

Produção de antígeno de lentivírus de pequenos ruminantes através da cultura celular de membrana nictitante caprina*

Dalva Alana Aragão de Azevedo¹⁺, Juscelânia Furtado Araújo², Ana Lídia Madeira de Sousa³, Ronaldo Pereira Dias⁴, Thiago Sampaio de Souza⁵, Alice Andrioli⁶ e Raymundo Rizaldo Pinheiro⁶

ABSTRACT. Azevedo D.A.A., Araújo J.F., Sousa A.L.M. de, Dias R.P., Souza T.S. de, Andrioli A. & Pinheiro R.R. [**Caprine nictitating membrane cell culture for production of small ruminants lentivirus antigen.**] Produção de antígeno de lentivírus de pequenos ruminantes através da cultura celular de membrana nictitante caprina. *Revista Brasileira de Medicina Veterinária*, 37(4):316-320, 2015. Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (Embrapa Caprinos e Ovinos), Fazenda Três Lagoas, Estrada Sobral/Jordão Km 4, Sobral, CE 62010-970, Brasil. E-mail: dalvaazevedo@outlook.com

Small Ruminants lentivirus (SRLV) belong to the Retroviridae family and is the etiologic agent of caprine arthritis encephalitis in goats and maedi-visna in sheep. Cells of the monocytic-phagocytic lineage are the main viral targets and infected hosts cannot develop a curative immune response. We evaluated whether nictitating membrane (NM) cells can be cultivated *in vitro* and also whether it is a feasible system for SRLV antigen production for immunodiagnosis purposes. MN cells were collected from a SRLV negative animal and cultivated in minimal essential media supplemented with bovine fetal serum. Subcultures were inoculated with caprine arthritis encephalitis virus (CAEV) Cork strain, the supernatant was collected, clarified by centrifugation (3.400 g for 20 minutes), concentrated using the AMICON® system. Samples were subjected to agar gel immunodiffusion (AGID) tests. MN cells presented satisfactory performance, were amenable to several subcultivation.

KEY WORDS. Cell Culture, AGID, SRLV.

RESUMO. Os Lentivírus de Pequenos Ruminantes (LVPR) pertencem à família Retroviridae e causam enfermidades crônicas e progressivas, conhecidas como artrite-encefalite caprina em caprinos e maedi-visna em ovinos. As células da linhagem monocítica fagocitária são os principais alvos do vírus no organismo animal, que não consegue desenvol-

ver resposta imune curativa. Baseando-se no fato de que a membrana nictitante (MN) sofre naturalmente infecção, no organismo do animal, por estes vírus, objetivou-se avaliar se essas são passíveis para o cultivo e se possuem bom crescimento em cultura, visando à produção de antígeno de lentivírus caprino (LVC) para técnica de imunodiag-

*Recebido em 14 de junho de 2013.

Aceito para publicação em 13 de junho de 2014.

¹ Mestranda em Zootecnia, Universidade Estadual Vale do Acaraú (UVA), Avenida da Universidade, 850, Campus da Betânia, Sobral, CE 62040-370, Brasil. ⁺ Autora para correspondência, E-mail: dalvaazevedo@outlook.com - bolsista CAPES.

² Curso de Biologia, UVA, Avenida da Universidade, 850, Campus da Betânia, Sobral, CE 62040-370. E-mail: laninha.araujo@hotmail.com - bolsista CNPq PIBIC.

³ Curso de Biologia, UVA, Avenida da Universidade, 850, Campus da Betânia, Sobral, CE 62040-370. E-mail: analidiams10@yahoo.com.br - bolsista de Iniciação Científica - FUNCAP.

⁴ Doutorando em Ciências Veterinárias, Universidade Estadual do Ceará (UECE), Av. Dedé Brasil, 1700, Itaperi, Fortaleza, CE 60740-000, Brasil. E-mail: ronaldodias01@yahoo.com.br

⁵ Doutorando em Ciência Animal nos Trópicos, Universidade Federal da Bahia, Av. Adhemar de Barros, 500, Ondina, Salvador, BA 40170-110, Brasil. E-mail: thiago_sampaio@hotmail.com - bolsista de Doutorado Fapesb.

⁶ Médico-veterinário, UVA, Avenida da Universidade, 850, Campus da Betânia, Sobral, CE 62040-370 e Embrapa Caprinos e Ovinos, Fazenda Três Lagoas, Estrada Sobral/Jordão Km 4, Sobral, CE 62010-970, Brasil. E-mail: rizaldo.pinheiro@embrapa.br

nóstico. Sendo assim, realizou-se *explant* de células de MN 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 3.300g e concentrados em sistema AMICON®. Após realizou-se o teste de Imunodifusão em Gel de Agarose (IDGA) do antígeno produzido. As células de MN demonstraram bom crescimento em cultura, foram permissíveis ao LVC e com isso pôde-se produzir antígeno, o qual apresentou uma evidente linha de precipitação no teste.

PALAVRAS-CHAVE. Cultivo Celular, IDGA, LVPR.

INTRODUÇÃO

Os Lentivírus de Pequenos Ruminantes (LVPR) são retrovírus que causam enfermidades crônicas e progressivas conhecidas como artrite-encefalite caprina e maedi-visna em caprinos e ovinos, respectivamente. Esses vírus persistem no organismo do animal se sobressaindo ao sistema imune, pois infectam células da linhagem de monócitos/macrófagos. Uma vez adsorvidos, o RNA viral é convertido em DNA através da transcriptase reversa, e incorporado pela enzima integrase ao DNA da célula hospedeira, que não consegue desenvolver resposta curativa. As lesões causadas por esse vírus ocorrem principalmente nas articulações, pulmões, sistema nervoso e glândulas mamárias (Callado et al. 2001).

O diagnóstico pode ser realizado por métodos de detecção direta do agente etiológico através do isolamento em cultivo celular (Feitosa et al. 2011), técnicas de biologia molecular (Andrioli et al. 1999) ou métodos indiretos, por meio da identificação de anticorpos, tais como Imunodifusão em Gel de Agarose -IDGA (Pinheiro et al. 2010), *Enzyme Linked Immunosorbent Assay* -ELISA e *Western Blot* -WB (Lima 2012).

Na produção de antígeno para técnicas de imunodiagnóstico, geralmente utiliza-se células obtidas da membrana sinovial caprina (MSC), de acordo com Abreu et al. (1998) e Pinheiro et al. (2005). Estes autores utilizaram células de MSC e demonstraram níveis satisfatórios de vitalidade e produtividade da cultura, as quais evidenciaram efeitos citopáticos perante a exposição ao vírus.

Entretanto, a produção de antígeno para LVPR não foi realizada apenas em MSC. Oliveira et al. (2008) demonstraram a permissividade de células epiteliais de córnea caprina à replicação da cepa padrão CAEV Cork. Cappuchio et al. (2003) em estudo realizado com ovinos infectados com lentivírus

ovino, verificaram a presença do agente infeccioso em tecido de membrana nictitante e pulmão através de teste de imunohistoquímica e PCR *in situ*. Comprovada a infecção natural de membrana nictitante por MVV torna-se necessária a análise *in vitro* do cultivo de células desse tecido. Com isso, objetivou-se avaliar se células da MN caprina são passíveis para o cultivo, se possuem bom crescimento em cultura e se são permissíveis ao LVPR, a fim de que se possa produzir antígeno, tornando-as mais uma linhagem de células conhecidamente para este fim.

MATERIAIS E MÉTODOS

Foram cultivadas células fibroblásticas da membrana nictitante, obtidas de caprino comprovadamente negativo para LVPR por *Western Blot*, IDGA e 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 dióxido de carbono-CO₂, por até 30 minutos para adesão dos *explants* na garrafa. Depois foram acrescidos 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 A25, 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.

A produção de antígeno, baseou-se na metodologia descrita por Pinheiro et al. (2005). Monocamadas semi-confluentes de MN (11^a passagem) cultivadas em garrafas roller de 830 cm² de superfície de cultivo foram inoculadas com 15mL de suspensão viral contendo amostra padrão CAEV Cork (titulação 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 meio suplementado com 5% de SFB, 2% de P/S e 1% de A. Realizou-se a coleta do sobrenadante (SN) de cultivo celular por três vezes, a cada sete dias, sendo o meio substituído nas duas primeiras e o conteúdo da garrafa na terceira vez 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 (10000 Daltons) e o filtrado foi concentrado 60 vezes 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 (Pinheiro et al. 2010).

Foi realizado o teste de IDGA, através da microtécnica descrita por Pinheiro et al. (2010) em ágar a 1% em tampão fosfato, utilizando 30 µL de soro/antígeno. O

gel foi perfurado com roseta metálica em formato hexagonal, contendo seis poços periféricos e um central. Os poços periféricos foram preenchidos com as diluições seriadas do antígeno de 1:1 à 1:32. No poço central, colocou-se soro padrão positivo. A leitura foi realizada após 48-72 horas, com luz indireta sobre fundo escuro, sendo considerada definitiva a última leitura, para verificar a linha de precipitação oriunda da ligação antígeno-anticorpo.

A monocamada de cultivo foi corada com 15 mL de cristal violeta, por 10 minutos. Depois o corante foi desprezado e a monocamada lavada com água destilada para retirar o 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 (Pinheiro 2001).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

As células de MN 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, mesmo tempo de adesão para MSC de acordo com Abreu et al. (1998). O método de obtenção de MN é simples e não tem a necessidade de sacrifício do animal. As células mostraram-se passíveis de infecção pelo lentivírus, tendo apresentado efeito citopático em forma de sincícios e vacúolos intracitoplasmáticos (Figura 2), podendo ser utilizadas para produção de antígeno. Os sobrenadantes foram concentrados cerca de 60 vezes.



Figura 1. Cultura primária de células da MN caprina; setas indicam o *Explant* do tecido e células individuais que aderiram e cresceram sobre a superfície da garrafa de cultivo - microscopia óptica invertida, aumento de 40x.

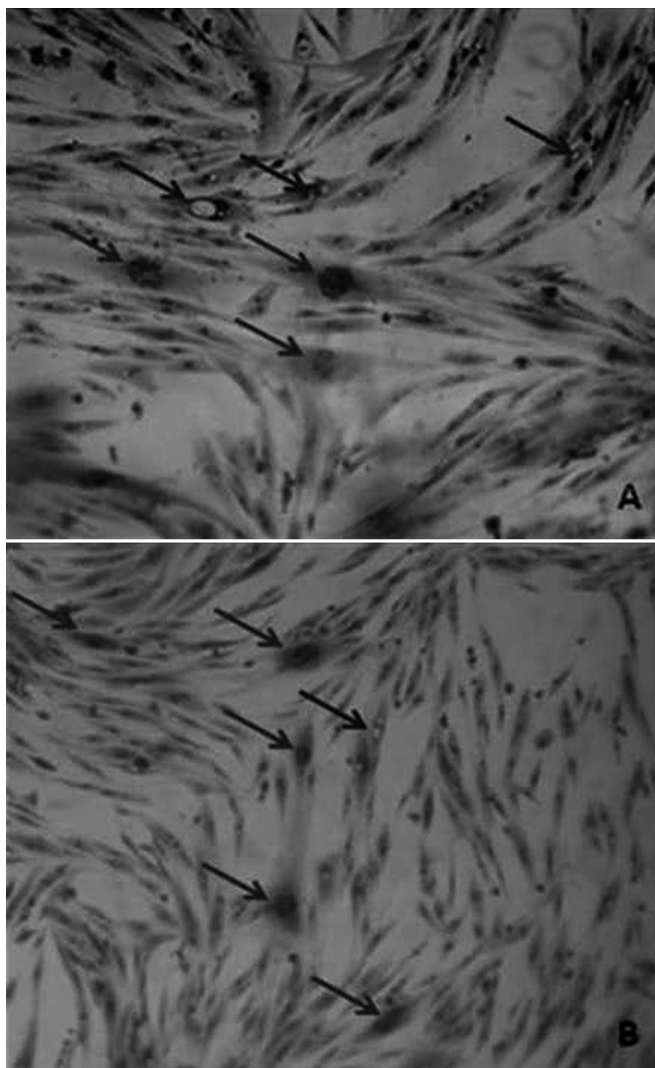


Figura 2. A e B: setas indicam sincícios e células vacuolizadas - microscopia óptica invertida em A aumento de 200x e em B aumento de 100x.

De acordo com o resultado de IDGA, o antígeno produzido apresentou reação em linha de precipitação até a diluição de 1:8, demonstrando bastante nitidez na diluição de 1:2 (Figura 3).

Outros estudos com culturas celulares provenientes de tecidos diferentes estão disponíveis na literatura, como o de Oliveira et al. (2008), com células epiteliais de córnea caprina, as quais foram permissíveis à replicação do CAEV Cork, apresentando em torno da 7ª passagem efeito citopático (sincícios). A infecção por LVPR também foi descrita por Leron-delle et al. (1999), em culturas de células epiteliais mamárias, provenientes de cabras e ovelhas infectadas experimentalmente e naturalmente.

A células de MN foram sub-cultivadas em intervalos de 5 a 9 dias e a replicação viral ocorreu em baixo número de passagens (11ª), apresentando efeito citopático. Os intervalos de sub-cultivo utilizados com MN foram similares aos de Abreu et al.

(1998), os quais utilizaram células de MSC. Nestas o sub-cultivo foi realizado com intervalos de 3 a 7 dias, demonstrando replicação pelo LVPR em células de baixa passagem (5^a a 7^a) e em alta passagem (17^a a 18^a). Já no estudo realizado por Pinheiro et al. (2005) também com células de MSC, os sub-cultivos foram em intervalos de 5 a 9 dias e a multiplicação viral ocorreu tanto em número baixo de passagens (7^a a 8^a) quanto em número elevado (15^a a 16^a).

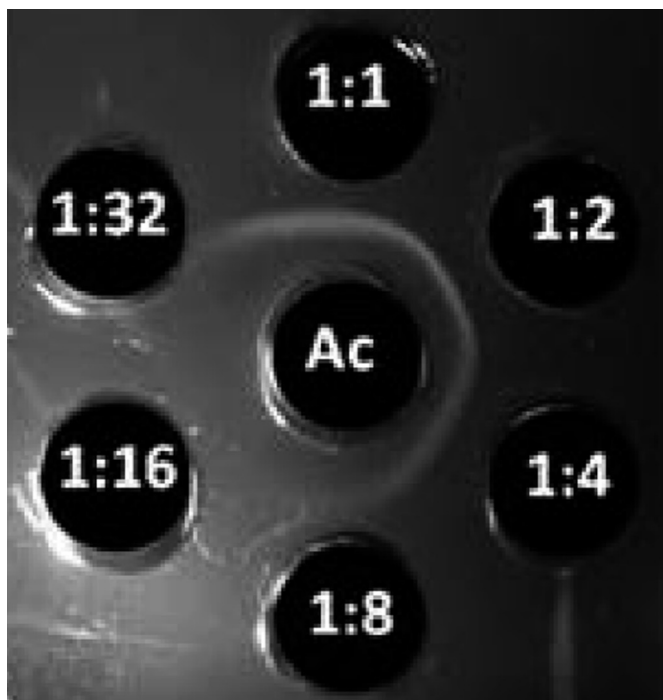


Figura 3. Avaliação de antígeno de lentivírus caprino produzido a partir de células de membrana nictitante, utilizando-se teste de imunodifusão em gel de agarose (IDGA).

A vitalidade da cultura de MN foi mantida por mais de 25 passagens, dado superior quando comparado com os dados de MSC estudados por Abreu et al. (1998) e Pinheiro et al. (2005). O primeiro citou que a cultura foi viável por mais de 20 passagens e o segundo observou a vitalidade da cultura por mais de 15 passagens.

Observou-se na formação de sincícios, células bastante vacuolizadas e também se notou que a morfologia é notavelmente diversificada, apresentando formas arredondadas, triangulares, sem forma definida e fusiforme (Figura 4). A morfologia fusiforme representada em "C" na Figura 4 dificulta a observação da infecção quando a monocamada ainda está em cultura (sem corante cristal violeta), pois se torna menos visível.

As células de MN mostraram-se persistentes a infecção pelo vírus, pois mesmo na terceira coleta do sobrenadante, depois de 21 dias da inoculação, as garrafas ainda apresentavam um grande número de células, cerca de 80% de confluência, havendo morte celular moderada, podendo então ser realizada mais coletas de sobrenadante. Quando se utiliza a MSC, os intervalos são de sete dias e realizam-se três coletas do SN, pois 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.

CONCLUSÃO

A obtenção do tecido de MN é simples e para tal não é necessário o sacrifício do animal. As células de MN possuem um bom crescimento em cultura

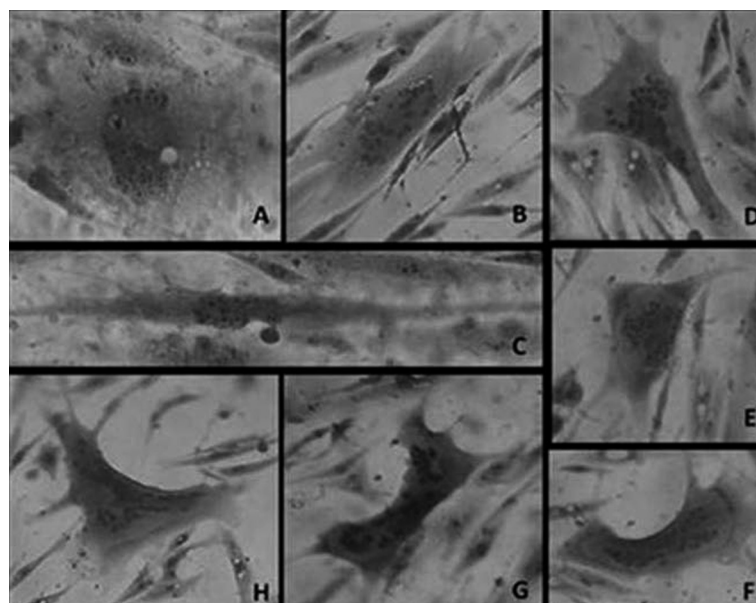


Figura 4. A e B: sincícios com morfologia arredondada; C: Sincício alongado; D, E e H: sincícios com morfologia triangular; F e G: sincícios com formas irregulares - microscopia óptica invertida, aumento de 400x.

e são passíveis de infecção pelos LVPR, apresentando efeito citopático, sendo assim outra opção de célula para cultura a fim de produzir antígeno, a ser utilizado em testes sorológicos.

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. *Pesq. Vet. Bras.* 18:57-60, 1998.
- Andrioli A., Gouveia A.M.G. & Pinheiro R.R. Detecção do DNA pró-viral do lentivírus caprino em sêmen de bodes naturalmente infectados. *Rev. Bras. Reprod. Anim.*, 23:420-420, 1999.
- Callado A.K.C., Castro R.S. & Teixeira M.F.S. Lentivírus de pequenos ruminantes (CAEV e Maedi-Visna): Revisão e perspectivas. *Pesq. Vet. Bras.*, 21:87-97, 2001.
- Cappuchio M.T., Sanna E., Sanna M.P., Farigu S., Minelli R. & Guarda F. Maedi-Visna Virus Detection in Ovine Third Eyelids. *J. Comp. Path.*, 129:37-43, 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. *Arq. Inst. Biológico*, 78:501-505, 2011.
- Lima C.C.V. Inquérito soropidemiológico da artrite-encefalite caprina na Microrregião de Juazeiro-Bahia e comparação de técnicas imunodiagnósticas. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal nos Trópicos), Escola de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Federal da Bahia, Salvador, 2012. 87f. (Disponível em: <http://www.mevtropical.ufba.br/limaccv/>).
- 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. *Arq. Inst. Biol.*, São Paulo, 75:263-270, 2008.
- Pinheiro R.R. Lentivírus caprino: estudos epidemiológicos no estado do Ceará e padronização e validação de ensaios imunoenzimáticos (ELISA e Dot-Blot). Tese (Doutorado em Medicina Veterinária Preventiva e Epidemiologia), Escola de Veterinária. Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2001. 133f. (Disponível em: <http://www.bibliotecadigital.ufmg.br/dspace/handle/1843/BUOS-8FEGES>).
- 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. *Braz J. Vet. Res. Anim. Sci.*, São Paulo, 42:453-458, 2005.
- 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. *Arq. Inst. Biol.*, São Paulo, 77:133-137, 2010.