



## **PADRONIZAÇÃO DAS TÉCNICAS DE PROCESSAMENTO E EXTRAÇÃO DE RNA VIRAL DE AMOSTRAS DE LÍQUIDO SINOVIAL.**

Ana Kamila Andrade Veras(1) - Alexsandro Nunes de Oliveira(2) - Roberta Lomonte Lemos (3) - Samir Moura Kadri(4) - Ana Paula Ravazzolo(5) - Alice Andrioli(6) - Lucia Helena Sider(7) - Raymundo Rizaldo Pinheiro(8) -

1. Aluna de Biologia/UVA - Bolsista PIBIC/CNPq - 2. Aluno de Zootecnia/UVA - Bolsista Macroprograma/Embrapa - 3. Bolsista CNPq - 4. Aluno de Zootecnia/UNESP Botucatu - Bolsista CNPq - 5. Faculdade de Medicina Veterinária/UFRGS - 6. Pesquisadora da Embrapa Caprinos e Ovinos - 7. Pesquisadora da Embrapa Caprinos e Ovinos - 8. Pesquisador da Embrapa Caprinos e Ovinos -

### **PALAVRAS-CHAVE**

CAE, caprinos, RNA, RT-nested PCR, líquido sinovial.

### **APOIO**

CNPq, Macroprograma/Embrapa

### **INTRODUÇÃO**

A Artrite-Encefalite Caprina (CAE), causada por lentivírus de pequenos ruminantes, caracteriza-se por uma artrite degenerativa crônica envolvendo principalmente o carpo e o tarso (PERK, 1998). A leucoencefalomielite constitui a forma nervosa. Provavelmente, a estratégia de diagnóstico mais adequada deve ser uma combinação de métodos imunológicos e moleculares. A Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) e sua variação RT-PCR despontam como métodos complementares aos testes sorológicos em virtude da sua alta sensibilidade e especificidade. Além disso, eles permitem a detecção do vírus antes mesmo da soroconversão. O desenvolvimento de um método de diagnóstico do CAE baseado em RT-nested PCR (duas rodadas de amplificação), permitirá a detecção do vírus na sua forma livre (RNA) e em seu estágio inicial de infecção. O RNA é uma molécula instável e sujeita à degradação por RNases. O sucesso dos métodos baseados em RNA depende da boa padronização do processamento e extração de RNA das amostras.

### **OBJETIVOS**

1. Padronizar a coleta e processamento de amostras de líquido sinovial (LS) de fêmeas caprinas infectadas pelo vírus da artrite-encefalite caprina.
2. Padronizar a extração de RNA viral por meio de um método baseado em centrifugação em coluna de sílica.
3. Avaliar a integridade do RNA por meio da reação de RT-nested PCR

### **MATERIAL E MÉTODOS**

Uma semana antes da coleta de LS, foi feita uma injúria bilateral nas articulações carpo-metacárpicas pela introdução e raspagem do osso com agulha. O LS foi coletado das articulações, alíquotado em microtubo e centrifugado a 14.000 Xg, a 4°C por 30 minutos. Em seguida foi feita extração com o kit Nucleo Spin®RNA II (Macherey- Nagel), de acordo com as indicações do fabricante. A partir do RNA, foi sintetizado o DNA complementar (cDNA) com o kit Improm IITM 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 amplificação com iniciadores internos (Andrioli, 2001) resultando em 187 pb. Os produtos foram submetidos a eletroforese em gel de agarose a 1%, visualizados sob luz ultravioleta em transiluminador.

### **RESULTADOS E DISCUSSÃO**

Das 17 fêmeas analisadas (positivas para a CAE de acordo com o teste de imunodifusão em gel de agarose ? IDGA), 14 apresentaram também resultados positivos no RT-nested PCR. O índice de positividade relativamente alto encontrado no LS deve-se provavelmente ao procedimento de injúria tecidual realizado nas articulações carpo-metacárpicas uma semana antes da coleta. Este procedimento foi feito no sentido de induzir um aumento na carga viral local. Mesmo assim, a não positividade de algumas das amostras de LS pode ser devido a persistência da baixa carga viral local ou ainda a diferenças na fase da doença.

### **CONCLUSÕES**

1. O LS se mostrou uma amostra adequada para a detecção de RNA genômico do vírus da artrite-encefalite caprina.
2. A centrifugação refrigerada por 30 minutos das amostras de LS se mostrou adequada para a sedimentação e isolamento de células caprinas e RNA livre do vírus, não acarretando em degradação significativa do último por RNases.

### **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.
- PERK, K. Ungulate lentiviruses: Pathogenesis and relationship to AIDS. Advances in Veterinary Science & Comparative Medicine, v. 32, p. 97-127, 1998.