

Ciências Biológicas Integral

Julia Patire Rosolen

**PRODUÇÃO DE UM MODELO ANIMAL PARA
O ESTUDO DE DOENÇAS CAUSADORAS
DE DESMIELINIZAÇÃO DO SISTEMA
NERVOSO CENTRAL**



Rio Claro
2015

JULIA PATIRE ROSOLEN

PRODUÇÃO DE UM MODELO ANIMAL PARA
O ESTUDO DE DOENÇAS CAUSADORAS
DE DESMIELINIZAÇÃO DO SISTEMA
NERVOSO CENTRAL

Orientador: MARCUS ALEXANDRE FINZI CORAT

Co-orientadora: MARIA APARECIDA MARIN-MORALES

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado
ao Instituto de Biociências da Universidade
Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” -
Câmpus de Rio Claro, para obtenção do grau de
Bacharela em Ciências Biológicas.

Rio Claro
2015

573.8 Rosolen, Julia Patire
R822p Produção de um modelo animal para o estudo de doenças
causadoras de desmielinização do sistema nervoso central /
Julia Patire Rosolen. - Rio Claro, 2015
39 f. : il., figs., gráfs., tabs.

Trabalho de conclusão de curso (bacharelado - Ciências
Biológicas) - Universidade Estadual Paulista, Instituto de
Biotecnologia de Rio Claro

Orientador: Marcus Alexandre Finzi Corat

Coorientador: Maria Parecida Marin-Morales

1. Neurobiologia. 2. Desmielinização nervosa. 3. Infecção
viral. I. Título.

Dedico este trabalho aos meus inúmeros professores, que desde a formação básica até aqui me incentivaram, instigaram e ensinaram. Sem vocês, meu mundo seria restrito.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente, agradeço à Deus e à todos os que me guardam e guiam, salve! Chegar ao fim dessa etapa não foi uma tarefa fácil, mas a tarefa é menos pesada quando se tem amor e suporte. Minha eterna gratidão à minha família, em especial minha mãe Miran e meus avós Dalva e Heitor, por nunca me deixarem desistir ou cair, por me ensinarem o significado de amor incondicional, pelas conversas, conselhos e colos. . . meu riso é mais forte porque vocês estão comigo. Aos meus amigos, presentes ou não, por serem meus corações fora do peito, ovintes, boas companhias e estimuladores das minhas loucuras sãs; coloco aqui alguns nomes, mas mesmo que não estejam no papel, estão sempre em meu coração: Pedro, Loira, Nathan, Rafa, Thaís, Gaga, Oompa, Thomas, Gaby. Aos meus amigos companheiros de intercâmbio, os brazucas e os gringos, por fazerem desse tempo o melhor ano da minha vida, “special thanks to 96 corridor, for being the best roomies I could ever ask; for being my family abroad”, Amanda e Larissa, minhas filhas do coração e irmãos da alma. Às repúblicas que foram minhas casas, oficialmente ou não, Portal, Bar do Moe, Carrapicho e Fantástica, as boas lembranças serão eternas. Ao PET, PETianos e ao Prof.Dr. Flávio Caetano, por toda a experiência e conhecimento adquiridos ao longo dos anos. Ao CEMIMB/UNICAMP, seus funcionários e aos animais que me permitiram desenvolver esse projeto; aos meus amores do Laboratório de Controle Santiário, vocês são parte fundamental do sucesso desse TCC. Ao meu orientador, Marcus, por acreditar em uma aluna do primeiro ano de faculdade, cheia de sonhos, e dar à ela uma oportunidade, obrigada por todas as conversas acadêmicas e conselhos. Aos professores Gustavo Habermann e Sílvio Govone, por todas as conversas e ajudas durante a graduação. Ao CBI 2011, por tudo que passamos juntos. À UNESP, por ser a casa que abrigou meus sonhos e ofereceu tantas oportunidades, à FAPESP, por financiar este trabalho, ao MEC e CNPq, pelas bolsas e oportunidades durante minha graduação. Aos funcionários da UNESP, especialmente ao Gui e ao Marcão dor ERAPI, pela ajuda, incentivo e paciência. À todos os que compraram meus quitutes. Palavras não são suficientes para expressar o que eu sinto, então eu deixo aqui meus mais profundos e sinceros agradecimentos e uma vontade enorme de continuar encontrando vocês nas estradas desse vida. Luz e paz no coração de todos.

RESUMO

O vírus da encefalomielite murina de Theiler (TMEV) é um patógeno entérico natural de camundongos. Sendo o ciclo de vida desse vírus muito similar ao da Poliomielite, o TMEV vem sendo utilizado como agente para estudos de doenças causadoras de desmielinização do sistema nervoso central. Várias doenças infecciosas desmielinizantes ainda não são bem estudadas e, portanto, seus mecanismos de ação não são totalmente conhecidos. Muitas delas não possuem um tratamento eficaz e isso provavelmente se deve à dificuldade de se realizar estudos, tanto para o entendimento quanto para o tratamento dessas doenças, devido a intervenções e controles ambientais e experimentais limitados. Atualmente, os modelos de animais de laboratório existentes nesta linha de pesquisa estão voltados principalmente para o estudo do comportamento viral no organismo. Há poucos estudos voltados para tratamento de sequelas, devido à demora de obtenção dos animais sequelados crônicos, além da dificuldade de sucesso de tratamento destas sequelas. Portanto, faz-se necessário o desenvolvimento de um modelo animal rápido na sua obtenção, viável para estudos do processo de desmielinização e do avanço da doença, bem como que possibilite formas de tratamento de suas sequelas crônicas. Neste trabalho pretendemos desenvolver um modelo animal que possa nos auxiliar no melhor entendimento e refinar tratamentos das sequelas crônicas, testando diferentes linhagens de camundongos, doses do vírus TMEV GDVII e vias de inoculação; apesar das dificuldades, avanços foram obtido.

Observamos que a idade do animal, bem como seu perfil imunológico, influenciaram no desenvolvimento da doença e, em alguns casos, impediram que a mesma se desenvolvesse.

Além disso, linhagens com deficiência no sistema imune inato, como a C57BL/6 Lep^{ob}, mostraram-se mais promissoras na obtenção do modelo, quando inoculada intracerebralmente com o vírus TMEV GDVII, mostrando uma ligação relevante entre o aparecimento dos sintomas, a idade e o sistema imunológico inato, o que será importante para a evolução deste trabalho.

Palavras-chave: modelo animal, desmielinização nervosa, infecção viral.

SUMÁRIO

1.	INTRODUÇÃO	6
2.	OBJETIVOS	10
3.	MATERIAIS E MÉTODOS	11
3.1	Linhagem celular	11
3.2	Produção do antígeno viral	11
3.3	Determinação do título viral em cultura celular	12
3.4	Linhagem de camundongos	12
3.5	Inoculação viral	13
3.5.1	<i>Inoculação oral</i>	13
3.5.2	<i>Inoculação intraperitoneal</i>	13
3.5.3	<i>Inoculação intracerebral</i>	14
3.6	Análises dos sintomas	16
3.7	Metodologias de análise sorológica	16
3.7.1	<i>Imunofluorescência indireta para análise sorológica</i>	16
3.7.2	<i>Extração por TRIzol</i>	17
3.7.3	<i>Reação em cadeia da polimerase com transcrição reversa (RT-PCR)</i>	17
4.	RESULTADOS	19
4.1	Linhagem celular	19
4.2	Produção do antígeno viral	19
4.3	Determinação do título viral em cultura celular	19
4.4	Inoculação viral	20
4.4.1/ 4.4.2	<i>Inoculação via intraperitoneal e oral</i>	20
4.4.3	<i>Inoculação via Intracerebral</i>	22
4.5	Metodologias de análise sorológica	31
4.5.1	<i>Imunofluorescência indireta</i>	31
4.5.2	<i>Reação em cadeia da polimerase com transcrição reversa (RT-PCR)</i>	31
5.	CONCLUSÃO	33
6.	REFERÊNCIAS	38

1. INTRODUÇÃO

O vírus da encefalomielite murina de Theiler (TMEV) é um patógeno entérico natural de camundongos. Originalmente descrito por Theiler, o vírus pertence ao gênero *Cardiovirus*, da família *Picornaviridae*; são vírus pequenos (aproximadamente 28 nm), não envelopados e possuem uma fita simples de RNA com polaridade positiva (FAZAKERLEY E BUCHMEIER, 1993).

O ciclo de vida desse vírus é muito similar ao da Poliomielite (RUECKERT, 1996) sendo também largamente utilizado como modelo de estudo de esclerose múltipla. O grande uso de modelos animais infectados pelo TMEV decorre do fato dele ser um patógeno muito bem caracterizado, geneticamente simples, causar infecção em camundongos (modelos ideais para a pesquisa em laboratório), além de ser passível de modificações genéticas (BRAHIC, 2002).

Várias cepas do TMEV, além do isolado original (TO) foram obtidas e estudadas em vários lugares do mundo. As cepas FA, GDVII são muito virulentas quando inoculadas via intracerebral, oral ou nasal e causam uma encefalite aguda; já as cepas DA, BeAn, Yale, TO e WW são menos virulentas e capazes de causar uma doença desmielinizante crônica (FAZAKERLEY E BUCHMEIER, 1993). No entanto, Roos e colaboradores, em 1992, sugeriram que todas as cepas do vírus são capazes de persistir no SNC e provocar uma doença desmielinizante, desde que a infecção não seja letal.

Uma nova cepa (DA) descoberta por Daniels e colaboradores em 1952, após inoculada intracerebralmente, mostrou induzir dois tipos de lesões em camundongos adultos: polioencefalomielite aguda e desmielinização crônica do cordão espinhal. Esta foi considerada a primeira descrição de desmielinização induzida por vírus. O TMEV induziu a doença em duas fases em linhagens de camundongos susceptíveis (SJL/J). Durante a fase aguda, após a 1ª semana de infecção, o TMEV causou polioencefalomielite caracterizada por infecção e apoptose dos neurônios na porção cinzenta do cérebro. Durante a fase crônica, cerca de um mês após a infecção, o vírus infectou as células da glia e os macrófagos, induzindo a desmielinização inflamatória, apoptose dos

oligodendrócitos e degeneração dos axônios na massa branca e no cordão espinal (TSUNODA E FUJINAMI, 2010). Os animais que sobrevivem à essa poliomielite precoce desenvolveram uma infecção persistente no SNC com lesões de desmielinização do cordão espinal; essa doença de forma crônica parece ser mais facilmente alcançada em animais através do uso das cepas menos virulentas (DANIELS, 1952).

Lipton e seus colaboradores, em 1979, mostraram que camundongos inbred e outbred diferem em suscetibilidade quanto ao tempo da doença desmielinizante. Também foi demonstrado que as linhagens SJL/J e o DBA/2 são altamente susceptíveis, as linhagens C3H e AKR são linhagens de suscetibilidade intermediária e que algumas sublinhagens, como a BALB/c e a C57BL/6 são altamente resistentes (LIPTON E DAL CANTO, 1979).

As cepas mais virulentas (GDVII e FA) diferem das outras cepas por induzirem infecções com curto período de incubação (THEILER E GARD, 1940). Camundongos que foram inoculados pela via intracerebral com a cepa GDVII apresentaram encefalite aguda e morreram entre 24 - 48 horas. Animais infectados apresentaram como sintomas: perda de peso, pelos arrepiados, postura curvada e hiperexcitabilidade. A paralisia flácida das patas anteriores e posteriores também foi frequentemente observada (DOWNS, 1982; LIPTON E ROHZON, 1986).

Cepas menos virulentas provocam sintomas de acordo com a idade do animal (THEILER, 1937). Por exemplo, camundongos recém-desmamados morreram entre dois a três dias após inoculação do vírus, no entanto não apresentaram paralisia; em animais mais velhos, depois de um período de 7 a 30 dias, observou-se fraqueza das patas dianteiras que progredia para paralisia das patas traseiras e, algumas vezes, para a morte. Outro sinal clínico muito observado foi a incontinência urinária (DOWNS, 1982; LIPTON E ROHZON, 1986).

Três tipos de respostas caracterizam a doença clínica na infecção por TMEV, são elas: encefalite, poliomielite e doença desmielinizante. O genótipo do hospedeiro, o isolado e a via de inoculação são fatores que influenciam na manifestação da doença e sua gravidade (DOWNS, 1982).

Várias doenças infecciosas desmielinizantes ainda não são bem estudadas e, portanto, seus mecanismos de ação não são totalmente

conhecidos. São exemplos a esclerose múltipla, a poliomielite humana e a cinomose em animais. A poliomielite causa paralisia flácida de membros, fraqueza e falta de ar. Já a cinomose é uma doença viral muito comumente diagnosticada em cães e sua forma neurológica costuma ser fatal; esta, quando não leva o animal a morte, deixa sequelas como paraplegia, hiperestesia, tremores e convulsões (DE BRITO *et al.*, 2010). Atualmente, os animais acometidos por esta enfermidade, devido a um prognóstico severo e sem possibilidade de tratamento, são destinados ao sacrifício.

Há diversos trabalhos atuais demonstrando a eficácia do tratamento com células tronco na redução de sequelas de doenças causadoras de desmielinização. Um exemplo é a remissão total ou parcial das sequelas neurológicas da cinomose em cães, alcançados num trabalho de nosso laboratório com cães acometidos por cinomose e sequelas de paralisia decorrentes (DE BRITO *et al.*, 2010). Neste trabalho a terapia celular mostrou-se eficaz em 70% dos casos. No entanto, as causas do sucesso ou do insucesso do tratamento não puderam ser esclarecidas, principalmente pela falta de informações sobre o histórico dos animais e de variabilidade entre seus modos de vida, tempo de infecção, possíveis contaminantes e suscetibilidade genética dos mesmos. Soma-se a esta falta de informação a impossibilidade de intervenções investigativas, pois estes não pertencem ao grupo de animais de laboratório desenvolvidos com finalidade de pesquisa.

A falta de um tratamento eficaz provavelmente se deve à dificuldade de se realizar estudos, tanto para o entendimento quanto para o tratamento dessas doenças, em humanos e animais grandes, devido a intervenções e controles ambientais e experimentais limitados. De maneira geral, os modelos de animais de laboratório existentes hoje nesta linha de pesquisa, estão voltados principalmente para o entendimento do comportamento viral no organismo e consequentes sequelas e morte. Estudos voltados para tratamento de sequelas são pouco realizados pela demora de obtenção dos animais sequelados crônicos, assim como pela dificuldade de sucesso de tratamento destas sequelas. Por esse motivo, faz-se necessário o desenvolvimento de um modelo animal rápido na sua obtenção e viável para estudos do processo de desmielinização e o avanço da doença, bem como formas de tratamento de suas sequelas crônicas. Sendo assim, este trabalho

corresponde ao desenvolvimento de um modelo animal controlado de camundongo que possa nos auxiliar no melhor entendimento das doenças e refinar tratamentos das sequelas crônicas, aliados aos resultados de sucesso obtidos por nosso grupo com o tratamento através da terapia celular em cães acometidos pela cinomose, como citado anteriormente.

Sendo que a maioria dos estudos virais envolvendo TMEV não se preocupam com a sobrevivência do modelo animal e sim com apresentação de sintomas de forma rápida para estudos do comportamento viral, altas doses de vírus são inoculadas direcionando o animal, em sua maioria, à óbito. No entanto, quadros com sequelas motoras crônicas que correspondem à realidade epidemiológica da doença causadas por este tipo viral são raramente observados. Sendo estes encarados mais como artefatos de tratamento/resposta do que como objetivo de estudo. Observando esta lacuna da literatura, nosso trabalho se preocupou em observar a tênue variação da resposta imunológica de animais infectados através de suas respostas de morte, sequela ou cura, alterando doses e vias de administração, comparadas com a variação da resistência genética de linhagens de camundongos isogênicas sensíveis ou resistentes a infecção por TMEV. Com isso, coletamos informações iniciais que contribuirão significativamente neste caminho à obtenção de um modelo que possa desenvolver uma doença desmielinizante consistente, apresentando sequelas crônicas de paralisia de membros posteriores sem morte e mais correspondente à realidade epidemiológica das doenças desmielinizantes.

2. OBJETIVOS

O objetivo desse trabalho foi desenvolver um modelo animal de desmielinização infecciosa do sistema nervoso central, utilizando a cepa de vírus TMEV GDVII em diferentes linhagens isogênicas de camundongos, para possibilitar estudos de patologias de desmielinização nervosa decorrentes de infecção viral.

Objetivos específicos:

1. Produção do antígeno viral, utilizando a cepa viral TMEV-GDVII em cultura celular permanente de fibroblastos de rim de hamster e determinar a dose infectante do vírus em cada passagem.
2. Teste da dose e via de inoculação mais apropriada para que seja causada a fase crônica da doença, ou seja, o processo de desmielinização. Para tanto, verificamos três vias de inoculação: oral, intracerebral e intraperitoneal.
3. Análise dos sintomas apresentados por diferentes grupos de animais, divididos de acordo com sua susceptibilidade à infecção do TMEV, após a inoculação viral e desenvolvimento da doença desmielinizante, analisando as sequelas neurológicas (paralisia das patas) e casos de morte.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Linhagem celular

Para a proliferação da amostra da cepa TMEV-GDVII utilizada na realização dos experimentos empregamos a linhagem celular BHK-21 (Baby Hamster Kidney), originada de fibroblastos de rim de hamster.

As células foram cultivadas em garrafas plásticas descartáveis de 75cm² (Costar, USA) e mantidas em meio Mínimo Essencial de Eagle com sais de Earle (MEM-Nutricell), suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB) (Nutricell) e 100UI/ml Penicilina (Fontoura-Wieth), 100µg/ml Estreptomicina (Sigma, USA), como descrito por Freshney (1993). As células foram mantidas a 37°C em atmosfera úmida contendo 5% CO₂ e diariamente observadas em microscópio invertido (Reichert Jung, Bio Star).

3.2 Produção do antígeno viral

Utilizamos a cepa TMEV-GDVII como amostra padrão para produzir o antígeno viral. Inoculamos monocamadas confluentes de células BHK-21 com 1,0 ml da suspensão viral e o inóculo foi mantido por 90 minutos a 37°C em atmosfera úmida com 5% CO₂. Passado o período de adsorção, adicionamos 15 ml de meio Mínimo Essencial de Eagle (MEM-Eagle), contendo 2% de SFB, 100UI/ml de Penicilina e 100µg/ml Estreptomicina. As células continuaram mantidas a 37°C em atmosfera úmida com 5% CO₂.

Foi realizada a observação do efeito citopático (ECP) e depois as células infectadas foram congeladas e descongeladas por três vezes, afim de que ocorresse a lise celular. O material foi centrifugado a 5.000 rpm por 15 minutos a 4°C (Beckman Instruments®-JC-21, rotor JA14). Os sobrenadantes adquiridos foram aliqüotados em ampolas de criogenia (Corning, USA) e depois congelados em freezer a -80°C, até o momento de utilização.

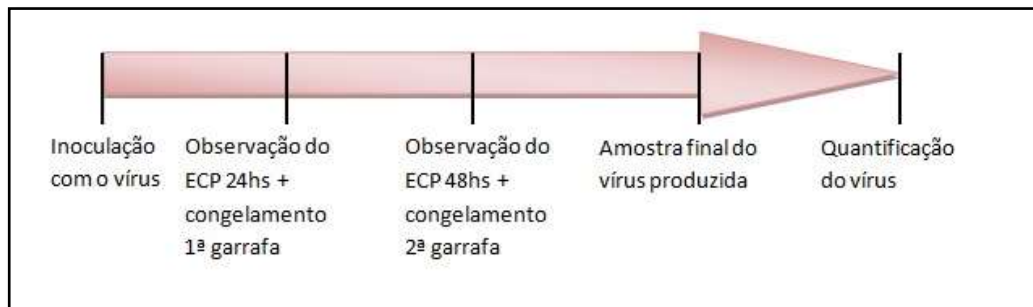


Figura 1: Linha do tempo da produção da amostra de vírus. ECP - efeito citopático

3.3 Determinação do título viral em cultura celular

Realizamos a metodologia descrita por Hierholzer & Killington (1996), afim de determinar o título viral da amostra produzida. Monocamadas confluentes de células BHK-21 foram tripsinizadas e ressuspensas em meio de cultivo contendo 10% SFB, de maneira que contivessem 2×10^5 células/ml; adicionamos 100µl dessa suspensão em cada poço de uma placa de 96 orifícios (Costar, USA). As placas foram mantidas em atmosfera úmida a 37°C com 5% CO₂ por 24 horas. Posteriormente, adicionamos 100 µl de cada amostra nas diluições 10^{-3} a 10^{-13} . Na sequência, incubamos a reação por 1 hora em estufa com 5% CO₂ para adsorção e depois retiramos o inóculo e adicionamos meio de cultivo contendo 2% de SFB. A monocamada de células BHK-21 não infectadas foram utilizadas como controle negativo da reação. Realizamos as leituras 24 e 48 horas após a infecção e o título viral foi determinado de acordo com o método de Spearman (1908) e Kraber (1931).

3.4 Linhagem de camundongos

Nos testes realizados, utilizamos camundongos SPF (specific pathogen free) das linhagens CBA, C3H/HePas, C57BL/6 INF-γKo, B6.V-Lep^{ob} e C57BL/6 com 4 semanas de vida e camundongos BALB/c e C3H/HePas com 20 dias de vida, ambos obtidos no Centro Multidisciplinar para Investigações Biológicas (CEMIB/UNICAMP). Os animais foram mantidos sob sistema de barreiras de miniisoladores em racks ventiladas, no próprio CEMIB, com água e ração esterilizadas em vapor úmido sob pressão, à temperatura de 121°C por 30 minutos.

3.5 Inoculação viral

Conforme autorizado pelo protocolo aprovado pelo Comitê de Ética no Uso de Animais da Universidade Estadual de Campinas – CEUA/UNICAMP, protocolo nº 3091-1, foram realizadas inoculações via oral, intraperitoneal e intracerebral, com diferentes diluições do vírus TMEV GDVII.

Comparamos os efeitos e resultados das três vias de inoculação testadas neste trabalho. Será considerada a via mais apropriada aquela que permitir a infecção do animal com o vírus e o desenvolvimento da fase aguda da doença, sem causar a morte do animal, possibilitando o surgimento da fase crônica com sequela desmielinizante.

3.5.1 *Inoculação oral*

Foram utilizados 9 camundongos C3H/HePas e 9 animais C57BL/6, separados em três grupos que receberam doses diferentes do vírus. Utilizamos para esse piloto a amostra padrão do laboratório, pois esta já se encontrava corretamente titulada e, de acordo com a capacidade de causar efeito citopático em cultura de células, realizamos as diferentes diluições do vírus. Sendo o título viral da amostra $10^{-5,25}$ TCID₅₀/ml, podemos calcular a maior diluição capaz de causar 50% ou mais de efeito citopático em uma monocamada confluyente de células BHK-21; as diluições foram realizadas de modo que fossem, capazes de causar 50, 100 e 150% de efeito citopático em cultura de células.

Inoculamos 3 animais de cada linhagem com 0,1ml de cada uma das diluições, para tanto, utilizamos o procedimento de gavagem.

3.5.2 *Inoculação intraperitoneal*

Utilizamos 9 camundongos da linhagem C3H/HePas e 9 animais da linhagem C57BL/6, divididos em 3 grupos e infectados com as mesmas diluições utilizadas na via oral. Os animais do procedimento anterior de inoculação oral correspondentes a 50 e 100% de efeito citopático, sem

resposta de sequelas, foram reinoculados, a fim de amenizar a possibilidade de morte do animal. Em cada grupo experimental havia, para cada linhagem, 1 animal nunca antes inoculado, 1 animal previamente inoculado via oral com a diluição 50% ECP e 1 animal previamente inoculado via oral com a diluição 100% ECP. A injeção intraperitoneal foi feita com 0,1ml de cada uma das soluções.

Sendo que nos experimentos pilotos anteriores não tivemos resultados, realizamos ainda mais um experimento visando uma maior agressividade, com uma maior concentração viral e com inoculação via intraperitoneal. Aqui, utilizamos 9 animais de cada linhagem nunca antes inoculados, onde foram inoculadas novas diluições de diferentes amostras virais. Foram utilizadas uma amostra produzida recentemente pela aluna e também a amostra padrão do laboratório. As diluições feitas foram as seguintes: amostra padrão diluída 1/100 em Mínimo Essencial de Eagle com sais de Earle (MEM-Nutricell), amostra produzida diluída 1/100 em Mínimo Essencial de Eagle com sais de Earle e amostra produzida sem diluição. Os grupos experimentais foram os seguintes: 3 animais de cada linhagem para a amostra produzida diluída 1/100; 3 animais de cada linhagem de cada linhagem para a amostra produzida não diluída; 3 animais C3H e 2 animais C57BL/6 para a amostra padrão diluída 1/100.

3.5.3 Inoculação intracerebral

Utilizamos para esse experimento animais das linhagens B6.V-Lep^{ob} , C57BL/6 , CBA , C3H/HePas e C57BL/6 INF- γ Ko, com 28 dias de vida e animais das linhagens BALB/c e C3H/HePas, com 21 dias de vida, obtidos no Centro Multidisciplinar para Investigações Biológicas (CEMIB/UNICAMP). Todos os animais foram pesados (faixa de peso entre 19 e 22g) e previamente anestesiados com Ketamina e Xilasina em solução salina na dosagem de 150mg/Kg e 10mg/Kg, respectivamente, e também tratados com Ibufreno (100 mg/ml) na dosagem de 15 mg/Kg, segundo o protocolo abaixo:

Ketamina

150mg – 1 kg

X – 0,020 kg

X= 2mg de Ketamina para cada 20g de peso do animal**Xilasina**

10mg – 1 kg

X – 0,020 kg

X= 0,2mg de Xilasina para cada 20g de peso do animal

Adicionamos solução salina à Ketamina e a Xilasina, de maneira que um animal de 20g recebesse 100 µl de anestésico

Ibuprofeno

15mg – 1 kg

X – 0,020 kg

X = 0,3 mg de Ibuprofeno num volume de 15 µl/animal

As dosagens de Ketamina, Xilasina e Ibuprofeno foram adequadas de acordo com peso de cada animal submetido à cirurgia.

Nesse experimento foram utilizadas as seguintes linhagens: C57BL/6 , CBA, C3H/HePas, C57BL/6 INF-γKo, B6.V-Lep^{ob} e BALB/c, divididos em grupos experimentais que receberam diferentes dosagens da amostra viral produzida para esses experimentos.. As dosagens utilizadas para inocular os grupos foram a alíquota produzida sem diluição (D1), e diluída 1:100 em meio Mínimo Essencial de Eagle (MEM) (D2) e o grupo controle recebeu somente o meio de cultura MEM puro.

Grupos experimentais:

Tabela 1 Grupos experimentais utilizados na inoculação intracerebral. Camundongos com 28 dias de vida.

Grupo	Linhagem	Nº camundongos dose D1	Nº camundongos dose D2	Nº camundongos controle
G1	B6.V-Lep ^{ob}	4	4	4
G2	C57BL/6	5	4	4
G3	CBA	2	2	1

G4	C3H/HePas	2	2	1
G5	C57BL/6 INF- γ Ko	1	1	1

Tabela 2 Grupos experimentais utilizados na inoculação intracerebral. Camundongos com 21 dias de vida.

Grupo	Linhagem	N° camundongos dose D1	N° camundongos dose D2	N° camundongos controle
G6	BALB/c	3	3	1
G7	C3H/HePas	4	4	2

3.6 Análises dos sintomas

Os animais inoculados foram observados diariamente por 31 dias, durante os quais analisamos sua desenvoltura fisiológica e motora, buscando perceber se havia sintomas como prostração, paralisia de patas anteriores e/ou posteriores ou qualquer outra sequela neurológica motora, também analisamos a mortalidade.

3.7 Metodologias de análise sorológica

3.7.1 Imunofluorescência indireta para análise sorológica

Realizamos a reação de imunofluorescência indireta como descrito por KRAFT & MEYER, 1986. O teste de imunofluorescência indireta foi utilizado para analisar as amostras de soro dos camundongos inoculados intraperitonealmente no segundo experimento realizado.

Foram utilizados 25 μ l dos soros testes diluídos 1:5 em tampão PBS 0,01M (pH 7,2), também foram utilizadas amostras de soro controle negativo e controle positivo padrões do laboratório. As amostras foram adicionadas em cada poço e incubadas à temperatura ambiente em câmara úmida por 20 minutos. As lâminas foram submetidas a lavagens sucessivas com tampão PBS 0,01M. Depois foram acrescentados 25 μ L de conjugado de carneiro anti-IgG de camundongo (Sigma-Aldrich), marcado com fluoresceína diluído a 1:160 em solução PBS - Azul de Evans em cada poço e incubamos as lâminas

novamente.. Montamos as lâminas em lamínula de vidro utilizando solução de glicerina tamponada alcalina (0,5M, pH: 8,5).

As leituras foram realizadas em microscópio binocular de fluorescência de epi-iluminação (ZEISS, Alemanha) modelo Standart 20, lâmina de mercúrio HBO 50W para luz ultravioleta, barreira de 450 a 490nm, filtros de excitação BG 38 e aumento final de 400 vezes. As amostras de soro serão classificadas como positivas, negativas e fluorescência não específica.

3.7.2 Extração por TRIzol

Utilizando TRIzol (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA), extraímos o RNA total de amostras de células BHK-21 Hn infectadas com a cepa padrão do vírus TMEV-GDVII e amostras de suspensão de fezes 20% de camundongos inoculados preparada em tampão PBS 0,01M. 900µL de TRIzol foi adicionado para cada 300µL de amostra e esta mistura foi incubada por 5 minutos à temperatura ambiente. Depois foram adicionados 240µL de clorofórmio gelado e novamente incubado por 5 minutos à temperatura ambiente. As amostras foram centrifugadas a 9.500 xg por 15 minutos a 4°C e depois de coletarmos a fase aquosa precipitamos o RNA com isopropanol gelado (v:v) por 10 minutos. Esta mistura foi então centrifugada a 9.500 xg rpm por 10 minutos a 4°C, o sobrenadante foi descartado e o precipitado ressuspense em 1,0 mL de etanol 75%. Após agitação em vortex (Daigger Vortex Genie 2TM), realizamos uma nova centrifugação a 9.500 xg por 5 minutos a 4°C RNA ressuspendido em 40µL de água DEPC, e aquecido por 55°C por 10 minutos.

3.7.3 Reação em cadeia da polimerase com transcrição reversa (RT-PCR)

O RNA total extraído das amostras de fezes dos animais inoculados e da cepa padrão do vírus foi utilizado para a reação de RT-PCR. Os oligonucleotídeos utilizados foram sintetizados e direcionados à região do capsídeo viral de TMEV-GDVII (Forward: 5'- TGA CCC CCC TGA CCT ACC CTT – 3') e (Reverso: 5'- CGC CCA TGC ACA CGA GCA TTC-3').

Utilizamos random hexamer *primer* na concentração de 100 μ M e 10 μ L do RNA, a fim de sintetizar o cDNA. Incubamos a reação por 5 minutos a 65°C e depois foi imersa em banho de gelo. Foi usado na transcrição reversa tampão concentrado em 5x contendo 50mM Tris-HCl pH 8,3, 75mM KCl, 3mM MgCl₂ e 200U da enzima RevertAid H-minus M-MuLV (Thermo Fisher Scientific, Brazil) em um volume de reação de 20 μ l. O RT-PCR foi feito em termociclador BioER (Gene Pro Block B 96G) a 25°C por 10 minutos, 42°C por 60 minutos, e depois inativado a 70°C por 10 minutos.

Utilizamos como tampão (20mM Tris-HCl (pH 8,4), 50mM KCl), 10mM dNTP (dATP, dCTP, dTTP, dGTP), 1,5mM de MgCl₂, 0,5 μ M de cada *primer* e 2,5U da enzima TAQ DNA polimerase (Thermo Fisher Scientific, Brazil), água tratada com DEPC (Gibco, BRL.) e o cDNA descrito anteriormente. Em seguida, as amostras foram submetidas à desnaturação em termociclador a 95 °C por 15 minutos e submetidas a 30 ciclos de amplificação: 94°C por 2 minutos, 59,6 °C por 2 minutos e 72°C por 1 minuto. A extensão ocorreu a 72° C por 10 minutos. Utilizamos controles positivos e negativos sendo o controle negativo água DEPC. Os produtos amplificados foram submetidos à eletroforese (80V por 50 min em cuba horizontal) em gel de agarose 2% em tampão TAE 1x, juntamente com marcador de peso molecular de DNA com 100pb (Thermo Fisher Scientific, Brazil). Os amplificados foram contrastados com brometo de etídeo. As bandas obtidas foram visualizadas e documentadas em fotodocumentador (Geldoc-It™ Imaging System UVP (Cambridge)).

4. RESULTADOS

4.1 Linhagem celular

A linhagem celular BHK-21 foi utilizada para a produção do vírus, tendo em vista que essa linhagem celular é aderente e forma um tapete celular confluyente, sendo propício para o desenvolvimento do vírus TMEV GDVII.

4.2 Produção do antígeno viral

A infecção pelo vírus TMEV causa efeito citopático caracterizado por arredondamento celular e despreendimento da monocamada (LIPTON & ROHZON, 1986). De acordo com as observações das culturas celulares infectadas, pudemos notar uma boa virulência da amostra viral pelo efeito citopático observado, tendo em vista que em, no máximo, 48 horas o tapete de células havia sido quase completamente destruído. Após o procedimento para lise celular e separação do vírus das células da cultura, foram obtidos dois lotes de vírus, que foram estocados em alíquotas a -80°C.

4.3 Determinação do título viral em cultura celular

A metodologia utilizada para determinar a dose infectante do vírus foi a TCID₅₀ (dose infectante de 50% da cultura de tecido), onde considera-se como resultado positivo a diluição viral onde houvesse 50% ou mais de ECP e o cálculo do título viral é realizado segundo o método de SPEARMAN (1908) e KRABER (1931).

Realizamos quatro repetições dessa etapa do projeto e não foi possível obter o título viral, devido ao crescimento demasiado das células ou ausência de ECP. Nas primeiras repetições, o crescimento exagerado do tapete de células dificultou definir a porcentagem de efeito citopático nos poços infectados com as diferentes diluições de vírus.

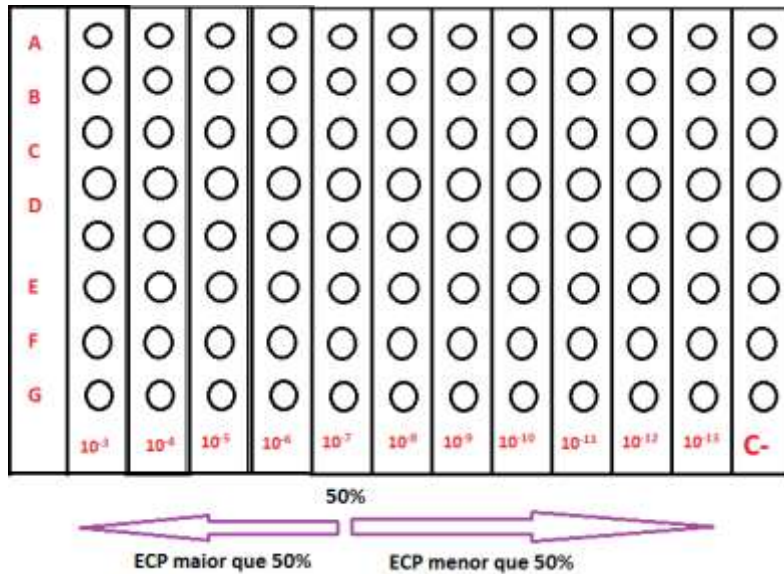


Figura 2: Esquema da análise da placa de 96 poços infectada pelo TMEV, segundo a metodologia de TCID 50.

. Nas repetições seguintes o vírus não causou danos à camada de células e portanto, não foi possível detectar o efeito citopático necessário para dar prosseguimento à quantificação. Isto se explicou devido a uma falha elétrica no briofreezer do laboratório que fez com que a alíquota do vírus perdesse sua capacidade de infecção.

Com isso, decidimos utilizar uma amostra padrão do laboratório pré-quantificada e infectante, mantida em outro biofreezer, para dar andamento aos nossos experimentos.

4.4 Inoculação viral

4.4.1/ 4.4.2 Inoculação via intraperitoneal e oral

TCID50 é a diluição requerida da amostra viral para infectar 50% das células inoculadas, sendo assim, a partir do título viral da amostra padrão do laboratório, $10^{-5,25}$ TCID50/ml, pudemos calcular diluições para que a alíquota tivesse 100% de infecção das células inoculadas e 150% de infectividade.

Os animais do primeiro experimento dos grupos 50%, 100% e 150% de efeito citopático em células, inoculados via oral, foram mantidos sob

observação diária para analisar o aparecimento de sintomas, porém, até 30 dias pós-infecção (dpi) eles ainda não apresentavam nenhum tipo de alteração comportamental ou motora (Tabela 3a). Os animais do grupo 150% foram mantidos até 60 dpi e, ainda assim, não apresentaram sinais clínicos da doença (Tabela 3b).

Tabela 3 A: Análise de sintomas no primeiro experimento

Sintomas em 30 dpi	Grupo 150%	Grupo 100%	Grupo 50%
Paralisia membros anteriores	Ausente	Ausente	Ausente
Paralisia membros posteriores	Ausente	Ausente	Ausente
Dificuldades motoras	Ausente	Ausente	Ausente
Morte	Ausente	Ausente	Ausente

Tabela 3B: Análise de sintomas do grupo 150% ECP

Sintomas em 60 dpi	Grupo 150%
Paralisia membros anteriores	Ausente
Paralisia membros posteriores	Ausente
Dificuldades motoras	Ausente
Morte	Ausente

No segundo experimento, a inoculação via intraperitoneal ocorreu com reinoculação de alguns animais do grupo de inoculação oral (100% e 50%) e inoculação de animais não inoculados previamente. Novamente, em 30 dpi nenhum dos animais apresentava sinais clínicos do desenvolvimento da fase aguda da doença. Os animais foram sacrificados e coletamos fezes e sangue para realizar testes sorológicos a fim de verificar a presença do vírus no organismo.

Tabela 4: Análise de sintomas no segundo experimento em 30 dpi

Sintomas em 30 dpi	Grupo 150%	Grupo 100%	Grupo 50%
Paralisia membros anteriores	Ausente	Ausente	Ausente
Paralisia membros posteriores	Ausente	Ausente	Ausente
Dificuldades motoras	Ausente	Ausente	Ausente
Morte	Ausente	Ausente	Ausente

Os animais do terceiro experimento foram inoculados via intraperitoneal com amostras mais concentradas, considerando diluições menores ou nenhuma como no caso dos experimentos anteriores, a fim de se aumentar a agressividade da infecção. Além disso, uma amostra de vírus recém-extraída foi utilizada para o experimento. Os animais foram sacrificados com 21 dpi e, ainda assim, não apresentaram nenhum tipo de sintoma.

Tabela 5: Análise de sintomas no terceiro experimento em 30 dpi

Sintomas em 21 dpi	Grupo padrão 1/100	Grupo 1/100 Recém-extraída	Grupo puro (s/ diluição) Recém-extraída
Paralisia membros anteriores	Ausente	Ausente	Ausente
Paralisia membros posteriores	Ausente	Ausente	Ausente
Dificuldades motoras	Ausente	Ausente	Ausente
Morte	Ausente	Ausente	Ausente

4.4.3 Inoculação via Intracerebral

Ao realizarmos a inoculação do vírus pela via intracerebral pudemos observar o desenvolvimento da fase aguda da doença em vários dos grupos experimentais. Foram observados sintomas como perda de equilíbrio,

movimentação circular, paralisia de patas posteriores, costas encurvadas e pelos eriçados (Figuras 5, 6, 7, 8, 9 e 10).

O tempo decorrido entre a infecção dos animais e a aparição dos primeiros sintomas variou entre os grupos, indo de 1 dpi até 14 dpi.

As figuras 3 e 4 mostram um animal do grupo experimental G2 (C57BL/6 com 4 semanas) inoculado com a dose não diluída do vírus (D1) em 1 dpi, apresentando os sintomas de paralisia de patas posteriores, costas encurvadas e pelos eriçados.



Figura 3: Animal do grupo G2 em 1 dpi apresentando sintoma típicos da fase aguda da doença causada pelo TMEV GDVII, como pelos eriçados e paralisia de membros posteriores.



Figura 4: Mesmo animal da figura 1, em 1 dpi, destaque para a pata posterior esquerda apresentando paralisia.

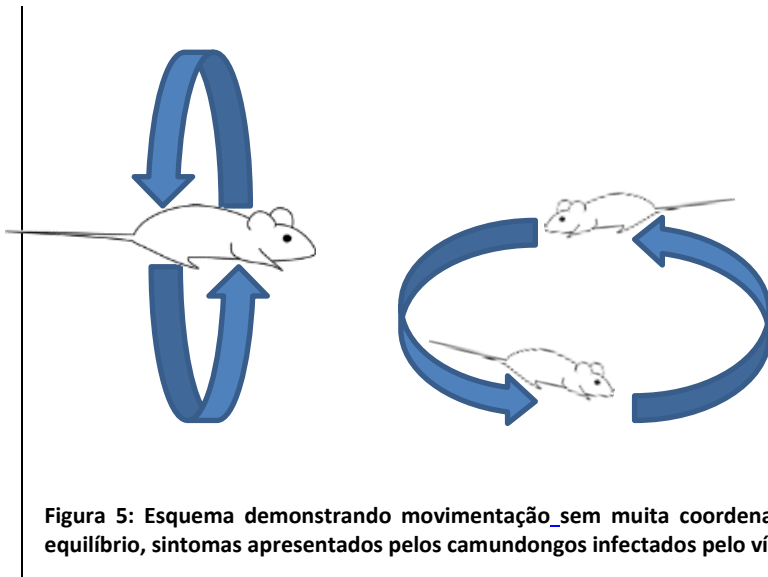


Figura 5: Esquema demonstrando movimentação sem muita coordenação, movimentos circulares e perda de equilíbrio, sintomas apresentados pelos camundongos infectados pelo vírus TMEV GDVII e gravados em vídeos.

Foi possível observar uma variação entre os grupos experimentais no que diz respeito a reação ao vírus. Em alguns grupos (G3, G4 para ambas as doses, G5 dose diluída e G6 dose pura) os animais não apresentaram nenhum

sintoma durante todo o tempo em que foram mantidos em observação, outros (G2 e G6 para a dose não diluída e G5 para a dose diluída) onde houve recuperação de todos os indivíduos ou até mesmo uma grande taxa de mortalidade dentro do grupo.

Abaixo está o detalhamento sobre os resultados obtidos para cada um dos grupos experimentais em relação à dose viral inoculada.

Tabela 6: Aparecimento de sintomas, mortes, recuperação e reaparecimento de sintomas em cada grupo experimental ao longo de 31DPI.

Grupo	Diluição	N° Sintomas / DPI	N° Mortes / DPI	N° Recuperação / DPI	N° Reaparecimento / DPI
1	Sem	4 animais/10DPI	1 animal / 12DPI	3 animais/12DPI	1 animal/21DPI – morte
1	1:100	2 animais/3DPI	1 animal/3DPI 1animal/4DPI	1 animal/5DPI	X
2	Sem	5 animais/1DPI	X	5 animais/até 12DPI	X
2	1:100	4animais/1DPI	1 animal/4DPI 1 animal/ 11DPI	2 animais/4DPI	1 animal/11DPI Canibalizado em 12DPI
3	Sem	0 animais/até 31 DPI	X	X	X
3	1:100	0 animais/até 31 DPI	X	X	X
4	Sem	0 animais/até 31DPI	1 animal/11DPI Sem sintomas	X	X
4	1:100	0 animais/até 31 DPI	X	X	X
5	Sem	0 animais/até 31 DPI	X	X	X
5	1:100	1 animal/1DPI	X	1 animal/3DPI	X
6	Sem	1 animal/14DPI	X	1 animal/16DPI	X
6	1:100	0 animais/até 31DPI	1 animal/19DPI Sem sintomas	X	X
7	Sem	2 animais/3DPI	1 animal/3DPI –s/ sintomas 2 animais/5DPI		
7	1:100	0 animais/até 31DPI	1 animal/4DPI Sem sintomas	X	X

As tabelas 7 e 8 mostram, para cada dose viral, a reação dos animais de cada grupo ao longo dos 31 dias em que ocorreu a observação dos resultados do experimento.

Tabela 7: porcentagem de animais afetados pela doença ao longo de 31 DPI, após inoculados com a dose não diluída do vírus (D1). Mortes são representadas pela constância do valor.

DPI	G1	G2	G3	G4	G5	G6	G7
1	0,00%	100,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%
2	0,00%	100,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%
3	0,00%	100,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	75,00%
4	0,00%	100,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	75,00%
5	0,00%	100,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	75,00%
10	100,00%	100,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	75,00%
11	100,00%	100,00%	0,00%	50,00%	0,00%	0,00%	75,00%
12	25,00%	0,00%	0,00%	50,00%	0,00%	0,00%	75,00%
14	25,00%	0,00%	0,00%	50,00%	0,00%	33,33%	75,00%
19	25,00%	0,00%	0,00%	50,00%	0,00%	0,00%	75,00%
21	50,00%	0,00%	0,00%	50,00%	0,00%	0,00%	75,00%
31	50,00%	0,00%	0,00%	50,00%	0,00%	0,00%	75,00%

Tabela 8: porcentagem de animais afetados pela doença ao longo de 31 DPI, após inoculados com a diluição 1:100 do vírus (D1). Mortes são representadas pela constância do valor.

DPI	G1	G2	G3	G4	G5	G6	G7
1	0,00%	100,00%	0,00%	0,00%	100,00%	0,00%	0,00%
2	0,00%	100,00%	0,00%	0,00%	100,00%	0,00%	0,00%
3	75,00%	100,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%
4	75,00%	50,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	25,00%
5	50,00%	50,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	25,00%
10	50,00%	50,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	25,00%
11	50,00%	75,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	25,00%
12	50,00%	50,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	25,00%
14	50,00%	50,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	25,00%
19	50,00%	50,00%	0,00%	0,00%	0,00%	33,33%	25,00%
21	50,00%	50,00%	0,00%	0,00%	0,00%	33,33%	25,00%
31	50,00%	50,00%	0,00%	0,00%	0,00%	33,33%	25,00%

É possível notar que os animais que foram encontrados mortos e haviam apresentados os sintomas da doença se encontravam muito debilitados, devido à virulência do vírus, conforme mostram as figuras 6, 7 e 8.



Figura 6: animal do grupo G2, infectado com a diluição 1:100 do vírus, morto em 1 DPI, apresentando encurvamento das costas e paralisia de membros posteriores.



Figura 7: animal do grupo G2, infectado com a diluição 1:100 do vírus, morto em 11 DPI. Apresentava paralisia de patas posteriores, costas encurvadas e falta de equilíbrio.



Figura 8: visão da outra lateral do animal mostrado na figura 7.

Os gráficos abaixo comparam a aparição de sintomas entre os grupos experimentais ao longo dos dias de observação, os dados de cada dose foram separados em dois gráficos a fim de facilitar sua visualização. A subida dos valores dos gráficos indica que houve o aparecimento de novos animais com sintomas ou mortos, a queda do valor indica a recuperação dos animais; quando o gráfico se mantém constante, não houve aparecimento de novos animais doentes ou mortos e nem recuperação.

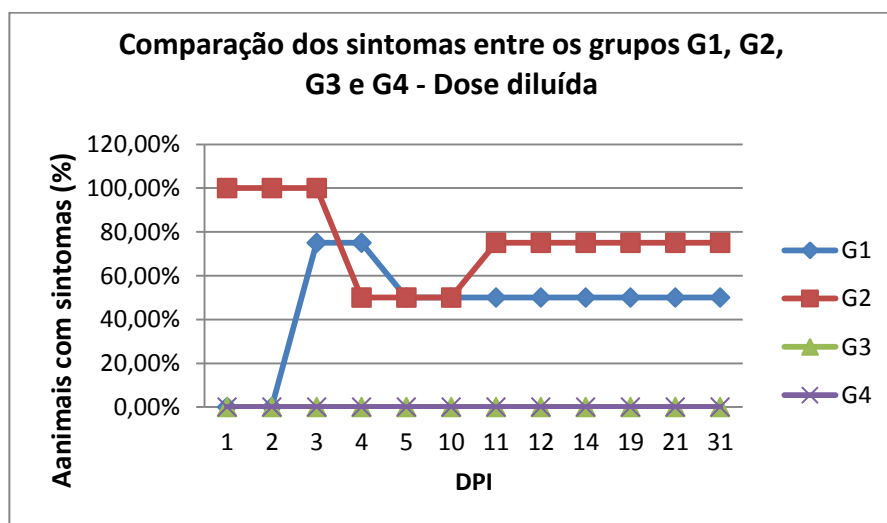


Gráfico 1: comparação entre os grupos G1 a G4 infectados com a diluição do vírus. G1 n= 4, G2 n= 5, G3 n= 2, G4 n= 2.

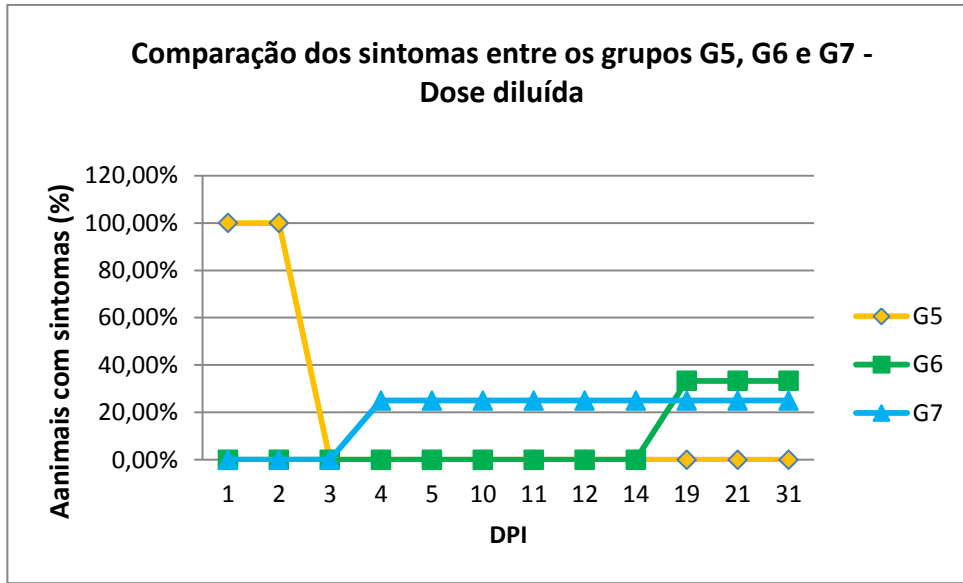


Gráfico 2: comparação entre os grupos G5 a G7 infectados com a diluição do vírus. G5 n= 1, G6 n= 3, G7 n=4.

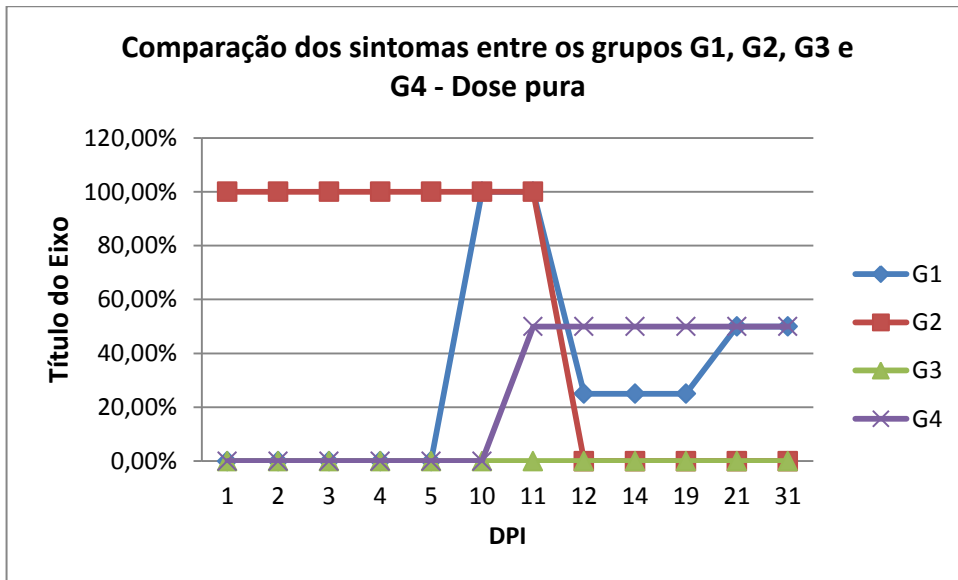


Gráfico 3: comparação entre os grupos G1 a G4 infectados com a dose não diluída do vírus. G1 n= 4, G2 n= 4, G3 n= 2, G4 n= 2.

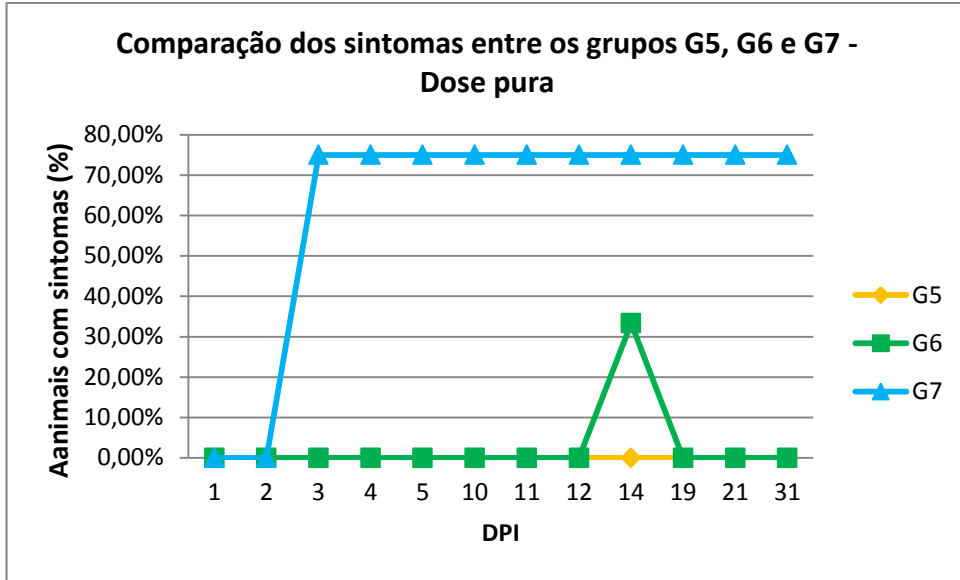


Gráfico 4: comparação entre os grupos G5 a G7 infectados com a dose pura do vírus. G5 n= 1, G6 n= 3, G7 n=4.

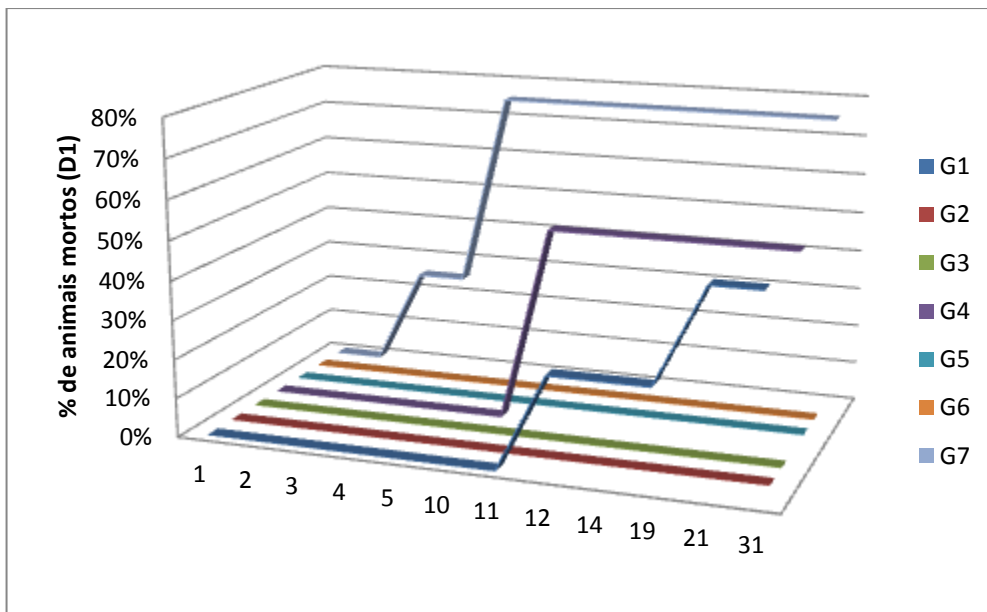


Gráfico 5: sobrevivência dos camundongos inoculados com a dose não diluída (D1) do vírus TMEV GDVII.

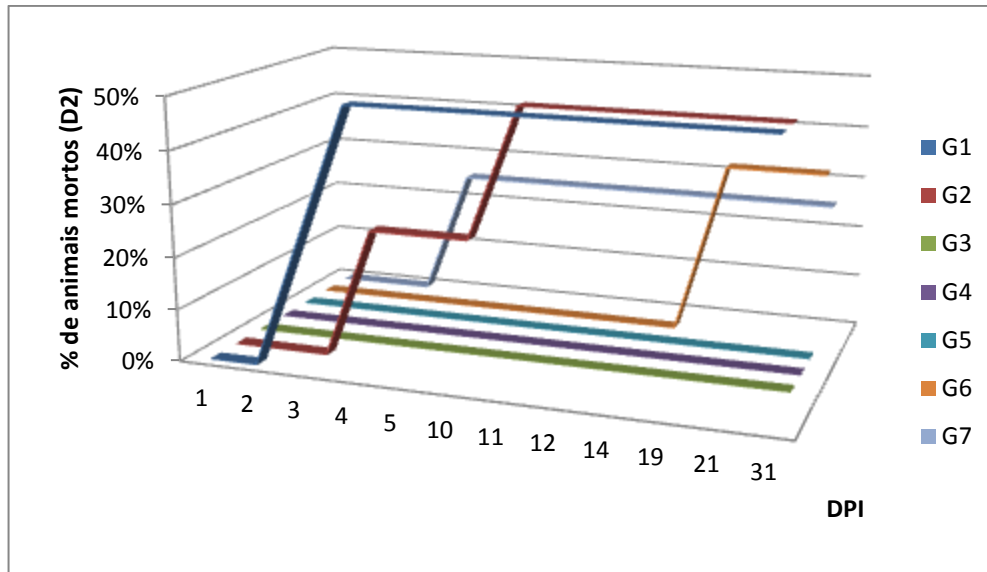


Gráfico 6: sobrevivência dos camundongos inoculados com a dose diluída 1:100 (D2) do vírus TMEV GDVII.

4.5 Metodologias de análise sorológica

4.5.1 Imunofluorescência indireta

Os resultados da análise sorológica por imunofluorescência indireta dos animais do segundo experimento deram negativos para todos os animais. Utilizamos um controle positivo para verificar o resultado esperado para a infecção viral.

4.5.2 Reação em cadeia da polimerase com transcrição reversa (RT-PCR)

Após a corrida da eletroforese em gel de agarose e posterior revelação do gel, pudemos observar que todas as amostras-teste dos animais inoculados deram um resultado negativo para a infecção por TMEV GDVII. Este resultado pode ser observado na Figura 9.

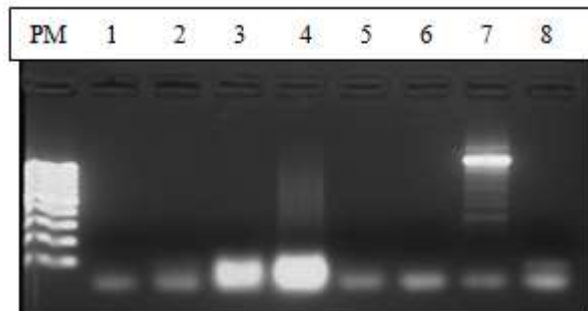


Figura 9: Revelação do gel de agarose do RT-PCR das amostras-teste. PM: Padrão de peso molecular 100pb. Coluna 1 a 6: amostras-teste de camundongos inoculados; Coluna 7: controle positivo (cepa padrão de TMEV-GDVII); Coluna 8: controle negativo (H₂O DEPC).

Pode-se ver claramente que a banda apresentada pelo controle positivo de 100 pb (coluna 7) não aparece em nenhuma das amostras (colunas de 1 a 6), sendo que estas se apresentaram mais parecidas com o controle negativo (coluna 8). Indicando que nenhum dos animais estavam com infecção persistente do vírus.

5. CONCLUSÃO

A produção do antígeno viral foi realizada sem problemas, com um bom crescimento do tapete celular pudemos realizar a passagem do vírus e produzir abundantes alíquotas virais, que se mostraram ativas *in vitro*, como pôde ser demonstrado com a ocorrência e efeito citopático nas culturas de células.

Apesar da produção bem sucedida dos vírus, encontramos diversas dificuldades na realização da quantificação dessas alíquotas. Nas duas primeiras repetições as células cresceram demasiadamente e, tendo em vista que o tapete celular se descolava do fundo da placa de 96 orifícios, foi impossível identificar o ECP. Quando realizamos a terceira e quarta repetições do protocolo a alíquota viral se mostrou inativa, tendo em vista o não aparecimento de efeito citopático no tapete celular. A inatividade do vírus se deve à um problema ocorrido com o biofreezer do laboratório que fez com essa e diversas outras alíquotas virais e bacterianas nele estocadas não fossem mais viáveis. Apesar desses contratemplos, ainda pudemos realizar experimentos com a amostra previamente produzida pelo laboratório, que estava estocada em outro biofreezer e apresentava título viral de $10^{-5,25}$ TCID₅₀/ml.

Os resultados obtidos com a realização da inoculação dos animais pelas vias intraperitoneal e oral nos surpreenderam. Apesar dos resultados positivos *in vitro*, os animais inoculados com diferentes amostras virais, concentrações e utilizando ambas as vias de inoculação, não apresentaram sintomas ou desenvolvimento da fase aguda da encefalomielite murina até 30dpi. Segundo VILLAREAL *et al* (2006) seria esperado que os animais inoculados via oral não apresentassem sintomas, mas os do grupo de inoculação intraperitoneal, sendo uma via de inoculação mais agressiva, deveriam apresentar os primeiros sintomas a partir de 6 dpi. Hipotetizamos que a reinoculação, via intraperitoneal, dos camundongos, causaria sequelas amenas, devido à uma sensibilização imunológica prévia devido à inoculação por via oral.

Com isso, várias hipóteses foram levantadas para explicar esses resultados: a idade dos animais na data de realização dos experimentos era

maior do que descrita na bibliografia e isso poderia ter influenciado na suscetibilidade do animal (Theiler, 1937); o vírus pode ter perdido sua virulência *in vivo* por já ter sofrido muitas passagens ou por ter ficado congelado por muito tempo (apesar da resposta infectiva *in vitro*); a quantidade de vírus utilizada na inoculação pode não ter sido suficiente, tendo em vista que, as referências que dão suporte a esse tipo de infecção e resposta são extremamente antigas, com trabalhos atuais praticamente inexistentes. Estas variáveis serão analisadas no futuro para otimização da cepa viral. Estas análises seriam inviáveis para este trabalho devido ao tempo disponível curto e limitado para abranger todas as perguntas.

Utilizamos a imunofluorescência e no RT-PCR, para confirmar a presença do vírus no organismo dos camundongos inoculados e tendo em vista os resultados obtidos, podemos concluir que nenhuns dos animais testados apresentavam infecção persistente pelo vírus inoculado, o que confirmando os resultados da análise de sintomas e corroborando as hipóteses levantadas de que a quantidade de vírus inoculada não foi suficiente ou que os animais não estavam suficientemente suscetíveis. Não pudemos observar o desenvolvimento da doença e nem da infecção viral no organismo, mesmo os resultados *in vitro* tendo sido promissores, o que nos leva a pensar que a resposta imune dos camundongos consegue acabar com a infecção viral antes que esta possa se estabelecer no organismo e causar os sintomas típicos.

Ao desenharmos os próximos experimentos, tivemos que encontrar uma via de inoculação e dose viral mais agressivas, que não permitiam ao organismo realizar uma resposta imune suficiente para eliminar o vírus antes que os sintomas desejados apareçam.

Buscamos nessa etapa da experimentação, além da utilização da via intracerebral de inoculação, utilizar novas linhagens, buscando, entre as disponíveis no CEMIB, as que pudessem ter alguma deficiência imunológica inata, pois pelo que pudemos notar nos outros experimentos realizados, a fase aguda não controlada eficientemente pelo sistema imune do animal parece ser a mais importante para o desenvolvimento de sequelas crônicas. A inoculação intracerebral se mostrou muito mais eficiente em provocar o desenvolvimento

da fase aguda da doença, indicando o caminho por onde devemos seguir para finalizar o desenvolvimento desse modelo animal. Pudemos distinguir as linhagens de camundongos que se mostraram mais adequadas ao cruzarmos os dados de mortalidade e aparecimento de sintomas, sendo considerada mais adequada aquela que apresentasse a fase inicial da doença, tivesse uma baixa mortalidade e conseguisse se recuperar, possibilitando o reaparecimento tardio da doença com a fase crônica.

Os animais das linhagens CBA e C3H/HePas (G3 e G4), com 4 semanas, inoculados com a diluição do vírus, bem como as linhagens CBA e C57BL/6 INF- γ Ko inoculadas com a dose pura, foram consideradas inadequadas para esse modelo experimental, pois não apresentaram sintomas. Esses dados são compatíveis com os disponíveis na literatura, pois segundo Lipton e Dal Canto (1979) e Lipton e Rhozon (1986), essas linhagens são consideradas pouco susceptíveis sendo as linhagens CBA e C3H/HePas, mais susceptíveis que a C57BL/6. Além disso, a resistência à infecção viral aumenta com a idade do animal (HEDRIC, 2012), corroborando os dados obtidos com os experimentos realizados com animais mais jovens (21 dias).

Quando inoculados com a dose pura, os camundongos C3H/HePas, apresentaram, poucos sintomas e média mortalidade; já o C57BL/6 INF- γ Ko apresentou sintomas, mas se recuperou, o que pode ser explicado pela maior quantidade de vírus injetada e maior susceptibilidade dessas linhagens, já que os animais C57BL/6 INF- γ Ko, apresentam deficiência na resposta imune inata

Os animais da linhagem C3H/HePas com 21 dias de idade (G7), quando inoculados com a dose diluída não apresentaram sintomas, mas ainda assim houve mortalidade; e quando inoculados com a dose pura, houve uma grande mortalidade nos primeiros DPI, portanto, por não apresentarem sintomas e por terem uma alta mortalidade, essa linhagem não foi considerada a mais adequada.

A linhagem BALB/c (G6), também considerada pouco susceptível ao vírus (LIPTON e RHOZON, 1986), apresentou poucos sintomas e total recuperação para a dose pura ou morte sem aparição de sintomas para a dose diluída, sendo considerada inadequada para o desenvolvimento do modelo..

As linhagens consideradas mais adequadas para esse modelo animal

foram as C57BL/6 (G2) e B6.V-Lep^{ob} (G1).. As linhagens consideradas mais adequadas para esse modelo animal foram as C57BL/6 (G2) e B6.V-Lep^{ob} (G1). A alta mortalidade apresentada pelos animais da linhagem C57BL/6 não é a reação mais apropriada, porém, a reincidência de sintomas em 11 DPI em um animal que havia se recuperado da fase aguda da doença nos deixa um indicativo de desenvolvimento da fase crônica da doença. Os animais dessa linhagem que foram inoculados com a dose não diluída do vírus apresentaram muitos sintomas, mas houve recuperação total dos animais.

A linhagem a B6.V-Lep^{ob} , com a dose pura, apresentou uma mortalidade menor do que o grupo G2-diluído e também apresentou reincidência de sintomas em 21 DPI em um animal que havia se recuperado dos sintomas agudos; esta foi considerada a linhagem mais adequada. Quando testados com a diluição viral, os animais dessa linhagem também apresentaram menor mortalidade do que os animais C57BL/6 inoculados com a mesma dose, mas não houve reaparecimento dos sintomas. Os resultados promissores obtidos com a linhagem B6.V-Lep^{ob} podem ser explicados com base em seu background genético. Nesses animais o gene produtor da leptina é total ou parcialmente desativado, sendo assim, a produção desse hormônio é baixa. É sabido que a leptina, além de influenciar no ganho de peso, também tem papel regulatório nas respostas imunes e inflamatórias (FANTUZZI e FAGGIONI, 2000). Segundo Siegmund e colaboradores (2002), uma menor quantidade de leptina circulante reduz a liberação de citocinas proinflamatórias pelas células do cólon e a severidade da colite. Sendo o TMEV um patógeno intestinal, provavelmente afetado pela presença de leptina, a baixa quantidade desse hormônio pode ter causado uma reação menos extrema à inoculação do vírus, fazendo com que os animais pudessem se recuperar da fase aguda da doença.

O objetivo do projeto, definir melhores linhagem, dose viral e via de inoculação, foi grandemente encaminhado nesse tempo de realização, pois pudemos chegar à respostas para duas dessas questões. Concluimos, portanto, que a melhor via de inoculação é a intracerebral e a melhor linhagem é a B6.V-Lep^{ob}. Será necessário realizar novos testes com essa linhagem, usando uma nova alíquota viral, para definir a dose certa para que obtenhamos um animal cronicamente sequelado. Utilizando uma nova alíquota viral, também será possível realizar a quantificação do vírus.

A falta de bibliografia que descrevesse uma metodologia mais apurada para a determinação da dose e via infectante mais apropriadas para desenvolver um modelo animal com a fase crônica da doença dificultou a realização dos experimentos, pois grande parte dos testes foram feitos baseados em trabalhos cujo objetivo era a fase aguda da doença, onde o animal morre após apenas alguns dias depois da inoculação.

Estudos mais detalhados com a linhagem B6.V- Lep^{ob} deverão ser realizados futuramente, uma vez que o objetivo de ter um animal sequelado ainda não foi alcançado. Os resultados foram extremos, como morte ou recuperação total sem infecção persistente, o que mostra a dificuldade na obtenção de um animal sequelado, como acontece mais naturalmente na natureza de outros animais. Uma análise mais profunda e um —maior entendimento sobre a atividade imunológica inata destes animais poderão elucidar melhor caminhos a serem seguidos para obtenção de sequelas crônicas. Por outro lado, as diferentes características de virulência dos subtipo de TMEV que não foram analisados neste trabalho poderiam enriquecer muito as informações aqui encontradas. Apesar de se mostrar um caminho longo de pesquisa para obtenção e entendimento deste modelo, nossos resultados nos deixaram um caminho promissor para nos guiar aos próximos passos e finalização do desenvolvimento deste modelo animal.

6. REFERÊNCIAS

BRAHIC, M. Theiler's virus infection of the mouse, or: Of the importance of studying animal models. **Virology** 301: 1 - 5, 2002.

DANIELS, J.B., PAPPENHEIMER, H., RICHARDSON, S. Observation on encephalomyelitis of mice (DA strain). **J. Exp. Med.** 96: 517 – 530, 1952.

DE BRITO, H.F.V., CORAT, M. A. F., MARCELO, R.S., ROVILSON, G., LUIZ A.C.P., MARCELO, L., FABIANO, F., MIN LL. Tratamento de sequelas neurológicas em cães, causadas por infecção pelo vírus da cinomose, através do transplante alogênico de células mononucleares de medula óssea. **Revista científica de Medicina Veterinária – Pequenos Animais e Animais de Estimação**. 8(24): 26–29, 2010.

DOWNS, W.G. Mouse encephalomyelitis virus. In: FOSTER, H.L., SMALL, J.D., FOX, J.G. (Eds.) **The mouse in biomedical research, Volume II: Diseases**. Academic Press, New York, 1982.

FANTUZZI Giamila; FAGGIONI Raffaella 2000. Leptin in the regulation of immunity, inflammation, and hematopoiesis. **J Leukoc Biol** 68(4):437-46.

FAZAKERLEY, John K., BUCHMEIER, Michael J. Pathogenesis of virus-induced demyelination. In: MARAMOROSCH, K., MURPHY, F. A., SHATKIN, A.J. (Eds.). **Advances in virus research**. V.42. San Diego: Academic Press, Inc, 249 – 324, 1993.

HEDRICH, Hans (Ed.). **The Laboratory Mouse**. 2. Ed. Academic Press, 2012. 868 p.

LIPTON, H.L., DAL CANTO, M.C. Susceptibility of inbred mice to chronic central nervous system infection by Theiler's murine encephalomyelitis virus. **Infect. Immun.** 26 (1): 369 – 374, 1979.

LIPTON, H.L., ROZHON, E.J. The Theiler's murine encephalomyelitis viruses. In: BHATT, P.N., JACOBY, R.O., MORSE III, H.C., NEW, A.E. (Eds.) **Viral and Mycoplasmal infections of laboratory rodents: effects on biomedical research**. **Academic Press Inc.**, London, 1986.

RODRIGUES, D.M. **Diagnóstico sorológico e molecular do vírus da encefalomielite murina de Theiler (TMEV) em colônias tradicionais de ratos**. 2004. 82 f. Dissertação (Mestrado em genética e biologia molecular na área de microbiologia) – Instituto de Biologia, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2004.

RODRIGUEZ, M., ROOS, R. P. Pathogenesis of early and late disease in mice infected with Theiler's virus, using intratypic recombinant GDVII/DA viruses. **J. Virol.**, 66(1): 217–225, 1992.

RUECKERT, R.R. *Piconarviridae* and their replication. In: **Virology**. FIELDS. B.N.; KNIPE, R.M.; CHANOCK, M.S.; HIRSCH, J.L.; MELNICK, T.P. Monath & B. Roizman, (Eds.). Raven New York, 1996.

Siegmund B; Lehr HA; Fantuzzi G. 2002. Leptin: a pivotal mediator of intestinal inflammation in mice. **Gastroenterology** 122(7):2011-25.

THEILER, M. Spontaneous encephalomyelitis of mice, a new virus disease. **J. Exp. Med.** 65: 705 – 719, 1937.

THEILER, M., GARD, S. Encephalomyelitis of mice. III. **Epidemiology. J. Exp. Med.** 72: 79 – 90, 1940.

TUNODSA, I., & FUJINAMI, R. S. Neuropathogenesis of Theiler's murine encephalomyelitis virus infection, an animal model for multiple sclerosis. **Journal of neuroimmune pharmacology**. New York, 5(3), 355–369, 2009.

VILLARREAL *et al.* A comparison of Theiler's virus and Poliovirus in CBA mice. **Microbial Pathogenesis** 41: 149-156; 2006.