

A utilização de biotecnologias no controle da Artrite Encefalite Caprina

Maria Fátima da Silva Teixeira; Valeska Shelda Pessoa Melo; Tânia Valeska Medeiros Dantas; Suzana Aparecida Costa de Araújo; Edmara Costa Chaves; Aracely Rafaelle Fernandes Ricarte

UECE

A artrite encefalite caprina é uma doença de caráter crônico, causada pelo vírus da Artrite Encefalite Caprina (CAEV), vírus RNA pertencente à família Retroviridae, gênero Lentivirus, (HAASE, 1986), acomete pequenos ruminantes em especial os caprinos, causando como principais sintomas: artrite, mamite, mais esporadicamente pneumonia nos adultos enquanto que nos animais jovens provoca encefalomielite (CORK et al., 1974).

A CAE apesar de não causar uma mortalidade expressiva, sobretudo nos animais adultos, determina inúmeros prejuízos econômicos. Valendo salientar que em se tratando de animais jovens, filhos de fêmeas soropositivas, o quadro muda drasticamente elevando o número de mortes, após o nascimento e nos dois meses subsequentes por problemas nervosos, como tremores, paresias e paralisias. Pode ocorrer uma baixa produção leiteira, quando acomete as fêmeas com quadros de mamites, sejam estas aguda, crônica ou indeterminada. Além disso, interferem na coagulação do leite impedindo a formulação de queijos e outros produtos lácteos utilizados.

A principal forma de transmissão da CAE é através do leite e colostro de animais contaminados, podendo também ocorrer essa disseminação por via horizontal através do contato direto, com menor intensidade pode acontecer transmissão por via reprodutiva, embora essa última possa não aparentar é de fundamental importância no controle da CAE. No intuito de melhoramento dos rebanhos, muitas importações de matrizes e ou reprodutores têm sido feitas representando um grande risco na introdução de novas doenças ou disseminação das já existentes.

Inúmeras práticas reprodutivas são utilizadas de rotina e muitas ainda estão sendo implantadas e todas merecem uma melhor investigação. A inseminação artificial (IA) é rotineiramente usada, porém no tocante ao controle da CAE não podemos ter uma certeza de eficácia adequada. Levando-se em consideração que a transmissão de patógenos pelo sêmen é bastante relevante, uma vez que na IA várias fêmeas são inseminadas com um único ejaculado, podendo causar grande prejuízo econômico, principalmente quanto à possibilidade de introdução de novas cepas de microrganismos mais virulentas em um rebanho inteiro (ANDRIOLI et al., 2003). Desta forma a utilização de sêmen requer um cuidado redobrado visto que este pode se contaminar de várias formas.

O ideal seria um controle de qualidade na produção de sêmen que abrangesse características relacionadas tanto com a qualidade da viabilidade físico-químicas, quanto do controle biológico sistemático de agentes infecciosos, sobretudo de vírus como o da artrite encefalite caprina (CAEV) seria a medida sanitária ideal para impedir a disseminação via sêmen. Sabe-se que no caso do isolamento de CAEV no sêmen é uma ocorrência esporádica, visto que, o vírus não é isolado de forma constante em todas as amostras. Existem também fatores que contribuem para a expressão do vírus tais como a injúria celular e ou a concomitância com outros agentes, inclusive bactérias. (CONCHA-BERMEJILLO, 1997; ANDRIOLI et al., 2003).

Um pouco diferente do que ocorre com o sêmen, para que ocorra a transmissão de um patógeno através do embrião é necessário que ele esteja presente dentro do oócito, em associação ou mesmo aderido à zona pelúcida (ZP), ou que esteja presente nos fluidos no quais os embriões são recolhidos, manipulados, criopreservados ou transferidos (SINGH, 1987; WRATHALL, 1995).

Outro fator importante na transmissão de agentes por embrião é a patogenia da doença, especialmente quanto à predileção do patógeno ao trato genital. Agentes carreados pelo sangue podem, também, ganhar acesso ao trato genital, aumentando o risco no caso de qualquer hemorragia uterina o que ocorre, inevitavelmente, durante a colheita de embriões. No caso de outros agentes de doenças que têm predileção por pele ou vísceras, a probabilidade de contaminação do embrião é remota, todavia, tais agentes, ocasionalmente, produzem infecções generalizadas, e mesmo as localizadas podem causar contaminação dos meios, das soluções e do equipamento (ANDRIOLI et al., 2003).

A Transferência de Embriões (TE) torna possível a obtenção de um grande número de crias em um curto intervalo de tempo e tem sido considerada a técnica mais segura para o trânsito internacional de material genético (CASTRO et al., 1992; PHILPOTT, 1993). Isto se deve a utilização das normas sanitárias da Sociedade Internacional de Transferência de Embriões (IETS) as quais têm o intuito de minimizar os riscos de transmissão de patógenos, dentre estas normas está a não utilização de embriões com zona pelúcida rompida, pois esta se caracteriza como uma barreira natural contra a entrada de patógenos no embrião, outra técnica adotada é a lavagem dos embriões, a qual visa retirar por lavagem qualquer patógeno que possa estar aderido a zona pelúcida, podendo se utilizar para isto meios de lavagem que contenham enzimas que facilitem essa remoção como a tripsina (PINHEIRO et al., 2001).

Desta forma a TE pode suprir a necessidade de rápida reposição dos animais puros infectados, com obtenção de crias saudáveis e manutenção da qualidade genética do plantel, possibilitando a importação de material genético com segurança, mesmo se utilizando fêmeas contaminadas, obtendo resultados satisfatórios no âmbito econômico, sanitário, reprodutivo e do melhoramento genético (ANDRIOLI et al., 2003).

O transplante de embriões é uma técnica que embora tenha se apresentado como uma das formas mais eficazes de controle da CAE, não está disponibilizada rotineiramente para a grande maioria dos interessados no seu uso, motivada pelo custo, aparelhagem necessária, além da mão de obra altamente qualificada para obtenção dos resultados desejados. Neste caso específico a Sociedade Brasileira de Tecnologia de Embriões (SBTE), possui normas rígidas de controle através de lavagens sistemáticas do embrião, uso de enzimas etc. Apesar dos empecilhos citados, até o momento tem sido demonstrada como a técnica mais segura para controle de crias saudáveis e uma das formas de aproveitamento do material genético de matrizes de alto valor e que sejam soropositivas para a CAE.

Atualmente, no desenvolvimento das biotécnicas existe um controle bem maior de infecções, tanto dos próprios gametas quanto dos meios e soluções utilizadas na manipulação dos mesmos. Diversos estudos foram realizados obtendo sucesso, se testando a utilização de antibióticos nos meios de coleta, maturação, fecundação e cultivo, bem como, a possibilidade de utilização de agentes antivirais como medida preventiva contra contaminações por vírus em meios de maturação, fecundação e de cultivo de oócitos, espermatozoides e embriões manipulados *in vitro* (GIVENS et al., 2006).

Hoje, embora ainda não consolidada em todas as fases, surge uma nova expectativa com relação à conservação de material de fêmeas, mais precisamente folículos pré-antrais. Já foi descrito a possibilidade de contaminação de amostras seminais criopreservadas em pellets através do nitrogênio líquido a partir de outras amostras de pellets contaminados inseridos no mesmo, o que também poderia acontecer com embriões ou oócitos (HARE, 1985; THIBIER & GUÉRIN, 2000).

A conservação de material genético também pode ser feita através de fragmentos de ovário, sendo esta uma opção estratégica para conservar as funções gametogênicas e esteroidogênicas, porém estes fragmentos são utilizados posteriormente para transplante, seja para o mesmo animal ou não (SANTOS et al., 2004). Estes fragmentos poderiam conter patógenos e contaminar outras amostras através do nitrogênio líquido ou também as receptoras do fragmento transplantado.

Muitos trabalhos têm sido desenvolvidos no sentido de poder aproveitar folículos pré-antrais de animais soropositivos para num futuro próximo poderem ser utilizados em fecundação in vitro e originar novos embriões que possam ser transplantados para receptoras. Para tanto pesquisas foram desenvolvidas e embora existam alterações em alguns folículos de fêmeas positivas para CAE, foi demonstrado também que muitos folículos continuam intactos e não contaminados, possibilitando assim a viabilidade do uso (OTOI et al., 1998; BOSCH et al., 2004; MOCHIDA et al., 2003).

Atualmente o que se tem mais palpável é o estudo dos folículos pré-antrais, técnicas de isolamento, formas de melhor conservação e dentre elas a criopreservação tem sido utilizada consolidando oportunidades de reutilização num futuro bem próximo (SANTOS et al., 2004).

Os avanços tem sido significante, em caprinos e ovinos que nada se tinha a respeito, já dispendo de forma de isolamento, protocolos de meios de transporte e conservação, inclusive criopreservação. O passo seguinte será o cultivo e tão logo esta difícil etapa se consolide, então teremos todo o instrumental para iniciar a fecundação in vitro e subsequente implantação em receptoras. Passo este de importância indiscutível na conservação de folículos, e uso como biotécnica consolidada da reprodução.

A acurácia das técnicas de diagnóstico desempenha um papel preponderante para obtenção do resultado adequado. As técnicas disponíveis no momento tais como as sorológicas, têm demonstrado um importante papel na investigação da CAE nos rebanhos e tem permitido fazer testes de triagem e subsequente a separação e eliminação dos soropositivos. O isolamento viral por ser uma técnica cara e nem sempre fornecem os resultados adequados além de existir poucos laboratórios equipados para tal finalidade; desta forma o diagnóstico não tem sido adequado, precisando um maior incremento para implantação de uma rotina que enquadre diagnósticos moleculares, merecendo destaque a reação em cadeia de polimerase (PCR) que é capaz de identificar o pró-vírus em componentes do sêmen de animais infectados inclusive de forma precoce onde as outras técnicas não o fazem. As amostras negativas pela PCR poderiam ser selecionadas para programas especiais de rebanhos negativos controlados para CAE. Estes rebanhos poderiam ter um valor financeiro mais expressivo, servindo de base para centrais de inseminação artificial, estimulando desta forma o controle da doença.

A técnica da reação em cadeia de polimerase (PCR) como diagnóstico da CAE poderia como já acontece nos estados do Centro e Sul ser implantada como técnica de rotina para plantéis de

reprodutores e matrizes de alto valor zootécnico e que já utilizam um programa de controle sorológico eficaz, onde seus animais já teriam obtido o status negativo por sorologia.

Esta realidade está sendo implantada no estado do Ceará no projeto em parceria com a FUNCAP/CNPq/Laboratório de Virologia FAVET /UECE.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ANDRIOLI, A.; GOUVEIA, A.M.G.; PINHEIRO, R.R. Seleção de sêmen de reprodutores portadores do vírus da artrite encefalite caprina através da técnica de reação em cadeia da polimerase. Sobral, Comunicado técnico. EMBRAPA-CNPC, 2003, n.50, 23 p.

ANDRIOLI-PINHEIRO, A. Vírus da Artrite Encefalite Caprina: PCR e isolamento viral em amostras de sêmen, fluido uterino e embriões. 2001. 68 f. Tese (Doutorado) - Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2001.

BOSCH, P.; HERNANDEZ-FONSECA, H.J.; MILLEN, D.M.; WININGER, J.D.; MASSEY, B.; LAMB, S.V.; BRACKETT, B.G. Deveploment of antral follicles in cryopreserved cat ovarian tissue transplanted to immunodeficient mice. *Theriogenology*, v. 61, p. 581-594, 2004.

CASTRO, R.S.; LEITE, R.C.; ABREU, J.J. Prevalence of antibodies to selected viruses in bovine embryos donors and recipients from Brazil, and its implications in international embryo trade. *Trop. Anim. Helth Prod.*, v. 24, p. 173-176, 1992.

CONCHA-BERMEJILLO, A. de la. Maedi-Visna and ovine progressive pneumonia. *Vet. Clin. Nrth Am.:Food Animm. Pract.*, v. 13, p. 12-33, 1997.

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.

GIVENS , M.D.; STRINGFELLOW, D.A.; RIDDELL, K.P.; GALIK, P.K.; NAVARRE, C.B. Normal calves produced after transfer ofin vitro fertilized embryos cultured with an antiviral compound. *Theriogenology*, v. 65, p. 344–355, 2006.

HAASE, A.T. Pathogenesis of Lentivirus infections. *Nature*, v. 322, n.10, p. 130-136, 1986. HARE, W.C.D. Enfermedades transmissibles por el semen y las tecnicas de transferencia de embriones. Paris: Office International des Epizooties, 1985. 83p. (Série Técnica, 4).

MOCHIDA, Y.; TAKEMURA, Y. KANDA, T.; HORIE, Y. Fertilized eggs obtained from transplatation of frozem ovaries and parthenogenesis in combination with artificial insemination of frozen sêmen of the silkworm, *Bombyx mori*. *Criobiology*, v. 46, p. 153-160, 2003.

OTOI, T.; YAKAMOTO, K.; KOYAMA, N.; SUZUKI, T. Cryopreservation of mature bovine

oocytes by vitrification in straws. *Criobiology*, v. 37, p. 77-85, 1998.

PHILPOTT, M. The dangers of disease transmission by artificial insemination and embryo transfer. *Br. Vet. J.*, v. 149, p. 339-369, 1993.

PINHEIRO, R.R.; GOUVEIA, A.M.G.; ALVES, F.S.F. Prevalência da infecção pelo vírus da artrite encefalite caprina no estado do Ceará, Brasil. *Ciência Rural*, Santa Maria, v.31, n.3, p.449-454, 2001.

SANTOS, R.R.; RODRIGUES, A.P.R.; MARTINS, F.S.; MATOS, M.H.T.; CELESTINO, J.J.H.; FIGUEIREDO, J.R. Preservação de folículos pré-antrais de pequenos ruminantes. *Ciência Animal*, v. 14, n. 1, p. 7-19, 2004.

SINGH, E. L. The disease control potential of embryos. *Theriogenology*, v. 27, n. 1, p. 9-20, 1987.
THIBIER, M., GUÉRIN, B. Hygienic aspects of storage and use of semen for artificial insemination. *Animal Reproduction Science*, v. 62, p. 233-251, 2000.

WRATHALL, A.E. Embryo transfer and disease transmission in livestock a review of recent research. *Theriogenology*, v.43, p. 81-88, 1995.