



Vírus da artrite encefalite caprina em sêmen: diagnóstico e transmissão

Caprine arthritis encephalitis virus by semen: diagnosis and transmission

K.C. Souza¹, A. Andrioli², M.F.S. Teixeira^{1,3}

¹UECE-FAVET-PPGCV, Labovir, Fortaleza, CE, Brasil.

²Embrapa Caprinos e Ovinos, Sobral, CE, Brasil.

³Correspondência: labovirfavetuece@yahoo.com.br

Resumo

Está consolidado que o vírus da artrite encefalite caprina (CAEV) está presente no sêmen, tanto na forma livre (RNA viral) no líquido seminal, como na forma de DNA pró-viral integrado às células não espermáticas. Estudos sugerem, ainda, que a presença do CAEV no sêmen pode não ter correlação positiva com o diagnóstico no sangue e que o patógeno pode ser detectado no plasma seminal antes mesmo da conversão sorológica. Além disso, os órgãos sexuais masculinos podem contribuir para a eliminação do DNA pró-viral do CAEV no ejaculado, e a transmissão do vírus pela via reprodutiva foi recentemente comprovada utilizando-se a inseminação artificial. Se considerada a adoção de testes de diagnósticos realizados diretamente no sêmen, pode-se diminuir o risco da entrada ou da disseminação do CAEV nos rebanhos pela via reprodutiva, especialmente na inseminação em que o número de fêmeas que podem receber sêmen contaminado é expressivamente maior. Neste contexto, objetivou-se com esta revisão fazer um levantamento bibliográfico e apontar perspectivas de utilização do sêmen para o diagnóstico da artrite encefalite caprina (CAE).

Palavras-chave: CAEV, detecção, plasma seminal.

Abstract

It is well established that the Caprine Arthritis Encephalitis Virus (CAEV) is found in semen, either in free form (RNA) in the seminal fluid or in the integrated proviral DNA in leukocytes and macrophages present in the semen. Studies also suggest that the presence of CAEV in semen may not have a positive correlation with the blood diagnosis, and that the pathogen can be detected in seminal plasma even before the seroconversion. Furthermore, male sexual organs may contribute to the DNA proviral elimination of CAEV in the ejaculate and transmission of the virus by reproduction was recently demonstrated using artificial insemination. If considered the adoption of diagnostic tests performed directly in semen, it can reduce the risk of entry of the virus or the spread of CAEV in flocks through reproduction, especially insemination, in which the number of females receiving contaminated semen is significantly higher. In this context, the aim of this report was to review the literature and point out perspectives for the use of semen in the diagnosis of caprine arthritis-encephalitis (CAE).

Keywords: CAEV, detection, seminal plasma.

Introdução

O sêmen tem sido reconhecido como um importante fator na transmissão sexual do vírus da artrite encefalite caprina (CAEV), quando da sua detecção no ejaculado de animais experimentalmente e naturalmente infectados (Travassos et al., 1998, 1999; Ali Al Hamad et al., 2008; Peterson et al., 2008; Cruz et al., 2009; Paula et al., 2009a; Gregory et al., 2011). Acresce-se a isso o fato de Rowe et al. (1992) observarem a soroconversão de fêmeas cobertas por machos soropositivos, o que levantou a suspeita de que a transmissão ocorreu pela cópula, e de Souza et al. (2013) comprovarem por inseminação artificial (IA) a transmissão do CAEV utilizando-se sêmen contaminado *in vitro*.

O risco de reprodutores permanecerem disseminando o CAEV nos rebanhos por monta natural (MN) ou IA é bastante relevante devido à ocorrência dos portadores assintomáticos e a falhas dos métodos de diagnósticos disponíveis. É importante ressaltar que a técnica mais amplamente utilizada para o diagnóstico da infecção é a imunodifusão em gel de agarose (IDGA) no soro, adotada pelo Programa Nacional de Sanidade dos Caprinos e Ovinos (PNSCO) do Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento (Mapa), além de recomendada pela Organização Mundial de Saúde Animal (OIE). Entretanto, o IDGA apresenta baixa sensibilidade, e a identificação de animais na fase inicial da infecção fica limitada (Pinheiro et al., 2006). Isto permite a ocorrência de falso-negativos no rebanho (Andrioli et al., 2006; Tigre et al., 2006). Em termos práticos, o teste tem pouco valor no diagnóstico individual, sendo mais eficiente como teste de triagem.



Portanto, faz-se necessário um diagnóstico preciso e individual dos reprodutores, que pode ser alcançado com técnicas imunológicas mais sensíveis ou de biologia molecular. Tais técnicas, além de realizadas no sangue, podem ser aplicadas diretamente no sêmen, assegurando que este esteja livre do patógeno, o que diminui o risco da entrada ou da disseminação do CAEV nos rebanhos pela via reprodutiva. Assim, o objetivo desta revisão é fazer um levantamento bibliográfico e apontar perspectivas de utilização do sêmen para o diagnóstico da artrite encefalite caprina (CAE).

O vírus da artrite encefalite caprina (CAEV)

O CAEV é pertencente à família Retroviridae, gênero *Lentivirus* (Lara et al., 2005). A este gênero compreendem outros vírus de importância em patologia veterinária e humana, como o vírus do Maedi-Visna (MVV), o vírus da anemia infecciosa equina (EIAV), o vírus da imunodeficiência felina (FIV), o vírus da imunodeficiência bovina (BIV), o vírus da imunodeficiência simia (SIV) e o vírus da imunodeficiência humana (HIV) Patrick et al. (2002).

O CAEV é envelopado e tem como material genético duas fitas simples de ácido ribonucleico (RNA). A estrutura do envelope viral é composta por uma dupla camada de lipídeos, onde se encontram inseridas diversas glicoproteínas codificadas pelo vírus. O CAEV apresenta ainda uma grande quantidade de ácidos siálicos em sua superfície, o que dificulta a ação dos anticorpos neutralizantes.

A primeira fase da infecção viral é por meio da ligação da partícula viral com moléculas de superfície da célula hospedeira. As proteínas virais que promovem essa interação ligam-se de forma específica aos receptores encontrados em apenas alguns tipos de células (linfócitos e monócitos), o que determina o tropismo celular do vírus. Logo após essa ligação, o CAEV penetra na célula, sendo necessária a fusão da partícula viral com a célula hospedeira, a fim de permitir a liberação do material genético viral para dentro do citoplasma ou do núcleo, onde irá iniciar o processo de replicação viral e a expressão dos genes virais (Kreutz, 2001). Por fim, a capacidade do vírus de infectar persistentemente os macrófagos, sem causar lise celular, facilita sua disseminação no hospedeiro.

O sêmen

O sêmen é produto da ejaculação e consiste de componentes celulares, os espermatozoides. É uma suspensão acelular líquida que contém secreções dos órgãos acessórios do trato genital masculino, o plasma seminal (Reece, 2006). Este se integra aos espermatozoides na ejaculação, servindo como meio de sobrevivência e de transporte para as células espermáticas. Além dos espermatozoides, outras células podem estar presentes no sêmen, como leucócitos, células epiteliais e células germinativas imaturas. Portanto, a identificação dos componentes do sêmen envolvidos na transmissão de patógenos é de grande importância.

Contaminação do sêmen pelo CAEV

O sêmen pode ser infectado com o vírus procedente dos testículos, epidídimo ou glândulas anexas, visto que foi demonstrada a presença do CAEV em diversos tecidos do trato genital masculino de bodes infectados (Ali Al Hamad et al., 2008; Peterson et al., 2008). Os microrganismos podem ainda contaminar amostras durante processos de manipulação como coleta, envasamento ou armazenamento (Bielanski, 2007).

Outra forma de infecção do sêmen envolve a presença de inflamações no sistema reprodutor do macho. O processo inflamatório poderia desencadear um maior fluxo de células de defesa infectadas com o vírus, resultando em aumento da carga viral no sêmen (Andrioli et al., 2006). Segundo estudos, o principal tipo de células infectadas pelo CAEV no ejaculado são os leucócitos. Destas, os macrófagos são as células principais do vírus *in vivo*, podendo estar presentes no lúmen dos ductos espermáticos ou epidídimo e conter o vírus em concentração suficiente para permitir a detecção por testes de diagnóstico, mas sem afetar negativamente a função desses tecidos ou a fertilidade do ejaculado (Paula et al., 2009b). Além dos leucócitos, o CAEV pode infectar outros tipos celulares, tais como as células epiteliais, comumente encontradas no sêmen.

Deteções do CAEV em sêmen

A reação em cadeia da polimerase (PCR) provou ser um método sensível para detecção dos lentivírus tanto no sangue como no sêmen de humanos e animais. Nos caprinos, a utilização da *Nested* PCR mais a PCR precedida pela transcrição reversa (RT-PCR) possibilitou detectar o DNA pró-viral e o RNA genômico do CAEV no ejaculado e em tecidos do trato genital de machos infectados, como também correlacionar à detecção do vírus em sêmen e sangue (Travassos et al., 1998, 1999; Ali Al Hamad et al., 2008; Peterson et al., 2008; Cruz et al., 2009; Paula et al., 2009a; Gregory et al., 2011). Em adição às técnicas moleculares, alguns testes sorológicos foram realizados no plasma seminal e podem vir a ser utilizados para identificar reprodutores positivos e negativos (Ramirez et al., 2009; Andrioli et al., 2012).



Os primeiros estudos realizados com a aplicação da técnica de PCR no sêmen caprino ocorreram na década de 90. Travassos et al. (1998, 1999) relataram a presença do DNA pró-viral do CAEV no sêmen de bodes experimentalmente e naturalmente infectados e ressaltaram o risco de transmissão da enfermidade pelo sêmen.

Posteriormente, diversos estudos com técnicas moleculares para detecção do CAEV em reprodutores foram realizados. Andrioli et al. (2006) investigaram a presença do DNA pró-viral do CAEV por *Nested*PCR em amostras de sêmen lavado, não lavado e criopreservado. Encontraram resultados positivos em 53,6% das amostras totais de sêmen não lavado, em 17,9% de sêmen lavado e em 35,7% do sêmen criopreservado. Portanto, a lavagem do sêmen diminuiu a carga viral, porém não eliminou totalmente o CAEV, enquanto o sêmen criopreservado pode conter o vírus na forma infectante. Philpott, em 1993, já havia constatado a viabilidade do CAEV em amostras de sêmen criopreservado, evidenciando que a congelamento do sêmen possibilita a sobrevivência do vírus, bem como de outros microrganismos.

Andrioli et al. (2006) observaram ainda que, após injúria testicular, houve um aumento de 21,4 para 50% de sêmen positivo à PCR. Possivelmente, o processo inflamatório aumentou a carga viral do sêmen por um maior fluxo de células de defesa nesse órgão. Em ovinos, os primeiros estudos sobre a presença do MVV no sêmen ocorreram após lesões patológicas nos testículos de animais infectados (Pálfi et al., 1989). Posteriormente, Concha-Bermejillo et al. (1996) e Preziuso et al. (2003) encontraram o lentivírus no epidídimo de carneiros infectados experimentalmente com *Brucella ovis* e constataram que infecção persistente ou inflamação induziram à eliminação do MVV no sêmen.

Em 2008, Ali Al Hamad et al., com o objetivo de buscar elevar o conhecimento sobre infectividade em reprodutores, investigaram a presença do CAEV por técnicas moleculares tanto no sêmen quanto no trato genital de animais naturalmente infectados. Por PCR, encontraram o pró-vírus em células não espermáticas presentes no sêmen e em tecidos como testículo, epidídimo, vasos deferentes e glândulas vesiculares. Adicionalmente, detectaram RNA viral no plasma seminal por RT-PCR. E, mediante a hibridação *in situ*, demonstraram que as seções de tecido epididimal (cabeça, corpo e cauda), por meio de PCR positivos, contêm células infectadas.

Em estudo semelhante, Peterson et al. (2008) detectaram o DNA pró-viral do CAEV e do MVV em amostras de tecidos a partir de testículos, epidídimo, âmpola vesicular, próstata e glândulas bulbouretrais. Esses autores demonstraram claramente a importância dos órgãos sexuais masculinos na excreção dos lentivírus no ejaculado.

Nas células espermáticas, no entanto, não foram demonstrados resultados positivos ao CAEV. Para Ali Al Hamad et al. (2008), a ausência de receptores na membrana plasmática dos espermatozoides impossibilitaria a internalização da partícula viral, o que conferiria resistência deles à infecção. Em humanos, foi sugerido que espermatozoides não expressavam níveis significativos de receptores de superfície (CD4, CXCR4 e CCR5), portanto não seriam alvos principais de infecção pelo HIV, contudo os estudos ainda são controversos (Bielanski, 2007). Com o lentivírus caprino, Thibault et al. (2001) destacaram ainda que proteínas epididimárias protegeriam o espermatozoide durante o trânsito através do trato genital do macho.

Apesar da pouca probabilidade de os espermatozoides serem alvos dos lentivírus, Peterson et al. (2008) observaram o DNA pró-viral do CAEV e do MVV na fração composta de agregados e em partes de espermatozoides separados pelo gradiente de Percoll, bem como na fração do sêmen que continha macrófagos e gotículas citoplasmáticas. Em outro estudo, Ricarte et al. (2010) visualizaram, por microscopia eletrônica de transmissão, uma partícula viral semelhante ao CAEV na peça intermediária do espermatozoide de um macho infectado experimentalmente, o que sugere que essas células poderiam ser infectadas pelo vírus. Desta forma, a susceptibilidade dos espermatozoides ao CAEV, bem como as estruturas dos receptores de membrana espermática para os lentivírus dos pequenos ruminantes, necessita de elucidação.

Paula et al. (2009a) destacaram um fato importantíssimo para o diagnóstico da artrite encefalite caprina (CAE) em reprodutores. Os autores avaliaram o perfil viral do sangue e do sêmen em machos naturalmente e experimentalmente infectados, salientando que tanto no sêmen como no sangue a presença do vírus é intermitente e que pode não haver correlação positiva entre as detecções. Nos animais naturalmente infectados, o DNA pró-viral foi detectado no sangue em apenas um animal, enquanto no sêmen o pró-vírus foi detectado nos cinco reprodutores do grupo. Portanto, a ausência do vírus no sangue não exclui a excreção do agente patogênico no plasma seminal nem uma possível transmissão. Nos reprodutores infectados experimentalmente, o DNA foi detectado tanto no sangue quanto no sêmen na primeira semana pós-infecção em dois de cinco animais, demonstrando que machos com infecção recente excretam o vírus no sêmen, o que representa importante fonte de infecção.

Na detecção de anticorpos anti-CAEV por IDGA, Paula et al. (2009a) somente detectaram anticorpos contra o vírus na 16ª semana pós-infecção no grupo dos animais experimentalmente infectados. Além disso, um reprodutor apresentou soroconversão tardia, 32 semanas pós-infecção. Esses resultados sugerem uma baixa sensibilidade do IDGA em detectar precocemente a soroconversão. Contudo, no diagnóstico sorológico da infecção, deve-se considerar a existência da “janela imunológica” (período entre a infecção e a soroconversão), além da possibilidade de sororeação intermitente. Dessa forma, Cruz et al. (2009) sugeriram que as provas sorológicas dos reprodutores devem ser realizadas em associação com as moleculares, bem como a detecção do DNA pró-viral do CAEV deve ser realizada no sangue e no sêmen.



Com relação à aplicação de técnicas sorológicas no plasma seminal, Ramirez et al. (2009), baseados em diagnóstico por anticorpos anti-CAEV e MVV, verificaram, por meio da técnica de ensaio de imunoadsorção enzimática (ELISA), resultados concordantes com os realizados no soro. Do mesmo modo, Andrioli et al. (2012) compararam por *Western Blot* (WB) a detecção de anticorpos anti-CAEV no soro sanguíneo e no plasma seminal e encontraram uma especificidade de 100% e uma sensibilidade de 87,5% entre elas, o que demonstra que o WB pode ser aplicado no diagnóstico da CAE utilizando-se plasma seminal. Vale ressaltar que ELISA e WB são técnicas mais sensíveis em comparação ao IDGA.

Em se tratando de sensibilidade, uma nova técnica designada PCR em tempo real (qPCR), evolução da PCR convencional, vem crescendo de forma significativa como técnica de grande importância em vários domínios da ciência. A qPCR permite quantificar as formas integrada e livre do CAEV, além de levar a um diagnóstico precoce em relação aos métodos convencionais. Entretanto, estudos com sua utilização nessa linha de pesquisa ainda são incipientes. Peterson et al. (2008) utilizaram a forma qualitativa da técnica e detectaram o CAEV em sêmen e tecidos do trato genital de machos. Em trabalhos com fêmeas, Ravazzolo et al. (2006) detectaram e avaliaram a carga viral na glândula mamária e no leite. Já Brajon et al. (2012) encontraram RNA viral e DNA pró-viral em amostras como fluido intra-articular e sangue.

Transmissão do CAEV pelo sêmen

Poucos estudos foram realizados visando à confirmação da transmissão sexual do CAEV. De acordo com Johnson et al. (1992) e Hubl et al. (1996), a comprovação somente é possível por meio da inseminação de fêmeas não infectadas utilizando-se ejaculados positivos, ou pela monta natural com macho infectado mais a subsequente comprovação da infecção nas fêmeas por meio de testes de diagnóstico. Para Peterson et al. (2008), é necessária a inclusão de atividade homossexual na transmissão dos lentivírus. Isso porque os animais, quando criados em lotes de mesmo sexo, desenvolvem hábitos comportamentais como montar uns nos outros.

Estudos iniciais não apontaram soroconversão de fêmeas que tiveram contato com sêmen contaminado (Adams et al., 1983). É provável, então, que a transmissão não tenha ocorrido, porque os ejaculados não continham partículas virais suficientes para infecção.

Por outro lado, Rowe et al. (1992) observaram que algumas cabras soroconverteram entre 100 e 140 dias após terem sido submetidas à MN com machos soropositivos e suspeitaram que a transmissão havia ocorrido pela cópula. Mais recentemente, Souza et al. (2013) comprovaram a transmissão sexual do CAEV por IA. No trabalho, 20 fêmeas foram inseminadas por via transcervical com sêmen fresco contaminado *in vitro*, sendo a transmissão comprovada 30 dias pós-infecção, quando 12 fêmeas apresentaram anticorpos anti-CAEV pela técnica de WB. Neste trabalho, pôde-se afirmar a via reprodutiva da infecção, pois o sêmen contaminado foi introduzido diretamente no trato genital das fêmeas, não existindo contato algum entre os animais. Em consonância a este resultado, Cortez-Romero et al. (2013) sugerem maior frequência de infecção observada em cabras na IA quando comparada ao acasalamento natural.

Técnicas de inativação viral

Em geral, esses procedimentos incluem metodologias aceitas internacionalmente e envolvem a utilização de lavagem, antibióticos, acidificação (pH), tripsina e outras enzimas, ozônio, agentes fotossensíveis (Bielanski, 2007).

Os procedimentos de lavagem são as técnicas mais amplamente utilizadas, das quais se destacam *swim-up* e centrifugação em gradiente de Percoll. A inclusão de tripsina é um método seguro para inativar ou separar vírus que podem aderir aos espermatozoides (Loskutoff et al., 2005).

A estratégia de lavagem para desinfecção seminal pelo CAEV foi utilizada por Andrioli et al. (2006), os quais observaram que o processo diminuiu a carga viral do sêmen, porém não eliminou totalmente o vírus. Peterson et al. (2008), após utilizarem gradiente de Percoll em amostras de sêmen caprino e ovino, conseguiram detectar resultados positivos. Já Ricarte et al. (2010) não detectaram o CAEV após *swim-up* realizado no sêmen de machos naturalmente infectados. Entretanto, observaram uma amostra positiva após *swim-up* de um macho experimentalmente infectado. Contudo, Bielanski (2007) evidencia que, embora alguns métodos não inativem ou removam completamente agentes infecciosos, a carga microbiana associada ao germoplasma pode ser reduzida a níveis baixos para infectividade intrauterina.

Considerações finais

Com base no que foi referenciado, acredita-se que técnicas de diagnóstico mais confiáveis, como *Western Blot* ou reação em cadeia da polimerase, devam ser aplicadas em programas de controle da CAE pelos órgãos competentes, a fim de reduzir os falso-negativos, além de garantir vigilância clínica mais segura.

Adicionalmente, o procedimento de lavagem seminal poderia ser adotado como rotina em centrais de inseminação, associado às técnicas de PCR e RT-PCR para assegurar a negatividade do sêmen quanto às formas



livre e integrada do CAEV. Estas medidas, embora laboriosas, certamente apresentariam um impacto significativo na prevenção da artrite encefalite caprina pela via venérea, além da possibilidade de o animal portador ter sua genética multiplicada sem comprometer a segurança do rebanho.

Agradecimentos

À Funcap, pela bolsa de estudos concedida; à Embrapa Caprinos e Ovinos, pelo apoio; e ao Laboratório de Virologia da Universidade Estadual do Ceará.

Referências

- Adams DS, Kleyjer-Anderson P, Carlson JL, McGuire TC, Gorham JR.** Transmission and control of caprine arthritis-encephalitis virus. *Am J Vet Res*, v.44, p.1670-1675, 1983.
- Ali Al Ahmad MZ, Fieni F, Pellerin JL, Guiguen F, Cherel Y, Chatagnon G, Bouzar AB, 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, Abreu DA, Pinheiro RR, Sider LH, Rodrigues AS, Brito LLR, Souza KC, Santos VWS.** Técnica de Western Blot para detecção de anticorpos antivírus da artrite encefalite caprina em plasma seminal. Sobral, CE: Embrapa Caprinos, 2012. 6 p. (Embrapa Caprinos e Ovinos. Comunicado Técnico, 130).
- Andrioli A, Gouveia AMG, Martins AS, Pinheiro RR, Santos DO.** Fatores de risco na transmissão do lentivírus caprino pelo sêmen. *Pesq Agropec Bras*, v.41, p.1313-1319, 2006.
- Brajon G, Mandas D, Liciardi M, Taccori F, Meloni M, Corrias F, Montaldo C, Coghe F, Casciari C, Giammarioli M, Orrù G.** Development and field testing of a Real-Time PCR assay for Caprine Arthritis-Encephalitis-Virus (CAEV). *Open Virol J*, v.6, p.82-90, 2012.
- Bielanski A.** Disinfection procedures for controlling microorganisms in the semen and embryos of humans and farm animals. *Theriogenology*, v.68, p.1-22, 2007.
- Concha-Bermejillo A, Magnus-Corral S, Brodie SJ, Demartini JC.** Veneral shedding of ovine Lentivirus in infected rams. *Am J Vet Res*, v.57, p.684-688, 1996.
- Cortez-Romero C, Pellerin JL, Ali-Al-Ahmad MZ, Chebloune Y, Gallegos-Sánchez J, Lamara A, Pépin M, Fieni F.** The risk of small ruminant lentivirus (SRLV) transmission with reproductive biotechnologies: state-of-the-art review. *Theriogenology*, v.79, p.1-9, 2013.
- Cruz JCM, Gouveia AMG, Souza KC, Braz GF, Teixeira BM, Heinemann MB, Leite RC, Reis JKP, Pinheiro RR, Andrioli A.** Caprine arthritis-encephalitis virus (CAEV) detection in semen of endangered goat breeds by nested polymerase chain reaction. *Small Rumin Res*, v.85, p.149-152, 2009.
- Gregory L, Lara MCCSH, Hasegawa MY, Castro RS, Rodrigues NM, Araújo Keller LW, Silva LKF, Durigon EL.** Detecção do vírus da artrite encefalite caprina no sêmen através das técnicas de PCR e nested-PCR. *Arq Inst Biol*, v.78, p.599-603, 2011.
- Hubl W, Tlustos L, Erath A, Andert S, Bayer PM.** Proposed reference method for peripheral-blood monocyte counting using fluorescence-labelled monoclonal antibodies. *Cytometry*, v.26, p.69-74, 1996.
- Johnson LK, Meyer AL, Zink MC.** Detection of ovine lentivirus in seronegative sheep by in situ hybridization, PCR, and cocultivation with susceptible cells. *Clin Immunol Immunopathol*, v.65, p.254-260, 1992.
- Kreutz LC.** Imunidade contra vírus. In: Madruga CR, Araújo FR, Soares CO. *Imunodiagnóstico em Medicina Veterinária*. Campo Grande: Embrapa Gado de Corte, 2001. p.19-45.
- Lara MCCSH, Birgel Junior EH, Birgel EH.** Possibility of vertical transmission of Caprine Arthritis-Encephalitis Virus in neonate kids. *Arq Bras de Med Vet e Zootec*, v.57, p.553-555, 2005.
- Loskutoff NM, Huyser C, Singh R, Walker DL, Thornhill AR, Morris L, Webber L.** Use of a novel washing method combining multiple density gradients and trypsin for removing human immunodeficiency virus-1 and hepatitis C virus from semen. *Fertil Steril*, v.84, p.1001-1010, 2005.
- Pálfi V, Glavits R, Hajtos I.** Testicular lesions in rams infected by Maedi/Visna virus [Abstract]. *Acta Vet Hung*, v.37, p.97-102, 1989.
- Patrick MK, Johnston JB, Power C.** Lentiviral neuropathogenesis: comparative neuroinvasion, neurotropism, neurovirulence, and host neurosusceptibility. *J Virol*, v.76, p.7923-7931, 2002.
- Paula NRO, Andrioli A, Cardoso JFS, Pinheiro RR, Sousa FML, Souza KC, Alves FSF, Campello CC, Ricarte ARE, Teixeira MFS.** Profile of the Caprine arthritis-encephalitis virus (CAEV) in blood, semen from bucks naturally and experimentally infected in the semi-arid region of Brazil. *Small Rumin Res*, v.85, p.27-33, 2009a.
- Paula NRO, Andrioli A, Cardoso JFS, Pinheiro RR, Sousa FML, Souza KC, Alves FSF, Teixeira MFS.** Características andrológicas de caprinos infectados naturalmente pelo lentivírus de pequenos ruminantes, durante as estações seca e chuvosa no Ceará. *Ciênc Anim*, v.19, p.7-18, 2009b.
- Peterson K, Brinkhof, J, Houwers D, Colenbrander B, Gadella B.** Presence of pro-lentiviral DNA in male sexual organs and ejaculates of small ruminants. *Theriogenology*, v.69, p.433-442, 2008.



- Prezioso S, Sanna E, Sanna MP, Loddo C, Cerri D, Taccini E, Mariotti F, Braca G, Rossi G, Renzoni G.** Association of Maedi-Visna virus with *Brucella ovis* infection in rams. *Eur J Histochem*, v.47, p.151-158, 2003.
- Philpott M.** The dangers of disease transmission by artificial insemination and embryo transfer. *Br Vet J*, v.149, p.339-369, 1993.
- Pinheiro RR, Gouveia AMG, Torres AMC, Andrioli A, Alves FSF.** Custo dos antígenos e dos testes de diagnósticos de lentivírus de pequenos ruminantes. *Rev Bras de Med Vet*, v.28, p.110-113, 2006.
- Ramrez H, San Roman B, Glaria I, Reina R, Hernandez MM, de Andres X, Crespo H, Hichou B, Cianca S, Goni X, Grandas A, Garcia-Pastor L, Vijil LE, Quintín F, Grillo MJ, de Andres D, Amorena B.** Antibody-based diagnosis of small ruminant lentivirus infection in seminal fluid. *Theriogenology*, v.72, p.1085-1096, 2009.
- Ravazzolo AP, Nenci C, Vogt H, Waldvogel A, Obexer-Ruff G, Peterhans E, Bertoni G.** Viral load, organ distribution, histopathological lesions, and cytokine mRNA expression in goats infected with a molecular clone of the caprine arthritis encephalitis virus. *Virology*, v.350, p. 116-127, 2006.
- Reece WO.** *Dukes, Fisiologia dos Animais Domésticos.* Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2006.
- Ricarte ARF, Andrioli A, Pinheiro RR, Bão SN, Silva JS, Braz SV, Name KPO, Lima-Verde IB, Brito IF, Dias RP, Freitas Aguiar TD, Dantas TVM, Araújo SAC, Cavalcanti DMLP, Paula NRO, Teixeira MFS.** Avaliação imuno-histoquímica e ultraestrutural de gametas e embriões caprinos infectados com o CAEV. *Arq Inst Biol*, v.77, p.217-223, 2010.
- Rowe JD, Esast NE, Franti CE, Thurmond MC, Pederson NC, Theilen GH.** Risk factors associated with the incidence of seroconversion to caprine arthritis-encephalitis virus in goats on California dairies. *Am J Vet Res*, v.53, p.2396-2430, 1992.
- Souza KC, Pinheiro RR, Santos DO, Brito RLL, Rodrigues AS, Sider LH, Paula NRO, Avila AA, Cardoso JFS, Andrioli A.** Transmission of the caprine arthritis-encephalitis virus through artificial insemination. *Small Rumin Res*, v.109, p.193-198, 2013.
- Thibault C.** La fécondation. In: Thibault C, Levasseur MC. *La Reproduction chez les Mammifères et l'Homme.* Paris: Ellipses & INRA, 2001. p.367-389.
- Tigre DM, Campos GS, Sardi SI.** Isolamento e identificação do Vírus da Artrite Encefalite Caprina, a partir do co-cultivo de células mononucleares do sangue com células de membrana sinovial de cabra. *Rev Ciênc Méd Biol*, v.5, p.124-131, 2006.
- Travassos C, Benoit C, Valas S, Silva AG, Perrin G.** Detection du virus de l'arthrite encéphalite caprine dans le sperme de boucs infectés expérimentalement. *Vet Res*, v.29, p.579-585, 1998.
- Travassos C, Benoit C, Valas S, Silva AG, Perrin G.** Caprine Arthritis-Encephalitis Virus in semen of naturally infected bucks. *Small Rumin Res*, v.32, p.101-106, 1999.
-