 de Dezembro - Mossoró/RN

Análise molecular e ultraestrutural de espermatozoides caprinos oriundos de animais infectados naturalmente e experimentalmente com o CAEV

Aracely Rafaelle Fernandes Ricarte¹, Maria Fátima da Silva Teixeira², Alice Andrioli³, Raymundo Rizaldo Pinheiro³, Sônia Nair Bão⁴ e Jean Berg Alves da Silva⁵

¹Laboratório de Conservação de Germoplasma Animal – UFERSA/Mossoró. e-mail: aracelyrfr@yahoo.com.br

²Laboratório de Virologia – PPGCV - UECE /Fortaleza. e-mail: mfteixeira@hotmail.com

³Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária – EMBRAPA- CNPC/Sobral. e-mail: alice@cnpq.embrapa.br, rizaldo@cnpq.embrapa.br

⁴Laboratório de Microscopia Eletrônica – UnB /Brasília. e-mail: snbao@unb.br

⁵Laboratório de Inspeção de Produtos de Origem Animal – UFERSA /Mossoró. e-mail: jeanberg@ufersa.edu.br

Resumo: O presente trabalho teve como objetivo realizar uma análise molecular e ultraestrutural em espermatozoides caprinos, afim de se averiguar a presença ou não do CAEV em sêmen de animais infectados naturalmente e experimentalmente. Para isto, foi coletado sêmen de 12 machos caprinos, sendo 4 machos infectados naturalmente com o CAEV, 4 experimentalmente e 4 negativos pelos testes de imunodifusão em gel de agarose (IDGA) e Reação em cadeia da polimerase (PCR), sendo este último grupo utilizado somente como controle. A coleta de sêmen foi realizada utilizando-se o método da vagina artificial. Foram realizadas seis coletas de cada animal e após cada coleta as amostras seminais foram destinadas às técnicas de PCR e Microscopia Eletrônica de Transmissão. Das 23 amostras seminais analisadas oriundas de animais infectados naturalmente apenas uma amostra apresentou positividade para o teste de PCR. Das 22 amostras provenientes de animais infectados artificialmente não se observou nenhuma amostra positiva, não tendo se observado nenhuma diferença estatística entre os grupos. Com relação às amostras analisadas ao microscópio eletrônico de transmissão, apenas em uma das amostras oriunda de animal infectado naturalmente, foi observado presença de vacúolos na porção da peça intermediária, porém, não foi observada nenhuma partícula viral no seu interior. O que demonstrou que espermatozoides de caprinos infectados naturalmente com o CAEV apresenta indícios de susceptibilidade para este vírus.

Palavras-chave: Análise Molecular, CAEV, Caprinos, Espermatozoíde

Molecular evaluation and ultrastructural of buck spermatozoa of natural and experimentally infected with CAEV

Abstract: This study aimed to perform a evaluation molecular and ultrastructural of buck spermatozoa infected in vitro and natural and experimentally infected with CAEV. For this, semen from 12 bucks, 4 bucks naturally infected with CAEV, 4 experimental and 4 negative tests by agarose gel immunodiffusion (AGID) and polymerase chain reaction (PCR), the latter group used only as control. Semen collection was performed using the method of artificial vagina. Were collected six samples from each animal and after each collection the semen samples were designed to PCR and transmission electron microscopy. Of the 23 semen samples analyzed originated from naturally infected animals only one sample was positive for PCR test. Of the 22 samples from artificially infected animals was no positive sample, and did not observed any statistical difference between groups. In the samples analyzed by transmission electron microscope, only one of the samples originated from naturally infected animal was observed vacuoles in the portion of the middle piece, however, there was no viral particle inside. What showed that spermatozoa of bucks naturally infected with CAEV shows signs of susceptibility to this virus.

Keywords: Molecular evaluation, CAEV, Caprine, Spermatozoa



VI CONGRESSO NORDESTINO DE PRODUÇÃO ANIMAL



Hotel Termas - de 29 de Novembro a 02 de Dezembro - Mossoró/RN

Introdução

Dentre os agentes virais causadores de enfermidades na espécie caprina, temos o vírus da artrite encefalite caprina (CAEV), um vírus do gênero *Lentivirus*, que pode provocar nos caprinos artrite crônica progressiva, mastite, pneumonia em animais adultos e leucoencefalomielite em animais jovens (Cork *et al.*, 1974). Podendo levar a perdas econômicas por causar morte de animais jovens, diminuição da produção láctea e perda de peso dos adultos devido às dificuldades de locomoção.

Um dos métodos de prevenção da artrite encefalite caprina (CAE) é a separação e sacrifício de animais soropositivos, levando assim a perdas de animais com alto valor genético. Neste contexto, o uso de biotécnicas reprodutivas surge como uma alternativa para o resgate e utilização do material genético desses animais. Dentre as técnicas promissoras para esta finalidade, podemos destacar a inseminação artificial e a fecundação *in vitro* (FIV), no entanto, pouco se sabe do risco da transmissão de agentes patogênicos pelo sêmen, podendo este ser uma fonte de entrada de doenças, com repercussões graves na produção e na comercialização de rebanhos (Andrioli *et al.*, 1999).

O HIV, exemplar do gênero *Lentivirus*, já foi identificado em espermatozoides e embrião de humanos (Baccetti *et al.*, 1998). Em caprinos, já foi detectado a presença do DNA pró-viral do CAEV no sêmen (Andrioli *et al.*, 1999; Travassos *et al.*, 1999), mas ainda não se sabe exatamente em qual componente seminal este pode estar presente e se o material genético desses animais pode ser utilizado com segurança nas biotécnicas de inseminação artificial e fecundação *in vitro*.

Sendo assim o objetivo do presente trabalho foi de realizar uma análise molecular e ultra-estrutural em espermatozoides caprinos, afim de se averiguar a presença ou não do CAEV em sêmen de animais infectados naturalmente e experimentalmente.

Materiais e Métodos

Foram utilizados sêmen de 12 machos caprinos, sendo 4 machos infectados naturalmente com o CAEV, 4 experimentalmente e 4 negativos pelos testes de imunodifusão em gel de agarose (IDGA) e Reação em cadeia da polimerase (PCR). Estes últimos foram utilizados como controle negativo. Foram realizadas 6 coletas de cada animal, no grupo dos animais infectados e uma coleta no grupo dos animais negativos. A coleta de sêmen foi realizada utilizando-se o método da vagina artificial, onde foi utilizada uma fêmea em estro para estimular o macho, e quando este efetuou o salto, o prepúcio foi desviado com a mão para dentro da vagina artificial. Logo após, o tubo contendo o sêmen foi tampado para proteger o ejaculado da poeira, luz solar e agitação e levado para o laboratório onde foi processado.

Para a extração do DNA das amostras de sêmen puro, estas foram filtradas, individualmente, em coluna Sephacryl S-400³, posteriormente foram adicionadas em solução de Chelex® e incubadas com Proteinase K. Para a amplificação do DNA foram utilizados dois pares de iniciadores derivados a partir das seqüências das regiões *gag* da amostra padrão CAEV- Cork. As reações de amplificação foram realizadas em termociclador. As amostras amplificadas e os controles positivo e negativo, constituído por monocamadas de membrana sinovial caprina, inoculadas com amostra do CAEV de referência, juntamente com o marcador molecular, foram submetidos à eletroforese em gel de agarose 1% em TBE (Tris, borato e EDTA 0,1X), corados com brometo de etídio adicionado ao gel (0,5 µg/mL). A visualização das bandas de DNA foi observada ao transluminador de luz ultravioleta, e registradas em aparelho de fotodocumentação.

Para análise ultraestrutural dos espermatozoides, foi retirada uma alíquota de 100µL do ejaculado, a qual foi lavada três vezes em PBS, posteriormente foi fixada em Karnowsky overnight (mínimo de 12 horas), depois em solução tampão 0,1M de Cacodilato de Sódio. Após esta fixação, a suspensão foi lavada com solução tampão 0,1M de Cacodilato de Sódio e pós-fixados em tetróxido de ósmio 1% e 0,8% de ferricianeto de potássio. Em seguida, a suspensão foi desidratada com acetona e impregnada em resina epóxi Sppur. Antes da confecção dos cortes ultrafinos, foram preparadas secções semi-finas (3µm) as quais foram coradas com azul de toluidina. Posteriormente, foram confeccionados os cortes ultrafinos (90nm), os quais foram contrastados com acetato de uranila e citrato de chumbo, para



VI CONGRESSO NORDESTINO DE PRODUÇÃO ANIMAL



Hotel Thermas - de 29 de Novembro a 02 de Dezembro - Mossoró/RN

que então pudessem ser examinados no microscópio eletrônico de transmissão. As amostras foram então analisadas, quanto a presença do CAEV, bem como a presença de alterações degenerativas.

Para a comparação dos resultados da reação em cadeia da polimerase entre o grupo dos animais infectados naturalmente e dos animais infectados experimentalmente com o CAEV, foi utilizado o teste de Mann-Whitney ao nível de cinco por cento de significância.

Resultados e Discussão

Das 23 amostras oriundas de animais infectados naturalmente apenas uma amostra apresentou positividade para o teste de PCR. Das 22 amostras provenientes de animais infectados artificialmente não se observou nenhuma amostra positiva, não tendo se observado nenhuma diferença estatística entre os grupos. A observação da presença do DNA pró-viral em amostra seminal de macho positivo para o CAEV neste trabalho corrobora com os achados de Andrioli et al. (1999); Travassos et al. (1999) e Ali Al Ahmad et al. (2008), porém, no presente trabalho a frequência de aparecimento deste resultado foi muito baixa, o que pode ter ocorrido devido ao fato de que a presença do CAEV no sêmen pode acontecer de forma intermitente, ou seja, este pode não estar presente em todos os ejaculados do animal infectado, talvez fosse necessário um número maior de ejaculados para observarmos essa frequência maior.

Com relação às amostras analisadas ao microscópio eletrônico de transmissão, apenas em uma das amostras oriunda de animal infectado naturalmente, foi observado presença de vacúolos na porção da peça intermediária, porém, não foi observada nenhuma partícula viral no seu interior (Figura 1).

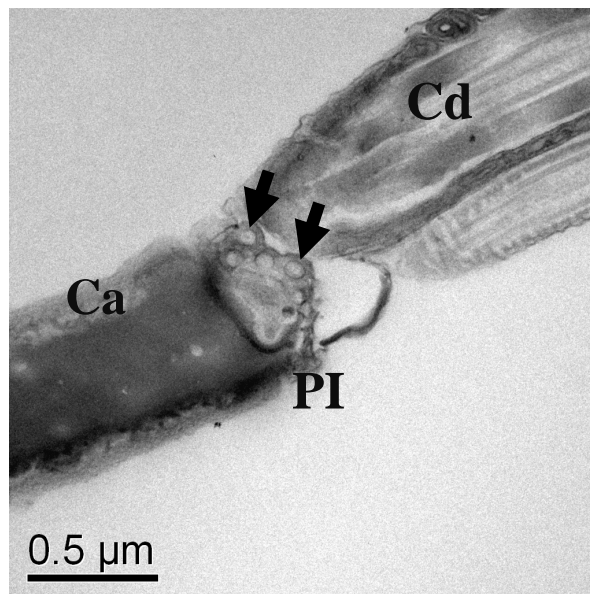


Figura 1 – Micrografia eletrônica de espermatozóide oriundo de animal naturalmente infectado com o CAEV, apresentando vacúolos na região da peça intermediária (setas). Ca (cabeça), PI (peça intermediária) e Cd (Cauda).



VI CONGRESSO NORDESTINO DE PRODUÇÃO ANIMAL



Hotel Thermas - de 29 de Novembro a 02 de Dezembro - Mossoró/RN

A presença de vacúolos na região da peça intermediária pode indicar a possibilidade da susceptibilidade dos espermatozoides ao CAEV, uma vez que o HIV que também é um RNA vírus e apresenta características de infecção e replicação semelhantes ao CAEV já foi identificado em espermatozoides de humanos, como demonstrado por Bacceti et al. (1998), estes conseguiram demonstrar através da microscopia eletrônica de transmissão e hibridização *in situ* partículas de HIV na região da peça intermediária de espermatozoides de homens que haviam se infectado naturalmente.

Conclusão

O sêmen de caprinos infectados naturalmente com o CAEV apresenta indícios de susceptibilidade para este vírus.

Agradecimentos

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal do Ensino Superior – CAPES, à Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária – Centro Nacional de Pesquisa em Caprinos e Ovinos (EMBRAPA-CNPC), ao Laboratório de Virologia da Universidade Estadual do Ceará e ao Laboratório de Microscopia Eletrônica da Universidade de Brasília pelo apoio financeiro e técnico imprescindíveis para a execução desta pesquisa.

Literatura Citada

- ALI AL AHMAD, M.Z.; FIENI, F.; PELLERIN, J.L. et al. 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. Detecção do DNA pró-viral do Lentivirus caprino em sêmen de bodes naturalmente infectados. **Rev. Bras. Reprod. Anim.**, v. 23, n. 3, p. 420-420, 1999.
- BACCETTI, B.; BENEDETTO, A.; COLLODEL, G.; CARO, A.; GARBUGLIA, A.R.; PIOMBONI, P. The debate on the presence of HIV-1 in human gametes. **Journal of Reproductive Immunology**, v. 41, p. 41-67, 1998.
- CORK, L.C.; HADLON, W.J.; CRAWFORD, T.B. Infectious leucoencephalomyelitis of young goats. **The Journal Infectious Disease**, v.129, n 2, p134-141, 1974.
- TRAVASSOS, C.; BENÔIT, C.; VALAS, S. Caprine arthritis-encephalitis virus in semen of naturally infected bucks. **Small Ruminant Research**, v. 32, p. 101-106, 1999.