

Detecção de RNA genômico do vírus da artrite-encefalite caprina (CAEV) por amplificação do gene estrutural *gag* em amostras sanguíneas e de líquido sinovial após injúria tecidual  
Lucia Helena Sider<sup>1,\*</sup>, Ana Kamila Andrade Veras<sup>2,\*\*</sup>, Alessandro Nunes de Oliveira<sup>2,\*\*</sup>, Roberta Lomonte Lemos de Brito<sup>1</sup>, Alice Andrioli<sup>1</sup>, Ana Paula Ravazzolo<sup>3</sup>, Maria Fátima da Silva Teixeira<sup>4</sup>, Raymundo Rizaldo Pinheiro<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Embrapa Caprinos e Ovinos, Sobral, CE, <sup>2</sup>Universidade Estadual Vale do Acaraú, Sobral, CE;

<sup>3</sup>Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS; <sup>4</sup>Universidade Estadual do Ceará, Fortaleza, CE; Autor para contato: [sider@cnpc.embrapa.br](mailto:sider@cnpc.embrapa.br).

## Resumo

Palavras-Chave: diagnóstico molecular, retrovíruses animais, caprinos.

A artrite-encefalite caprina (CAE) é uma doença viral que acomete os caprinos provocando artrite, encefalite, mamite e pneumonia, acarretando perdas econômicas. A RT-nested PCR é uma técnica de diagnóstico molecular sensível e específica que foi aplicada em amostras sanguíneas e de líquido sinovial coletadas de animais infectados pelo CAEV e submetidos a uma injúria tecidual nas articulações carpo-metacárpicas uma semana antes da coleta. O RNA foi extraído das amostras, convertido a cDNA e então submetido a duas rodadas de amplificação com iniciadores externos e internos direcionados para o gene estrutural viral *gag*. Das 17 fêmeas analisadas, 12 apresentaram resultados positivos no sangue e 14 foram positivas (sendo 2 positivos fracos) no líquido sinovial. Estes resultados mostram que estas amostras podem ser utilizadas para o diagnóstico da CAE, não havendo diferenças estatísticas entre elas.

## Introdução

O vírus da artrite encefalite caprina (CAEV) é um lentivírus que acomete caprinos no mundo todo causando artrite, encefalite, mamite e pneumonia, diminuindo assim parâmetros produtivos e reprodutivos acarretando perdas econômicas (Zink, 1992). A transmissão se dá principalmente pela ingestão de colostro e leite infectados (East et al., 1993; Mselli-Laktal et al., 1999), mas também pode ser por meio de contato respiratório (East et al., 1993). O vírus da anemia infecciosa equina e os lentivírus de pequenos ruminantes (LVPR) replicam predominantemente em macrófagos, ao contrário do humano, símio e felino que se replicam tanto em macrófagos como linfócitos. Este tropismo diferenciado implica em diferentes manifestações clínicas da doença (Clements & Zink, 1996). Uma vez infectado, o animal se torna reservatório da doença (Dawson, 1989). Medidas epidemiológicas de controle e o exame periódico por imunodifusão em gel de ágar não são suficientes para o controle e erradicação da doença. Métodos de diagnóstico alternativos se fazem necessários. O RT-PCR é uma técnica que se mostra adequada por sua alta sensibilidade e especificidade. Além disso, ela permite a detecção do vírus em sua forma livre, antes mesmo da soroconversão. A sua variação RT-nested PCR tem uma sensibilidade ainda maior e é apropriada para a detecção do vírus em amostras clínicas onde a carga viral é baixa. O objetivo geral desse estudo foi o de desenvolver um método de diagnóstico molecular do vírus da artrite encefalite caprina baseada na técnica de RT-nested PCR a partir de amostras sanguíneas e de líquido sinovial de modo a contribuir para o controle e a erradicação da doença.

## Metodologia

A técnica de RT-nested PCR foi aplicada em amostras de sangue e líquido sinovial coletadas de 17 fêmeas caprinas infectadas pelo vírus da CAE (CAEV) provenientes do rebanho isolado da Embrapa Caprinos e Ovinos e consideradas positivas para a doença de acordo com o teste de imunodifusão em gel de ágar (IDGA). O sangue foi coletado por venipuntura da jugular e as células mononucleares foram separadas das demais. Uma semana antes da coleta do líquido sinovial, foi feita uma injúria tecidual bilateral das articulações carpo-metacárpicas pela introdução de uma agulha e raspagem do osso do local. O objetivo deste procedimento foi o de induzir uma resposta celular local com a migração de macrófagos e conseqüentemente replicação viral com aumento da carga viral no local. No momento da coleta, foi feita uma assepsia e em seguida as amostras de líquido sinovial foram coletadas bilateralmente com agulha e seringa. As amostras foram centrifugadas por 30 minutos a 4°C para sedimentação de células e vírus livres. O RNA foi então extraído das amostras pelo método NucleoSpin RNA II (Macherey-Nagel) e armazenado em freezer -80°C. A partir do RNA, foi sintetizado o DNA complementar (cDNA) com o kit Improm II<sup>TM</sup> Reverse Transcription System (Promega). O cDNA foi amplificado inicialmente com um par de iniciadores externos direcionados para o gene estrutural viral *gag* (Barlough et al., 1994), resultando na amplificação de um fragmento

de DNA de 296pb. O produto desta amplificação foi então submetido a uma nova rodada de amplificação com iniciadores internos direcionados para o mesmo gene (Andrioli, 2001), que resultou na amplificação de um fragmento de 187 pb. O cDNA e os produtos de amplificação foram armazenados em freezer  $-20^{\circ}\text{C}$ . Os produtos de cada amplificação foram submetidos a eletroforese em gel de agarose a 1%, visualizados sob luz ultravioleta em transiluminador e em seguida fotografados com equipamento fotodocumentador.

## Resultados e Discussão

O diagnóstico rápido da artrite-encefalite caprina é essencial para o controle e erradicação da doença. Por esta razão têm-se estimulado estudos visando disponibilizar métodos de diagnóstico molecular capazes de detectar a doença antes mesmo dos métodos sorológicos tradicionais, que só o fazem depois da soroconversão. A RT-nested PCR, além de ser um método sensível e específico permite a detecção do RNA genômico livre, ao passo que o nested PCR detectaria apenas o DNA proviral. O objetivo do presente trabalho foi apontar uma amostra adequada para a detecção do vírus. A escolha do sangue como material a ser analisado deu-se pela facilidade de coleta. A utilização do líquido sinovial deu-se pelo fato de que a grande maioria dos animais infectados apresentam quadros de artrite com conseqüente reação celular e presença de macrófagos.

A replicação dos LVPR in vivo ocorre principalmente nas células do sistema monocítico fagocitário, sendo os macrófagos a grande maioria das células infectadas (Concha-Bermejillo, 1997). O método de extração de RNA utilizado permite acesso ao RNA genômico internalizado nas células mononucleares bem como o RNA ainda livre nos fluidos corpóreos.

A ação dos fatores celulares dos LVPR, para sua replicação, pode ocorrer com os fatores *c-jun* e *c-fos*, presentes em macrófagos ativados, que se ligam às seqüências ativadoras AP (1 e 4) da LTR (Neuveut et al., 1993) ou, ainda, por outro fator celular induzido pelo interferon  $\gamma$ , secretado em resposta a infecção viral, que atua nas LTR extremidade 5' ativando a replicação (Tong-Starksen et al., 1996).

Dentre as dezessete fêmeas analisadas, doze (70,6%) apresentaram amplificação do gene estrutural viral *gag* em amostras de sangue, enquanto que quatorze (82,3%) foram positivas em amostras de líquido sinovial (duas destas foram resultados positivos fracos, Tab.1). Esta proporção ainda não pode ser considerada alta, visto que todos estes animais são IDGA-positivos. Isto pode ser resultado de uma carga viral mais baixa em alguns animais, mesmo naqueles onde foi feita a injúria tecidual, ou de diferentes fases de evolução da doença. Para testar a possibilidade, de que os resultados negativos fossem decorrentes de problemas no momento da extração de RNA, principalmente no que se diz respeito à degradação por ribonucleases, as amostras de sangue foram submetidas à RT-PCR direcionada para amplificação do gene caprino gliceraldeído fosfo-desidrogenase (GAPDH), utilizado com o intuito de acessar a expressão de um gene controle e, indiretamente, avaliar integridade do RNA eucariótico. Das dezessete amostras sanguíneas, doze amplificaram o gene GAPDH e cinco não apresentaram a banda correspondente. Como o gene GAPDH é constitutivamente expresso tanto em organismos procariontes e eucariontes, exceto vírus, é possível inferir que ou o RNA estava degradado ou, o que é mais provável, levando-se em conta que todos os procedimentos de inibição de ribonucleases foram feitos, que a celularidade das amostras era baixa. O que reforça ainda mais esta última hipótese é o fato de que três das amostras negativas para o GAPDH foram positivas para o gene viral *gag* (dados não mostrados). Por conseguinte, verificamos que a presença de RNA eucariótico não é um indicativo perfeito para indicar a presença de RNA viral, já que este pode estar presente na ausência do primeiro. Assim sendo, não foi feita a RT-PCR para o gene GAPDH nas amostras de líquido sinovial.

Observações feitas anteriormente no laboratório também indicam que algumas amostras são melhores que outras para a detecção do vírus por nested PCR. Os dados de RT-nested PCR comparando sangue e líquido sinovial indicam uma concordância de 76,5% e uma pequena vantagem numérica do último em relação ao primeiro quanto à positividade, diferença que no entanto não é estatisticamente significativa ( $P > 0,05$ ; teste Qui-quadrado). Em função do número de animais ainda ser pequeno, não foram calculadas a especificidade e a sensibilidade, a fim de não gerar resultados tendenciosos.

As análises foram feitas apenas nas fêmeas do rebanho isolado da Embrapa Caprinos e Ovinos. Faz-se necessário testar também os machos, inclusive no cenário da reprodução para verificar a transmissibilidade ou não do vírus por esta via. Trabalhos em andamento da equipe têm

buscado padronizar os métodos de nested PCR e RT-nested PCR para detectar o vírus da CAE em diferentes amostras clínicas e reprodutivas.

TABELA 1. Relação de animais testados com RT-nested PCR em amostras sangüíneas e de líquido sinovial.

Animal	Raça	Deteccão do gene <i>gag</i> no sangue	Deteccão do gene <i>gag</i> no líquido sinovial
0862	SAAN	+	+
1072	AGNB	-	+
1055	AGNB	+	+
0092	AGNB	-	+fr
0974	AGNB	+	+
0034	AGNB	-	-
1129	AGNB	-	+
1134	AGNB	+	+
0883	AGNB	+	+
1101	AGNB	-	+
0804	AGNB	-	-
0884	AGNB	+	+
1049	AGNB	+	+
0774	SAAN	+	+
0887	SAAN	+	-
0041	SAAN	+	+
0046	SAAN	+	+fr
0862	SAAN	+	+
Porcentagem de animais positivos		70,6%	82,3%

SAAN = Saanen, AGNB = Anglo-nubiana, +fr = positivo fraco

#### 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. et al. Double-nested polymerase chain reaction for detection of caprine arthritis-encephalitis virus proviral DNA in blood, milk, and tissues of infected goats. *J. Virol. Methods*, 50, 101-114, 1994.

Clements, J.E. e Zink, M.C. Molecular biology and pathogenesis of animal lentivirus infections. *Clinic. Microbiol. Rev.*, 9, 100-117, 1996.

Concha-Bermejillo, A. Maedi-visna and ovine progressive pneumonia. *Vet. Clin. North Am.: Food Anim. Pract.*, 13, 13-33, 1997.

Dawson, M. The caprine arthritis-encephalitis syndrome. *Vet. Annual*, 29, 98-102, 1989.

East, N.E. et al. Modes of transmission of caprine arthritis-encephalitis virus infection. *Small Rum. Res.* 10, 251-262, 1993.

Mselli-Lakhal, L. et al. Goat milk epithelial cells are highly permissive to CAEV infection in vitro. *Virology*, 259, 67-73, 1999.

Neuveut, C. et al. The visna transcriptional activator *tat*: effects on the viral LTR and on cellular genes. *Virology*, 197, 236-244, 1993.

Tong-Starksen, S.E. et al. Activation of caprine arthritis-encephalitis virus long terminal repeat by gamma interferon. *J. Virol.*, 70, 595-599, 1996.

Zink, M.C. The pathogenesis of lentiviral disease in sheep and goats. *Semin. Virol.*, 3, 147-155, 1992.