

Comunicado 117

Técnico

ISSN 1676-7675
Sobral, Ce
Outubro, 2010

On line

Processamento de amostras provenientes do trato reprodutivo feminino para extração de RNA genômico do vírus da artrite-encefalite caprina e diagnóstico molecular por RT- nested PCR Metodologia Científica

Lucia Helena Sider¹
Ana Kamila Andrade Veras²
Kelma Costa de Souza³
Eduardo Luis de Oliveira⁴
Roberta Lomonte Lemos de Brito⁵
Vicente de Paula Fernandes Neto⁶
Raymundo Rizaldo Pinheiro¹
Alice Andrioli¹

Entre as retrovíroses de importância na medicina veterinária, encontra-se a artrite-encefalite caprina (CAE). O agente causador da doença faz parte da família dos lentivírus, em especial, dos lentivírus de pequenos ruminantes (LVPR), juntamente com o vírus maedi-visna, que afeta ovinos. A CAE é uma doença persistente, incurável e 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 endurativa crônica. Os LVPR infectam preferencialmente as células do sistema monócito-fagocitário, especialmente macrófagos maduros (NARAYAN et al., 1983; GENDELMAN et al., 1986; CLEMENTS; ZINK, 1996).

Em caprinos, a principal porta de entrada do vírus é a via digestiva, por meio da ingestão de leite e colostro de animais infectados, conforme revisão de Blacklaws et al. (2004). Além da via digestiva, o contato direto, principalmente através de secreções, também deve ser considerado (EAST et al., 1993), especialmente em ovinos, em que uma das principais manifestações clínicas da doença provocada pelo maedi-visna vírus é a pneumonia (ADAMS et al., 1983). A transmissão vertical, de mãe para filho, também parece ocorrer (CUTLIP et al., 1981). Há relatos da detecção dos LVPR 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). A

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

2Bolsista, Biologia, Universidade Estadual Vale do Acaraú

3M.Sc., Bolsista, CNPq.

4Méd. Vet., M.Sc., Embrapa Caprinos e Ovinos

5Méd. Vet., M.Sc., doutoranda em Medicina Veterinária, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal

6Méd. Vet., mestrando em Ciência Animal, Universidade Federal do Piauí

detecção do vírus em amostras provenientes ou recuperadas do trato reprodutivo feminino, tais como fluido uterino, líquido folicular, folículos ovarianos, ovócitos e embriões, é importante para determinar os riscos de transmissão do vírus da CAE (CAEV) de mãe para filho.

Técnicas moleculares sensíveis, como a reação em cadeia da polimerase (PCR) e suas variantes são ferramentas eficientes para determinar a presença do vírus, ou melhor, do seu material genético, em amostras de diferentes naturezas. Além disso, potencialmente permitem o diagnóstico precoce da doença, enquanto que os métodos sorológicos só o fazem após a soroconversão.

O genoma do CAEV é constituído por RNA que, uma vez introduzido na célula, é integrado ao genoma do hospedeiro na forma de DNA proviral. A nested PCR precedida pela transcrição reversa (RT-nested PCR) é uma técnica que permite a amplificação e detecção do RNA genômico livre. O RNA é uma molécula instável e sujeita à degradação por RNases. Uma vez extraído e convertido a uma molécula de cDNA, processo conhecido como transcrição reversa (RT), está pronto para ser amplificado pela PCR. Como a carga viral é geralmente baixa, uma rodada de amplificação é insuficiente para que as bandas sejam visualizadas após eletroforese em géis de agarose. Assim, uma segunda rodada de amplificação, com iniciadores internos é feita, caracterizando a técnica de nested PCR. O sucesso dos métodos baseados na amplificação de RNA depende da boa padronização do processamento e extração de RNA das amostras.

Este trabalho descreve os procedimentos necessários para a coleta e processamento de amostras provenientes ou recuperadas do trato reprodutivo feminino de cabras infectadas pelo CAEV para posterior extração do RNA viral por meio de um método baseado em centrifugação em coluna de sílica. A avaliação da presença do RNA nestas amostras é feita diretamente por meio da reação de RT-nested PCR, potencial método de diagnóstico molecular da CAE.

Materiais Necessários

Medicamentos

- Anestésico Ketamina
- Anestésico Xilazina
- Antibiótico Gentamicina
- Hormônio folículo estimulante suíno (FSH-p)
- Hormônio Cloprostenol – Prostaglandina sintética
- Hormônio – Esponjas intravaginais para caprinos e ovinos com acetato de medroxiprogesterona (MAP), 60 mg e azul de metileno

- Hormônio luteinizante (LH) 25 mg
- Hormônio Crestar
- Hormônio HCG Vetcor
- Medicamento Dipirona injetável para ruminantes

Reagentes

- β-mercapto etanol
- Brometo de etídio
- Diethyl 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
- Solução fosfato tamponada esteril
- Solução balanceada de Hanks
- Soro fetal bovino (BSA)
- Tampão Tris-Borato-EDTA (TBE) 5X
- Taq DNA Polymerase (Invitrogen)
- Tripsina

Equipamentos e vidrarias

- Agitador de tubos de ensaio (vórtex)
- Agitador magnético
- Autoclave
- Bailarinas magnéticas
- Balança analítica
- Balão volumétrico de 1000 mL
- Béquer de 1000 mL
- Cama de contenção (decúbito dorsal)
- Catéter
- Filtro coletor
- Forno de esterilização
- Frasco de vidro de 1000 mL autoclavável
- Material cirúrgico esterilizado (tesouras, pinças anatômicas e hemostáticas, bistur, agulhas e fios de sutura)
- Microcentrífuga refrigerada
- Microtubos de 0,5 - 1,5 mL estéreis
- pHmetro
- Pipetas automáticas (10 µL – 1000 µL)
- Seringa de 10 mL
- Sondas Foley nº 8 e 12
- Trocáter de 4 mm
- 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 µL 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, tampar com filme

plástico com pequenos furos 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 Na₂HPO₄ e 0,24 g de KH₂PO₄. 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 1000 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.

Sincronização do estro e superovulação

O estro foi sincronizado utilizando-se esponjas intravaginais, por 11 dias, iniciando-se o tratamento superovulatório 48 horas antes do final do tratamento com progestágeno. A superovulação foi induzida com o hormônio folículo estimulante FSH (200mg), fracionada em oito doses e decrescentes, intervaladas em 12 horas. Ao mesmo tempo da primeira aplicação do FSH, foi administrado 50 g de cloprostenol.

A partir de 12 horas da retirada das esponjas até o final do estro, as fêmeas foram observadas quanto à manifestação de estro, duas vezes ao dia, no início da manhã e no final da tarde. A fêmea, uma vez em estro, foi fertilizada pelo reprodutor e a cobertura repetida após 12 horas.

Coleta de embriões

A coleta de embriões foi feita entre o quinto e o sétimo dia do ciclo estral (dia do estro = dia 0) devido à possibilidade de se obter embriões em estágio de morula compacta a blastocisto. A coleta foi realizada por laparotomia com o animal em decúbito dorsal sob anestesia (cloridrato de xilazina e quetamina) e incisão na linha média cranialmente ao úbere. Após observação do número de ovulações, um dos cornos uterinos foi perfurado próximo à bifurcação do útero, com um trocáter fino (4mm). Por esta perfuração, foi introduzida uma sonda Foley (no

8) e inflado com ar o balão desta, para a sua sustentação e para evitar a perda de líquido de lavagem contendo os embriões para o corpo do útero. O líquido de lavagem para colheita de embriões (PBS com soro fetal bovino a 1%, a 37° C) foi injetado lentamente através de um catéter no corno uterino próximo à junção útero tubárica e recolhido por meio da sonda Foley num filtro coletor acoplado a esta. Usou-se de 80 a 100 mL de meio de lavagem por corno uterino, divididos em várias lavagens, tomando-se o cuidado para não distender excessivamente o endométrio.

Lavagem e avaliação dos embriões recuperados

Sob estereomicroscópio, os embriões foram recuperados do meio de lavagem, para uma solução de PBS acrescida de 2,0% de soro fetal bovino. Os embriões viáveis e com zona pelúcida íntegra foram lavados conforme recomendação da *Sociedade Internacional de Transferência de Embriões (IETS)*. A lavagem consiste na passagem dos embriões por cinco banhos em PBS acrescido de 50 g/mL de gentamicina e 0,4% de albumina sérica bovina (BSA) e depois, dois banhos de tripsina a 0,25%, em uma solução balanceada de Hanks, sem cálcio e magnésio (pH 7,6 a 7,8) por 60 a 90 segundos. Após o tratamento com tripsina, os embriões foram passados por cinco banhos em PBS, contendo 2,0% de soro fetal bovino e, por fim, em uma solução de PBS-BSA a 0,4% e antibiótico. O processo possibilita a remoção de microrganismos presentes no meio de colheita ou aderidos ao embrião. Após as lavagens, os embriões foram avaliados e selecionados.

Protocolo de processamento de amostras para extração de RNA genômico viral

As amostras líquidas (fluido uterino e líquido folicular) foram alíquotadas (1000 mL) em tubos de microcentrífuga de 1,5 mL estéreis. Em seguida foram centrifugadas a 12000 g a 4°C por 30 minutos, a fim de sedimentar as partículas virais ou eventuais células. O sobrenadante foi descartado tomando-se o cuidado de deixar cerca de 40 µL do fluido que, em seguida, foi extraído com o kit NucleoSpin® RNA II (Marcherey-Nagel), segundo as instruções do fabricante.

Os folículos ovarianos, ovócitos e embriões foram visualizados, identificados e capturados dos respectivos fluidos sob estereomicroscópio. O volume total das amostras contendo os folículos ovarianos, ovócitos e embriões lavados ou não lavados não ultrapassou 40 µL e, em seguida, essas amostras foram submetidas à extração de RNA com o kit NucleoSpin® RNA II (Marcherey-Nagel), segundo as instruções do fabricante.

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 sintetizado com o kit Improm IITM 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 é 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 é, então, reamplificado 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 positivo e negativo foram submetidos à eletroforese em gel de agarose a 1% em TBE e corados com brometo de etídio, conforme Andrioli et al. (2006b), 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 virus (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) - Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte.
- ANDRIOLI, A.; GOUVEIA, A. M. G.; ANDRADE, J. S.; PINHEIRO, R. R.; YORINORI, E. H.; SILVA, X. M. 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, n.1, p. 467, 2002. Proceedings do Conference of the International Embryo Transfer Society.
- 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, v. 41, n. 8, p. 1313-1319, ago., 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.; PINHEIRO, R. R.; SOUSA, F. M. L. **Protocolos para extração do DNA-proviral e PCR do lentivirus caprinos em sangue**. Sobral: Embrapa Caprinos e Ovinos, 2006b. 5p. (Embrapa Caprinos e Ovinos. 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. **Artrite Encefalite Caprina: Infecção experimental via inseminação artificial e acompanhamento clínico e sorológico**. 2010. 100 f. Dissertação (Mestrado em Zootecnia) - Universidade Estadual Vale do Acaraú, Sobral, CE.

Comunicado Técnico, 117 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 (Outubro/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