



*Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária
Centro Nacional de Pesquisa de Caprinos
Ministério de Agricultura, Pecuária e Abastecimento*

ISSN 1676-7659

Dezembro, 2003

Documentos 50

Seleção do Sêmen de Reprodutores Portadores do Vírus da Artrite Encefalite Caprina Através da Técnica de Reação em Cadeia da Polimerase

Alice Andrioli

Aurora Maria Guimarães Gouveia

Raymundo Rizaldo Pinheiro

Sobral, CE
2003

Exemplares desta publicação podem ser adquiridos na:

Embrapa Caprinos

Estrada Sobral/Groaíras, Km 04, Caixa Postal D 10

CEP 62011-970 - Sobral, CE

Fone: (0xx88) 3677-7000

Fax: (0xx88) 3677-7055

Home-page: <http://www.cnpc.embrapa.br>

E-mail: sac@cnpc.embrapa.br

Comitê de Publicações

Presidente: *Ângela Maria Xavier Eloy*

Secretário Executivo: *Alice A. Pinheiro*

Membros: *Eneas Reis Leite*

Alcido E. Wander

Tânia Maria Chaves Campêlo

Supervisão editorial: *Alexandre César S. Marinho*

Normalização bibliográfica: *Tânia Maria C. Campêlo*

Revisão gramatical: *José Ubiraci Alves*

Foto de capa: *Raymundo Rizaldo Pinheiro*

Editoração eletrônica: *Ingrapel - (88) 3611.3082*

1ª edição

1ª impressão (2003): 300 exemplares

Todos os direitos reservados;

A reprodução não-autorizada desta publicação, no todo ou em parte, constitui violação dos direitos autorais (Lei nº 9.610).

Andrioli, Alice.

Seleções do sêmen de reprodutores portadores do vírus da artrite encefalite caprina através da técnica de reação em cadeia da polimerase / Alice Andrioli, Aurora Maria Guimarães Gouveia, Raymundo Rizaldo Pinheiro. - Sobral : Embrapa Caprinos, 2004.

23p. : 21 cm - (Documentos / Embrapa Caprinos; ISSN 1676-7659; 50).

1. Reprodução Animal. 2. Biologia Molecular. 3. Sêmen - Seleção. 4. Reação em cadeia de polimerase. I. Gouveia, Aurora Maria Guimarães. II. Pinheiro, Raymundo Rizaldo. III. Título. IV. Série.

CDD 573.8

© Embrapa, 2003

Apresentação

A partir de 1976, importações de caprinos de raças exóticas, procedentes de vários países, buscaram a introdução de potencial genético leiteiro, tendo ocorrido também a efetiva introdução de agentes infecciosos no Brasil pela importação de caprinos sem adequados critérios sanitários, com conseqüente dispersão de doenças infecciosas entre os rebanhos nacionais, dentre elas a CAE - artrite encefalite caprina.

Os avanços das técnicas de conservação de sêmen, aliados ao aumento da importância econômica da caprinocultura favorecem o seu intercâmbio nacional e internacional. Somando-se a isto, a inseminação artificial possibilita a concepção de um expressivo número de fêmeas, num curto intervalo de tempo, no entanto, pouco se sabe do risco da transmissão de agentes patogênicos pelo sêmen.

A detecção do CAEV no sêmen de caprinos, pela técnica de PCR demonstra o risco da transmissão do CAEV pelo sêmen e preencheu uma lacuna no controle da CAE, pois desde que a CAE se expandiu nos rebanhos nacionais e medidas de controle foram estabelecidas, a partir do conhecimento das suas principais vias de transmissão, ainda se questionava muito, sobre a possibilidade de uso dos reprodutores contaminados, havendo a recomendação de que deveriam ser descartados, o que causou muito desconforto aos criadores, visto que a maioria dos animais eram de alta linhagem e considerável valor econômico.

A PCR demonstrou sua eficácia como teste controle em aliquotas de sêmen, sendo um teste importante na seleção e no comércio de animais ou sêmen, que uma vez colocado em rotina será de grande utilidade para os rebanhos caprinos nacionais, sendo utilizado nos programas de controle da CAE e em barreiras sanitárias.

Alice Andrioli
Pesquisadora da Embrapa Caprinos

Sumário

Introdução	9
A Técnica de Reação em Cadeia da Polimerase - PCR	11
Vantagens da técnica de PCR.....	13
Restrições.....	14
Deteção do CAEV em Sêmen por PCR	14
Técnica da Reação em Cadeia da Polimerase	16
Coletas de Sêmen e Processamento.....	16
Reação em Cadeia da Polimerase.....	17
Preparo de Controle Positivo e Negativo.....	17
Extração do DNA.....	17
Técnica de PCR.....	17
Análise dos produtos da PCR.....	19
Eletroforese.....	19
Teste de Especificidade por Restrição Enzimática.....	19
Sensibilidade da Técnica de PCR em Sêmen.....	20
Considerações Finais	21
Referências Bibliográficas	20

Seleção do Sêmen de Reprodutores Portadores do Vírus da Artrite Encefalite Caprina Através da Técnica de Reação em Cadeia da Polimerase

Alice Andrioli

Aurora Maria Guimarães Gouveia

Raymundo Rizaldo Pinheiro

Introdução

A inseminação artificial possibilita o uso e a comercialização do sêmen de excelentes reprodutores, permitindo a concepção de um expressivo número de fêmeas, num curto intervalo de tempo. No entanto, pouco se sabe do risco da transmissão de agentes patogênicos pelo sêmen (congelado ou diluído à fresco), ressaltando-se que, assim como é expressivo o número de cabras que irão ser emprenhadas pela inseminação artificial, também há grande risco de ser expressiva a transmissão e disseminação de agentes patogênicos através do sêmen, sendo fonte de entrada de doenças, com repercussões graves na produção e na comercialização destes rebanhos.

Os avanços das técnicas de conservação de sêmen, aliados ao aumento da importância econômica da caprinocultura e da ausência de um programa nacional de melhoramento genético na espécie caprina, favorecem, ainda mais, o intercâmbio de sêmen. Desta forma, importações de caprinos de raças exóticas, procedentes de vários

países, buscaram a introdução de potencial genético leiteiro, mas tendo ocorrido, também, a introdução de agentes infecciosos nos rebanhos brasileiros pela importação de caprinos, sem os devidos critérios sanitários e com conseqüente dispersão de doenças entre os rebanhos nacionais, dentre elas destaca-se a CAE - Artrite Encefalite Caprina.

A CAE é uma enfermidade de caráter crônico, degenerativa, incurável e que apresenta alta prevalência nos rebanhos leiteiros brasileiros, sendo causa de grandes perdas econômicas ao agronegócio da caprinocultura. O conhecimento das vias de transmissão do lentivírus caprino - CAEV, possibilita o delineamento de medidas de controle e a futura erradicação da enfermidade, sendo que esta meta é altamente demandada pelos produtores, visto ser cada vez mais exigido apresentar rebanhos livres da CAE, para o comércio Nacional e Internacional.

Até recentemente, a detecção do vírus da Artrite Encefalite Caprina à Vírus - CAEV em amostras de sêmen não havia sido descrita, provavelmente em função da pouca sensibilidade das técnicas utilizadas na detecção de partículas virais. Porém, Pinheiro (2001) demonstrou pela técnica de reação em cadeia da polimerase *Nested* (PCR-*Nested*) a presença do CAEV em 20 amostras de sêmen congeladas (35,7%), provenientes de um total de 56 amostras coletadas de sete reprodutores, naturalmente infectados, das raças Parda Alpina, Anglo Nubiana, Saanen e mestiços (Pardo Alpino e Moxotô). Este resultado demonstra o risco da transmissão do CAEV pelo sêmen, tornando-se relevante a restrição do uso de bodes e sêmen de caprinos contaminados pelo CAEV.

A detecção do CAEV foi realizada pela técnica de PCR-*Nested*, sendo uma técnica laboratorial que possui alta sensibilidade, ou seja, consegue detectar quantidades mínimas do patógeno nas amostras e de alta especificidade, que comprova que o patógeno identificado é o CAEV. Além disso, após ser padronizado, o teste é prático e rápido, pois os resultados podem ser fornecidos em 24 horas e o custo de cada teste gira em torno de três dólares.

É relevante a problemática causada pela detecção de um reprodutor com CAE num rebanho, pois caso seja ele abatido haverá grande perda

do valor econômico e genético do animal. Por outro lado, a permanência deste animal no rebanho representa significativo detrimento do agronegócio, visto que poderá ocorrer infecção das matrizes e do nascimento de crias infectadas, tanto pelo uso da inseminação artificial como pela monta natural, levando irremediavelmente a diminuição da produção do rebanho, à necessidade de se implantar um rigoroso programa de controle da CAE, à restrição na venda de animais, a depreciação do rebanho, além da necessidade e do custo do monitoramento do estado sanitário do rebanho por testes diagnósticos do CAEV.

A detecção do CAEV no sêmen de caprinos, pela técnica de PCR, preencheu uma lacuna no controle da CAE, pois desde que a CAE se expandiu pelos rebanhos nacionais e medidas de controle foram estabelecidas, a partir do conhecimento das suas principais vias de transmissão (colostro/leite e contato direto), ainda se questionava muito, sobre a possibilidade de uso dos reprodutores contaminados, havendo a recomendação de que deveriam ser descartados, o que causou muito desconforto aos criadores, visto que a maioria dos animais eram de alta linhagem e considerável valor econômico.

A PCR demonstrou sua eficácia como teste controle em alíquotas de sêmen, além disso, foi observado que a presença do vírus no sêmen não é constante, desta forma o teste de PCR em uma alíquota de sêmen poderá ser um recurso para uso de caprinos de alto valor genético. A PCR também é um teste importante na seleção e no comércio de animais ou sêmen, e uma vez colocado em rotina será de grande utilidade para os rebanhos caprinos nacionais, sendo utilizado nos programas de controle e erradicação da CAE e em barreiras sanitárias.