



Avaliação de técnicas biomoleculares em amostras de sangue e ovócitos de fêmeas infectadas com vírus da Artrite Encefalite Caprina

Solange Damasceno Sousa(1) - Pedro Alberto Freitas da Silva(2) - Kelma Costa de Souza(3) - Ana Kamila Andrade Veras(4) - Tânia de Azevedo Lopes(5) - Alice Andiolli(6) -

1. Graduanda em Zootecnia / UVA / bolsista FUNCAP - 2. Graduando em Medicina Veterinária/ INTA / bolsista FUNCAP - 3. Zootecnista/ UVA - Doutoranda/ UECE - 4. Graduanda em Biologia / UVA / bolsista CNPq - 5. Bióloga / UVA / bolsista FUNCAP - 6. Pesquisadora da Embrapa Caprinos e Ovinos -

PALAVRAS-CHAVE

Vírus, Artrite Encefalite Caprina, PCR, RT-PCR, diagnóstico, ovócito, sangue

APOIO

EMBRAPA, FUNCAP, CNPQ

INTRODUÇÃO

O vírus da artrite encefalite caprina (CAEV) provoca uma enfermidade degenerativa, persistente e progressiva em caprinos, determinando importantes perdas econômicas. Dentre os principais sintomas da CAE estão artrite, mamite e mais esporadicamente pneumonia nos adultos enquanto que nos animais jovens provoca encefalomielite (CORK et al., 1974). Como vírus possui longo período de incubação a utilização de técnicas biomoleculares para o diagnóstico da CAE mostra-se uma importante ferramenta de prevenção. A reação em cadeia da polimerase (PCR) e a RT-PCR são métodos diretos de diagnóstico, sendo que a técnica de PCR permite a verificação do DNA proviral (integrado a célula do hospedeiro) e a RT-PCR, uma reação da transcriptase reversa seguida da PCR, detecta o RNA genômico do vírus, ou seja, na sua forma livre. Portanto, o desenvolvimento de métodos de diagnóstico pelo uso da biologia molecular vem auxiliar no controle de enfermidades víricas (RICARTE et al., 2008).

OBJETIVOS

Avaliar as técnicas de PCR e RT-PCR para detecção do DNA-Proviral e do vírus da Artrite Encefalite Caprina em amostras de sangue e ovócitos provenientes de cabras acometidas pela CAE.

MATERIAL E MÉTODOS

Foram coletadas amostras de sangue e ovócitos de 11 fêmeas caprinas Sem Raça Definida, infectadas pelo CAEV. O sangue foi centrifugado por 15min a 13000rpm, posteriormente os leucócitos foram isolados e o DNA extraído para realização da PCR. Os ovócitos foram tratados com Phosphate Buffered Saline e em seguida repassados juntamente com 50 (micro litros) deste meio para tubos eppendorfs. Então, adicionou-se 200 (micro litros) de tampão PCR e 2,5 (micro litros) de proteinase K para a extração de DNA. As amostras foram mantidas em banho maria à 56°C durante 1h e na sequência realizou-se a PCR segundo metodologia descrita por (ANDRIOLI et al., 2006). Na extração de RNA utilizou-se o Kit Nucleo Spin RNA II (Macherey-Nagel), usaram-se alíquotas de 40 (micro litros). O material foi centrifugado, acrescentou-se 350 (micro litros) de tampão RA1, 3,5 (micro litros) de beta-mercaptoetanol e passou-se o material no vortex. Em seguida foi prosseguido o protocolo sugerido pelo manual do fabricante do kit baseado em coluna. Posteriormente foi aplicada a RT-PCR.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

O teste de RT-nested PCR identificou o CAEV em amostras de ovócitos de sete das 11 fêmeas coletadas (53,84 porcentagem), enquanto a PCR nested identificou o DNA proviral em ovócitos de apenas uma cabra (9,09 porcentagem). Como a RT - nested PCR detecta o RNA genômico do vírus (forma livre) e a PCR nested revela o DNA proviral, material encontrado quando o CAEV infecta a célula do hospedeiro, inferimos que o CAEV se encontrava, provavelmente, aderido à zona pelúcida dos ovócitos. Já no sangue o vírus se encontra, principalmente infectando os monócitos, sendo que a PCR foi positiva em 53,84 porcentagem dos animais.

CONCLUSÕES

O CAEV provavelmente não infecta os ovócitos com zona pelúcida íntegra, pois a maioria destes foi positiva na RT-PCR e apenas um à PCR, o qual poderia estar com a zona pelúcida rompida. Já no sangue o CAEV seria encontrado, principalmente na forma integrada às células.

REFERÊNCIAS

ANDRIOLI, A.; GOUVEIA, A. M. G.; MARTINS, A. S. et al.. Fatores de risco na transmissão do lentivirus caprino pelo sêmen. Pesquisa Agropecuária Brasileira, v. 41, p. 1313-1319, 2006
CORK, L. C.; HADLON, W. J.; CRAWFORD, T. B. Infectious leucoencephalomyelitis of young goats. Journal of Infectious Diseases, v.129, n.2, p.134-141, 1974.
RICARTE A. R. F., ARAÚJO S. A. C., DANTAS T. V. M., COSTA E. C., SILVA J. B. A., TEIXEIRA M. F. S. Possibilidades de aplicação de biotecnologias reprodutivas em animais de produção acometidos por agentes víricos, Rev Bras Reprod Anim, Belo Horizonte, v.32, n.1, p.3-8, jan./mar. 2008.