

VII Encontro de Iniciação Científico da Universidade Estadual Vale do Acaraú - UVA CO-CULTIVO DE LÍQUIDO ARTICULAR EM MEMBRANA SINOVIAL CAPRINA

Maria Alzira do Carmo Aragão (IC - EMBRAPA, Biologia- UVA), Andréa Alice da Fonseca Oliveira (Pesquisadora – Embrapa Caprinos), Alice Andrioli (Pesquisadora – Embrapa Caprinos), Priscila Martinez Martinez (AT – Embrapa Caprinos), Aryana Lushese V. Lima Feitosa (IC - EMBRAPA, Biologia- UVA), Daniele Alves de Farias (Zootecnia – UVA)

Raymundo Rizado Pinheiro (Orientador e Pesquisador da Embrapa Caprinos).

Palavras-chave: Lentivírus, Co-cultivo. Líquido articular.

Agradecimentos a Embrapa, Banco do Nordeste e a FUNCAP pelo apoio financeiro para realização deste projeto.

Introdução

O co-cultivo é uma técnica empregada para o isolamento viral. No caso da Artrite Encefalite Caprina (CAE), em que uma das sintomatologias apresentadas pelos animais é a artrite, o vírus encontra-se presente no líquido sinovial (LS). Em razão deste tropismo, o LS revela-se como material de eleição para isolamento. O presente trabalho objetiva a padronização da técnica de co-cultivo de líquido sinovial empregada no isolamento de uma cepa do Vírus da Artrite Encefalite Caprina (CAEV), bem como verificar a ação viral no cultivo de células de membrana sinovial caprina (MSC).

Material e Métodos

Coletou-se LS de cinco animais que apresentavam alterações articulares e sabidamente positivos para CAE, testados através do teste de imunodifusão em gel de agarose. O material foi levado ao laboratório de virologia da Embrapa Caprinos. Cada amostra foi acrescida de 8,0 ml de cloreto de amônio (0,84%) e centrifugado a 1500 rpm por 3 vezes. Após estas etapas, o sobrenadante (SN) foi distribuído em uma placa de 24 poços, previamente preenchidas por células de membrana sinovial caprina (MSC). Cada animal correspondeu a uma amostra diferente, sendo, portanto, inserido em poços distintos. Ao final da distribuição, os pellets restantes foram acrescidos de 0,3 ml de solução salina de PBS, sendo homogenizado. Esta mistura (PBS+Pellets) foi distribuída nos poços restantes, separadamente por animal. Após acrescentou-se 0,1 mL de MEM (meio essencial mínimo) sem SFB (soro fetal bovino) em todos os poços, inclusive o de controle negativo. A placa foi então incubada em ambiente controle do com 5% de CO₂ à 37°C durante uma hora para que houvesse a adsorção viral tanto nas amostras de LS, quanto do CAEV. Cork colocado nos poços de controle positivo. Transcorrido o tempo, adicionou-se 0,8 ml de MEM com 5% de SFB, 1% de anfotericina e 2% de penicilina e estreptomicina nas amostras. O controle positivo correspondeu aos poços inoculados com a amostra padrão CAEV-Cork (título 104,8TCID₅₀/mL) e o controle negativo aos poços inoculados somente com MEM, ambos processados nas mesmas condições das amostras de campo. Com trocas de meio a cada sete dias e passagem de células a cada 21 dias, sendo a monocamada examinada diariamente em microscópio invertido para verificação de efeito citopático (ECP) característico (presença de células mononucleadas ou sincícios). Após 63 dias na última passagem de células, foi realizada coloração da monocamada com cristal violeta a 0,1% para melhor visualização do ECP.

Resultados e Discussão

Foi possível observar a presença de sincícios nas células MSC inoculadas com todas as cinco amostras de LS, o que permite sinalizar a presença do vírus neste fluido celular. Observou-se, também, que duas das amostras apresentaram um efeito lítico maior que as outras amostras. As três amostras que apresentaram um efeito citopático são mais propícias para a produção de antígeno nacional e desta forma foram separadas para futuro trabalho.

Conclusão

O LS dos caprinos estudados apresenta provavelmente o vírus da Artrite Encefalite Caprina seja na forma livre, em células sinoviais e/ou em células do sistema monocítico-fagocitário. As amostras virais isoladas têm ação citopáticas ou líticas.