

EXTRAÇÃO DE DNA DE GÂNGLIO TRIGÊMEO DE BÚFALOS PARA DETECÇÃO DO HERPESVÍRUS BOVINO TIPO 1

MÁRCIA HELENA JORGENS PRADO¹; PAULO QUADROS; DAIANA MACIEL MEDEIROS; MARCELO DE LIMA; GILBERTO D'AVILA VARGAS; GEFERSON FISCHER²

¹ Universidade Federal de Pelotas - marcia.h.jorgens@gmail.com

² Universidade Federal de Pelotas - geferson.fischer@gmail.com

1. INTRODUÇÃO

Estudos sobre metodologias específicas que possam otimizar extrações de DNA são de grande importância para que regiões alvos sejam amplificadas, e assim garantir sucesso em trabalhos científicos no campo da biologia molecular (SOLLÉRO et al., 2004). A obtenção de DNA de boa qualidade é essencial para se obter bons resultados em experimentos, especialmente no uso da Reação em Cadeia da Polimerase (PCR), nas quais os excessos de estruturas celulares e proteínas podem inibir o processo de amplificação (SAIKI, 1990; HOY, 1994).

O Herpesvírus Bovino Tipo 1 (BoHV-1) pertence a família *Herpesviridae*, subfamília *Alphaherpesvirinae*, e gênero *Varicellovirus*. Esse vírus é responsável por causar doença respiratória e aborto, além de promover doença genital como vulvovaginite e balanopostite pustular infecciosa, o que gera grandes prejuízos econômicos na bovinocultura. Infecções por Herpesvírus podem ser transmitidas pelo contato direto e indireto entre animais, porque o vírus é disseminado através de secreções respiratórias, oculares e genitais, sendo excretado em grandes quantidades por animais durante a infecção aguda (FLORES et al., 2007). A ampla disseminação destes agentes está relacionada diretamente com o mecanismo de latência, uma forma de infecção na qual o vírus persiste no organismo do animal de forma silenciosa. A latência desses vírus ocorre em neurônios dos gânglios que inervam a região associada a primo-infecção, como os gânglios trigêmeo e o sacral (MEYER et al., 2001.; PEREZ et al., 2002).

O BoHV-1 está amplamente distribuído em rebanhos bovinos de praticamente todo o mundo, tendo o Brasil uma prevalência alta nessa espécie (WYLER et al., 1989). Bovinos são os principais reservatórios de BoHV-1, entretanto outras espécies de ruminantes, como os bubalinos, vem sendo estudadas como possíveis reservatórios em potencial para o vírus (MOLLEMA et al., 2005; SIX et al., 2001). Em um estudo realizado por Scicluna et al. (2010), ficou comprovada a presença de partículas virais ativas em fezes de búfalos positivos para BoHV-1, o que pode representar uma fonte de contaminação ambiental para o Herpesvírus.

Dessa forma, o presente trabalho teve como objetivo avaliar a eficiência de um protocolo baseado na extração de DNA com Fenol descrito por Sambrook et al. (1989) com modificações, para a detecção de DNA viral de BoHV-1 em gânglios trigêmeos de búfalos provenientes da região sul do Rio Grande do Sul.

2. METODOLOGIA

Foram coletados gânglios trigêmeos de búfalos em um frigorífico localizado no município de Pelotas, e posteriormente encaminhados ao Laboratório de Virologia e Imunologia Animal da Faculdade de Veterinária da UFPel. Inicialmente, foi feita a fragmentação dos gânglios em placas de Petry estéreis com lâmina de bisturi. Para cada amostra coletada foi preparada em microtubos de 1,5 mL uma solução de lise contendo 800 µL de TE⁵N 2X pH 7,4 (10mM de Tris-Cl, pH 7,4; 5x1mM de EDTA, pH 8,0; 150mM de NaCl), 80 µL de Dodecil Sulfato de Sódio (SDS) 10% e 6 µL de proteinase K. Logo após, foram mantidas durante 2h a 56 °C.

Posteriormente, as amostras foram centrifugadas por 10 minutos a 13.000 RPM, e 400 µL do sobrenadante foram coletados para novos microtubos, e adicionado 40 µL de NaCl 5M e 300 µL de Fenol. A uma temperatura de 37 °C as amostras foram agitadas durante 30 minutos, e logo após centrifugadas por 10 minutos a 13.000 RPM. Aproximadamente 400 µL do sobrenadante contendo a fase aquosa foram coletados, e então adicionados 800 µL de álcool absoluto (92,8° INPM) em cada amostra para a precipitação do DNA.

As amostras contendo álcool absoluto foram mantidas a uma temperatura de -20°C por 30 minutos, com posterior centrifugação por 10 minutos a 13.000 RPM para a formação do *pellet*. Após este tempo, o álcool foi desprezado dos tubos, e foram adicionados 100 µL de TEN 1X, e 10 µL da enzima RNase. Em seguida, as amostras foram levadas para o banho-maria a 37°C por 30 minutos, e após armazenada a uma temperatura de -20°C.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

O protocolo utilizado para extração da DNA foi realizado em diferentes etapas. A primeira delas consistiu na ruptura química e enzimática da membrana celular, extração com Fenol, precipitação do DNA e reidratação. Muitos protocolos disponíveis são utilizados pela sua rapidez ou até mesmo pelo seu custo, porém em alguns o padrão de bandas não é nítido, apresentando impurezas que prejudicam a visualização em gel de agarose. Deve-se lembrar, que a forma de coleta e a conservação do material são de grande importância para a obtenção do DNA em concentrações e qualidades adequadas (SOLLÉRO et al., 2004).

O protocolo utilizado baseado na extração de DNA com Fenol é rápido, de baixo custo e de fácil exequibilidade, podendo-se obter um DNA de boa qualidade, gerando produtos com tamanho molecular esperado e de forte intensidade. Para monitorar o processo de extração, inicialmente as amostras foram testadas por PCR utilizando primers desenhados para amplificar um fragmento de 358 pb da região *D-loop* do DNA mitocondrial bubalino, e posteriormente analisadas por eletroforese em gel de agarose 1,5% (Figura 1). A seguir, as amostras de gânglios trigêmeos as quais foram submetidas ao protocolo de extração foram testadas quanto à presença de DNA viral do BoHV-1, através de uma *Semi-Nested-PCR* (SN-PCR) para amplificação de um segmento do gene que codifica para a glicoproteína D (gD) do envelope do BoHV-1. O produto final gerado foi de 425 pb (Figura 2).

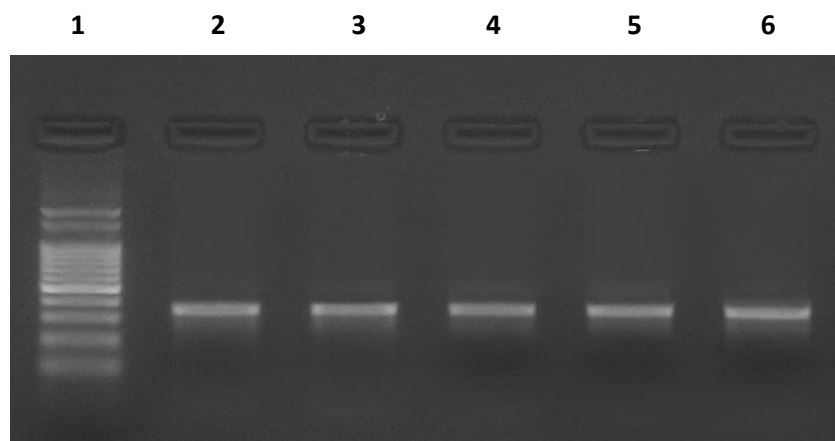


Figura 1: Gel de agarose a 1,5% evidenciando a amplificação de um fragmento de 358 pb do DNA mitocondrial bubalino (canaletas 2 a 6). Caneleta 1: Marcador de tamanho molecular 100 pb.

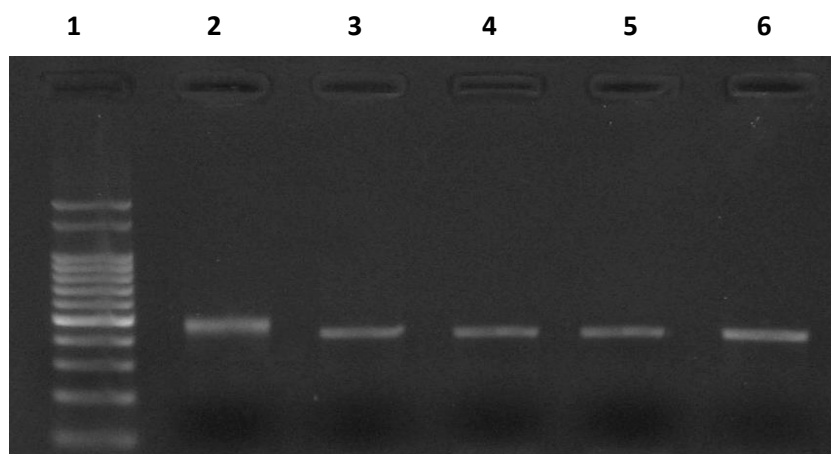


Figura 2: Gel de agarose a 1,5% evidenciando a amplificação do produto final da *Semi-nested-PCR* de 425 pb (canaletas 2 a 6). Caneleta 1: Marcador de tamanho molecular 100 pb.

4. CONCLUSÕES

A partir dos resultados obtidos, o método de extração de DNA utilizado foi considerado satisfatório quanto à facilidade de uso, rapidez na extração e qualidade do DNA obtido para a amplificação através da Reação em Cadeia da Polimerase, mostrando que o procedimento é perfeitamente aplicável tanto para obtenção de DNA total como para a detecção de DNA viral em tecidos.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

FLORES, E.F. **Virologia Veterinária**. Santa Maria: editora UFSM, 2007.

HOY, M. A. DNA amplification by the Polymerase Chain Reaction: molecular biology made accessible. In: *Insect molecular genetics: an introduction principles and applications*. San Diego: Academic Press, 1994. p.203-244.

MEYER, G.; LEMAIRE, M.; ROS, C.; BELAK, K.; GABRIEL, A.; CASSART, D.; COIGNOUL, F.; BELAK, S.; THIRY, E. Comparative pathogenesis of acute and latent infections of calves with bovine herpesvirus types 1 and 5. **Archives of Virology** 146, p.633–635, 2001.

MOLLEMA, L.; RIJSEWIJK, F.A.; NODELIJK, G.; DE JONG, M.C. Quantification of the transmission of bovine herpesvirus 1 among red deer (*Cervus elaphus*) under experimental conditions. **Vet Microbiol**, v.111, p.25-34, 2005.

PEREZ, S.E.; BRETSCHEIDER, G.; LEUNDA, M.R.; OSORIO, E.A.; FLORES, E.F.; ODEON, A.C. Primary infection, latency, and reactivation of bovine herpesvirus type 5 in the bovine nervous system. **Veterinary Pathology** 39, p.437–444, 2002.

SAIKI, R. K.; SCHARF, S.; FALOONA, F. A. et al. Enzymatic amplification of β globin sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anaemia. *Science*, v. 230, n. 4732, p. 1350-1354, 1985.

SAMBROOK, J.; FRITSCH, E.F.; MANIATIS, T. **Molecular Cloning. A Laboratory Manual**. 2nd ed. Cold Spring Harbor: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989.

SIX, A.; BANKS, M.; ENGELS, M.; BASCUNA, C.R.; ACKERMANN, M. Latency and reactivation of bovine herpesvirus 1 (BHV-1) in goats and of caprine herpesvirus 1 (CapHV-1) in calves. **Arch Virol**, v.146, p.1325-1335, 2001.

SOLLERO, B. P.; FARIA, D. A.; PAIVA, S. R.; GUIMARÃES, S. E. F.; LOPES, P. S.; PAIXÃO, D. M. Método rápido de extração de DNA utilizando CTAB em tecidos musculares de suínos. In: CONGRESSO INTERNACIONAL DE ZOOTECNIA, 6., CONGRESSO NACIONAL DE ZOOTECNIA, 13., 2004. Brasília. Anais... Brasília: SBZ, 2004. CD-ROM

WYLER, R.; ENGELS, M.; SCHWYZER, M. Infectious bovine rhinotracheitis/vulvovaginitis (BHV1). In: WITTMANN, G. (Ed.). **Herpesvirus diseases of cattle, horses, and pigs**. Boston/Dordrecht/London: Kluwer Academic Publishers, 1989. p. 1-72.