

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



República Federativa do Brasil

Luís Inácio Lula da Silva

Presidente

Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento

Roberto Rodrigues

Ministro

Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária – Embrapa

Conselho de Administração

José Amauri Dimárzio

Presidente

Clayton Campanhola

Vice-Presidente

Alexandre Kalil Pires

Ernesto Paterniani

Hélio Tollini

Luis Fernando Rigato Vasconcelos

Membros

Diretoria Executiva da Embrapa

Clayton Campanhola

Diretor-Presidente

Gustavo Kauark Chianca

Herbert Cavalcante de Lima

Mariza Marilena T. Luz Barbosa

Diretores-Executivos

Embrapa Caprinos

Aurino Alves Simplício

Chefe-Geral

Maria Eliene da Silva Dourado

Chefe-Adjunto de Administração

Luiz da Silva Vieira

Chefe-Adjunto de Pesquisa e Desenvolvimento

Expedito Aguiar Lópes

Chefe-Adjunto de Comunicação e Negócios para Transferência de Tecnologias



*Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária
Centro Nacional de Pesquisa de Caprinos
Ministério da 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

Autores

Alice Andrioli

Méd. Vet., D.Sc. em Ciência Animal

Pesquisadora Embrapa Caprinos

Estrada Sobral/Groaíras, km 04, Caixa Postal D10

CEP 62011-970 - Sobral-CE

Email: alice@cnpq.embrapa.br

Aurora Maria Guimarães Gouveia

Méd. Vet., D.Sc. em Epidemiologia/Virologia

Universidade Federal de Minas Gerais

Escola de Veterinária/Departamento de

Medicina Veterinária Preventiva

E-mail: aurora@net.ufmg.br

Raymundo Rizaldo Pinheiro

Médico Veterinário, D. Sc. em Ciência Animal

Pesquisador Embrapa Caprinos

E-mail: rizaldo@cnpq.embrapa.br

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 alíquotas 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 Moxotó). 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.

A Técnica de Reação em Cadeia da Polimerase - PCR

A técnica de reação em cadeia da polimerase PCR, foi primeiramente descrita em 1985, na Conferência da Sociedade Americana de Genética Humana, e devido ao seu grande impacto na biologia molecular é uma das técnicas que mais se desenvolveu nas últimas décadas. Desta forma, a PCR vem sendo adotada em todo o mundo na pesquisa de

microrganismos devido à especificidade, sensibilidade e rapidez de seus resultados.

Os primeiros trabalhos sobre o uso da PCR no diagnóstico veterinário apareceram no final dos anos 80, e têm sido de grande importância para o diagnóstico de doenças virais, em várias amostras de animais, visto que os métodos de diagnóstico tradicionais requerem longos e complexos procedimentos, como cultivo de células e microscopia eletrônica.

A técnica de PCR permite detectar pequenas quantidades de DNA viral presentes no material, amplificando-o em quantidades identificáveis. Até mesmo patógenos de difícil crescimento em cultivo ou que se encontrem sob estado de latência ou integrados ao genoma do hospedeiro ou, ainda, microrganismos mortos, podem ser detectados pelo método.

A amplificação *in vitro* dos ácidos nucleicos pela PCR permite a obtenção de milhares de cópias de uma seqüência específica de DNA, imitando o fenômeno de replicação natural que ocorre *in vivo* nos seres vivos, ou seja, uma nova fita de DNA complementar ao molde desejado pode então ser enzimaticamente sintetizada. O molde de DNA fita única é obtido por desnaturação pelo calor do DNA de fita dupla. Os iniciadores ou "primers" se ligam no DNA a que se deseja amplificar e na presença de DNTPs a nova fita é copiada (extensão), com a ação de uma enzima DNA polimerase. O esquema de desnaturação, o anelamento dos iniciadores e extensão são chamados "um ciclo".

A repetição de ciclos leva a amplificação do DNA. As três reações ocorrem no mesmo tubo, com os mesmos reagentes, variando-se apenas a temperatura. Cada fita de DNA, novamente criada, conterà um sítio de ligação para o outro "primer", e deste modo, cada nova fita de DNA se torna um molde para caracterizar um ciclo de amplificação. Repetidos ciclos de amplificação, teoricamente, levam à síntese em exponencial de fragmentos de DNA. Teoricamente, após 30-40 ciclos, a fita inicial de DNA terá sido amplificada na ordem de 10^6 vezes.

Dentre os principais usos da PCR podem-se destacar:

- ✓ diagnóstico de doenças infecciosas, determinando o DNA do agente etiológico em amostras de animais, sendo que a técnica é particularmente importante para a identificação de animais que apresentam soro conversão tardia ou de resultado sorológico duvidoso;
- ✓ diagnóstico de doenças genéticas;
- ✓ mapeamento genético - localização e manipulação de loci cromossômicos relacionados com características produtivas ou de susceptibilidade e resistência a doenças;
- ✓ permite a pesquisa e o estudo dos agentes etiológicos, possibilitando uma avaliação minuciosa da variabilidade viral;
- ✓ permite o estudo da evolução molecular, pois a análise de seqüência de nucleotídeos fornece dados a respeito da história evolutiva das espécies;
- ✓ possibilita a amplificação de DNA de tecidos embebidos em parafina, permitindo o estudo retrospectivo de enfermidades;
- ✓ permite identificar e diferenciar microrganismos que possuem fatores de virulência como as toxinas, identificando se o DNA do agente possui o gen que codifica tais toxinas;
- ✓ é utilizada na sexagem de embriões, pela detecção da seqüência específica do DNA do cromossoma sexual Y.

Uma vez que as condições da reação sejam otimizadas, a técnica confere alto grau de especificidade, sendo que a PCR pode detectar o agente desejado em amostras altamente contaminadas por outros microrganismos.

Vantagens da Técnica de PCR

- ✓ as principais vantagens da PCR são a sua alta sensibilidade e especificidade;
- ✓ rapidez do diagnóstico, ou seja o resultado é obtido em 24 horas utilizando a técnica padrão, e caso haja a necessidade de comprovação por restrição enzimática adicionam-se mais 36 horas;
- ✓ elevada capacidade de detecção, inclusive de agentes em estado de latência, mortos, integrados ao genoma ou de difícil crescimento em cultivo do hospedeiro;
- ✓ uma vez que não depende de microrganismos vivos para diagnóstico, torna-se uma técnica segura, pois o diagnóstico de agentes altamente danosos como o vírus da hepatite B podera ser pesquisado após a inativação;

✓ a técnica de PCR é altamente versátil, tanto em variedade de amostras, as quais podem ser analisadas, quanto à variedade de microrganismos que podem ser estudados;

Restrições

✓ Necessidade de prévia padronização e otimização quando um novo agente etiológico é pesquisado ou se utiliza outro tipo de amostra (sangue, leite, semen entre outros);

✓ Possibilidade de contaminação com quantidades mínimas de DNA, resultando em falsos-positivos;

✓ Há restrição no diagnóstico de uma enfermidade com agente etiológico desconhecido;

✓ O protocolo deve ser seguido minuciosamente, para não ocorrer falhas na amplificação e, conseqüentemente, resultados falso negativos.

Deteção do CAEV em Sêmen por PCR

Várias doenças virais de importância veterinária já possuem protocolos padronizados de diagnóstico pela técnica de PCR, e dentre eles estão os lentivírus, como o vírus da imunodeficiência bovina (Nash et al., 1995ab) e os lentivírus de pequenos ruminantes (Zanoni et al., 1990).

A PCR tem sido utilizada para a pesquisa do DNA proviral do lentivírus de caprinos em diferentes amostras como: sangue, líquido sinovial, leite e soro do leite e tecidos (Reddy et al., 1993; Rimstad et al., 1993; Barlough et al., 1994; Clavijo & Thorsen, 1996; Russo et al., 1997).

O genoma do lentivírus caprino (CAEV) é composto de duas moléculas idênticas de RNA, lineares, de cadeia simples, não complementares e de polaridade positiva com tamanho de aproximadamente 10 Kb. O genoma do lentivírus caprino CAEV Cork foi seqüenciado por Saltarelli et al. (1990). É formado pelos genes estruturais (*gag*, *pol* e *env*), os quais são traduzidos em proteínas que formam a partícula viral, regulatórios (*tat* e *rev*) e auxiliares (*vif*, *vpr/vpx*, *vpu* e *nef*) e por duas LTR (*long terminal repeats* seqüências longas repetidas), localizadas nas extremidades 5' e 3' do genoma e que contêm toda a informação essencial para o início e término da transcrição (Gonda, 1994).

Os genes *gag* e *pol* são os mais conservados, enquanto que o gene *env* é heterogêneo, devido a mutações pontuais (uma base) que ocorrem durante a replicação dos ácidos nucleicos dos retrovírus, por "erros" cometidos pela transcriptase reversa (Narayan & Clements, 1989).

Quanto à detecção dos lentivírus no sêmen, tem sido descrita a presença de fatores inibidores da síntese de ácidos nucleicos presentes no plasma seminal. Esses fatores interferem no uso do DNA como *template*, pois parece que esses oligopeptídeos se ligam ao DNA (Lugaro et al., 1988). Porém vários trabalhos têm sido realizados com o objetivo de utilizar a PCR na detecção de patógenos no sêmen, como o vírus da IBR (Silva, 1995). Da mesma forma a detecção dos lentivírus em sêmen através da PCR foi obtida em humanos e em diferentes espécies animais, incluindo os pequenos ruminantes (Travassos et al., 1998, 1999; Andrioli et al., 1999, 2001; Concha-Bermejillo et al., 1996; Mermin et al., 1991; Nash et al., 1995a; Jordan et al., 1995).

Segundo Barlough et al. (1994), a seqüência da região *gag* foi capaz de amplificar a maioria dos resultados positivos (69,4%), comparada às regiões *pol*, e isto pode estar relacionado à região *gag* por ser a mais conservada. Baixa eficiência na amplificação da região *pol* foi reportada por outros autores (Zanoni et al., 1992).

A PCR *Nested* aumenta a sensibilidade quando comparada à PCR simples, e a combinação do uso de PCR múltiplos reduz o número de falsos negativos (Suarez & Whetstone, 1997). Já Barlough et al. (1994) consideram que o uso de PCR duplo *Nested* é mais adequado para identificar animais falso-negativos às provas sorológicas.

A dificuldade em amplificar o DNA proviral dos lentivírus pode estar na sua característica de alta taxa de mutação (Suarez & Whetstone, 1997). A variação das seqüências de bases no genoma dos lentivírus afeta a eficiência da PCR, pois esta é intimamente dependente da complementaridade entre os *primers* e *template* (Pasick, 1998). Os vírus RNA de forma geral e particularmente os lentivírus apresentam grande variedade de quasispécies, o que se atribui ao fato da RNA polimerase ter, intrinsecamente, altas taxas de erro. Desta forma, os lentivírus se reproduzem imperfeitamente e este mecanismo é útil aos vírus na sua habilidade de escape das defesas do hospedeiro e de produzir infecção persistente (Pasick, 1998).

A variação na detecção do CAEV em ejaculados do mesmo animal sugere que a presença do DNA proviral no sêmen de caprino não é constante, o que está de acordo com Jordan et al. (1999), que observaram que a presença do lentivírus no ejaculado de gatos varia tanto entre animais quanto nos vários ejaculados do mesmo animal e Concha-Bermejillo et al. (1996) que observaram que a presença do MVV em sêmen de ovinos é intermitente. Como a presença do CAEV no sêmen não é constante, o material genético de excelentes reprodutores poderia ser utilizado, desde que uma alíquota de sêmen de cada coleta seja analisada por PCR.

Após a padronização da técnica PCR, em amostras de sêmen para a detecção do DNA-proviral do lentivírus caprino, esta poderá estar a disposição em laboratórios credenciais ou Centrais de inseminação artificial, em todo território nacional.

O custo inicial de padronização e implantação da PCR é alto, até ser colocada em rotina, incluindo gastos com equipamentos e material de consumo. Porém, uma vez disponibilizada, o custo do diagnóstico da PCR, por amostra, será acessível aos criadores, tornando-se uma ferramenta útil no teste do CAEV em partidas de sêmen comercializadas.

Técnica da Reação em Cadeia da Polimerase

Coletas de Sêmen e Processamento

As coletas de sêmen podem ser realizadas pelo método da vagina artificial, enquanto que as amostras de sêmen são lavadas em Solução Krebs-Ringer-Fosfato na proporção de nove partes da solução para uma parte de sêmen com centrifugação a 2.000 g durante 10 minutos, sendo este um processo usual da Central de Tecnologia de Sêmen da Embrapa Caprinos. Ao sêmen lavado, é adicionado diluente à base de leite desnatado, glicose e glicerol. As amostras são envasadas, submetidas aos vapores de nitrogênio líquido e em seguida imersas no nitrogênio para proceder-se a congelação. Após essa etapa, os pailletes são armazenados em botijão criobiológico (-196°C).

Reação em Cadeia da Polimerase

Preparo de Controle Positivo e Negativo

A prova de PCR requer o preparo dos controles positivo e negativo, a partir de monocamadas de células de membrana sinovial caprina (MSC), sendo ou não respectivamente, inoculadas com amostra do CAEV de referência. As suspensões celulares são obtidas por tripsinização das monocamadas. Depois de centrifugadas (6500g / 5 minutos) e submetidas à duas lavagens com 10 mL de PBS, as células são ressuspensas em tampão hipertônico (0,32M sacarose; 10mM Trizma hydrochloride, pH 7,5; 5,0mM MgCl₂; 1,0% Triton X 100), para lise do citoplasma (Higuchi, 1989), durante alguns minutos na temperatura ambiente. Em seguida, o material deve ser centrifugado (2.500 rpm/10 minutos; Centrifugador Excelsa 2 FANEN, rotor 8X15 mL), sendo o sedimento lavado com PBS e ressuspenso em 250 L de tampão de PCR (10mM Tris.HCl, pH 8,0; 50mM KCl; 1,0mM MgCl₂; 5% glicerol; 0,05% Tween20) e tratado com 100g de proteinase K/mL, durante 60 minutos a 56°C. Finalmente, a proteinase K será inativada termicamente (cerca de 100°C durante 10 minutos) e as amostras acondicionadas em geladeira e, posteriormente, em freezer a -20°C.

Extração do DNA

Para extração do DNA viral as amostras de sêmen devem ser filtradas, individualmente, em coluna de Sephacryl S-400¹, segundo Santurde et al. (1996) e, em seguida, as amostras são incubadas a 56°C por 45 minutos em solução contendo 200µL de Chelex 100² a 5%, 2µL de proteinase K³ (10 mg/mL) e 7µL de DTT 1M. Após centrifugação por 10 segundos a 13.000g, os tubos serão colocados em banho de água fervente por 8 minutos e a seguir centrifugados por três minutos a 13.000g (Walsh et al., 1991). O material deve ser acondicionado em geladeira até sua utilização na prova de PCR.

Técnica de PCR

Utilizam-se dois pares de iniciadores derivados a partir das seqüências das regiões *gag* da amostra padrão CAEV-Cork (Saltarelli et al., 1990), sendo os iniciadores 1 (5' CAAGC AGCAGGAGGGAGAAGCTG-3', nucleotídeos 953 à 975) e 2 (5'TCCTACCCCC ATAATTTGATCCAC -

¹Pharmacia, Uppsala, Sweden

²Sigma, EUA C- 7901

³Gibco / BRL, EUA

3', nucleotídeos 1249 à 1226) descritos por Barlough et al. (1994), resultando na amplificação de um fragmento de DNA de 297pb. Os iniciadores 3 (5'GTTCCAGCAACTGCAAACAGTAGCAATG-3' nucleotídeos 997-1024) e 4 (5' ACCTTTCTGCTTCTTCATTTAATTTCCC 3' - nucleotídeos 1181 à 1154) foram utilizados na segunda amplificação, resultando num fragmento final de 185 pb (Rimstad et al., 1993). A reação de PCR *Nested* deve ser realizada num volume total por reação de 50µL, os quais contenham: tampão Tris HCl (pH 8,3) 10mM; KCl - 50mM; MgCl₂ 1,5mM; Gelatina- 0,001% (p/v); dNTP - 100M de cada; TMAC- 5M ; iniciadores 20pmoL de cada (Ciclo 1 iniciadores 1 e 2; Ciclo 2 iniciadores 3 e 4); Taq DNA polimerase 2 U; *Target* DNA: Ciclo 1 - 3µL e Ciclo 2 - 1L produto do Ciclo 1 e água Ω ultra pura 18 (Milli-Q) livre de DNase, autoclavada 50µLq.s.p.

As reações de amplificação realizam-se em termociclador⁴, constituindo num ciclo inicial para desnaturar as fitas de DNA, de 94°C por 5 minutos; 35 ciclos: 94°C - 1 minuto, 56°C - 1 minuto, 72°C - 45 segundos; extensão final a 72°C por 7 minutos; 4°C - até a coleta da amostra.

Normas de segurança necessárias para obtenção de um teste confiável devem se seguidas rigorosamente. Para prevenir contaminações, os procedimentos de preparo das amostras de sêmen, infecção das células, extração do DNA proviral, montagem da PCR e manipulação do material amplificado devem ser realizados em ambientes distintos. Luvas de procedimentos, ponteiras com barreira para aerossóis, microtubos e outros recipientes utilizados devem ser novos, estéreis e descartáveis. As reações de PCR são montadas em unidade de fluxo laminar classe II exclusivo para manipulação. Reagentes estoques (iniciadores, enzimas e tampões) foram preparados em água ultra pura 18 Ω (Milli-Q) livre de DNase, manipulados em cabine de fluxo laminar livre de contaminação externa.

⁴Programmable Thermal Controller, PTC-100, MJ Research, Inc, EUA.

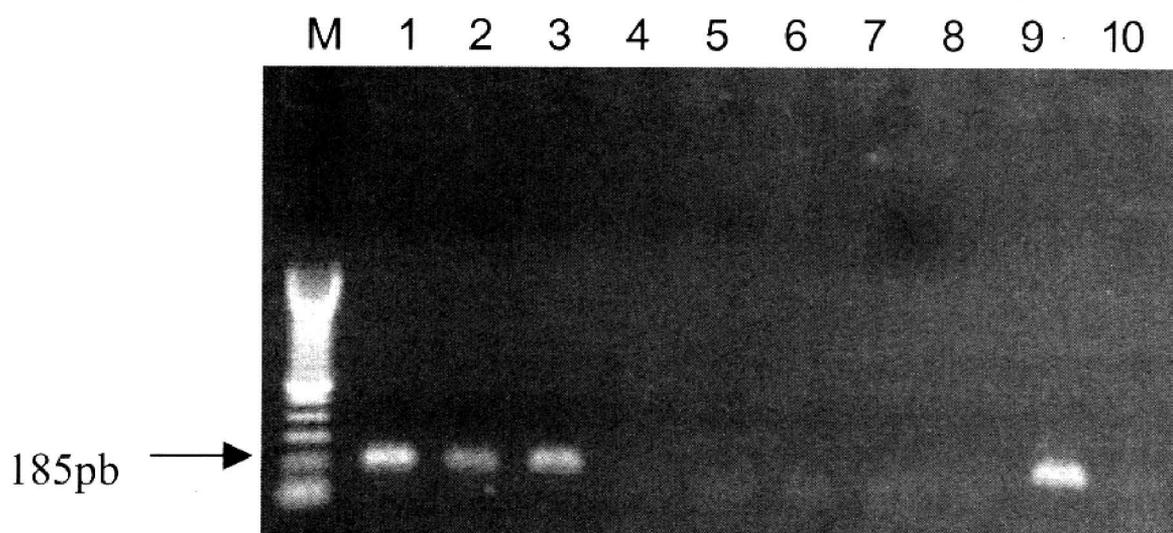


Fig. 1. Gel de agarose 1% corado com brometo de etídio. Reação em cadeia da polimerase - PCR *Nested* de amostras de sêmen de bodes infectados naturalmente com o CAEV, bandas de 185pb. Sendo M - marcador DNA Ladder; 1, 2 e 3 - amostras positivas; 4, 5, 6, 7, 8 - amostras negativas; 9 - controle positivo e 10 - controle negativo.

Análise dos produtos da PCR

Eletroforese

As amostras amplificadas e os controles positivo e negativo, juntamente com o marcador molecular⁵, foram submetidos à eletroforese em gel de agarose 1% em TBE (Tris, borato e EDTA 0,1X), corado com brometo de etídio adicionado ao gel (0,5µg/mL). Cada amostra (15µL), juntamente com 3µL de tampão da amostra, foi submetida à eletroforese em cuba horizontal, com TBE (0,5X), por 60 minutos (2amp e 90volts). A visualização das bandas de DNA são observadas ao transiluminador de luz ultra violeta, e registradas fotograficamente (Figura 1).

Teste de Especificidade por Restrição Enzimática

O uso de enzimas de restrição, também chamadas de endonucleases de restrição, tem a função de cortar em pontos específicos, moléculas de DNA longas em fragmentos pequenos, que variam, geralmente, de quatro a oito pares de bases. A clivagem ocorre por clivagem de uma ligação fosfodiéster, em cada fita, portanto, essas enzimas reconhecem uma seqüência de bases específica na dupla hélice do DNA e cortam ambas as fitas da hélice, em lugares determinados.

⁵ 100bp DNA Ladder, Gibco /BRL, EUA.

Verifica-se o perfil de restrição enzimática do DNA amplificado do CAEV frente à enzima $Bal\ I^6$, sendo esta diluída nos respectivos tampões que acompanham o kit seguindo as recomendações do fabricante. As amostras e os controles foram incubados a $37^\circ C$, por uma noite, e os produtos da restrição foram submetidos a eletroforese em gel de agarose como descrito acima. A enzima $Bal\ I$ reconhece e corta as seqüência $5' \dots TGC \downarrow CCA \dots 3'$ e a cópia correspondente - $3' \dots ACC \downarrow GGT \dots 5'$, desta forma, os fragmentos amplificados no experimento de 185 pb resultam em dois fragmentos de 116 e 69 pb, comprovando a especificidade desta técnica de PCR.

Sensibilidade da Técnica de PCR em Sêmen

Quanto à sensibilidade do teste, a PCR identificou bandas de DNA - proviral em $10^{4.5}$ a $10^{0.5}$ TCDI₅₀/50 μ L em sobrenadante de cultivo celular inoculado, quando se utilizaram os iniciadores externos. Com a realização da segunda etapa - PCR *Nested*, utilizando os iniciadores internos, as bandas esperadas foram obtidas entre $10^{4.5}$ a $10^{4.5}$ TCDI₅₀/50 μ L, indicando que a PCR *Nested* possui boa sensibilidade para identificação do DNA-proviral do CAEV em sêmen.

Considerações Finais

- ✓ A presença do CAEV no sêmen sugere um risco potencial da sua transmissão por esta via, tornando-se relevante maior controle nas importações e comercialização de reprodutores e sêmen de caprinos.
- ✓ A técnica de PCR pode ser utilizada na detecção do CAEV no sêmen de excelentes reprodutores, por possuir alta sensibilidade e especificidade, podendo ser um recurso importante no comércio de animais ou sêmen.
- ✓ A intermitência da presença do CAEV no sêmen sugere que o material genético de reprodutores de alto valor poderia ser utilizado em IA, desde que uma alíquota de sêmen de cada coleta seja analisada por PCR *Nested*, porém a possibilidade de transmissão do vírus pelo sêmen PCR negativo ainda está em estudo.

⁶Promega, EUA.

Referências Bibliográficas

- ANDRIOLI, A.; GOUVEIA, A. M. G.; PINHEIRO, R. R.; ROCHA, M. A.; MARTINS, A. S.; SANTOS, D. O. Detecção do DNA pró-viral do lentivírus caprino em sêmen de bodes naturalmente infectados. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 23, n. 3, p. 420-421, 1999.
- BARLOUGH, J.; EAST, N.; ROWE, J. D.; VAN HOOSEAR, K.; DeROCK, E.; BIGORNIA, L.; RIMSTAO, E. Double-nested polymerase chain reaction for detection of caprine arthritis-encephalitis virus proviral DNA in blood, milk, and tissues of infected goats. **Journal of Virology Methods**, v. 50, p. 101-114, 1994.
- CLAVIJO, A.; THORSEN, J. Application of polymerase chain reaction for the diagnosis of caprine arthritis-encephalitis. **Small Ruminant Research**, v. 22, p. 69-77, 1996.
- CONCHA-BERMEJILLO, A.; MAGNUS-CORRAL, S.; BRODIE, S. J.; MARTINI, J. C. de. Veneral shedding of ovine lentivirus in infected rams. **American Journal Veterinary Research**, v. 57, p. 684-688, 1996.
- GONDA, M. A. Molecular biology and virus-host interactions of lentiviruses. **Annals of the New York Academy Science**, v. 724, p.22-42, 1994.
- HIGUCHI, R. Rapid, efficient DNA extraction for PCR from cells or blood. **Amplifications**, v. 1, p. 1-3, 1989.
- JORDAN, H. L.; HOWARD, J.; TOMPKINS, W. A.; KENNEDY-STOSKOPE, S. Detection of Feline immunodeficiency virus in semen from seropositive domestic cats (*Felis catus*). **Journal of Virology**, v. 69, n. 11, 1995.
- JORDAN, H. L.; LIANG, Y.; HUDSON, L. C.; TOMPKINS, W. A. Shedding of feline immunodeficiency virus in semen of domestic cats during acute infection. **American Journal of Veterinary Research**, v. 60, n. 2, p. 211-215, 1999.
- LUGARO, G.; CAMPAGNARI, F.; MORETTI, R.; CASELLATO, M. M. Inhibition of DNA transcription to RNA by seminal plasma peptides. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 950, p. 420-428, 1988.

MERMIN, J. H.; HOLODNIITY, M.; KATZENSTEIN, D. A.; MERIGAN, T. C. Detection of human immunodeficiency virus DNA and RNA in semen by the polymerase chain reaction. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 164, p. 769-772, 1991.

NASH, J. W.; HANSON, L. A.; COATS, K. S. T. C. Bovine immunodeficiency virus in stud bull semen. **American Journal Veterinary Research**, v. 56, n. 6, p. 760-763, 1995a.

NASH, J. W.; HANSON, L. A.; COATS, K. S. T. C. Detection of Bovine immunodeficiency virus in blood and milk-derived leuckocytes by polymerase chain reaction. **American Journal Veterinary Research**, v. 56, n. 4, p. 445-449, 1995b.

NARAYAN, O.; CLEMENTS, J. E. Biology and pathogenesis of lentiviruses: review article. **Journal of General Virology**, v. 70, p. 1617-1639, 1989.

PASICK, J. Maedi-Visna vírus and Caprine Arthritis-Encephalitis Vírus: distinct species ou quasispecies and its implications for laboratory diagnosis. **Canadian Journal Veterinary Research**, v. 62, p. 241-244, 1998.

PINHEIRO, A. A. **Vírus da artrite e encefalite caprina: PCR e isolamento viral em amostras de sêmen, fluido uterino e embriões**. Belo Horizonte: UFMG, 2001. 68 p. Tese apresentada a UFMG, para a obtenção do título Doutor em Ciência Animal (Medicina Veterinária Preventiva e Epidemiológica).

REDDY, P. G.; SAPP, W. J.; HENEINE, W. Detection of caprine arthritis-encephalitis virus by polymerase chain reaction. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 31, n. 11, p.3042-3043, 1993.

RIMSTAD, E.; EAST, N.E.; TORTEN, M.; HIGGINS, J.; DeROCK, E. Delayed seroconversion following naturally acquired caprine arthritis-encephalitis virus infection in goats. **American Journal Veterinary Research**, v. 54, n. 11, p. 1858-1862, 1993.

RUSSO, P.; VITU, C.; BOURGOGNE, A.; VIGNONI, M.; ABADIE, G.; DAVID, V.; PEPIN, M. Caprine arthritis-encephalitis virus: detection of proviral DNA in lactoserum cells. **Veterinary Record**, v. 140, n. 18, p. 483-484, 1997.

SALTARELLI, M.; QUERAT, G.; KONINGS, D. A. M.; VIGNE, R.; CLEMENTS, J. E. Nucleotide sequence and transcription analysis of molecular clones of CAEV which generate infectious virus. **Virology**, v. 179, p. 347-364, 1990.

SANTURGE, G.; SILVA, N. da; VILLARES, R.; TABARÉS, E.; SOLANA, A.; BAUTISTA, J. M.; CASTRO, J. M. Rapid and high sensitivity test for direct detection of bovine herpesvirus-1 genome in clinical samples. **Veterinary Microbiology**, v. 49, n. 1/2, p. 81-92, 1996.

SILVA, D. N. **Detección inactivación de vírus sêmen bovino destinado a la inseminación artificial**. Madrid: Universidad Complutense de Madrid. Facultad de Veterinaria, 1995. 194 p. Tese (Doutorado).

SUAREZ; D. L.; WHETSTONE, C. A. Comparison of different pcr test to detect bovine lentivirus in cell culture and experimentally and naturally infected cattle. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v. 9, n. 4, p. 421-424, 1997.

TRAVASSOS, C.; BENOÎT, C.; VALAS, S.; SILVA, A. G. da; PERRIN, G. Caprine arthritis-encephalitis virus in semen of naturally infected bucks. **Small Ruminant Research**, v. 32, n. 2, p. 101-106, 1999.

TRAVASSOS, C.; BENOÎT, C.; VALAS, S.; SILVA, A. G. da; PERRIN, G. Détection du virus de l`arthrite encéphalite caprine dans le sperme de boucs infectés expérimentalement. **Veterinary Research**, v. 29, p. 579-585, 1998.

WALSH, P. S.; METZGER, D. A.; HIGUCHI, R. Chelex 100 as a medium for simple extraction DNA for PCR-based typing from forensic material. **Biotechniques**, v. 10, p. 506-513, 1991.

ZANONI, R.; NAUTA, I. M.; KUHNERT, P.; PAULI, U.; POHL, B.; PETERHANS, E. Genomic heterogeneity of small ruminant lentiviruses detected by PCR. **Veterinary Microbiology**, v. 33, p. 341-351, 1992.

ZANONI, R.; PAULI, U.; PETERHANS, E. Detection of caprine arthritis-encephalitis (CAEV) and Maedi-Visna viruses using the polymerase chain reaction. **Experientia**, v. 46, p. 360-318, 1990.

Embrapa

Caprinos