

On line

Processamento de sêmen para extração de RNA genômico do vírus da artrite-encefalite caprina e diagnóstico molecular por RT-nested PCR

¹Lucia Helena Sider

²Alexsandro Nunes de Oliveira

³Ana Kamila Andrade Veras

⁴Samir Moura Kadri

⁵Maurício Machaim Franco

⁶Raymundo Rizaldo Pinheiro

⁷Alice Andrioli

A Artrite-encefalite caprina (CAE) é uma lentivirose caracterizada como uma doença persistente e incurável, diretamente associada a perdas econômicas na cadeia produtiva (ANDRIOLI et al., 2006a). Suas principais manifestações clínicas são a artrite, pneumonia intersticial crônica, leucoencefalomielite desmielinizante e mastite endurecida crônica. Estas lesões ocorrem devido ao tropismo dos lentivírus de pequenos ruminantes (LVPR) por células do sistema mononuclear fagocitário presentes nestes órgãos, se replicando especialmente em macrófagos maduros. Sua expressão está intimamente ligada ao processo de diferenciação e maturação dos monócitos em macrófagos (NARAYAN et al., 1983; GENDELMAN et al., 1986; CLEMENTS; ZINK, 1996).

Em caprinos, a principal via de entrada do vírus no organismo é a digestiva, por meio da ingestão de leite e colostro de animais infectados (revisado por BLACKLAWS et al., 2004). O contato direto,

principalmente através de secreções, também é importante (EAST et al., 1993), especialmente em ovinos, que são acometidos por outra lentivirose semelhante, o maedi visna (ADAMS et al., 1983). A transmissão vertical também parece ocorrer (CUTLIP et al., 1981). Os LVPRs já foram encontrados no aparelho reprodutivo (ANDRIOLI, 2001; ANDRIOLI et al., 1999; 2002; FIENI et al., 2002; ALI AL AHMAD et al., 2005; 2008) e, recentemente, foi comprovada a transmissão através do sêmen (SOUZA, 2010).

Além dos métodos sorológicos de diagnóstico comumente empregados, o uso de técnicas moleculares sensíveis, como a reação em cadeia da polimerase (PCR) e suas variantes, promete ser válido, sobretudo para o diagnóstico precoce do vírus da artrite-encefalite caprina (CAEV). O RT-nested PCR permite a detecção da forma livre do vírus (RNA), antes mesmo da soroconversão. Dessa forma, pode ser adotada como medida precoce de

¹Méd. Vet., D.Sc., Embrapa Caprinos e Ovinos, Estrada Sobral Groaíras, km 4, Caixa Postal 145, CEP 62010-970 – Sobral, CE, Email: sider@cnpc.embrapa.br

²Mestrando, Zootecnia, Universidade Federal do Ceará

³Bolsista, Biologia, Universidade Estadual Vale do Acaraú

⁴Mestrando, Zootecnia, Universidade Estadual Paulista, Botucatu

⁵Méd. Vet., D.Sc., Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia

diagnóstico. Além disso, as técnicas moleculares permitem a avaliação da presença do vírus em amostras diversas, como naquelas provenientes dos tratamentos reprodutivos feminino e masculino, especialmente no sêmen. A importância da detecção do material genético do vírus no sêmen está diretamente associada ao controle da transmissão da doença, sobretudo por meio da inseminação artificial, em que apenas um ejaculado pode inseminar e, conseqüentemente, infectar várias fêmeas.

O RNA é uma molécula instável e sujeita à degradação por RNases. Uma vez convertido em uma molécula de cDNA, processo conhecido como transcrição reversa (RT), será amplificado pela PCR. Como a carga viral é geralmente baixa, apenas uma rodada de amplificação é insuficiente para que as bandas sejam visualizadas à eletroforese em géis de agarose. Assim, uma segunda rodada de amplificação, com iniciadores internos, é realizada, caracterizando a técnica de nested PCR. O sucesso dos métodos baseados na amplificação do RNA depende da boa padronização do processamento e extração de RNA das amostras.

O presente comunicado descreve os procedimentos necessários para a coleta e processamento de amostras de sêmen de caprinos infectados pelo CAEV para posterior extração do RNA viral por meio de um método baseado em centrifugação em coluna de sílica. A avaliação da presença de RNA no sêmen será feita, diretamente, por meio da reação de RT-nested PCR, potencial método de diagnóstico molecular da CAE.

Materiais Necessários

Reagentes

- Água morna
- β -mercapto etanol (bME, Sigma)
- Brometo de etídio (Sigma)
- Dietil pirocarbonato (DEPC)
- dNTP mix (Sigma)
- Etanol PA (Merck)
- Improm II™ Reverse Transcription System (Promega)
- NucleoSpin® RNA II (Macherey-Nagel)
- Oligonucleotídeos iniciadores customizados (IDT)
- RNase Away (Sigma)
- Solução fosfato tamponada (PBS) estéril
- Tampão TRIS-Borato EDTA (TBE) 5X
- Taq DNA Polymerase (Invitrogen)

Equipamentos e vidrarias

- Agitador de tubos de ensaio (vortex)
- Agitador magnético
- Autoclave
- Bailarinas magnéticas
- Balança analítica
- Balão volumétrico de 1000 mL
- Béquer de 1000 mL
- Forno de esterilização
- Frasco de vidro de 1000 mL autoclavável
- Garrafa térmica
- Microcentrifuga refrigerada
- Microtubos de 0,5 - 1,5 mL estéreis
- pHmetro
- Pipetas automáticas (10 μ L – 1000 μ L)
- Seringa de 10 mL
- Tubos plásticos de 15 mL (Falcon)
- Vagina artificial

Preparo de soluções

Água tratada com DEPC (0,5%)

Em um balão volumétrico de 1000 mL autoclavado e fornado a 180°C por 4 horas, adicionar 500 mL de DEPC e completar o volume para 1000 mL com água bidestilada e deionizada (MilliQ). Transferir o líquido para um béquer de 1000 mL autoclavado e fornado, mergulhar uma bailarina magnética e tampar com filme plástico, em seguida, fazer pequenos furos no filme plástico com o auxílio de uma tesoura. Deixar em agitação *overnight* em agitador magnético, dentro de uma capela de exaustão de gases. No dia seguinte, passar o líquido para um frasco de 1000 mL previamente autoclavado e fornado, e autoclavar novamente por 15 minutos. Estocar a 4°C.

Solução fosfato tamponada (PBS) estéril

Em um béquer de 1000 mL autoclavado e fornado, acrescentar 8 g de NaCl, 0,2 g de KCl, 1,44 g de Na_2HPO_4 e 0,24 g de KH_2PO_4 . Dissolver em cerca de 800 mL de água-DEPC e ajustar o pH para 7,4. Passar a solução para um balão volumétrico de 1000 mL autoclavado e fornado e completar o volume para 1000 mL. Transferir a solução para um frasco de 1000 mL autoclavado e autoclavar novamente. Estocar a 4°C.

Tampão Tris-Borato EDTA (TBE) 5X

Em um béquer de 100 mL, acrescentar 54 g de Tris base, 27,5 g de ácido bórico e 20 mL de EDTA 0,5 M (pH 8,0). Dissolver em cerca de 800 mL de água MilliQ, passar a solução para um balão volumétrico de 1000 mL e completar o volume para 1000 mL. Transferir a solução para um frasco de 1000 mL e estocar a 4°C.

Coleta de Sêmen

As amostras de sêmen fresco foram coletadas de machos natural e artificialmente infectados pelo CAEV, segundo avaliação prévia pelo teste de imunodifusão em gel de ágar (IDGA). Inicialmente, foi esquentada a água e colocada em uma garrafa térmica para evitar a perda de calor. A vagina artificial foi preenchida com a água, com o auxílio de uma seringa até adquirir uma pressão similar à vagina da cabra. Os bodes foram postos individualmente junto ao manequim e, após a monta, foi feita a coleta do ejaculado. As amostras foram armazenadas individualmente em tubos tipo falcon de 15 mL.

Protocolo de Processamento de Sêmen para Extração de RNA genômico viral:

O protocolo do fabricante do kit baseado em coluna (NucleoSpin® RNA II -Marcherey-Nagel) foi adaptado ao procedimento de extração de RNA do sêmen. As extrações de RNA seminal foram feitas a partir de 300 ou 500 mL de sêmen fresco. As amostras foram mantidas refrigeradas até serem transferidas para tubos de microcentrífuga de 1,5 mL, onde foi acrescentado PBS estéril até completar um volume de 1 mL. As amostras foram homogenizadas e centrifugadas a 11.000 g, a 4°C, por 10 minutos, a fim de sedimentar as células (espermatozóides e células mononucleares), bem como o vírus livre.

Em seguida, o sobrenadante foi descartado e aos péletes foi acrescentado 1 mL de PBS estéril. Após a homogenização, as amostras foram novamente centrifugadas a 11.000 g, a 4°C, por 10 minutos. Este procedimento de lavagem foi repetido até a obtenção de um pélete pequeno e transparente.

Finalmente, o pélete foi ressuscitado em 350 µL de tampão RA1 (fornecido no kit de extração) e 3,5 µL de β-mercapto etanol (βME). Este tampão constitui o primeiro passo do processo de extração descrito pelo manual do fabricante do kit baseado em coluna (NucleoSpin® RNA II -Marcherey-Nagel).

Antes de proceder a extração como sugerido pelo fabricante, o sêmen ressuscitado em Ra1 + βME foi incubado a 60°C por 30 minutos, sendo homogenizado a cada 10 minutos. Em seguida, o procedimento seguiu o protocolo sugerido pelo manual do fabricante.

É importante ressaltar que o tempo transcorrido entre as coletas e o processamento das amostras não ultrapassou algumas horas.

Síntese de cDNA (transcrição reversa, RT)

O DNA complementar (cDNA) foi, em seguida, sintetizado com o kit Improm II™ Reverse Transcription System segundo as instruções do fabricante.

Reação de nested PCR

Na amplificação do cDNA, todos os oligonucleotídeos iniciadores foram determinados a partir da região do gene estrutural gag da amostra padrão CAEV-Cork (SALTARELLI et al., 1990). O cDNA e amplificado inicialmente com um par de iniciadores externos (primers 1 - 5'-CAAGCAGCAGGAGGGAGAAGCTG-3' e 2 - 5'TCCTACCCCATTAATTTGATCCAC-3', descritos por Barlough et al. (1994), resultando na amplificação de um fragmento de DNA de 296pb. O produto desta amplificação e então re-amplificado com iniciadores internos (primers 3 - 5'-GTTCCAGCAACTGCAAACAGTAGCAATG-3' e 4 - 5'-ACCTTTCTGCTTCTTCATTTAATTTCCC - 3', descritos por Andrioli (2001), resultando em um fragmento de 187pb.

As condições de amplificação são realizadas segundo metodologia descrita por Barlough et al. (1994), com algumas modificações (ANDRIOLI et al., 2006b).

Eletroforese

Os produtos de amplificação das amostras e os controles positivos e negativos foram submetidos à eletroforese em gel de agarose a 1% em TBE e corados com bormeto de etídio, conforme Andrioli et al. (2006), visualizados sob luz ultravioleta em transiluminador e fotografados em fotodocumentador.

Agradecimentos

Os autores gostariam de agradecer ao Macroprograma 3 da Embrapa (03.07.09.039.00), pelo financiamento deste trabalho.

Referências

ADAMS, D. S.; KLEVJER-ANDERSON, P.; CARLSON, B. S.; McGUIRE, T. C. Transmission and control of caprine arthritis-encephalitis virus. **American Journal of Veterinary Research**, v. 44, p. 1670-1675, 1983.

ALI AL AHMAD, M. Z.; FIENI, F.; MARTIGNAT, L.; CHATAGNON, G.; BARIL, G.; BOUVIER, F.; CHEBLOUNE, Y. Proviral DNA of caprine arthritis encephalitis vírus (CAEV) is detected in cumulus oophorus cells but not in oocytes from naturally infected goats. **Theriogenology**, v. 64, p. 1656-1666, 2005.

ALI AL AHMAD, M. Z.; FIENI, F.; PELLERIN, J. L.; GUIGUEN, F.; CHEREL, Y.; CHATAGNON, G.; BOUZAR, A. B.; CHEBLOUNE, Y. Detection of viral genomes of caprine arthritis-encephalitis virus (CAEV) in semen and in genital tract tissues of male goat. **Theriogenology**, v. 69, p. 473-480, 2008.

ANDRIOLI, A. **Vírus da artrite encefalite caprina: PCR e isolamento em amostras de sêmen, fluido uterino e embriões.** 2001. 68 f. Tese (Doutorado em Ciência Animal) – Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte.

ANDRIOLI, A.; GOUVEIA, A.M.G; ANDRADE, J.S ; PINHEIRO, R.R.; YORINORI, E.H; SILVA, M.X .
Diagnostic of the caprine arthritis encephalitis virus in uterine fluid and embryos of goats by virus isolation in cell culture and PCR Nested. **Theriogenology**, v. 57, p. 567-567, 2002.

ANDRIOLI, A.; GOUVEIA, A. M. G.; MARTINS, A. S.; PINHEIRO, R. R.; SANTOS, D. O. Fatores de risco na transmissão do lentivírus caprino pelo sêmen. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, DF, v. 41, p. 1313-1319, 2006a.

ANDRIOLI, A.; GOUVEIA, A.M.G.; PINHEIRO, R. R.; ROCHA, M.A.; MARTINS, A.S.; SANTOS, D.O.
Detecção do DNA pro-viral do LVC em sêmen de bodes naturalmente infectados. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 23, n. 3, p. 420-421, 1999.

ANDRIOLI, A.; SOUZA, K. C. de; PINHEIRO, R. R.; SOUSA, F. M. L. Protocolos para extração do DNA-proviral e PCR do lentivirus caprinos em sangue. Sobral: Embrapa Caprinos, 2006b. 5 f. (Embrapa Caprinos. Comunicado Técnico, 72).

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.

BLACKLAWS, B. A.; BERRIATUA, E.; TORSTEINDOTTIR, S.; WATT, N. J.; DE ANDRES, D.; KLEIN, D.; HARKISS, G. D. Transmission of small ruminant lentiviruses. **Veterinary Microbiology**, v. 101, p. 199-208, 2004.

CLEMENTS, J. E.; ZINK, M. C. Molecular biology and pathogenesis of animal lentivirus infections. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 9, p. 100-117, 1996.

CUTLIP, R. C.; LEHMKUHL, H. D.; JACKSON, T. A. Intrauterine transmission of ovine progressive pneumonia virus. **American Journal of Veterinary Research**, v. 42, p. 1795-1797, 1981.

EAST, N. E.; ROWE, J. D.; DAHLBERG, J. E.; THEILEN, G. H.; PEDERSEN, N. C. Modes of transmission of caprine arthritis-encephalitis virus infection. **Small Ruminant Research**, v. 10, p. 251-262, 1993.

FIENI, F.; ROWE, J.; VAN HOOSEAR, K.; BURUCOA, C.; OPPENHEIM, S.; ANDERSON, G.; MURRAY, J.; BONDURAT, R. Presence of caprine arthritis-encephalitis virus (CAEV) infected cells in flushing media following oviductal-stage embryo collection. **Theriogenology**, v. 57, p. 931-940, 2002.

GENDELMAN, H. E.; NARAYAN, O.; KENNEDY-STOSKOPF, S.; KENNEDY, P. G. E.; GHOTBI, Z.; CLEMENTS, J. E.; STANLEY, J.; PEZESHKPOUR, G. Tropism of sheep lentivirus for monocytes: susceptibility to infection and virus gene expression increase during maturation of monocytes to macrophages. **Journal of Virology**, v. 1, n. 58, p. 67-74, 1986.

NARAYAN, O.; KENNEDY-STOSKOPF, S.; SHEFFER, D.; GRIFFIN, D.E.; CLEMENTS, J.E. Activation of caprine arthritis-encephalitis virus expression during maturation of monocytes to macrophages. **Infection and Immunity**, v. 41, n. 1, p. 67-73, 1983.

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

SOUZA, K. C. de. **Artrite-encefalite caprina: infecção experimental via inseminação artificial e acompanhamento clínico e sorológico.** 2010. 99 f. Dissertação (Mestrado em Zootecnia. Área de concentração: Reprodução de ruminantes) - Universidade Estadual Vale do Acaraú (UVA), Sobral.

Comunicado Técnico, 113 On line

Exemplares desta edição podem ser adquiridos na:
Embrapa Caprinos e Ovinos
Endereço: Estrada Sobral/Groaíras, Km 04 - Caixa Postal 145 - CEP: 62010-970 - Sobral-CE
Fone: (0xx88) 3112-7400
Fax: (0xx88) 3112-7455
Home page: www.cnpc.embrapa.br
SAC: http://www.cnpc.embrapa.br/sac.htm

Ministério da Agricultura,
Pecuária e Abastecimento



1ª edição
On line (Novembro/2010)

Comitê de publicações

Presidente: Marco Aurélio Deolmondes Bomfim
Secretário-Executivo: Alexandre César Silva Marinho
Membros: Carlos José Mendes Vasconcelos, Tânia Maria Chaves Campelo, Luciana Cristine Vasques Villela, Antônio César Rocha Cavalcante, Sérgio Cobel da Silva, Adriana Brandão Nascimento Machado, Manoel Everardo Pereira Mendes e Geny Rodrigues Cunha de Queiroz (suplente)

Expediente

Supervisão editorial: Alexandre César Silva Marinho.
Revisão de texto: Carlos José Mendes Vasconcelos.
Normalização bibliográfica: Tânia Maria Chaves Campelo.
Editoração eletrônica: Fábio Fernandes