



PADRONIZAÇÃO DAS TÉCNICAS DE PROCESSAMENTO E EXTRAÇÃO DE RNA VIRAL DE AMOSTRAS DE SÊMEN CAPRINO

Alexsandro Nunes de Oliveira(1) - Ana Kamila Andrade Veras(2) - Samir Moura Kadri(3) - Maurício Machaim Franco(4) - Raymundo Rízaldo Pinheiro(5) - Alice Andrioli Pinheiro(6) - Lucia Helena Sider(7) -

1. Aluno de Zootecnia/UVA - Bolsista Macroprograma/Embrapa - 2. Aluna de Biologia/UVA - Bolsista PIBIC/CNPq - 3. Aluno de Zootecnia/UNESP Botucatu - Bolsista CNPq - 4. Pesquisador da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia - 5. Pesquisador da Embrapa Caprinos e Ovinos - 6. Pesquisadora da Embrapa Caprinos e Ovinos - 7. Pesquisadora da Embrapa Caprinos e Ovinos -

PALAVRAS-CHAVE

CAEV, caprinos, RNA, RT-nested PCR, sêmen

APOIO

Macroprograma/Embrapa, CNPq

INTRODUÇÃO

A Artrite Encefalite Caprina (CAE) é uma doença persistente, incurável, que está diretamente associada a perdas econômicas na cadeia produtiva (ANDRIOLI et al., 2006). A principal via de entrada do Vírus da Artrite Encefalite Caprina (CAEV) no organismo dos animais é através da ingestão de colostro e leite de fêmeas infectadas. Porém acredita-se que outras rotas de infecção possam estar envolvidas na transmissão da CAE, como por exemplo o sêmen (ANDRIOLI, 2001). Além das técnicas sorológicas, faz-se necessário o uso de técnicas moleculares sensíveis para o diagnóstico do CAEV. O RT- nested PCR permite a detecção da forma livre do vírus (RNA), antes mesmo da soroconversão. Desta forma, pode ser adotada como medida precoce de diagnóstico. 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 sêmen de caprinos infectados 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

As amostras de sêmen fresco foram coletadas de machos natural e artificialmente infectados pelo CAEV (IDGA-positivos). O protocolo do fabricante (NucleoSpin® RNA II -Marcherey-Nagel) foi adaptado ao procedimento de extração de RNA do sêmen. As amostras de sêmen foram lavadas com PBS estéril e incubadas por 30 minutos a 60°C na solução inicial proposta pelo fabricante. Em seguida, o procedimento seguiu o protocolo mencionado. Logo após, 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 re-amplificado com iniciadores internos (Andrioli, 2001) resultando em fragmento de 187pb. Os produtos foram submetidos a eletroforese em gel de agarose a 1%, visualizados sob luz ultravioleta em transiluminador.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

As extrações de RNA seminal foram feitas a partir de 300 ou 500 microlitros de sêmen fresco. Resultados preliminares mostraram que não houve diferença significativa no índice de positividade entre elas. No entanto, partindo-se de 300 microlitros de sêmen, a extração foi mais fácil, pois uma maior quantidade de filtrado foi recuperado após a primeira centrifugação. Isto ocorreu devido a menor viscosidade da amostra de 300 microlitros em relação à de 500 microlitros, resultante de uma maior proporção reagente/sêmen. Apesar de detectável em algumas amostras, nem todas foram positivas para o CAEV. Isto pode ser devido à baixa carga viral local, mas também a problemas técnicos. O protocolo de processamento ainda deve ser aperfeiçoado.

CONCLUSÕES

1. O sêmen se mostrou uma amostra adequada para a detecção de RNA genômico do vírus da artrite-encefalite caprina.
2. As sucessivas lavagens com PBS estéril foram eficientes para a retirada do fluido seminal do restante dos componentes celulares.
3. A incubação do sêmen fresco a 60°C por 30 minutos, após a homogenização em solução denaturante, foi eficiente para a dissolução protéica e inibição de RNases, sendo adequada para iniciar o protocolo de extração de RNA viral de amostras de sêmen.

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).

ANDROLI, A. et al. Fatores de risco na transmissão do lentivírus caprino pelo sêmen. Pesquisa Agropecuária Brasileira, v. 41, p. 1313-1319, 2006.

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.