



Isolamento do lentivírus caprino pela técnica de cultivo de macrófagos e confirmação por PCR *nested*

Dalva Alana Aragão Azevedo¹, Samilly Mesquita Alves², Kelma Costa de Souza³, Talysson Bruno Chagas Sousa⁴, Alice Andrioli⁵, Raymundo Rizaldo Pinheiro^{6*}

¹Graduanda em Biologia Bacharelado pela Universidade Estadual Vale do Acaraú - UVA, bolsista CNPq/PIBIC;

²Graduanda em Zootecnia pela Universidade Estadual vale do Acaraú - UVA, bolsista FUNCAP;

³Doutoranda em Medicina Veterinária, pela Universidade Estadual do Ceará - UECE;

⁴Graduando em Biologia bacharelado pela Universidade Estadual Vale do Acaraú – UVA, bolsista FUNCAP;

⁵Pesquisadora EMBRAPA Caprinos e Ovinos;

⁶ Prof. Adjunto da UVA / Pesquisador EMBRAPA Caprinos e Ovinos; *Orientador; Autor para correspondência: rizaldo@cnpc.embrapa.br

Resumo: O vírus da Artrite Encefalite Caprina (CAEV) é um lentivírus da família *Retroviridae* que possui tropismo por células da linhagem monocítico-fagocitária. A maturação do monócito a macrófago estimula a replicação desses vírus. Objetivou-se com este estudo, padronizar o cultivo de monócitos/macrófagos, com posterior co-cultivo em membrana sinovial caprina (MSC), para isolamento do CAEV, a partir de células mononucleares do sangue periférico, além de visualizar o efeito citopático (ECP) na monocamada de MSC e identificar o DNA-proviral por reação em cadeia de polimerase (PCR). Foram cultivados macrófagos do sangue de sete cabras soropositivas para CAEV, pelo *Western Blotting*, provenientes de criatórios do Estado de Minas Gerais. Durante o isolamento, o sobrenadante do cultivo celular de cada amostra foi coletado para extração de DNA e, posteriormente, amplificado por PCR *nested*. A monocamada de células foi corada com cristal violeta (0,1%) para visualização do . Isolou-se o CAEV das sete amostras. Dessas, duas foram formadoras de sincício (célula multinucleada) e as demais tiveram um forte efeito lítico, sendo que todas elas apresentaram freqüentes resultados positivos na PCR.

Palavras-chave: CAEV, cultivo celular, DNA-proviral

Caprine lentivirus isolation by macrophages cultivation and confirmed by nested PCR

Abstract: The caprine arthritis encephalitis virus (CAEV) is a lentivirus of the *Retroviridae* family that has tropism for monocytic-phagocytic lineage cells. The maturation of monocyte to macrophage stimulates the replication of these viruses. The objective of this study, to standardize the monocytes / macrophages culture , with subsequent co-cultivation in goat synovial membrane (GSM) for isolation of CAEV from peripheral blood mononuclear cells, as well as view the cytopathic effect (CPE) in monolayer of MSC and identify the proviral DNA by polymerase chain reaction (PCR). Macrophages were cultured from the blood of seven goats seropositive for CAEV, by Western blotting, from farms of Minas Gerais state. During isolation, the supernatant cell culture of each sample was collected for DNA extraction and subsequently amplified by nested PCR. The monolayer cell was stained with violet crystal (0.1%) for viewing. CAEV was isolated from seven samples. Of these, two were forming syncytium (multinucleate cells) and the another had a stronger lytic effect, all of which showed frequent positive PCR results.

Key words: CAEV, cell culture, proviral DNA



Introdução

A artrite encefalite caprina (CAE) foi reconhecida internacionalmente como uma virose em 1980. O vírus causador dessa enfermidade (CAEV) pertence à família *Retroviridae* e causa uma doença crônica, caracterizada por artrite progressiva em animais adultos e encefalomielite desmielinizante em animais jovens. Após ser introduzido no organismo do animal, o CAEV infecta os monócitos, células do sistema imune fagocitário, nos quais integra seu genoma, escapando da resposta imune do hospedeiro e causando, assim, infecção persistente. Além disso, a expressão do gene viral é ativada quando os monócitos maturam para macrófagos (CALLADO *et al.* 2001). Objetivou-se com este estudo, padronizar o cultivo de monócitos/macrófagos, com posterior co-cultivo em membrana sinovial caprina (MSC), para isolamento do CAEV, a partir de células mononucleares do sangue periférico (CMSP) de animais soropositivos, visualizar o efeito citopático viral (ECP) na monocamada de MSC e identificar o DNA-proviral do CAEV por reação em cadeia de polimerase (PCR *nested*).

Material e Métodos

Tubos vacutainer de 5 mL com anti-coagulante (EDTA) foram utilizados para coleta de 15 mL de sangue, através de venipuntura da jugular de sete animais soropositivos para CAE pelo teste de *Western Blotting* (WB), provenientes de rebanhos do Estado de Minas Gerais. O sangue foi centrifugado e os leucócitos foram obtidos por sucessivas centrifugações e lavagens com cloreto de amônio (0,84%) e tampão fosfato, segundo Feitosa *et al.* (2010). Por fim, os leucócitos foram ressuspensos em 1 mL de meio RPMI (5% de soro fetal bovino – SFB, 2% de penicilina com estreptomicina e 1% de anfotericina). As amostras foram cultivadas em placas de seis poços. O meio foi trocado depois de 24 horas com RPMI, utilizando 2 mL em cada poço. Após uma semana de cultivo dos macrófagos, foram acrescentadas células de MSC em meio essencial mínimo (MEM) com 5% de SFB, 2% de penicilina e estreptomicina e 1% de fungison. A MSC foi obtida por “*explant*”, de cabrito comprovadamente negativo para CAE pelo WB e PCR de CMSP, subcultivada a partir da tripsinização das células. Realizou-se trocas de meio a cada sete dias e passagens a cada 15 dias. Os co-cultivos foram observados diariamente, em microscópio óptico invertido, por até 42 dias, para detectar alterações compatíveis com o efeito citopático viral. A cada troca de meio e passagem, os sobrenadantes celulares foram coletados e armazenados em freezer a -80°C. Para visualização de ECP, corou-se a monocamada com cristal violeta 0,1%, por 10 min, lavou-se com água destilada para retirar o excesso de corante e, em seguida, observou-se em microscópio óptico invertido. Por conseguinte, procedeu-se a extração de DNA a partir do sobrenadante celular, utilizando a técnica descrita por Feitosa *et al.* (2010). As amostras extraídas foram submetidas à amplificação por PCR *nested*, de acordo com a técnica descrita por Andrioli (2001).

Resultados e Discussão

Padronizou-se a técnica de cultivo de monócitos/macrófagos com posterior co-cultivo em MSC, isolando o CAEV de todas as amostras processadas. Identificou-se o DNA-proviral através da PCR *nested* e alguns efeitos citopáticos foram visualizados como formação de sincícios, morte e alterações morfológicas celulares (Figura 1). Todas as amostras apresentaram freqüentes resultados positivos para PCR, feitos ao longo do cultivo, no sobrenadante, o que comprova o isolamento do vírus. Foram consideradas positivas todas as amostras que apresentaram, pelo menos, dois resultados positivos pela PCR. Demonstrou-se que o cultivo dos macrófagos por uma semana levou à sua maturação e, conseqüentemente, à replicação do vírus, o que certamente agilizou o processo de isolamento viral, diminuindo o tempo de execução da técnica. Lima *et al.* (2004) e Tigre *et al.* (2006) demonstraram que a técnica de cultivo de macrófago e co-cultivo em MSC é eficiente para o isolamento do CAEV. As metodologias usadas pelos autores foram alvítres, com algumas modificações. Apesar de terem utilizado um protocolo diferenciado, Feitosa *et al.* (2010) também obtiveram êxito no isolamento do vírus, através do co-cultivo de leucócitos com MSC. Tigre *et al.* (2006) demonstraram que quando CMSP são cultivadas *in vitro*, há uma melhoria na detecção do DNA proviral pois o cultivo dos macrófagos aumenta o número de amplificações positivas. Neste trabalho, o volume de sangue utilizado foi de 15 mL, sendo considerado satisfatório para o isolamento.



Segundo sugerido por Tigre *et al.* (2006), o aumento do volume sanguíneo aumenta a sensibilidade da PCR, visto que o número de monócitos/macrófagos se torna maior.

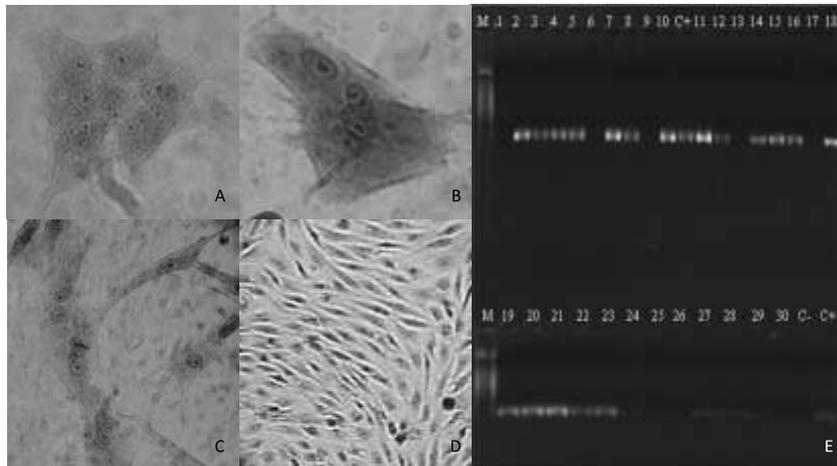


Figura 1: [A] Célula multinucleada (sincício), amostra 1613 MG; [B] sincício, amostra 1625 MG; [C] indica alterações celulares; [D] células sem infecção viral; [E] demonstração da eletroforese das amostras do isolamento amplificadas por PCR *nested*, amostras 1, 6, 9, 13, 17, 24, 25, 26 e 30 negativas, 27, 28 e 29 fraco positivas e as demais positivas, M = marcador molecular, C = controle negativo e C+ = controle positivo.

Conclusões

A técnica de cultivo de monócitos/macrófagos com posterior co-cultivo em MSC foi eficaz no isolamento do vírus. Foi possível observar o ECP provocado pelo CAEV, bem como identificar o DNA-proviral por PCR *nested*, para confirmação do isolamento viral. As cepas isoladas do estado de Minas Gerais foram incorporadas ao banco de microrganismos da Embrapa Caprinos e Ovinos. Tais cepas poderão ser, no futuro, analisadas geneticamente para comparação com as cepas referência (CAEV Cork, CAEV 63, Maedi-Visna K1514) e cepas nativas do Nordeste Brasileiro, a fim de conhecer a diversidade genética circulante desses vírus no Brasil.

Literatura citada

- ANDRIOLI, A. **Vírus da artrite encefalite caprina: PCR e isolamento em amostras de sêmen, fluido uterino e embriões**. Belo Horizonte, MG: UFMG – Escola de Veterinária, 68p., Tese (Doutorado), 2001.
- CALLADO, A. K. C.; CASTRO, R. S. de; TEIXEIRA, M. F. da S. Lentivírus de pequenos ruminantes (CAEV e Maedi-visna): revisão e perspectivas. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 21, n. 3, p. 87-97, 2001.
- FEITOSA, A. L. V. L.; TEIXEIRA, M. F. da S.; PINHEIRO, R. R.; CUNHA, R. M. S. da; LIMA, J. P. M.; ANDRIOLI, A.; DANTAS, T. V. M.; MELO, V. S. P. de; PINHEIRO, D. C. S. N. Phylogenetic analysis of small ruminant lentiviruses from Northern Brazil. **Small Ruminant Research**, v. 94, p. 205-209, 2010.
- LIMA, P. P.; ROCHA, M. A.; STANCEK, A. M. G.; GOUVEIA, G. D. R.; OLIVEIRA, G. D. R. Vírus da artrite encefalite caprina: isolamento e caracterização de parte do gene gag. **Arquivo Brasileiro Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 56, n. 2, p. 135-142, 2004.
- TIGRE, M. D.; CAMPOS, G. S.; SARDI, S. I. Isolamento e identificação do vírus da Artrite encefalite caprina, a partir do co-cultivo de células mononucleares do sangue com células de membrana sinovial de cabra. **Revista de Ciências Médicas e Biológicas**, Salvador, v. 5, n. 2, p. 124-131, 2006.