

Uso de Cultura Celular de Membrana Nictitante Caprina para Produção de Antígeno de Lentivírus de Pequenos Ruminantes

Raymundo Rizaldo Pinheiro¹

Dalva Alana Aragão de Azevedo²

Ana Lídia Madeira de Souza³

Juscilânia Furtado Araújo⁴

Alice Andrioli⁵

Lucia Helena Sider⁶

Thiago Sampaio de Souza⁷

Juliano Cezar Minardi da Cruz⁸

Introdução

Os lentivírus de pequenos ruminantes (LVPR) pertencem à família *Retroviridae* e ao gênero *Lentivirus* e são complexos não oncogênicos (PASICK, 1998). Inicialmente, lentivírus isolados em ovinos eram denominados de Maedi-Visna vírus (MVV) e em caprinos, vírus da Artrite-Encefalite Caprina (CAEV). Estes foram comumente considerados como entidades virais específicas. Entretanto, a partir de análises filogenéticas, verificou-se que esses vírus devem ser vistos como um grupo heterogêneo e não mais como vírus estritamente relacionados às espécies, sendo assim denominados genericamente de LVPR (PISONI et al., 2005; GIAMMARIOLI et al., 2011).

Os lentivírus geralmente limitam a infecção a um simples hospedeiro, levando a sérios problemas ou

até à morte; multiplicam-se tanto em células ativas como em células em repouso; infectam monócitos, macrófagos e/ou linfócitos, causando infecção persistente e multissistêmica (AIEV, MVV e CAEV) e/ou síndrome de imunodeficiência (SIV, HIV e FIV); e apresentam altas taxas de mutação, com consequente diversidade genotípica, fenotípica e antigênica (GONDA et al., 1986; PINHEIRO, 2001). Caracterizam-se, também, pelo longo período de latência, já que se disseminam no organismo sem qualquer sinal clínico por meses ou anos (STRAUB, 2004), provocando enfermidades de curso progressivo nos pequenos ruminantes, denominadas de Artrite-Encefalite Caprina (CAE) em caprinos e Maedi-Visna (MV) ou Pneumonia Progressiva Ovina (PPO) em ovinos (ADAMS; CRAWFORD, 1980; PASICK, 1998).

O diagnóstico pode ser realizado por métodos de detecção direta do agente etiológico através do

¹ Méd. Vet., D. Sc., Pesquisador da Embrapa Caprinos e Ovinos, Fazenda Três Lagoas, Estrada Sobral/Groairas, Km 04, CEP - 62010-970, C. Postal 145, Sobral/CE. E-mail: rizaldo.pinheiro@embrapa.br

² Bióloga, Mestranda em Zootecnia, Universidade Estadual Vale do Acaraú. E-mail: dalvaazevedo@outlook.com

³ Graduanda em Biologia, Universidade Estadual Vale do Acaraú. E-mail: bio.analidia@gmail.com

⁴ Graduanda em Biologia, Universidade Estadual Vale do Acaraú. E-mail: laninha.araujo@hotmail.com

⁵ Méd. Vet., D. Sc., Pesquisadora da Embrapa Caprinos e Ovinos. E-mail: alice.andrioli@embrapa.br

⁶ Méd. Vet., D. Sc., Pesquisadora da Embrapa Caprinos e Ovinos. E-mail: lucia.sider@embrapa.br

⁷ Méd. Vet., Doutorando, Universidade Federal da Bahia. E-mail: thiago_sampaio@hotmail.com

⁸ Méd. Vet., Ph. D., Bolsista de Pós-Doctor da Embrapa Caprinos e Ovinos. E-mail: jcminardi@yahoo.com

isolamento em cultivo celular (FEITOSA et al., 2011), microscopia eletrônica (RICARTE et al., 2010) e técnicas de biologia molecular (ANDRIOLI et al., 1999) ou por métodos indiretos, por meio da identificação de anticorpos, tais como Imunodifusão em Gel de Agarose (IDGA) (PINHEIRO et al., 2010), Dot-Blot (ARAGÃO et al., 2008), Enzyme Linked Immunosorbent Assay (ELISA) e Western Blot (WB) (LIMA, 2012).

Na produção de antígeno para as técnicas de imunodiagnóstico, geralmente utilizam-se células obtidas da membrana sinovial caprina (MSC) para a infecção viral. Abreu et al. (1998) e Pinheiro et al. (2005) utilizaram estas células e demonstraram níveis satisfatórios de vitalidade e produtividade da cultura, a qual evidenciou efeitos citopáticos perante a exposição ao vírus. Outras células já foram utilizadas com este propósito. Oliveira et al. (2008) demonstraram a permissividade de células epiteliais de córnea caprina à replicação da cepa padrão CAEV Cork. Cappuchio et al. (2003), estudando ovinos infectados com Maedi-Visna, verificaram a presença do MVV em tecido de membrana nictitante e pulmão através de teste de imunohistoquímica e PCR *in situ*. Estes tecidos foram reagentes a p25 de MVV.

Como o uso de MSC necessita do sacrifício do animal doador das células e a replicação destas normalmente é restrita a aproximadamente vinte passagens, procurou-se encontrar outras opções celulares que minimizassem estes problemas. Com isso, padronizou-se o cultivo de células da membrana nictitante caprina – MNC para infecção por LVPR e produção de antígeno.

Protocolo

Foram cultivadas células fibroblásticas da membrana nictitante, obtidas de caprino negativo para LVPR por WB, IDGA e reação em cadeia de polimerase - PCR. Os *explants* foram embebidos em Meio Essencial Mínimo (MEM), e transferidos para três garrafas de 25cm² (A25), as quais foram incubadas em estufa a 37°C com atmosfera de 5% de CO₂, por até 30 minutos, para adesão dos *explants* na garrafa. Posteriormente, foi acrescentado 5mL de MEM suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB), 2% de penicilina e estreptomicina (P/S) e 1% de

anfotericina B (A) em cada garrafa A25, que foram recolocadas na estufa nas mesmas condições anteriormente citadas. As culturas de *explants* foram cultivadas até a obtenção de 100% de confluência da monocamada celular. Por conseguinte foram subcultivadas por tripsinização das células.

As células de MNC aderiram bem à superfície da garrafa de cultura (Figura 1). O tempo de 30min em estufa permitiu a adesão dos *explants* na parede da garrafa. O método de obtenção de MNC é simples, prático e não tem a necessidade de sacrificar o animal.

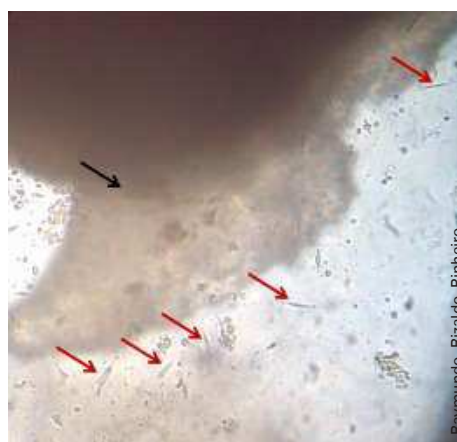


Figura 1. Cultura primária de células da MNC; seta na cor preta aponta Explant; setas na cor vermelha apontam células individuais que aderiram e cresceram sobre a superfície da garrafa de cultivo – microscopia óptica invertida aumento de 40x.

A vitalidade da cultura de MNC foi mantida por mais de 25 passagens, sendo este valor superior quando comparado com os dados de MSC citados por Abreu et al. (1998) e Pinheiro et al. (2005). Abreu et al. (1998) demonstraram que a cultura foi viável por mais de 20 passagens e Pinheiro et al. (2005) observaram a vitalidade da cultura por mais de 15 passagens.

Monocamadas semiconfluentes de MNC (11^o passagem) cultivadas em garrafas *Roller* de 830 cm² de superfície de cultivo foram inoculadas com 15mL de suspensão viral contendo amostra padrão CAEV Cork (título - 10^{4,5}TCID₅₀/mL) diluída em MEM, sem SFB. Incubou-se por 60 minutos em estufa a 37°C. Posteriormente, acrescentou-se 135mL de MEM suplementado com 5% de SFB, 2% de P/S e 1% de A.

A monocamada de cultivo foi corada com cristal violeta, por 10 minutos. Posteriormente, o corante foi desprezado e a monocamada lavada com água destilada para retirada do excesso de corante. As garrafas foram visualizadas em microscópio óptico invertido, para verificação dos efeitos citopáticos causados pelo vírus, tais como formação de sincício (células multinucleadas resultantes da fusão de células infectadas com células não infectadas) e vacúolos intracitoplasmáticos. As células mostraram-se passíveis de infecção pelo lentivírus, apresentando efeito citopático em forma de sincícios e vacúolos intracitoplasmáticos (Figura 2 A e B).

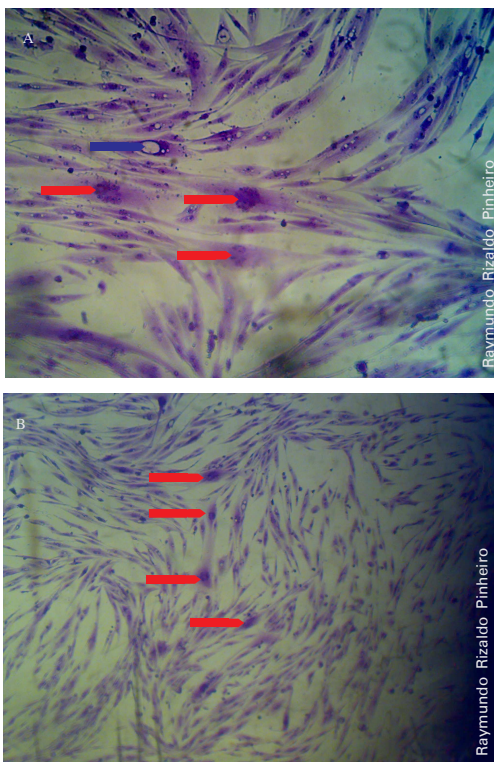


Figura 2. A e B: setas vermelhas indicam sincícios e setas azuis indicam células vacuolizadas – microscopia óptica invertida em A aumento de 200x e em B aumento de 100x

As células de MNC mostraram-se persistentes à infecção pelo vírus. Mesmo na terceira coleta do sobrenadante, depois de 21 dias da inoculação, as garrafas ainda apresentavam um grande número de células com cerca de 80% de confluência e morte celular moderada, podendo então ser realizadas mais coletas de sobrenadante. Quando se utiliza a MSC, os intervalos de coleta são de sete dias. De acordo com Pinheiro et al. (2010), na produção de antígeno com MSC, os sobrenadantes devem ser

coletados três vezes ou até a destruição de 75% da monocamada.

Realizou-se a coleta do sobrenadante (SN) de cultivo celular por três vezes, a cada sete dias. Este material foi submetido a três ciclos de congelamento e descongelamento para a lise celular e liberação de partículas virais.

Após os ciclos de congelamento e descongelamento, o SN viral foi clarificado por centrifugação a 3.300g a 4° C por 20 minutos, o pellet foi desprezado e o SN armazenado. O clarificado foi concentrado por pressão de gás nitrogênio em sistema AMICON®. Solutos com peso molecular superior a 10 KDa foram retidos pela membrana e o filtrado foi concentrado 60X do volume inicial. Após a concentração do antígeno, este foi tratado com éter etílico na proporção de 1:1 para destruição das glicoproteínas, evidenciando a proteína p28.

Teste do antígeno por IDGA

Para avaliar o antígeno produzido foi realizado o teste de IDGA, em ágar a 0,9% em tampão fosfato, utilizando 30 uL de soro/antígeno. O gel foi perfurado com roseta metálica em formato hexagonal, para formação de seis poços periféricos e um central. Os poços periféricos foram preenchidos com as diluições seriadas do antígeno de 1:1 a 1:32 (Figura 3). No poço central, colocou-se soro padrão positivo. A leitura foi realizada após 48 e 72 horas, com luz indireta sobre fundo escuro, sendo considerada definitiva a última leitura, para verificar a linha de precipitação oriunda da ligação antígeno-anticorpo. O antígeno produzido apresentou reação em linha de precipitação até a diluição 1:8, sendo esta linha bastante forte e nítida na diluição 1:2.

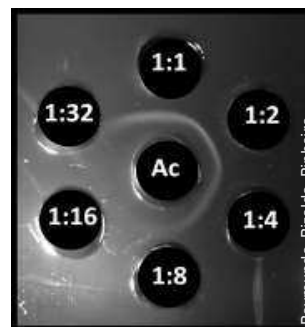


Figura 3. Avaliação de antígeno de lentivírus caprino produzido a partir de células de membrana nictitante, utilizando-se teste de imunodifusão em gel de agarose (IDGA).

Conclusão

A obtenção de crescimento satisfatório em cultura e a observação do efeito citopático demonstram que as células MNC são passíveis de infecção pelos LVPR e atuam como outra opção de tecido para isolamento viral. Foi observado que as células de MNC infectadas permitem mais coletas de sobrenadante rico em partículas virais e, conseqüentemente, de produção de antígeno, pois mostraram-se mais persistentes a infecção pelo vírus. A obtenção do tecido de MNC é um procedimento simples e prático e não exige o sacrifício do animal.

Referências

- ABREU, S. R. O.; CASTRO, R. S.; NASCIMENTO, S. A.; SOUZA, M. G. Produção de antígeno nucleoprotéico 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**, Rio de Janeiro, v. 18, n. 2, p. 57-60, 1998.
- ADAMS, D. S.; CRAWFORD, T. B. CAE: viral arthritis-encephalitis syndrome in goats. **International Goat and Sheep Research**, v. 1, n. 2, p. 168-172, 1980.
- ANDRIOLI, A.; GOUVEIA, A. M. G.; PINHEIRO, R. R.; ROCHA, M. A.; MARTINS, A. S.; SANTOS, D. A. Detecção do DNA pró-viral do lentivírus caprino em sêmen de bodes naturalmente infectados. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 23, n. 3, p. 420-420, 1999. Edição dos resumos do 13º. Congresso Brasileiro de Reprodução Animal, 1999.
- ARAGÃO, M. A. C.; PINHEIRO, R. R.; ANDRIOLI, A.; ALVES, F. S. F.; OLIVEIRA, A. A. F.; TEIXEIRA, M. F. S. Maedi-visna vírus: produção de antígeno, análise proteica e antigênica. **Arquivos do Instituto Biológico**, São Paulo, v. 75, n. 4, p. 423-429, out./dez., 2008.
- CAPPUCHIO, M. T.; SANNA, E.; SANNA, M. P.; FARIGU, S.; MINELLI, R.; GUARDA, F. Maedi-visna virus detection in ovine third eyelids. **Journal Comparative Pathology**, v. 129, n. 1, p. 37-43, Jul., 2003.
- FEITOSA, A. L. V. L.; TEIXEIRA, M. F. S.; PINHEIRO, R. R.; PINHEIRO, A. A.; AZEVEDO, D. A. A.; ALVES, S. M. Primeiro isolamento de lentivírus de pequenos ruminantes em caprino naturalmente infectado em rebanho do Rio Grande do Norte, Brasil. **Arquivos do Instituto Biológico**, São Paulo, v. 78, n. 4, p. 501-505, out./dez., 2011.
- GIAMMARIOLI M.; BAZZUCCHI M.; PUGGIONI G. Phylogenetic analysis of small ruminant lentivirus (SRLV) in Italian flocks reveals the existence of novel genetic subtypes. **Virus Genes**, v. 43, n. 3, p. 380-384, Dec., 2011.
- GONDA, M. A.; BRAUM, M. J.; CLEMENTS, J. E.; PYPHER, J. M.; WONG-STAAAL, F.; GALLO, R. C.; GILDEN, R. V. Human T-cell lymphotropic virus type III shares sequence homology with a family of pathogenic lentiviruses. **Proceedings of the National Academy of Science** v. 83, n. 11, p. 4007-4011, Jul., 1986.
- LIMA, C. C. V. **Inquérito soroepidemiológico da artrite-encefalite caprina na Microrregião de Juazeiro-Bahia e comparação de técnicas imunodiagnósticas**. 2012. 87 f. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal nos Trópicos) - Escola de Medicina Veterinária e Zootecnia. Universidade Federal da Bahia, Salvador.
- 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. **Arquivos do Instituto Biológico**, São Paulo, v. 75, n. 3, p. 263-270, jul./set., 2008.
- PASICK, J. Maedi-Visna Vírus and Caprine Arthritis-Encephalitis Vírus: distinct espécies or quasispecies and its implications for laboratory diagnosis. **Canadian Journal of Veterinary Research**, n. 62, p. 241-244, 1998.
- PINHEIRO, R. R. **Lentivírus caprino: estudos epidemiológicos no estado do Ceará e padronização e validação de ensaios imunoenzimáticos (ELISA e Dot-Blot)**. 2001. 133 f. Tese (Doutorado em Medicina Veterinária Preventiva e Epidemiologia) - Escola de Veterinária. Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte.

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

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 Veterinary Research Animal Science**, São Paulo, v. 42, n. 6, p. 453-458, 2005.

PISONI, G.; QUASSO, A.; MORONI, P. Phylogenetic analysis of small-ruminant lentivirus subtype B1 in mixed flocks: Evidence for natural transmission from goats to sheep. **Virology**, v. 339, n. 2, p. 147-152, Sep., 2005.

RICARTE, A. R. F.; ANDRIOLI, A.; PINHEIRO, R. R.; BÁO, S. N.; SILVA, J. S.; BRAZ, S. V.; NAME, K. P. O.; LIMA-VERDE, I. B.; BRITO, I. F.; DIAS, R. P.; FREITAS AGUIAR, T. D.; DANTAS, T. V. M.; ARAÚJO, S. A. C.; CAVALCANTI, D. M. L. P.; PAULA, N. R. O.; TEIXEIRA, M. F. S. Avaliação Imunohistoquímica e Ultraestrutural de gametas e embriões Caprinos infectados com o CAEV. **Arquivos do Instituto Biológico**, São Paulo, v. 77, n. 2, p. 217-223, abr./jun., 2010.

STRAUB, O. C. Maedi-Visna virus infection in sheep. History and present knowledge. **Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases**, v. 27, n. 1, p. 1-5, Jan., 2004.

Comunicado Técnico, 132



Ministério da
Agricultura, Pecuária
e Abastecimento

Embrapa Caprinos e Ovinos

Endereço: Estrada Sobral/Groairas, 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>

1ª edição

On line (set./2012)

Comitê de publicações

Presidente: *Olivardo Facó*

Secretário-Executivo: *Alexandre César Silva Marinho*

Membros: *Carlos José Mendes Vasconcelos, Tânia Maria Chaves Campêlo, 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)*

Supervisão editorial: *Alexandre César Silva Marinho.*

Revisão de texto: *Carlos José Mendes Vasconcelos.*

Normalização bibliográfica: *Tânia Maria Chaves Campêlo.*

Editoração eletrônica: *Comitê Local de Publicações*

Expediente