

**Presença do circovírus suíno 2 (PCV2) em sêmen e órgãos de cachaços
de Centrais de Inseminação Artificial.**

Janice Reis Ciacci Zanella
Médica Veterinária, M.Sc., Ph.D.
Pesquisador A, Embrapa Suínos e Aves
Caixa Postal 21, Vila Tamanduá
Concórdia, SC, 89.700-000, Brasil
Fone: 0**49 3441 0400
Fax: 0**49 3441 0497
mailto:janice@cnpa.embrapa.br

A circovirose suína é um conjunto de síndromes causada pela infecção do circovírus suíno tipo 2 (PCV2). A doença tem grande importância econômica e é atualmente a mais pesquisada da suinocultura mundial. A principal manifestação da circovirose suína é Síndrome Multissistêmica do Definhamento do Suíno (SMDS). Contudo, o PCV2 tem sido relacionado também com outras síndromes e doenças, como a síndrome da dermatite e nefropatia suína (SDNS), falhas reprodutivas, pneumonias associadas ao complexo respiratório do suíno (SRDC), enterites e tremores congênitos. Mas, de todas as doenças, a SMDS e as falhas reprodutivas são reais consequências da infecção por PCV2, considerando as infecções naturais e experimentais com PCV2 e reprodução da doença. As falhas reprodutivas são caracterizadas pela ocorrência de abortos, natimortos, mumificados e nascimento de leitões fracos. Assim como as outras síndromes onde existe envolvimento do PCV2, o quadro clínico dessas doenças pode ser variado por estar acompanhado de outros agentes infecciosos que estejam circulando no rebanho.

As doenças reprodutivas no plantel das granjas de suínos são mundialmente consideradas a maior causa de prejuízo econômico. A manifestação clínica destas doenças reprodutivas no suíno é variável, dependendo do agente infeccioso e o estágio da gestação, sendo que podem

ocorrer desde infecções subclínicas até a interrupção da gestação. No Brasil, após o advento da circovirose suína, essas ocorrências tem aumentado, baseado em relatos de colegas da assistência técnica de granjas tecnificadas.

A associação do PCV2 com abortos e natimortos indica que a transmissão transplacentária também pode ser um fator se matrizes soronegativas forem infectadas durante a prenhez. O DNA de PCV2 já foi detectado por nested-PCR (reação em cadeia da polimerase interna) em sêmen de machos suínos de centrais de inseminação artificial no Sul do Brasil. É importante determinar o papel do macho na epidemiologia da circovirose, pois ao confirmar esta forma de infecção, a contaminação das fêmeas e, conseqüentemente, da leitegada com PCV2 poderá ser evitada.

Projetos de pesquisa realizados na Embrapa Suínos e Aves tiveram o objetivo de estudar a importância da infecção do PCV2 no sistema reprodutor masculino, seu tropismo, a disseminação viral via sêmen e capacidade infectiva do PCV2 no sêmen para fêmeas suínas e suas leitegadas. Para isso, propôs-se a implantação de metodologias de diagnóstico específicas, como a imunohistoquímica (IHQ) e hibridização in situ (HIS). Estas técnicas foram desenvolvidas e implantadas a partir de material positivo por histopatologia e nested-PCR (reação da polimerase em cadeia – interna) para circovirose suína, provenientes de diagnósticos de casos de campo e inoculações experimentais realizadas anteriormente.

Testou-se por nested- PCR 503 amostras de sêmen de 11 centrais de colheita de sêmen e 1 granja (monta natural) e obteve-se 53 amostras positivas (10,5%). Posteriormente, machos de centrais de inseminação positivos para PCV2 no sêmen (por nested-PCR ou PCR em tempo real) foram necropsiados ou enviados ao abate e sêmen e órgãos foram coletados. Quando os órgãos destes cachaços suínos positivos para PCV2 foram analisados, foi demonstrado que o DNA de PCV2 está presente no aparelho reprodutor, mas ainda não se sabia quais células deste sistema abrigavam o vírus ou se a infecção viral era persistente. Estudos da localização do vírus por HIS e IHQ auxiliaram na elucidação da patogenia do agente ao identificar o DNA viral em células nos cortes histológicos de órgãos destes suínos, relacionando as

lesões encontradas com o nível de atividade viral. Análises de IHQ ou HIS puderam detectar células positivas nos rins (células do epitélio renal tubular), linfonodo mesentérico, inguinal, e tonsilas (histiócitos), testículos (macrófagos intersticiais) e órgãos reprodutivos acessórios como próstata (células intersticiais), glândula bulbo-uretral (macrófagos) e epidídimo (células epiteliais). Porém não estava claro qual o mecanismo que o PCV2 utilizava para se manter persistente nas células dos órgãos reprodutivos dos machos suínos.

A morte celular programada ou apoptose ocorre em linfócitos B e T durante a infecção por PCV2, mas ela também ocorre em células do sistema reprodutor do macho suíno? A patogenia celular do PCV2 ainda não está clara, principalmente o tropismo celular e alterações celulares que a infecção viral pode causar. Assim como o vírus da PRRS (síndrome reprodutiva e respiratória dos suínos), o PCV2 infecta células da linhagem linfóide como macrófagos. O ácido nucleico de PRRSV já foi detectado durante a infecção testicular em células epiteliais germinativas dos túbulos seminíferos (espermátides e espermatócitos) e também macrófagos localizados no interstício testicular. Desta forma, é interessante especular que o PCV2, assim como o vírus da PRRS, pode também infectar outras células da linhagem não linfóide, caracterizando a infecção nos sistema reprodutivo, e a apoptose de células linfóides ajudariam a manter uma produção viral eficiente capaz de ser transmitido pelo sêmen e desta forma infectar fêmeas e, conseqüentemente, levar à patologia reprodutiva.

A reação de TUNEL (terminal deoxynucleotidyltransferase-mediated dUPT nick end-labelling) foi empregada para descartar a hipótese de apoptose (morte celular programada) nas células do sistema imune ou outras células que poderiam ser causadas pelo PCV2, objetivando assim se manter e replicar nesses tecidos. A reação de TUNEL detecta quebras na fita de DNA que indicam morte celular por apoptose. Nesse estudo, a técnica de TUNEL não caracterizou que a patogenia do PCV2 em células do sistema reprodutor masculino é devido à apoptose. Histologia quantitativa foi realizada nos cortes de tecido de órgãos do aparelho reprodutivo masculino (testículos) com células

positivas para apoptose, e o número e tipo das células afetadas foi comparado com o das células normais.

Devido ao fraco sinal de positividade, tanto por IHQ, HIS ou PCR em tempo real, a quantidade de PCV2 nessas células é mínimo, indicando uma baixa carga viral nesses tecidos. Avaliações de morfologia e motilidade espermática do sêmen colhido aos 21 e 1 dia anteriores à necropsia destes machos positivos para PCV2, também foram realizadas. Não foi encontrado uma ligação entre a presença do PCV2 e as alterações de morfologia espermáticas.

Para estudar a epidemiologia da doença, suínos machos, filhos de mães negativas para PCV2 com pai positivo e de mãe e pai negativos para PCV2 foram acompanhados clinicamente, e ao atingirem a maturidade sexual foram realizadas coletas de sêmen e de sangue para avaliação por nested-PCR. Após isto, os animais foram eutanasiados e procedida a coleta de diversos órgãos para análise por histopatologia, nested-PCR, ISH, IHQ e TUNEL, para análises de morfologia, patogenia, tropismo viral e duração da persistência viral. Ao avaliar as amostras por nested-PCR, vários tecidos foram positivos em 10 dos 12 suínos, sendo mais prevalentes linfonodos, medula óssea e baço. Ao avaliar as mesmas amostras por IHQ, várias foram positivas em 8 dos 12 suínos, sendo as mais prevalentes linfonodos, tonsila e glândula bulbouretral. No geral, os resultados obtidos nas diferentes amostras nos 3 testes (ICQ, nested-PCR e IHQ) colaboraram entre si. Assim, estes resultados evidenciam que a transmissão do PCV2 pelo sêmen para as fêmeas e para a leitegada pode ocorrer e também representam um potencial risco de infecção para rebanhos negativos.

Questões Técnico-Científicas Levantadas Pelo Projeto

1) Será o sêmen suíno contaminado com o PCV-2 o responsável pela ampla disseminação do agente e conseqüentemente a ocorrência elevada da circovirose nos rebanhos suínos brasileiros?

Provavelmente. Esse projeto pôde identificar uma elevada porcentagem de amostras de sêmen positivo para PCV2 de cachaaos de CIAs. Além disso, a

liberação de PCV2 foi esporádica, necessitando uma monitoria freqüente desses plantéis de cachaços. Isso foi confirmado num experimento onde as colheitas foram realizadas de todos os cachaços (total de 49) a cada 15 dias, sendo realizadas pelo menos 4 colheitas por animal. A idade destes cachaços variou entre 12 a 41 meses. Foram realizadas nested-PCR para PCV2 e estudos da motilidade e avaliação da morfologia espermática. Apenas um macho resultou positivo para PCV2 no teste de PCR (1 / 49). Colheitas quinzenais foram realizadas e as amostras testadas, sendo que todos os outros 48 machos resultaram negativos todo período. Das sete colheitas realizadas nesse cachaço (A), apenas as colheitas 1, 3, 5 e 7 foram positivas. O macho positivo (A), em uma das coletas apresentou 32 % de patologias totais, sendo 10% de gota citoplasmática distal. Cerca de 9,3% dos machos (n=4) desta mesma central, apresentaram patologias acima de 20%, sendo que 3 deles testaram negativos para PCV2.

Análises de PCR em tempo real do DNA do sêmen desses cachaços também foram realizadas. O total de 156 amostras foram testadas e quatro resultaram positivas. A quantificação viral foi realizada, e o teste utilizado pode detectar abaixo de 1.000 cópias por mililitro.

Pelo fato do sêmen desses cachaços não terem alterações morfológicas ou outra patologia espermática, esses animais dificilmente seriam descartados se o sêmen não fosse testado para PCV2, continuando assim eliminar e possivelmente transmitir o vírus. Os órgãos desses cachaços também eram positivos, indicando a presença de DNA e antígenos virais.

2) Teriam as centrais de inseminação artificial que implantar a nested-PCR em sêmen e/ou sangue para detectar PCV2 nos suínos doadores de sêmen, evitando-se assim sua distribuição para diversas produções?

Sim, a eliminação viral é esporádica e não intermitente. Estudos de PCR em tempo real em andamento visaram quantificar a carga viral nessas amostras de sêmen. Essa técnica pode também ser realizada se implantada nas centrais ou que esses animais tenham um protocolo de colheita e monitoria periódicos. Recomenda-se exames mensais de todos cachaços, principalmente daqueles mais jovens que estão ainda em treinamento ou sujeitos a maior estresse.

3) Qual é a importância da presença do PCV2 em órgãos do aparelho reprodutor do macho suíno adulto, quais aspectos morfológicos, de tropismo e de infecção viral que o vírus estabelece?

Órgãos do aparelho reprodutor de cachorros positivos e negativos no sêmen para PCV2 por nested-PCR de CIAs foram examinados por nested-PCR, IHQ e HIS. Machos jovens, filhos de cachorro positivo (B) também foram avaliados. O cachorro B foi positivo em todas amostras de sêmen e sangue coletados, e a nested-PCR amplificou DNA de PCV2 em órgãos linfóides (linfonodo mesentérico, inguinal, e tonsilas), testículos e órgãos reprodutivos acessórios (glandula bulbo-uretral, vesícula seminal, próstata, pênis, epidídimo e ducto deferente). Órgãos testados como coração, pulmão, baço, traquéia, fígado, rins foram negativos por nested-PCR. Análises de IHQ puderam detectar células positivas nos rins (células do epitélio renal tubular), linfonodo mesentérico, inguinal, e tonsilas (histiócitos), testículos (macrófagos intersticiais) e órgãos reprodutivos acessórios como próstata (células intersticiais), glandula bulbo-uretral (macrófagos) e epidídimo (células epiteliais). Resultados semelhantes foram encontrados por HIS. Órgãos (epidídimo e testículo) de outros cachorros positivos C e D e negativos também foram testados.

Os experimentos conduzidos nesse projeto não elucidaram totalmente o mecanismo pelo qual o PCV2 utiliza para se manter persistente nas células dos órgãos reprodutivos dos machos suínos. A técnica de TUNEL foi empregada para descartar a hipótese de apoptose nas células do sistema imune ou outras células que poderiam ser causadas pelo PCV2, objetivando assim se manter e replicar nesses tecidos. Futuros trabalhos são necessários para elucidar a patogenia do PCV2.

4) Quais as vantagens da implantação das técnicas de Hibridização *in situ* (HIS) e imunohistoquímica (IHQ) comparado com a nested-PCR atualmente empregada na confirmação do agente para o diagnóstico laboratorial?

Nenhuma técnica laboratorial é 100% completa e perfeita. Todas três técnicas tem suas características de detecção. Para sêmen é importante realizar a nested-PCR, todavia para análise e detecção do PCV2 em órgãos ambas HIS ou IHQ podem ser utilizadas. A vantagem da HIS sobre a IHQ é que a sonda

empregada é fácil ser obtida por síntese de oligonucleotídeos, não ficando na dependência de um bom anticorpo para a IHQ.

CONCLUSÕES:

Projetos de pesquisa financiados pela EMBRAPA avaliaram a importância da detecção de PCV2 em sêmen de cachorros suínos, sua eliminação pelo ejaculado, persistência em células do sistema reprodutivo, possibilidade de transmissão para fêmeas suínas durante a cobertura e infecção dos conceptos e doença reprodutiva. Identificou-se o DNA do PCV2 no sêmen e em células do sistema reprodutivo de machos reprodutores, e o PCV2 é capaz infectar a leitegada de filhos destes machos positivos verticalmente.

Agradecimentos:

Esse projeto foi realizado com o apoio e financiamento da Embrapa Suínos e Aves e CNPq (Edital Universal). Não poderia ser realizado sem a participação da seguinte equipe: Eraldo Lourenso Zanella, Nelson Mores, Neide Simon, Almiro Dahmer, Salette Oliveira. Estudantes e bolsistas de graduação Marcelo Locatelli, Júlio L. Brambatti, Simone Savoldi Bassi, Kelen Ascoli, Michele Coldebella, Aline Viancelli, Giseli Ritterbuschi e Juliana Amaral Conceição. Parte desse projeto de pesquisa foi Tese de Mestrado da Médica Veterinária Danielle Gava do CAV-UDESC.