

VII Encontro de Iniciação Científica da Universidade Estadual Vale do Acaraú - UVA CO-CULTIVO DE LEUCÓCITO EM MEMBRANA SINOVIAL CAPRINA

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

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

Palavras-chave: Lentivírus, Co-cultivo, Leucócitos.

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

Introdução

Os lentivírus de pequenos ruminantes (LVPR) replicam-se predominantemente em células do sistema monocítico-fagocitário, sendo os macrófagos os preferencialmente infectados. Baseado na presença viral em macrófagos objetivou-se neste experimento observar a ação viral em cultivo celular de membrana sinovial caprina através da inoculação de papa de leucócitos de animais sabidamente soropositivos.

Materiais e métodos

Foi coletado através de venipuntura da jugular, sangue em tubos com anti-coagulante (EDTA) de dois animais soropositivos para CAEV. Coletaram-se dois tubos (5mL) de sangue de cada animal. Centrifugou-se o sangue a 1500 rpm por 10 min, após centrifugação formaram-se três fases distintas: hemácias, leucócitos e plasma. Desprezou-se o plasma, e coletaram-se os leucócitos com micropipeta (reclusão acidentada ou buff coat); as hemácias também foram desprezadas. Os leucócitos coletados separadamente e colocados em tubos contendo 8mL de cloreto de amônio (0,84%), homogeneizou-se a suspensão que foi centrifugada 1500 RPM por 5 minutos. Desprezou-se o cloreto de amônio, repetiu-se a lavagem por duas vezes. Ressuspendeu-se a amostra em 10 mL de PBS e centrifugou-se a 1500 RPM por 5 minutos; desprezou-se o PBS e adicionou-se novamente 1 mL de PBS. As amostras foram novamente homogeneizadas. Cada amostra foi inoculada em monocamadas de células de membrana sinovial caprina (MSC) obtidas a partir de explant de cabrito comprovadamente negativo para o CAEV e sub-cultivada previamente em placas de 24 poços e mantidas em solução de MEM, com 5% de soro fetal bovino, 1% de anfotericina e 2% de penicilina e estreptomicina que corresponde ao meio de manutenção de cultura de células. Para a inoculação das amostras foi retirado o meio das placas e a monocamada foi lavada duas vezes com PBS. Em cada poço foi colocado 200µL de leucócitos com 0,5 ml de MEM sem soro fetal bovino. 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 a coloração da monocamada com cristal de violeta a 0,1% para melhor visualização do ECP.

Resultados e Discussão

Todos os poços apresentaram formação de sincícios confirmando a presença do vírus em células do sistema monocítico-fagocitário e a ação citopática viral.

Conclusão

In vitro os LVPR infectam e replicam em macrófagos e em células de membrana sinovial podendo essa ser uma ferramenta para isolamento de cepas virais locais.