

TÍTULO

DETECÇÃO DO RNA GENÔMICO DO VÍRUS DA ARTRITE ENCEFALITE CAPRINA (CAEV) POR AMPLIFICAÇÃO DO GENE ESTRUTURAL GAG DE AMOSTRAS SANGÜÍNEAS.

AUTORES

Ricardo Basto Souza^{1,3}; Alexsandro Nunes de Oliveira^{2,3}; Alice Andrioli Pinheiro⁴; Raymundo Rizaldo Pinheiro⁴; Lúcia Helena Sider^{5,6,1}. Graduando em Biologia/UVA; ². Graduando em Zootecnia/UVA; ³ Estagiário da Embrapa Caprinos ⁴. Pesquisador da Embrapa Caprinos; ⁶ Orientadora

PALAVRAS-CHAVE

RNA genômico, Vírus da Artrite Encefalite Caprina, amostras sangüíneas

APOIO

Embrapa

INTRODUÇÃO

A Biologia Molecular é o estudo dos processos biológicos em nível molecular, com especial foco no estudo da estrutura e função do material genético e seus produtos de expressão. É um campo de estudo alargado e muito empregado em estudos de enfermidades e seus respectivos diagnósticos. A artrite encefalite caprina (CAE) é uma enfermidade crônica, incurável e com repercussão negativa sobre a produtividade dos rebanhos. Desta forma, ressalta-se a importância da aplicação de testes de diagnóstico sensíveis e específicos, como a PCR (Polymerase Chain Reaction), nos rebanhos em que a enfermidade está controlada, mas que ainda observam-se casos esporádicos de animais portadores do vírus. A grande vantagem dos testes de diagnóstico molecular (baseados em PCR) é que estes possibilitam a detecção do vírus antes mesmo da soroconversão, portanto antes da detecção por testes sorológicos.

OBJETIVOS

Geral Desenvolver um método de diagnóstico molecular do vírus da artrite encefalite caprina (CAEV) por RT (Reverse Transcription)-nested PCR em amostras sangüíneas. Específicos Padronizar o método de extração de RNA das amostras realizado logo após a sua coleta ou congeladas a -20°C e -80°C. Padronizar as reações de síntese de cDNA e a amplificação de genes caprino e viral por RT-nested PCR.

MATERIAL E MÉTODOS

A vidraria utilizada foi autoclavada e fornada a 200°C/4h. Utilizou-se material plástico novo e soluções tratadas com DEPC (Dietilpirocarbonato) e autoclavadas. Coletou-se por venipuntura jugular o sangue de um caprino com PCR positivo para a CAE, porém não soroconvertido. O RNA total de amostras frescas e congeladas foi extraído pelos métodos NucleoSpin® RNA II (Macherey-Nagel) e Trizol® (Invitrogen) logo após a separação dos leucócitos, segundo as indicações do fabricante e em seguida quantificado por espectrofotometria. O cDNA foi sintetizado com o kit ImProm-ITM Reverse Transcription System (Promega) segundo as indicações do fabricante. Em seguida foi amplificado o gene constitutivo caprino GAPDH com os primers descritos por Harmache et al. (1996) e o gene estrutural viral GAG Cork (SALTARELLI et al, 1990) por duas amplificações com primers externos (BARLOUGH et al., 1994) e internos (ANDRIOLI, 2001). Os produtos amplificados foram submetidos à eletroforese em gel de agarose 1%.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A concentração dos RNAs extraídos, à espectrofotometria, foi de 264 e 190 µg/ml, com relação 260/280nm de 0,8 e 0,7 para RNAs de amostras congeladas a -80°C e -20°C, respectivamente, extraídos com TRIZOL, e inválidas para RNAs extraídos com NucleoSpin®, provavelmente devido à alta diluição. Para se confirmar a integridade do RNA total extraído, amplificou-se um gene constitutivo de caprinos, o GAPDH, visualizado em gel de eletroforese a 1%, com 381pb. Houve produtos amplificados para as amostras extraídas com TRIZOL e apenas para amostra fresca, de intensidade fraca e com uma amplificação inespecífica, extraída com o NucleoSpin®. Para a detecção do vírus CAEV amplificou-se um gene estrutural GAG observado em gel 1% com 296pb (1o round) e principalmente de 187pb (2o round). Obteve-se, até o momento, produtos amplificados apenas para as amostra extraídas com o método do NucleoSpin®.

CONCLUSÕES

Quase todas as amostras demonstraram amplificação de gene constitutivo caprino GAPDH, mostrando que ambos os métodos foram capazes de extrair RNA total íntegro. Na detecção do vírus CAEV por amplificação do gene expresso GAG, verificou-se até agora sua positividade nas amostras de sangue extraídas pelo método NucleoSpin®, demonstrando que este kit é superior ao Trizol®, para as condições de armazenamento de amostra testadas. Contudo, devem-se realizar outros estudos.

REFERÊNCIAS

ANDRIOLI, A. Vírus da artrite encefalite caprina: PCR e isolamento em amostras de sêmen, fluido uterino e embriões. Belo Horizonte, MG: UFMG - Escola de Veterinária, 2001. 68p. Tese (Doutorado). BARLOUGH, J., EAST, N., ROWE, J.D.; VAN HOOSEAR, K.; DeROCK, E.; BIGORNIA, L.; RIMSTAD, 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. HARMACHE, A.; RUSSO, P.; GUIGUEN, F.; VITU, C.; VIGNONI, M.; BOUYIAC, M.; HIEBLOT, C.; PEPIN, M.; VIGNE, R.; SUZAN, M. Requirement of caprine arthritis encephalitis virus vif gene in vivo replication. *Virology*, v.224, p.246-255, 1996. SALTARELLI, M.; QUERAT, G.; KONINGS, D.A.M. VIGNE, R.; CLEMENTS, J.E. Nucleotide sequence and transcriptional analysis of molecular clones of AECV which generate infections virus. *Virology*, v. 179, p.347-364, 1990.