

X ENCONTRO DE PÓS-GRADUAÇÃO E PESQUISA

USO DA CULTURA DE CÉLULAS DO PLEXO COROIDE CAPRINO NA PRODUÇÃO DE ANTÍGENO DE LENTIVÍRUS DE PEQUENOS RUMINANTES

Juscilânia Furtado Araújo¹, Dalva Alana Aragão de Azevedo², Ana Lúcia Madeira de Sousa³,
Edgar Marques Damasceno⁴, Raimundo Rizaldo Pinheiro⁵

¹Estudante do Curso de Mestrado em Zootecnia, na Universidade Estadual Vale do Acaraú – UVA, E-mail: laninha.araujo@hotmail.com. ²Estudante do Curso de Doutorado em Ciência Veterinária, na Universidade Estadual do Ceará – UECE. ³Estudante do Curso de Mestrado em Zootecnia, na Universidade Estadual Vale do Acaraú – UVA. ⁴Estudante de Graduação em Medicina Veterinária, nas faculdades INTA, bolsista PIBIC/CNPQ. ⁵Orientador, Docente no curso de Zootecnia, na Universidade Estadual Vale do Acaraú - UVA/pesquisador da EMBRAPA Caprinos e Ovinos, E-mail: Rizaldo.pinheiro@embrapa.br

RESUMO

Os Lentivírus de Pequenos Ruminantes (LVPR) têm tropismo por células da linhagem monocítica-fagocitária e são caracterizados pela infecção persistente no animal, o qual não consegue desenvolver resposta imune curativa. O Plexo Coroide Caprino (PCC) sofre naturalmente infecção no organismo do animal, por estes vírus, diante disto objetivou-se avaliar se células do PCC são efetivas para o cultivo do vírus e se possuem bom crescimento em cultura visando à produção de antígeno. Sendo assim, realizou-se *explant* de células do PCC de um animal negativo para LVPR. Essas células foram sub-cultivadas por tripsinização e então inoculadas com a cepa padrão CAEV Cork. Os sobrenadantes foram coletados, clarificados por centrifugação a 2.800 rpm, concentrados em sistema AMICON®, sendo realizado o teste de Imunodifusão em Gel de Agarose (IDGA) do antígeno produzido. As células do PCC apresentaram bom crescimento celular em cultivo, foram permissíveis ao CAEV, visto que houve replicação viral, apresentando efeito citopático. Com isso pode-se produzir antígeno, que testado no IDGA apresentou uma visível linha de precipitação antígeno-anticorpo

Palavras-Chave: Antígeno; LVPR; Plexo coroide

INTRODUÇÃO

Os pequenos ruminantes são passíveis de serem infectados por um grupo de lentivírus, conhecidos mundialmente por Lentivírus de Pequenos Ruminantes (LVPR) (SOUZA et al., 2012). Os membros deste grupo têm tropismo por células da linhagem monocítica-fagocitária e são caracterizados pela infecção persistente *in vivo*, denominada Artrite Encefalite Caprina (CAE) (NARAYAN et al., 1997). Para o diagnóstico dessa enfermidade o teste de Imunodifusão em Gel de Ágar (IDGA) é utilizado mundialmente como triagem devido ao custo relativamente baixo, praticidade de execução e leitura, além de que é o teste indicado pela Organização Mundial de Saúde Animal (OIE) (PINHEIRO et al., 2012).

OS LVPR podem ser isolados e terem seu material genético amplificado a partir de amostras de animais positivos, como sangue periférico, leite, líquido, sêmen, fluido uterino e tecidos como membrana sinovial, pulmão e plexo coroide (PINHEIRO, 2001). Tendo em vista tais afirmações, objetivou-se nesse estudo avaliar se células do Plexo Coroide Caprino (PCC), estrutura ramificada e altamente vascularizada que tem como função a formação do líquido cefalorraquidiano (CSF), são viáveis para o cultivo celular, e se ocorre à replicação do CAEV em tais células, com finalidade caracterizar mais uma linhagem celular para a infecção *in vitro* pelos LVPR de produção de antígeno.

METODOLOGIA

O experimento foi realizado na Embrapa Caprinos e Ovinos e está de acordo com os princípios éticos de experimentação animal.

A partir de um animal jovem (três dias de nascido), comprovadamente negativo para lentivirose, foi realizado o *explant* celular acondicionando-o em um Becker contendo solução fisiológica de cloreto de sódio (NaCl) 0,9% com 10% de antibiótico (penicilina e estreptomicina), 2% de antifúngico (anfotericina) e 1% de gentamicina. Dentro de um fluxo laminar o PCC foi retirado e picado. Os pedaços do tecido foram colocados em garrafa A25 (25cm²), incubados em estufa a 37°C com 5% de CO₂ por volta de 30 minutos para adesão dos *explants* na superfície de cultivo. Posteriormente, acrescentou-se 5mL de MEM, tratado com 10% de soro fetal bovino (SFB), 2% de penicilina/estreptomicina e 1% de anfotericina (CORK et al., 1974). Após dez dias de incubação, realizou-se a primeira troca de meio (Meio Essencial Mínimo tratado), na qual os *explants* foram retirados da garrafa de cultivo, ficando apenas a monocamada de células, esse procedimento foi realizado a cada 48 horas. As células foram subcultivadas através de tripsinização.

A inoculação das garrafas foi realizada segundo a metodologia descrita por Pinheiro et al., (2006). A cultura celular infectada foi mantida durante 21 dias e foram realizadas sucessivas trocas de meio e coleta de sobrenadante com intervalos de sete dias. Na 3^o coleta uma das garrafas foi para coloração para visualização dos efeitos citopáticos e as demais sofreram três ciclos de congelamento e descongelamento, para lise celular. O antígeno para técnica de IDGA foi preparado conforme metodologia descrita por Pinheiro et al. (2010). Com finalidade de testar o antígeno produzido, foi realizada a técnica de Imunodifusão em Gel de Agarose (IDGA) pela metodologia descrita por Gouveia et al., (2000).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

As células do PCC apresentaram boa aderência à parede da garrafa de cultivo e foram subcultivadas em intervalos de três a sete dias, corroborando com os dados apresentados por Abreu et al., (1998) que ao cultivar células de MSC obtiveram de tempo intervalo semelhante. Já em estudo realizado por Pinheiro et al. (2005) com MSC e Azevedo (2012) com MN o intervalo de subcultivo foi de cinco a nove dias, em ambos os trabalhos.

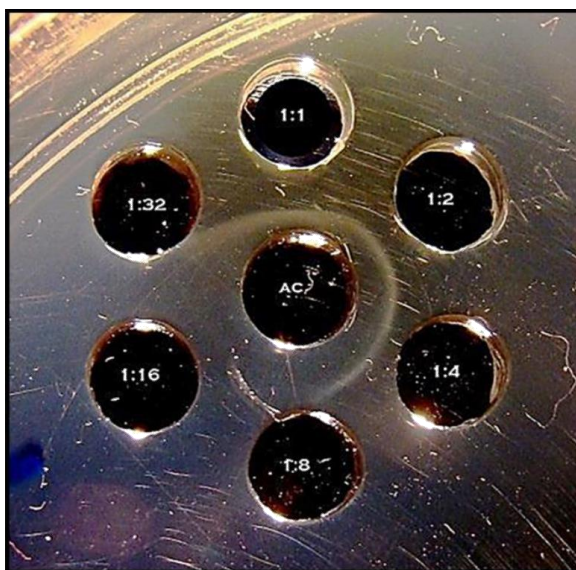
As células subcultivadas mantiveram-se em níveis satisfatórios de vitalidade por mais de 20 subcultivos, esse dado foi similar ao de Abreu et al., (1998), quando analisou o subcultivo de MSC, superior ao de Pinheiro et al. (2005), que observou a vitalidade da cultura de MSC por mais de 15 passagens, e inferior ao de Azevedo (2012) que constatou vitalidade de cultura de MN, por mais de 25 passagens.

Quanto à replicação viral, as células do PCC apresentaram boa permissividade a cepa CAEV Cork. A infecção ocorreu em baixo número de passagem (8ª e 13ª) apresentando, por volta do oitavo ao décimo dia de inoculação, efeito citopático, caracterizado por morte celular, formação de células gigantes multinucleadas (sincícios) e vacuolização. Os sobrenadantes foram coletados três vezes quando ocorreu a destruição de aproximadamente 75% da monocamada. Resultados semelhantes aos verificados por Pinheiro et al., (2010) na produção de antígeno com MSC.

De acordo com a literatura outros estudos foram realizados, com linhagens celulares provenientes de diferentes tecidos. Lerondelle et al., (1999), descreveram a infecção por LVPR, através de cultura de células epiteliais mamárias caprina e ovina. Enquanto, Oliveira et al., (2008) utilizaram células epiteliais de córnea caprina para replicação do CAEV Cork, apresentando em torno da 7ª passagem efeito citopático (sincícios).

Após a coloração das células com cristal violeta notou-se nitidamente, morte celular de aproximadamente 70% da monocamada celular, presença de sincícios e células bastante vacuolizadas.

O sobrenadante viral foi concentrado aproximadamente 70 vezes. Em relação ao resultado de IDGA, o antígeno produzido apresentou reação antígeno-anticorpo, visualizado através de uma linha de precipitação até a diluição 1:8. Entretanto, apresentou maior nitidez e definição a diluição de 1:2 (Figura 1). Dados semelhantes foram obtidos por Azevedo (2012) quando produziu antígenos a partir de células de MN.



Fonte: Juscilânia Furtado

Figura 1 – Teste de Imunodifusão em Gel de Agarose (IDGA).

CONSIDERAÇÕES FINAIS

As células do PCC foram viáveis para o cultivo *in vitro*. São permissíveis ao CAEV, visto que houve replicação viral. Esta infecção caracterizou-se por ser lenta, progressiva e produtiva, com formação de sincícios, demonstrando que as células do PCC podem ser usadas na elaboração de antígeno de lentivírus de pequenos ruminantes. Com isso, torna-se mais uma opção de linhagem celular.

AGRADECIMENTOS

UVA, EMBRAPA Caprinos e Ovinos, FUNCAP.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABREU, S. R. O.; CASTRO, R. S.; NASCIMENTO, S. A.; SOUZA, M. G. Produção de antígeno nucleoproteico do vírus da artrite-encefalite caprina e comparação com o do vírus Maedi-Visna para utilização em teste de imunodifusão em ágar gel. **Pesquisa Veterinária Brasileira**. v.18, n.2, p.57-60, 1998.

AZEVEDO, D. A. A. **Produção de antígeno de lentivírus de pequenos ruminantes através da cultura celular de membrana nictitante caprina**. 2012. 22 f. Trabalho de Conclusão de curso (Biologia bacharelado), Universidade Estadual Vale do Acaraú, Sobral, 2012.

GOUVEIA, A. M. G.; MELO, L. M.; PINHEIRO, R. R. Microimunodifusão em gel de ágar para diagnóstico sorológico de infecção de lentivírus de pequenos ruminantes. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE MEDICINA VETERINÁRIA, 27, Águas de Lindóia – SP. **Anais ... Águas de Lindóia: Resumo**. 2000. p. 33.

LERONDELLE, C.; GODET, M.; MORNEX, J. F. Infection of primary cultures of mammary epithelial cells by small ruminant lentiviruses. **Veterinary Research**, v. 30, p. 467-474, 1999.

NARAYAN, O.; JOAG, S. V.; CHEBLOUNE, Y.; ZINK, M. C.; CLEMENTS, J. E. Visna maedi: the prototype lentiviral disease. **Viral Pathogenesis**, p. 657-668. In: *Viral Pathogenesis* Edited by N. Nathanson. Lippincott- Raven Publishers. Philadelphia. 1997.

OLIVEIRA, M. M. M.; MELO, M. A. de; ANDRADE, P. P. de; GOMES, S. M.; CAMPOS, A. C.; NASCIMENTO, S. A. do; CASTRO, R. S. de. Western Blot para o diagnóstico das infecções pelos lentivírus de pequenos ruminantes em caprinos: um método simples para produção de antígeno. **Arquivo Instituto de Biologia**, São Paulo, v.75, n.3, p.263-270, 2008.

PINHEIRO, R.R. **Lentivírus caprino: estudos epidemiológicos no estado do Ceará e padronização e validação de ensaios imunoenzimáticos (ELISA e Dot-Blot)**. 2001. 133f. Tese (Doutorado em Medicina Veterinária Preventiva e Epidemiologia). Escola de Veterinária. Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2001.

PINHEIRO R. R.; GOUVEIA A. M. G.; YORINORI E. H.; ANDRIOLI, A. Comparação de três técnicas de produção do antígeno do lentivírus caprino utilizado no teste de imunodifusão em gel de Agar. **Brazilian Journal of Veterinary Research and animal Science**. São Paulo, v. 42, n. 6, p. 453-458, 2005.

PINHEIRO, R. R.; OLORTEGUI, C. D. C.; GOUVEIA, A. M. G. et al. Desenvolvimento de dot-blot para detecção de anticorpos para o vírus da Artrite Encefalite Caprina em caprinos. **Revista Portuguesa Ciência Veterinária**, v.101, p.51-56, 2006.

PINHEIRO, R. R.; ANDRIOLI, A.; GOUVEIA, A. M. G.; ARAGÃO, M. A. C.; MARTINEZ, P. M. Avaliação de antígenos para o diagnóstico de lentivírus em rebanho caprino sob programa de controle. **Arquivo Instituto de Biologia**, v.77, n.1, p.133-137, 2010.

PINHEIRO, R. R.; ANDRIOLI, A.; SIDER, L. H.; SANTIAGO, L. B.; OLIVEIRA, E. L.; SOUSA, A. L. M.; ALVES, F. S. F.; CRUZ, J. C. M. Lentiviroses em pequenos ruminantes: principais métodos de diagnóstico. **Comunicado Técnico EMBRAPA**, n. 107, p.1-32, 2012.

SOUZA, T. S.; PINHEIRO, R. R.; LIMA, C. C. V.; COSTA, J. N. Transmissão interespecie dos lentivírus de pequenos ruminantes: revisão e desafios. **Acta Veterinaria Basilea**, v.6, n.1, p.23-34, 2012.