

**UNIVERSIDADE
ESTADUAL DE
CAMPINAS**

mestrado

BC/49488

IB/ 81781

INSTITUTO DE BIOLOGIA



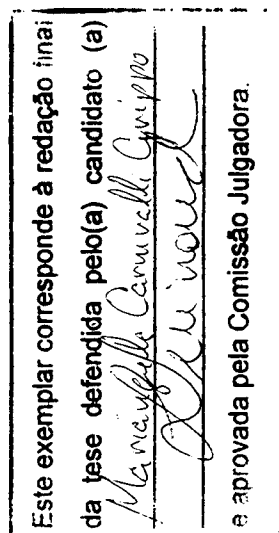


UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

Mariangela Carnivalli Grippo

**“IDENTIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE UM
CORONAVÍRUS MURINO (MHV-CAM) ATRAVÉS DA
COMPARAÇÃO COM O VÍRUS DA HEPATITE MURINA
TIPO 3”**

Tese apresentada ao Instituto de
Biologia para a obtenção do título
de Mestre em Genética e Biologia
Molecular na Área de Imunologia.



Orientadora: Prof^a Dr^a Liana Verinaud

2002

UNIDADE IB
 Nº CHAMADA 71/UNICAMP
6886i
 V EX
 TOMBO BCI 49488
 PROC 16-837/02
 C DX
 PREÇO R\$ 11,00
 DATA _____
 Nº CPD _____

CN00168403-3

BIB ID 242727

**FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
 BIBLIOTECA DO INSTITUTO DE BIOLOGIA - UNICAMP**

G886i **Grippe, Mariangela Carnivalli**
 Identificação e caracterização de um coronavírus murino (MHV-CAM)
 através da comparação com o vírus da hepatite murina tipo 3/
 Mariangela Carnivalli Grippe.--
 Campinas, SP:[s.n.], 2002

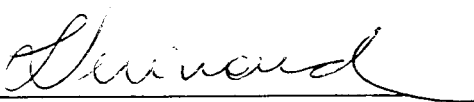
Orientadora: Liana Verinaud

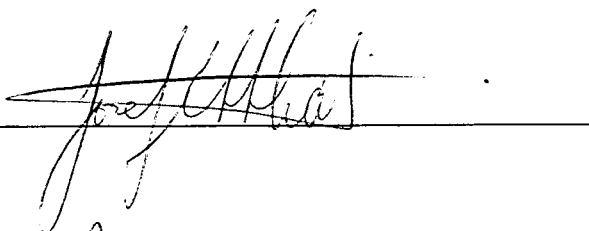
Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual de Campinas.
 Instituto de Biologia

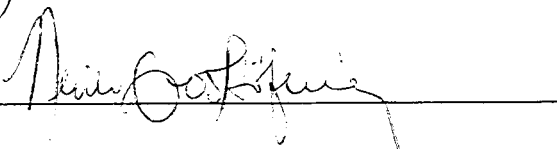
1.Hepatite. 2. Vírus. 3. Caracterização. I. Verinaud, Liana. II.
 Universidade Estadual de Campinas. Instituto de Biologia.
 III. Título.

Data da Defesa: 21/03/2002

Banca Examinadora:

Profª Drª Liana Verinaud (Orientadora): 

Prof. Dr. José Alberto Caram Dias: 

Profª Drª Maria Alice da Cruz Höfling: 

Profª Drª Leonilda M.B.Santos: _____

“É um grande privilégio ter vivido um dia difícil.”

Indira Gandhi

Aos meus queridos pais, Geraldo e Valquíria,
que sempre estiveram ao meu lado
em todos os momentos,
dedico este trabalho.

O presente trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Imunopatologia do Departamento de Microbiologia e Imunologia do Instituto de Biologia da UNICAMP, Campinas, São Paulo.

AGRADECIMENTOS

A Deus, pela força e pela coragem em todos os momentos.

A minha querida família italiana, que sempre está comigo em todos os meus momentos.

À Profª Drª Liana Verinaud, pela orientação e pela amizade .

A FAPESP pelo auxílio financeiro concedido.

A minha pequena Dirce, não só pelos ensinamentos, que foram muitos, mas também pela amizade, paciência e companherismo nesses 3 anos .

A minha irmã de coração Daniela, pela amizade e pelo incentivo em todos os momentos.

A todos meus amigos, em especial a Arianne, Luciane, Cleber e Tavoni que acompanharam esses dois anos e que estiveram do meu lado.

A minhas amigas de laboratório, Paula, Vânia, Camila e Jacy pelo companherismo

Aos amigos Luís , Letícia , Cris , Lia, Daniele pela ajuda e paciência em etapas importantes desse trabalho.

A minhas companheiras Tereza, Kellye e Sandra que me ensinaram que tem que se ter paciência , sempre.

Ao meu querido Dri que me deu muita coragem e amor nesses últimos meses.

Ao Dr. José Alberto Caram Dias , Profª Clarice W. Arns e a Profª Dagmar Ruth-Machado pela atenção e pelas sugestões oportunas oferecidas a este trabalho.

À Profª Drª Maria Alice da Cruz Höfling e À Profª Drª Leonilda M.B. Santos, pela participação na banca examinadora e por todas as sugestões

Aos funcionários do Depto de Microbiologia e Imunologia, em especial para Rose , Marcos, Lúcia por todo o auxílio no dia-a-dia.

A todos aqueles que de um jeito ou de outro estiveram comigo nesses dois anos, minha profunda gratidão.

RESUMO

Grippo, M. C. **IDENTIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE UM CORONAVÍRUS MURINO (MHV-CAM) ATRAVÉS DA COMPARAÇÃO COM O VÍRUS DA HEPATITE MURINA TIPO 3.** Tese de Mestrado, Departamento de Microbiologia e Imunologia, Instituto de Biologia, UNICAMP.

O Vírus da Hepatite Murina (MHV), pertencente ao grupo dos Coronavírus, é o patógeno mais freqüentemente identificado em camundongos utilizados como modelo experimental e mantidos de modo convencional em biotérios.

Em trabalhos anteriores, detectamos a presença de um vírus murino que estava sendo transmitido com o *Trypanosoma cruzi*, o agente causador da Doença de Chagas. Experimentos preliminares de neutralização sugeriam fortemente que este vírus, isolado em nosso laboratório e provisoriamente denominado de MHV-CAM, era um Coronavírus uma vez que a taxa de mortalidade dos animais era dramaticamente reduzida quando anticorpos anti-MHV-3 eram administrados juntamente com o vírus. O vírus foi então isolado e sua identificação tornou-se o objetivo deste trabalho.

Quatro linhagens celulares foram testadas quanto à susceptibilidade à infecção, sendo que as células L929 e NCTC 1469 mostraram-se permissíveis ao crescimento do MHV-CAM.

Partículas virais e proteínas estruturais foram, então purificadas do sobrenadante de células L929 e analisadas através de (i) Teste de Neutralização *in vitro*, (ii) Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET), (iii) SDS-PAGE e (iv) teste de “Immunoblotting”. Todos experimentos mostraram que o MHV-CAM possui semelhanças estruturais e antigênicas com o Vírus da Hepatite Murina tipo 3 (MHV-3). Portanto, é provável que o vírus contaminante dos estoques de *T. cruzi* seja, de fato, um MHV-3.

Em paralelo, este estudo indica que muitos estoques de parasitas podem estar contaminados com o vírus MHV-3, e que os resultados obtidos na Doença de Chagas experimental devem ser interpretados com cautela pois o maior efeito adverso na infecção pelo MHV é a imunomodulação.

SUMÁRIO

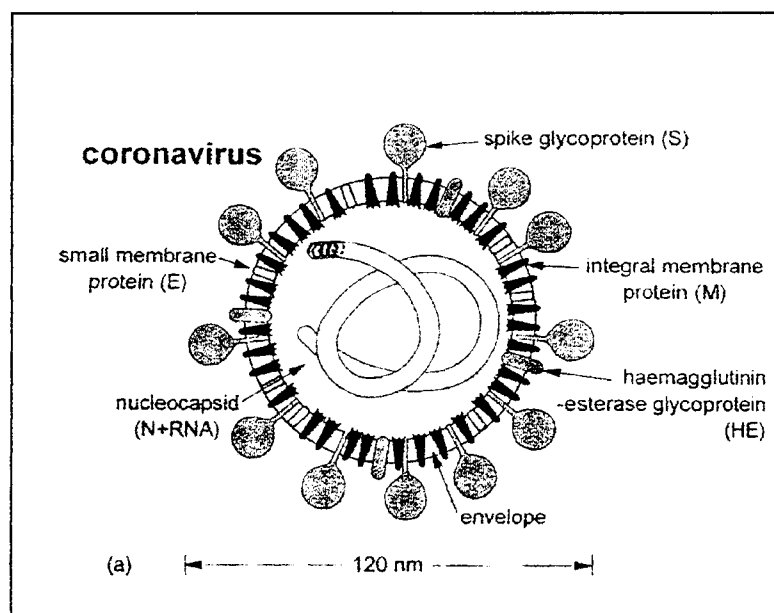
1. INTRODUÇÃO.....	1
2. OBJETIVOS.....	7
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	9
3.1. Animais	10
3.2. Isolamento do MHV-CAM.....	11
3.3. Obtenção de estoques de MHV-CAM.....	11
3.4. Infecção das linhagens celulares.....	12
3.5. Purificação das partículas virais.....	13
3.6. Produção de soro-hiperimune.....	14
3.7. Imunofluorescência Indireta.....	14
3.8. Titulação <i>in vitro</i> do MHV-CAM e MHV-3.....	15
3.9. Teste de patogenicidade <i>in vivo</i>	16
3.10. Microscopia Eletrônica de Transmissão.....	16
3.11. Teste de Neutralização <i>in vitro</i>	16
3.12. Eletroforese em Gel de Poliacrilamida na presença de SDS (SDS-PAGE).....	17
3.13. Teste de “Immunoblotting”.....	17
3.14. Imuno-Microscopia Eletrônica de Transmissão.....	18
4. RESULTADOS	19
4.1. Obtenção de estoques de MHV-CAM.....	20
4.2. Infecção da linhagem celular L-929.....	21
4.3. Infecção da linhagem celular NCTC-1469.....	23
4.4. Infecção da linhagem celular J-774.....	24
4.5. Infecção da linhagem celular 3T3.....	25
4.6. Titulação <i>in vitro</i> do MHV-CAM e MHV-3.....	25
4.7. Teste de Patogenicidade <i>in vivo</i>	25
4.8. Purificação das partículas virais.....	25
4.9. Obtenção de soros hiperimunes anti MHV-CAM e anti MHV-3.....	26
4.10. Microscopia Eletrônica de Transmissão.....	26
4.11. Teste de Neutralização <i>in vitro</i>	27
4.12. Eletroforese em Gel de Poliacrilamida na presença de SDS (SDS-PAGE).....	27
4.13. Teste de Immunoblotting.....	28
4.14. Imuno-Microscopia Eletrônica.....	29
5. DISCUSSÃO.....	30
6. CONCLUSÕES.....	37
7. ABSTRACT.....	39
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	41

I. INTRODUÇÃO

Infecções murinas naturais são de difícil detecção e controle em animais de laboratório mantidos de forma convencional, isto é, sem a presença de barreiras protetoras, tais como, unidades isoladoras, gaiolas protegidas por filtros, acomodação dos animais em fluxo laminar, cortina de ar na entrada do biotério, esterilização de ração, maravalha e água, restrição do fluxo de usuários e, ainda, a presença de pessoal técnico especializado.

O Vírus da Hepatite Murina (MHV), pertencente ao grupo dos Coronavírus, é o patógeno mais frequentemente identificado em camundongos utilizados como modelo experimental e várias estirpes, que diferem na sua patogenicidade e antigenicidade, têm sido isoladas (BARTHOLD & SMITH, 1984; BOND *et al.*, 1979; TAGUCHI *et al.*, 1982).

Os Coronavírus são vírus grandes, com 80 a 160 nm de diâmetro, envelopados e que possuem um genoma de aproximadamente 30.000 nucleotídeos. Cada partícula viral é constituída por quatro proteínas estruturais, conforme mostra a figura abaixo:



Fonte: Sidell *et al.* Curr Top. Microbiol 99 (1982)

A maior das proteínas estruturais é a proteína S, uma proteína de membrana que forma as espículas características dos Coronavírus. Também é a proteína responsável pela ligação da partícula viral à célula hospedeira, apresentando um importante papel na fusão do envelope viral com a membrana celular. A proteína M e a proteína E são importantes na formação e no brotamento das partículas virais. A proteína N reveste todo o RNA viral.

Muitos Coronavírus, incluindo algumas estirpes do MHV, apresentam ainda uma outra glicoproteína em seu envelope – a proteína HE (Hemaglutinina-esterase), responsável pela aglutinação e adsorção do vírus a hemáceas de diferentes espécies animais.

Trabalhos recentes sugerem que as diferentes estirpes de MHV podem ser divididas em dois grandes grupos de acordo com o tropismo tecidual: os pleiotrópicos que replicam predominante no trato respiratório (MHV-1, MHV-3, MHV-JHM, MHV-A59) e os enterotrópicos que replicam predominantemente no trato intestinal (MHV-4, MHV-D e MHV-S/CDC). Entretanto, com o estabelecimento da infecção outros órgãos tais como o fígado, cérebro e órgãos linfóides também são comprometidos (BARTHOLD & SMITH, 1992). O MHV produz doença em camundongos por causa da infecção lítica das células, embora a replicação viral e a exocitose possam acontecer na ausência da citólise. Em adição à citólise, a fusão celular é a marca registrada dos MHV, tanto *in vivo* quanto *in vitro*, embora não seja necessária para replicação viral.

Além da virulência inerente à cepa do vírus, a patogenicidade do MHV é significativamente influenciada pela idade, pelo genótipo, pela via de infecção e também pelo *status* imunológico do animal (BRODERSON *et al.*, 1976; KYUWA *et al.*, 1992; SEBESTENY & HILL, 1974). Camundongos susceptíveis, da linhagem C57BL/6,

desenvolvem uma hepatite aguda e morrem três ou quatro dias após a infecção, enquanto que, camundongos resistentes, da linhagem A/J, desenvolvem apenas uma infecção subclínica com eliminação das partículas virais sete dias após a infecção.

O sistema imunológico tem um papel importante no estabelecimento e/ou desenvolvimento da doença uma vez que, animais A/J tornam-se completamente susceptíveis após tratamento com agentes imunossupressores (LE PRÉVOST *et al.*, 1975).

De fato, o envolvimento do sistema imunológico durante a infecção pelo MHV é marcante. Alteração na resposta proliferativa de esplenócitos frente à estimulação com concanavalina A (SMITH *et al.*, 1991), alteração na produção de Interleucina 2, Interleucina 4 e Interferon γ por células T (De SOUZA *et al.*, 1991), alterações nas funções de macrófagos (BOORMAN *et al.*, 1982; DEMPSEY *et al.*, 1986), atrofia de órgãos linfóides (KNOBLER & OLDSTONE, 1987), imunodeficiências celular e humoral (LAMONTAGNE *et al.*, 1985) e replicação viral em linfócitos (LAMONTAGNE *et al.*, 1989) têm sido descritos na literatura. Estes dados mostram que esta infecção viral pode ter uma interferência contundente nos estudos que envolvem o sistema imunológico e utiliza camundongos como modelo experimental.

Desde que a Doença de Chagas foi descoberta, observou-se que camundongos eram susceptíveis à infecção pelo *Trypanosoma cruzi*, seu agente causal. Por esta razão, e outras como facilidade de acomodação e manipulação, o camundongo tem sido amplamente utilizado para se investigar a resposta imune e a patologia desta infecção. Entretanto, a acomodação dos camundongos em biotérios com barreiras ou em unidades isoladoras é prática recente em muitos laboratórios no Brasil e, portanto, os primeiros

isolados do parasita foram obtidos utilizando-se animais mantidos de forma convencional e que são usualmente infectados por diferentes ectoparasitas, endoparasitas, fungos, bactérias e vírus (FOSTER *et al.*, 1982).

Em trabalhos anteriores realizados em nosso laboratório detectamos a presença de um vírus murino que estava sendo transmitido juntamente com o *Trypanosoma cruzi*, em virtude do método de manutenção deste parasita, baseado na transferência semanal de sangue de hospedeiros previamente infectados para hospedeiros normais. Além disso, foi observado que animais inoculados concomitantemente com parasitas e vírus apresentavam níveis de parasitemia mais elevados, menor tempo de sobrevivência e marcante queda no número de leucócitos circulantes quando comparados com animais infectados com estoques de parasitas nos quais o vírus havia sido eliminado, através da passagem prévia em meio de cultura de células ou em meio axênico (RANGEL *et al.*, 1994a; RANGEL *et al.*, 1994b). Subseqüentemente, foi demonstrado que o curso da infecção chagásica experimental podia ser bastante influenciado em virtude de profundas alterações nos órgãos linfóides que tinham lugar logo no início da infecção viral (VERINAUD *et al.*, 1999).

Experimentos preliminares de neutralização sugeriam fortemente que este vírus, isolado no laboratório e provisoriamente denominado de MHV-CAM, era um Coronavírus uma vez que a mortalidade era dramaticamente reduzida quando anticorpos anti-MHV-3 eram administrados juntamente com o vírus (CAMARGO, Comunicação Pessoal).

A alta prevalência do MHV em biotérios nacionais (GILIOLI *et al.*, 1996) e estrangeiros (LUSSIER & DESCOTEAUX, 1990), associada a sua interferência na pesquisa científica, levando à interpretação errônea dos resultados experimentais obtidos

principalmente na área de Imunologia devido ao seu linfotropismo, justificam os esforços no sentido de se identificar e melhor caracterizar o vírus contaminante de nossas amostras de *Trypanosoma cruzi*.

II . OBJETIVOS

OBJETIVOS

Este trabalho teve como objetivo geral a identificação estrutural e antigênica de um vírus isolado em nosso laboratório, a partir de sangria de camundongos infectados pelo *Trypanosoma cruzi*, através da comparação com o vírus da Hepatite Murina tipo3.

Os objetivos específicos do trabalho incluíram:

- Adaptação do vírus selvagem em sistemas de cultura de células;
- Purificação das partículas virais obtidas a partir de órgãos de animais infectados e de cultura de células permissíveis à sua infecção;
- Produção, em camundongos isogênicos e Specific Pathogen Free (S.P.F.), de anticorpos policlonais específicos para o MHV-CAM;
- Caracterização da estrutura viral através da técnica de Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET);
- Caracterização das proteínas virais através da técnica de “SDS-PAGE”, e
- Caracterização antigênica do MHV-CAM através das técnicas de: “Immunoblotting”, Imuno-Microscopia Eletrônica e Teste de Neutralização “*in vitro*”.

III . MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Animais

Camundongos Balb/c de 4 e 8 semanas de idade foram utilizados, respectivamente, para obtenção dos estoques de MHV-CAM e para produção de soro policlonal. Animais da linhagem C57Bl/6 foram utilizados nos testes de Patogenicidade *in vivo*. Os animais foram obtidos do CEMIB-UNICAMP a partir de colônias Livres de Patógenos Específicos (S.P.F.) mantidas sob barreiras. Testes, realizados a cada 3 meses desde 1989, para detecção de infecções nestas colônias apresentam resultados negativos para os seguintes patógenos: coronavírus (MHV-3), Sendai vírus, vírus da pneumonia de camundongo (PVM), vírus da coriomeningite linfocítica (CCMV), Adenovírus, Polyoma vírus, k- vírus, Citomegalovírus murino (MCMV), Rotavírus, Ectromelia, *Mycoplasma pulmonis*, ectoparasitas e endoparasitas.

Durante todo o período experimental os animais foram mantidos em isoladores flexíveis (TREXLER, 1959), com água e rações estéreis fornecidas *ad libitum*, sob temperatura constante de 20°C a 25°C e com um ciclo de fotoperíodo de 12/12 horas. Todos os procedimentos foram realizados de acordo com as normas propostas pelo Conselho Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA) e aprovados pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal do Instituto de Biologia da Unicamp (CEEAA/Unicamp). Animais controle e animais experimentais foram mantidos em isoladores separados a fim de se evitar o risco de transmissão do vírus.

3.2. Isolamento do MHV-CAM

Camundongos CBA/J de 8 semanas de idade inoculados previamente com a cepa Y de *Trypanosoma cruzi* foram sangrados, seus plasmas separados, filtrados em membrana Millipore (0,2 μ m) e checados quanto à ausência completa de parasitas através da observação ao microscópio. Estes plasmas foram então inoculados em animais imunodeficientes, mantidos em isoladores, que a cada quatro dias eram sacrificados para obtenção de seus plasmas que serviriam para a infecção de novo lote de animais. Após quatro passagens consecutivas de plasma filtrado os animais imunodeficientes começaram a apresentar, entre três e quatro dias após a inoculação, um quadro clínico de morbidade com algumas mortes. Estes animais doentes tiveram seus fígados e baços retirados, macerados e inoculados em animais Balb/c de quatro semanas de idade, mantidos em isoladores. Após quatro dias de infecção estes animais apresentavam-se doentes sendo então sangrados, seus plasmas separados e filtrados em membrana Millipore (0,2 μ m). Aliquotas de 0,2 ml foram injetadas em animais “naive” e desta forma o fator presente no plasma dos animais foi seriadamente transferido por dez vezes. Fígado e baço dos animais doentes foram retirados e conservados a -70°C para serem utilizados como fonte primária de vírus sempre que necessário.

3.3. Obtenção dos estoques de MHV-CAM

Fígados congelados a -70°C , obtidos previamente de animais infectados com o vírus, foram homogeneizados a 10% (peso/volume) em meio RPMI 1640 e inoculados intraperitonealmente em animais Balb/c de 4 semanas de idade. A cada 3 ou 4 dias, quando

os animais apresentavam sintomas de doença, o fígado e o baço eram retirados, homogeneizados, centrifugados e o sobrenadante inoculado em novo grupo de animais. A partir da terceira passagem seriada uma parte do homogeinato dos órgãos foi distribuída em alíquotas e estocada à -70°C . Esses estoques foram utilizados posteriormente como fonte de vírus para infecção de linhagem celular. O inóculo para os animais controle foi preparado a partir de um homogeinato (10% peso/volume) de fígado e de baço obtidos de animais normais. Todos os procedimentos foram realizados em condições de assepsia.

3.4. Infecção das linhagens celulares

As linhagens celulares abaixo relacionadas foram testadas quanto à susceptibilidade ao vírus:

Nome	Animal	Tecido	Fonte
NCTC-929	Camundongo	Tecido Conjuntivo	ATCC ^a
L929	Camundongo	Tecido Conjuntivo	ATCC
J774A1	Camundongo	Monócito/Macrófago	ATCC
3T3	Camundongo	Fibroblasto	ATCC

^a American Type Culture Collection, Rockville, MD

As linhagens celulares foram cultivadas em frascos de 25cm^2 (Corning Glassworks, Corning, NY) a 37°C e 5% de CO_2 , em meio RPMI 1640 (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO) suplementado com 10% de soro fetal bovino, $100\mu\text{g/ml}$ de estreptomicina e 100U/ml de penicilina. Quando as células apresentaram aproximadamente 80% da camada confluenta formada, o meio foi retirado e as culturas foram expostas à suspensão de vírus (MHV-3 ou MHV-CAM). Para tal, $500\mu\text{l}$ de um dos estoques de vírus foi adicionado

juntamente com 0,5 ml de meio RPMI 1640, seguido de adsorção à 37°C por 1 hora, quando finalmente foi adicionado mais 4ml de meio. Garrafas com a mesma linhagem celular, porém sem infecção, foram mantidas em paralelo para controle de possíveis alterações. Quando as culturas celulares apresentavam sinais de efeitos citopáticos eram submetidas a ciclos de congelamento e descongelamento, centrifugadas, o sobrenadante coletado e estocado para posterior utilização na purificação das partículas virais e produção de soro policlonal. A comprovação de efeito citopático especificamente induzido pelo vírus foi feita através da técnica de Imunofluorescência Indireta.

3.5. Purificação das partículas virais

A metodologia descrita por Kraft & Meyer (1986) foi seguida. Para tal, sobrenadantes de cultura de células infectadas com MHV-3 ou MHV-CAM, foram clarificados a 1.200 x g por 30 minutos à 4° C. Em seguida, os sobrenadantes obtidos destas centrifugações foram precipitados pela adição de solução saturada de sulfato de amônia numa concentração final de 40%, à temperatura de 4°C e sob agitação constante durante 14-18 horas. Após centrifugação, a 1.500 x g, por 30 minutos à 4° C, os “pellets” foram ressuspensos em 1/10 do volume original com tampão Tris-EDTA, pH 7,4.. Este material foi então acomodado sobre uma solução de sacarose a 15% (w/w) em tampão Tris-EDTA, disposta sobre um colchão de sacarose a 50% (w/w). Após centrifugação, a 50.000 x g por 3hs à temperatura de 4° C, a banda clara localizada na interfase das camadas de sacarose foi coletada e estocada em a -70° C até o momento de uso.

3.6. Produção de soro hiperimune

Suspensões celulares infectadas com os vírus foram submetidas a ciclos sucessivos de congelamento e descongelamento para liberação de partículas virais e em seguida centrifugadas (200 x g/10min/4°C) para remoção de restos celulares. O sobrenadante foi então diluído (1:1000), e inoculado (0,2ml/intra-peritonealmente) em camundongos Balb/c mantidos em isoladores. Injeções de reforço foram aplicadas a cada 7 dias por um período de três semanas. No 28º dia após a primeira inoculação os animais foram sangrados pelo plexo orbital, o soro foi separado e testado quanto à presença de anticorpos através da técnica de Imunofluorescência Indireta utilizando-se células L929 previamente infectadas. Após verificação de obtenção de título apropriado de anticorpos, os animais foram submetidos à sangria branca pelo plexo braquial, sendo o soro separado, distribuído em aliquotas de 1ml em tubos tipo “eppendorfs” e congelado a -70°C.

3.7. Imunofluorescência Indireta

A metodologia descrita por Kraft & Meyer (1986) foi seguida para comprovação de efeito citopático em células infectadas com os vírus e para titulação dos anticorpos anti-MHV-3 e anti-MHV-CAM produzidos em camundongos. Os testes foram realizados em lâminas multi-teste (8 poços) recobertas com teflon (Dynatec) e limpas com álcool e água destilada. Células NCTC e L929, assentadas nos poços das lâminas, foram incubadas em estufa 37°C sob atmosfera de 5% de CO₂ para possibilitar formação de camada confluenta, e então infectadas com os vírus após remoção do meio de crescimento. Cada uma das culturas foi infectada com 25 µl de uma diluição pré-testada de vírus capaz de infectar de 10 a 30 % das células cultivadas. Após período de incubação de uma hora, para

possibilitar a adsorção do vírus, 75µl de meio RPMI foi adicionado às lâminas e as células novamente incubadas por 24/48 horas. Terminado o período de incubação o meio foi removido, as lâminas foram secas ao ar e finalmente fixadas por 10 minutos em acetona gelada. As culturas infectadas foram cobertas diretamente com diluições seriadas na razão 10 dos soros teste e incubadas durante 30 minutos. Após duas lavagens, em solução salina tamponada com fosfato (PBS), as culturas foram novamente incubadas, por um período de 30 minutos, com soro de coelho anti-IgG de camundongo conjugado com isotiocianato de fluoresceína (FITC). Terminado o tempo de incubação as lâminas foram lavadas em água bi-destilada, tratadas com uma solução de glicerina em PBS (9:1) e examinadas em microscópio de fluorescência. A intensidade de fluorescência foi avaliada numa escala de 1+ até 4+. Cada experimento incluiu quatro controles: (i) células não infectadas similarmente tratadas; (ii) células infectadas tratadas apenas com o conjugado; (iii) controle positivo utilizando o sistema MHV3 e anti-MHV3 cedido pelo Centro de Controle Viroológico do CEMIB-UNICAMP e (iv) controle negativo com soro obtido de animais normais mantidos em isoladores. As células foram examinadas utilizando-se um microscópio de fluorescência (AxiosKop HB50/ Zeiss).

3.8. Titulação *in vitro* do MHV-CAM e MHV-3.

Diluições seriadas na razão 10 (10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4} , 10^{-5} , 10^{-6}) dos estoques de MHV-CAM e MHV-3 foram utilizadas para infecção da linhagem celular L929 em placas de 24 orifícios. As células infectadas foram analisadas diariamente para observação de efeito citopático. O título, expresso como TCID₅₀ por ml, foi então calculado de acordo com o método descrito por Reed & Muench (1938).

3.9. Teste de patogenicidade *in vivo*

A capacidade do MHV-CAM de induzir doença, após dez passagens seriadas em cultura de células, foi testada através da inoculação intraperitoneal de 0,1 ml do sobrenadante da cultura celular em animais susceptíveis (C57Bl/6) e de oito semanas de idade. A ocorrência de doença e/ou morte foi observada ao longo de 15 dias.

3.10. Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET)

Suspensões celulares infectadas, submetidas a ciclos sucessivos de congelamento e descongelamento para liberação de partículas virais, foram centrifugadas (200x g/10min/4°C). Os sobrenadantes foram então precipitados com sulfato de amônia 30% (30 min/temperatura ambiente), centrifugados (200 x g/10min), e os “pellets” resuspensores em 25-50 µl de água destilada. Telas de cobre (100-200 mesh), previamente tratadas com película de parlodium e reforçadas com carbono, foram incubadas com as suspensões virais por 5 min. O material, corado com ácido fosfotungstico 1%, foi então examinado em Microscópio Eletrônico de Transmissão (Leo 906).

3.11. Teste de Neutralização *in vitro*

Soros hiperimunes anti MHV-CAM e anti MHV-3, produzidos previamente em camundongos Balb/c de 8 semanas de idade, foram aquecidos a 56°C durante 45 minutos para desativação das proteínas do sistema complemento. Diluições, entre 1/320 e 1/10.240, dos anti-soros foram adicionadas a suspensões contendo 100 TCID₅₀ de MHV-CAM e MHV-3 de forma a se obter reações específicas e cruzadas (MHV-CAM

com anti MHV-CAM e anti MHV-3/ MHV-3 com anti MHV-3 e anti MHV-CAM). As misturas foram incubadas por 1 hora à 37⁰C e em seguida utilizadas para infectarem subculturas de células L929. As culturas foram observadas diariamente para verificação de presença ou não de efeito citopático. O controle foi realizado utilizando-se soro normal de camundongos obtido de animais Specific Pathogen Free não imunizados.

3.12. Eletroforese em Gel de Poliacrilamida na presença de SDS (SDS-PAGE)

Partículas virais, previamente purificadas do sobrenadante das culturas celulares de células L929, foram diluídas em tampão de amostra (Tris-HCl, 2-Mercaptanol, Glicerol, SDS, Bromofenol 0,1% e água), fervidas durante 3 minutos e finalmente aplicadas em gel de poliacrilamida na presença de dodecil sulfato de sódio na concentração de 10,5%, conforme descrito por Laemmli (1970). Em cada poço do gel de separação foram aplicados 40µg de MHV-CAM e 67 µg of MHV-3. Os géis foram submetidos a uma corrente elétrica de 100V por 2/3 horas para separação das proteínas que foram então coradas pelo método da prata.

3.13. Teste de “Immunoblotting”

As proteínas virais presentes no gel de poliacrilamida foram transferidas para uma membrana de nitrocelulose (Immobilion-P transfer membrane/ Millipore) através de corrente elétrica de 30V durante 2 horas utilizando-se tampão de transferência contendo 0.125M Tris e 0.192M glicina. Em seguida, a membrana foi “bloqueada” com Leite em pó Desnatado (Molico) 5% diluído em TBS (Tampão- Tris- Salina) contendo 0,1% de Tween 20, durante 2 horas. A membrana de nitrocelulose foi então incubada durante toda noite

com 4 ml de soro anti MHV-CAM ou anti MHV-3 diluído a 1/250 em tampão TBS contendo 5% de Leite em pó desnatado (Molico), conforme descrito na literatura. (Heegaard & Bjerrum, 1988; Stott, 1989)

A incubação com o anticorpo secundário foi realizada utilizando-se anticorpo de cabra anti-IgG de camundongo conjugado com fosfatase alcalina (Sigma) na diluição de 1/20.000 durante 60 minutos. A membrana foi em seguida incubada com o substrato BCIP (5-Bromo-4-cloro-3-indolylphosphate) e o cromógeno NBT (nitro-blue tetrazolium) para desenvolvimento de coloração. Todos os procedimentos foram executados a temperatura ambiente.

O controle negativo deste teste foi feito omitindo-se do protocolo, o anticorpo primário (anti-MHV-CAM ou anti MHV-3).

3.14. Imuno- Microscopia Eletrônica de Transmissão

Telas de níquel (100-200 mesh), previamente tratadas com película de parlodium e reforçadas com carbono, foram colocadas sobre gotas de suspensões contendo partículas virais purificadas e incubadas por 10 minutos à temperatura ambiente para permitir adsorção do vírus. Após duas lavagens em salina tamponada com fosfato (PBS) as telas foram incubadas, por 2 horas, com soro hiperimune de camundongo (anti MHV-CAM e anti MHV-3). Em seguida, as telas foram novamente lavadas em PBS e em seguida incubadas por 1 hora com anticorpo de coelho anti-imunoglobulina G de camundongo conjugado com ouro coloidal (Sigma Chemical Co, St Louis/USA) diluído 1/25 em tampão Tris (Tris-HCl 20mM, NaCl 150mM; pH 8.2). Após lavagem em PBS as telas foram imersas em água destilada e secas ao ar. O material foi então negativamente corado utilizando-se ácido fosfotungstico 1% (pH 7,4) por um minuto e finalmente examinado em Microscópio Eletrônico de Transmissão (Leo 906).

IV . RESULTADOS

4.1. Obtenção dos estoques de MHV-CAM

A partir de fígado e baço de animais infectados e apresentando sinais clínicos de infecção pelo MHV-CAM obteve-se vários estoques de vírus que foram aliquotados em tubos “ependorfs”, em um volume de 2ml, e estocados à -70°C até o momento de uso (Tabela 1).

Animais	Homogêinatos	Número de eppendorfs
Infectados com MHV-CAM	Fígado	125
	Baço	115
Controle	Fígado	145
	Baço	90

Tabela 1. Estoques de órgãos de animais com sinais clínicos de doença pelo MHV e animais controle.

Em paralelo, estoques do vírus MHV-3 também foram obtidos para serem utilizados nos experimentos para identificação e caracterização do MHV-CAM. O estoque inicial de MHV-3 foi gentilmente cedido pelo Centro de Controle Viroológico do CEMIB-UNICAMP. O vírus foi mantido, então, em nosso laboratório através de repiques de células L929 .

4.2. Infecção da Linhagem Celular L 929

Células L929 infectadas com o estoque do vírus MHV-CAM (Figura 1) apresentaram início do efeito citopático logo às 24 horas após a infecção. Após 72 horas de incubação foi observado aumento do efeito citopático, caracterizado por agrupamento das células e pela formação de sincícios. Células infectadas mostraram-se fluorescentes, indicando a presença de partículas virais em seu interior.

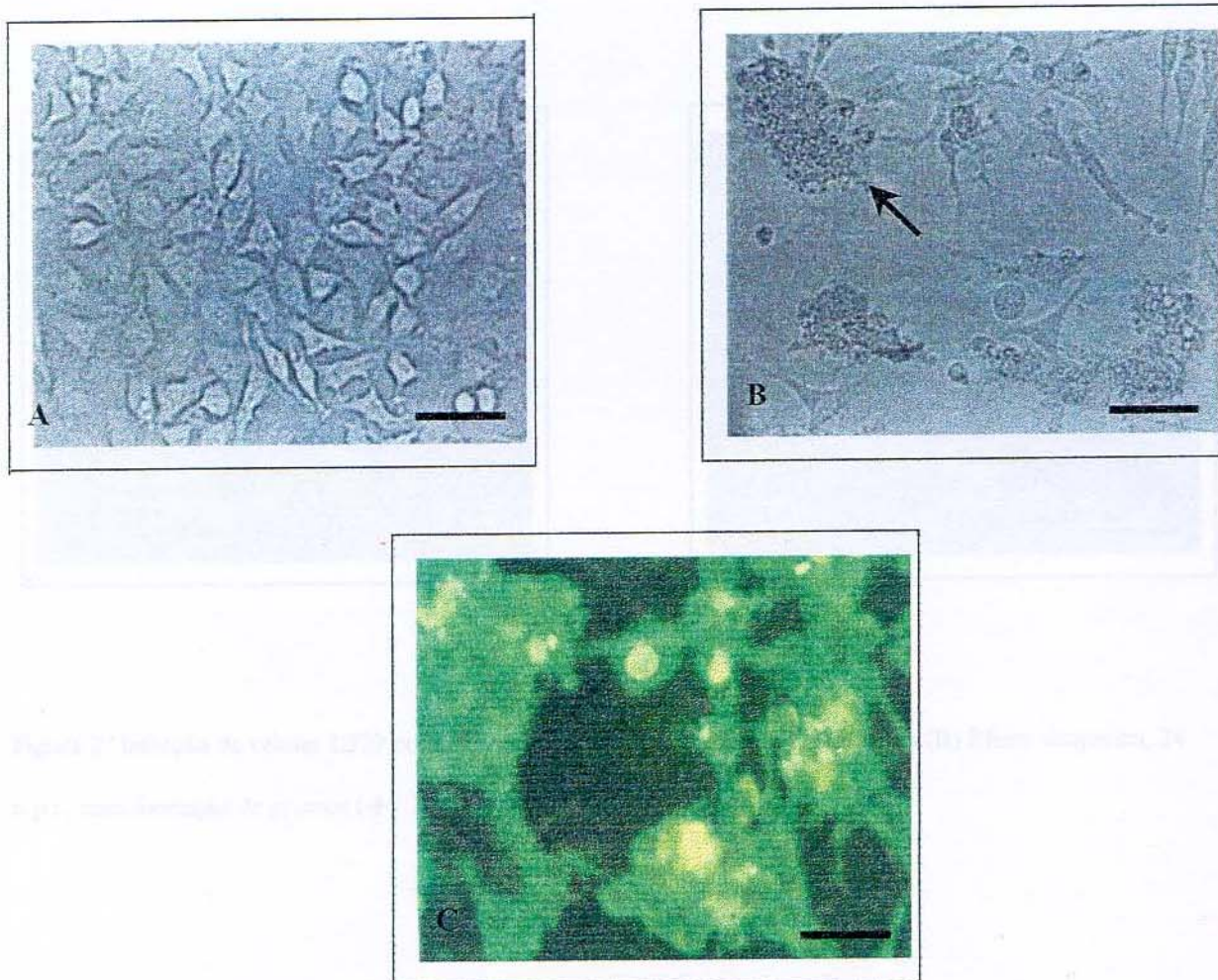


Figura 1: Infecção da linhagem celular L929 com MHV-CAM (A) células controle não infectadas ; (B). Início do efeito citopático (24h.p.i). Observar formação de grumos(→); (C) Partículas virais detectadas por imunofluorescência (24h.p.i).

Barra = 30 μm .

Em menos de 24 horas de infecção da linhagem celular L929 com o vírus MHV-3 foi observado efeito citopático, com grande agrupamento de células (Figura 2). Testes de imunofluorescência indireta também se mostraram positivo para infecção das células com este vírus (Dados não mostrados).

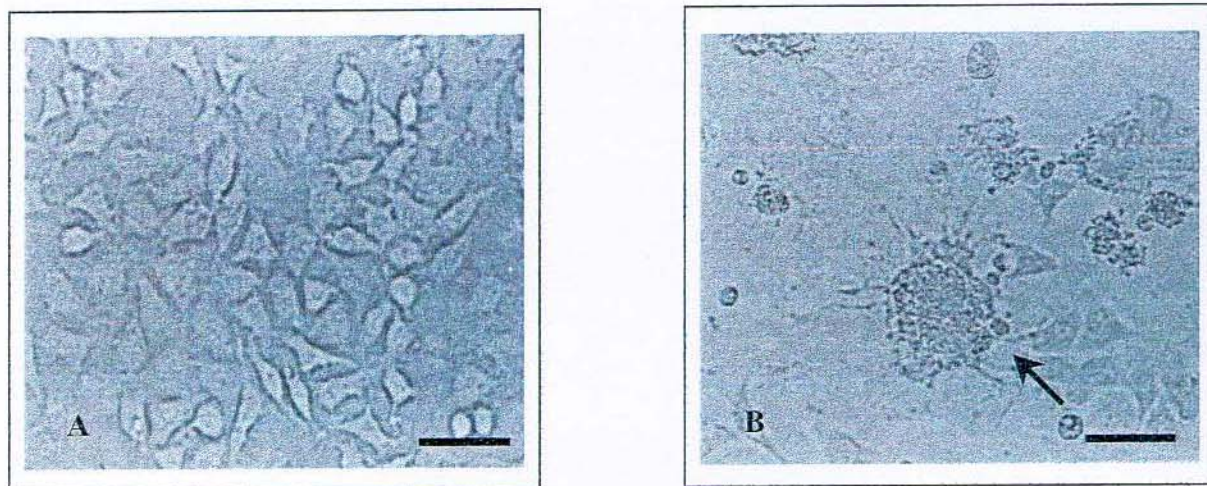


Figura 2: Infecção de células L929 com MHV-3. (A) células controle não infectadas (B) Efeito citopático, 24 h.p.i., com formação de grumos (→). Barra = 30 μ m.

4.3. Infecção da Linhagem Celular NCTC- 1469

Após 24 horas de infecção foi observado o início do efeito citopático, com as células apresentando-se agrupadas, e com formação de grumos (Figura 3). Após a terceira passagem da linhagem celular infectada o efeito citopático com agrupamento e morte de células era evidente. As alterações descritas acima não foram observadas com a linhagem celular mantida como controle, e portanto, não infectadas .

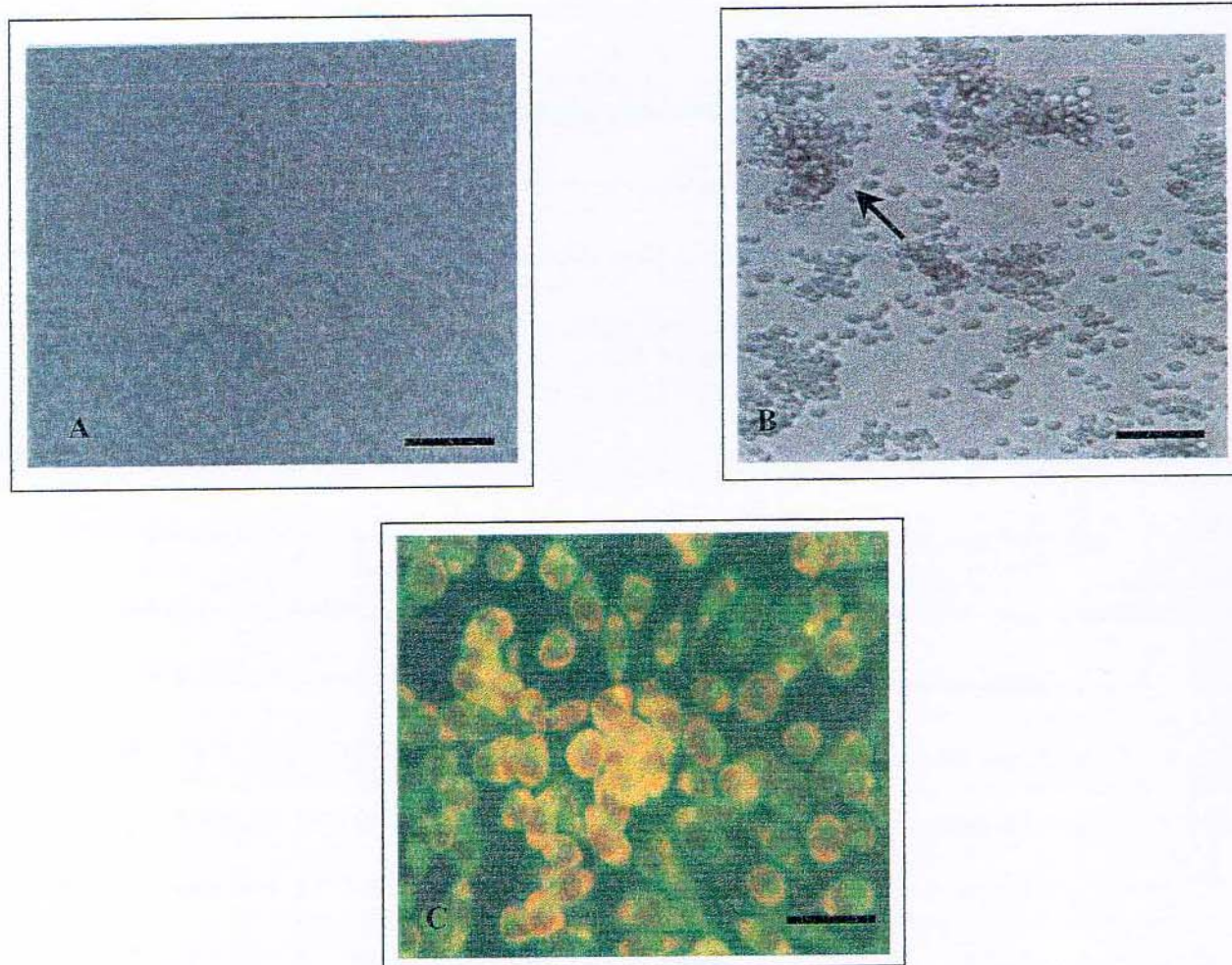


Figura 3: Infecção da linhagem celular NCTC 1649 com MHV-CAM. (A) células controle não infectadas; (B) Início do efeito citopático, 24h.p.i, com formação de grumos (→); (C) Partículas virais detectadas por imunofluorescência(24h.p.i).

Barra = 30 μ m .

4.4. Infecção da Linhagem Celular J774.1

Nesta linhagem não foram observadas mudanças nas primeiras horas de infecção. Mesmo sem a observação do efeito citopático, foram realizadas algumas passagens seriadas (passagens cegas). Na quinta passagem foi observado que a maioria das células apresentavam sinais de morte por lise (Dados não mostrados).

4.5. Infecção da Linhagem Celular N- Balb- 3T3

Após descongelamento, as células foram colocadas em cultura com o objetivo de mantê-las por cinco repiques antes que a infecção com o vírus fosse realizada. Embora nas duas primeiras passagens as células apresentassem crescimento acelerado e aspecto normal, à partir da terceira passagem observou-se uma queda no ritmo de seu crescimento. A infecção não foi realizada e as células foram submetidas a um novo teste para detecção de micoplasma que se mostrou positivo. O tratamento para descontaminação da linhagem celular foi efetuado utilizando Ciprofloxacin® (solução fina de 2 mg/ml) por dez passagens consecutivas e a cultura novamente testada para a presença de micoplasma. Embora a cultura se mostrasse agora negativa para a presença do micoplasma, repetidas tentativas, incluindo seis passagens seriadas “cegas” (sem observação do efeito citopático) falharam em revelar crescimento viral. Efeito citopático não pode ser observado em nenhum momento da infecção e partículas virais não foram detectas pela técnica de imunofluorescência.

4.6. Titulação *in vitro* dos vírus MHV-CAM e MHV-3

A tabela 2 mostra a dose capaz de induzir efeito citopático em 50% das células L929 infectadas (TCID_{50%}).

Vírus	TCID _{50%}
MHV-3	10 ^{-3,5}
MHV-CAM	10 ^{-3,74}

Tabela 2: Dose capaz de induzir efeito citopático em 50% das células da linhagem L929 infectadas com MHV-3 e MHV-CAM.

4.7. Teste de patogenicidade *in vivo*

A capacidade de partículas virais, recuperadas do sobrenadante da linhagem celular L929, induzirem doença aguda após sua inoculação em animais foi testada utilizando-se camundongos susceptíveis, da linhagem C57BL/6, com oito semanas de idade. Embora a replicação viral pudesse ser observada regularmente nas células L929, o vírus aparentemente perdeu sua habilidade de induzir doença aguda nos animais. Nenhum sinal clínico de infecção viral, como prostração, inapetência ou pêlos eriçados, foi observado nos camundongos infectados com os estoques obtidos da cultura celular.

4.8. Purificação das Partículas Virais

Partículas virais obtidas do sobrenadante de culturas celulares infectadas e purificadas em gradiente de sacarose, foram recuperadas da banda clara formada na interface dos gradientes. Aliquotas de 2ml foram estocadas a -70°C até o momento de uso.

4.9. Obtenção de soros hiperimunes anti MHV-CAM e anti MHV-3

O soro hiperimune anti MHV-CAM e o soro hiperimune anti MHV-3 produzidos em animais imunizados foram distribuídos em alíquotas e congelados a -70°C . A Tabela 3 mostra os títulos dos soros obtidos após a imunização de camundongos.

Soro Hiper-imune	Título obtido por IFI
Anti MHV-CAM	1:160
Anti MHV-3	1:80

Tabela 3. Titulação dos soros hiperimunes produzidos em camundongos Balb/c.

4.10. Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET)

A caracterização da estrutura viral do MHV-CAM foi feita através da técnica de MET. Partículas virais arredondadas, moderadamente pleomórficas e com projeções de espículas, características dos Coronavírus, foram visualizadas (Figura 4).

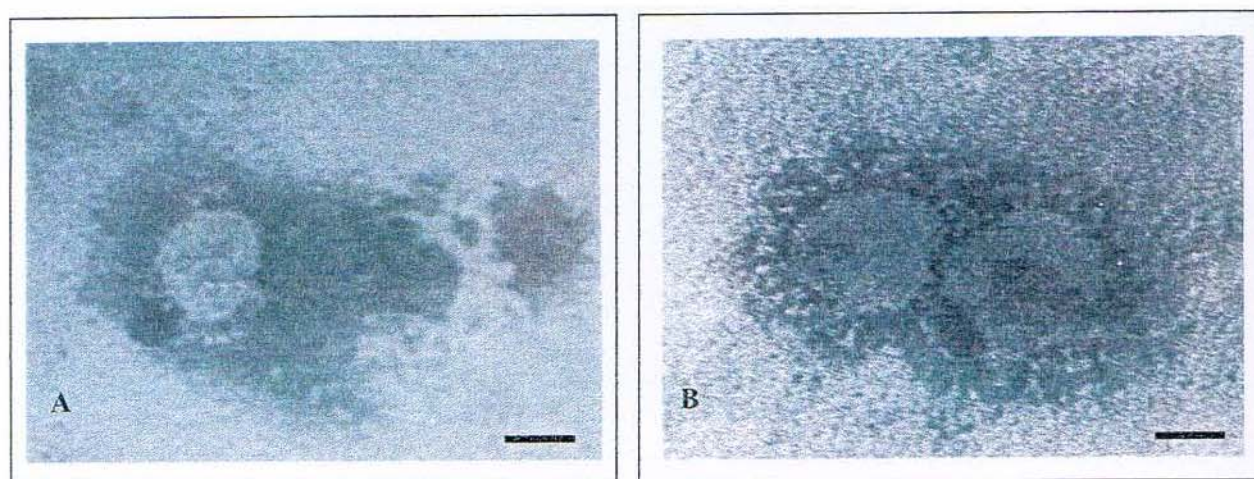


Figura 4: Partículas virais obtidas do sobrenadante das culturas de células L929 infectadas. (A) MHV-3, barra=54nm; (B) MHV-CAM, barra = 31nm

4.11. Teste de Neutralização *in vitro*

O teste de Neutralização *in vitro* demonstrou que os soros hiperimunes anti MHV-3 e anti MHV-CAM exibem forte atividade neutralizante uma vez que nenhum efeito citopático sobre células L929 foi observado quando a mistura soro/vírus era utilizada. As misturas anti MHV-CAM/MHV-CAM e anti MHV-3/MHV-CAM exibiram atividade neutralizante em diluições de até 1/5.120, e as misturas anti MHV-3/MHV-3 e anti MHV-CAM/MHV-3 exibiram atividade neutralizante em diluições de até 1/10.240.

4.12. Eletroforese em Gel de Poliacrilamida na presença de SDS (SDS PAGE)

A figura 5 mostra os resultados obtidos com o SDS-PAGE. Pode-se observar a presença de quatro proteínas estruturais para o MHV-CAM: proteína S com 200K (espícula), proteína N com 50K (nucleocapsídeo), proteína M com 30K (membrana) e proteína E com 20K (envelope). Estas proteínas têm aparentemente o mesmo peso molecular das proteínas estruturais do MHV-3, já descritas na literatura e que também podem ser observadas aqui.

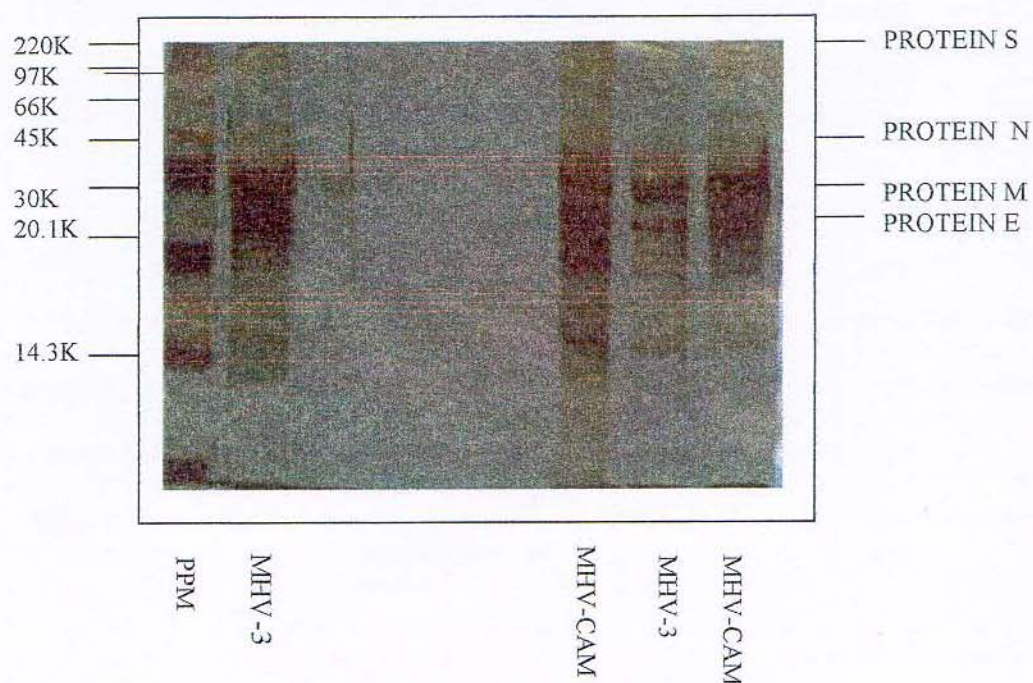


Figura 5: SDS PAGE. Presença das quatro proteínas estruturais no vírus MHV-CAM à semelhança do MHV-3.

4.13. Teste de “Immunoblotting”

A Figura 6 mostra os resultados obtidos com o “Immunoblotting”. A análise destes experimentos demonstra que os anticorpos anti MHV-3 e anti MHV-CAM foram capazes de reconhecer a proteína N (50K) e a proteína M (30K) dos vírus tanto na reação específica (cada vírus com seu anticorpo específico) como na reação cruzada (cada vírus com o anticorpo não específico).

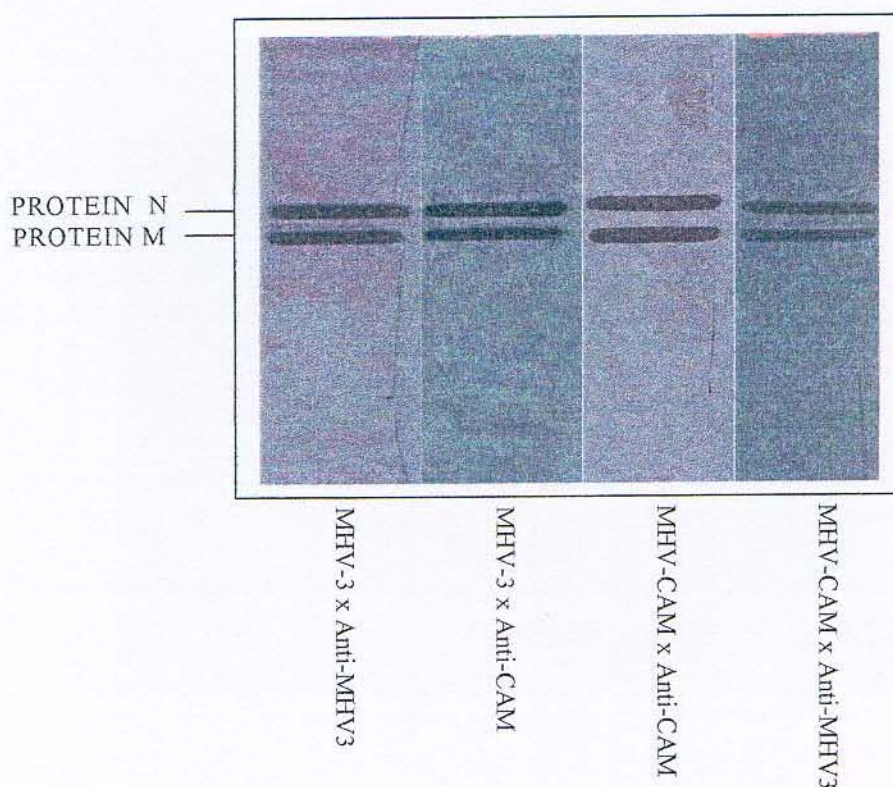


Figura 6: Immunoblotting dos vírus MHV-CAM e MHV-3 com seus respectivos anti- soros e também em reações cruzadas. As bandas revelam a marcação das proteínas estruturais N e M em ambas amostras virais.

4.14. Imuno-Microscopia Eletrônica

A caracterização antigênica do vírus MHV-CAM foi finalizada com a análise dos resultados obtidos com a Imuno-Microscopia Eletrônica de Transmissão (Figura 7). A presença de partículas arredondadas, pleomórficas e com espículas foram visualizadas através da marcação com ouro coloidal.

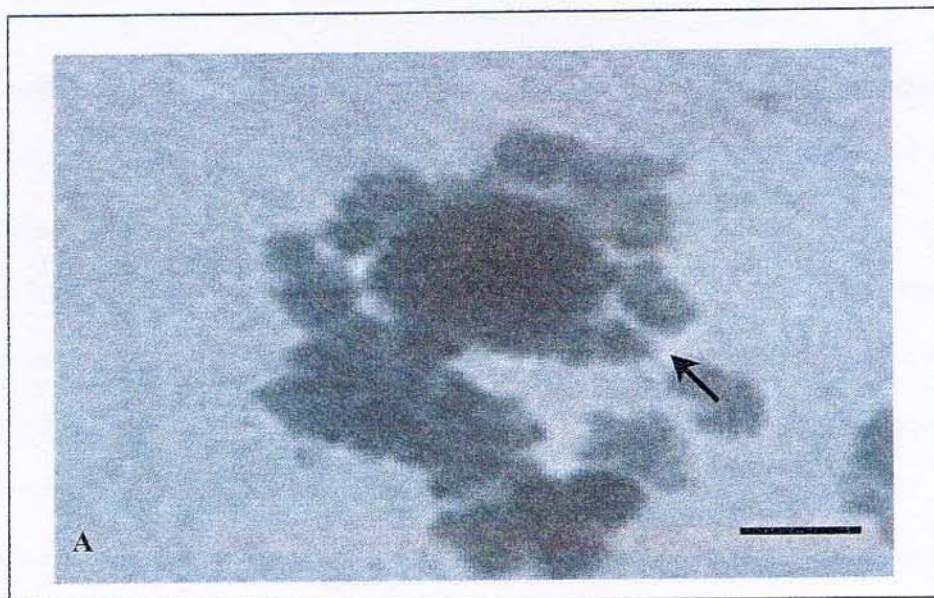


Figura 7: Imuno Microscopia Eletrônica de Transmissão do vírus MHV -CAM. Barra = 0,5 μm . Observar a partícula viral ($\rightarrow$).

V. DISCUSSÃO

V . DISCUSSÃO

A infecção pelo Vírus da Hepatite Murina (MHV) é altamente prevalente em camundongos de laboratório do mundo todo, podendo causar doença entérica, respiratória, hepática ou neurológica nos animais. Sob condições naturais, o MHV pode ser transmitido pela rota respiratória ou oro-fecal e a expressão de doença aberta requer a presença de animais neonatos, imunocomprometidos ou geneticamente susceptíveis nos biotérios. A manutenção da infecção em uma população, conhecida como infecção enzoótica, requer a contínua exposição de camundongos jovens ou susceptíveis ao vírus causador da doença. A prática bastante comum de introdução freqüente de camundongos neonatos em biotérios enzooticamente infectados contribui para a perpetuação da contaminação nos biotérios convencionais. Além disso, a prática de acasalamento dos animais em biotérios contaminados também muito contribui para a manutenção e propagação da infecção. A transmissão vertical é possível, porém rara. A prevenção da infecção é difícil em biotérios que constantemente recebem animais, mas pode ser alcançada com a implantação de algumas barreiras físicas, ou com o uso de unidades isoladoras, e com a obtenção de animais Livres de Patógenos Específicos (S.P.F.) de fornecedores confiáveis. A vacinação tem-se mostrado eficiente em reduzir a severidade da infecção, mas não em preveni-la totalmente. Além disso, o grande número de diferentes cepas de MHV, aliada ao fato de geralmente se tratar de infecções subclínicas, principalmente quando o vírus é enzoótico em uma colônia, tornam a vacinação impraticável. O tropismo pelas células ou tecidos linfóides é a marca registrada dos MHV e, portanto, um grande impacto na área de Imunologia experimental pode ser facilmente previsto.

Recentemente, o laboratório de Imunopatologia do Departamento de Microbiologia e Imunologia detectou e isolou um vírus contaminante de alguns estoques do parasita *Trypanosoma cruzi* que foi provisoriamente denominado de MHV-CAM, e que era capaz

de alterar profundamente o curso da infecção da Doença de Chagas experimental. A identificação e caracterização deste agente tornaram-se, então, o propósito deste trabalho.

O passo inicial e essencial para o início do trabalho foi à adaptação do vírus em sistemas de cultura de células, tendo em vista os títulos muito baixos de partículas virais que eram obtidas à partir dos órgãos de animais infectados pelo MHV-CAM. A literatura mostra que muitas estirpes de Coronavírus adaptam-se bem a replicação em cultura de órgãos e células, entretanto, tanto a origem das células como condições de crescimento apropriadas são particularmente importantes para o isolamento e a propagação destes vírus (CHALONER-LARSSON & JOHNSON-LUSSENBURG, 1981; HOLMES & LAI, 1996).

Quatro linhagens celulares diferentes, NCTC-1469, L-929, N-Balb-3T3 e J774A.1, foram testadas quanto à susceptibilidade para infecção pelo MHV-CAM com o objetivo de melhorar as condições para a purificação das partículas e assim facilitar os estudos envolvendo sua caracterização estrutural e antigênica. Duas linhagens celulares, NCTC-1469 e L929, mostraram-se capazes de sustentar a infecção viral após um extenso período de adaptação por repetidas passagens ou repiques. Isto pôde ser evidenciado através de alterações citopatológicas progressivas, formação de sincício e pela presença de partículas virais detectadas pela técnica de Imunofluorescência Indireta (IFI).

Por outro lado, as linhagens celulares N-Balb-3T3 e J-774A.1 não foram capazes de sustentar a multiplicação do vírus MHV-CAM. LAMONTAGNE & DUPUY (1984), estudando a infecção persistente do MHV-3 nas linhagens de células linfóides YAC e RDM4 observaram que baixos títulos de partículas virais estavam associados com um aumento na lise celular. Os autores sugerem que em determinados sistemas celulares pode haver a ocorrência de eventos sequenciais, nos quais a produção do vírus leva a um acúmulo de antígenos virais com subsequente morte celular. MASSALSKI *et al* (1982),

também demonstraram um acúmulo de material viral após uma interrupção abrupta de multiplicação viral em células L2 infectadas pela estirpe JHM do MHV. É possível que o mesmo fenômeno tenha ocorrido nas células N-Balb-3T3 e J-774A.1, devido às características inerentes destes sistemas celulares, o que impediu a adaptação do MHV-CAM nestas linhagens.

Testes de patogenicidade “*in vivo*” demonstraram que, aparentemente, a habilidade do MHV-CAM em induzir doença aguda, quando inoculado em camundongos susceptíveis da linhagem C57BL6, foi perdida após sua adaptação na cultura de células. Este fato pode estar relacionado ou com o acúmulo de partículas defeituosas ou com a seleção de variantes virais que mantêm sua patogenicidade “*in vitro*” mas apresentam efeitos patogênicos reduzidos “*in vivo*”. LAMONTAGNE & DUPUY (1984), também relatam a perda da capacidade de MHV-3 induzir infecção sub-clínica em animais susceptíveis após adaptação do vírus para o crescimento em células YAC. Estas variantes não-patogênicas, entretanto, podem ainda apresentar propriedades antigênicas e, portanto, estimular mecanismos de defesa que capacitam o animal a sobreviver quando desafiado com partículas virais virulentas. Assim, a possibilidade de utilização destas variantes como uma vacina não pode ser excluída. Além disso, a obtenção de infecção persistente do MHV-CAM, nas linhagens celulares NCTC-1469 e L-929, representa um modelo interessante, para nosso laboratório, no estudo tanto das interações vírus-células como dos mecanismos celulares envolvidos na perda da patogenicidade viral.

A purificação do MHV, através da precipitação com sulfato de amônia e subsequente ultracentrifugação em gradiente de sacarose, é um procedimento bem estabelecido e já descrito na literatura (SPAAN et al., 1981; KRAFT & MEYER, 1986). A adaptação do MHV-CAM para a replicação *in vitro* possibilitou-nos a obtenção de grandes

quantidades de partículas virais, a partir do sobrenadante das culturas celulares, que foram então concentradas e purificadas viabilizando a completa caracterização do patógeno.

A caracterização estrutural do MHV-CAM foi realizada utilizando-se a técnica de Microscopia Eletrônica de Transmissão. Partículas virais de 100 a 150 nm, moderadamente pleomórficas e com projeções de superfície semelhantes a uma coroa (espículas), as quais caracterizam os Coronavírus, foram visualizadas. Este resultado confirma a expectativa inicial em relação à identidade do vírus isolado, uma vez que atualmente o MHV é o vírus mais comumente encontrado em colônias de camundongos utilizados na pesquisa científica.

A identificação da estirpe ou cepa à qual pertence o MHV-CAM foi realizada através de sua caracterização antigênica utilizando-se para tal a técnica de Eletroforese em Gel de Poliacrilamida na presença de Dodecil Sulfato de Sódio (SDS-PAGE), o teste de “Immunoblotting” e Testes de Neutralização *in vitro*.

O SDS-PAGE das proteínas virais do MHV-CAM revelou-nos a presença das quatro proteínas estruturais (S, M, N e E), características dos Coronavírus, num padrão de bandas semelhante ao encontrado para o Vírus da Hepatite Murina tipo 3 (MHV-3). Este resultado já nos identificava antigenicamente o MHV-CAM como sendo, muito provavelmente, um MHV-3. A visualização, tanto em relação do MHV-CAM quanto em relação ao MHV-3, de outras bandas, além das quatro proteínas estruturais, pode ser atribuída à degradação das proteínas estruturais durante o processo de fervura para o preparo das amostras antes da aplicação do gel.

O Teste de “Immunoblotting”, realizado com anticorpos policlonais produzidos em camundongos S.P.F. e comprovadamente livres de infecção prévia por MHV, revelou uma forte reação com as proteínas virais M e N. O fato dos anticorpos serem capazes de reconhecer estas proteínas tanto em reações específicas (MHV-CAM X ANTI- MHV-CAM

e MHV-3 X ANTI- MHV-3) como em reações cruzadas (MHV-CAM X ANTI- MHV-3 e MHV-3 X ANTI- MHV-CAM) de forma idêntica, reforça a certeza da identidade de nosso vírus contaminante como sendo um MHV-3.

Atualmente, o Centro de Controle Viroológico do Cemib–Unicamp (CCV/CEMIB-Unicamp) monitora nossas colônias de camundongos utilizando a técnica denominada de Mouse Antibody Production Test (MAP Test) que detecta, pelo método de IFI, a presença de anticorpos para MHV no soro de animais infectados. O método de “immunoblotting”, realizado em nosso laboratório, demonstrou que as proteínas virais do MHV retêm seus grupos imunoreativos após a eletroforese e o “blotting”, e ainda, que os anticorpos primários a serem empregados na reação podem ser policlonais pois demonstram alta especificidade sem qualquer vestígio de “background”. Estas observações levantam a possibilidade de utilização deste método como um teste diagnóstico alternativo para detecção de possíveis contaminações no plantel de vários biotérios monitorados pelo CCV/CEMIB-Unicamp.

Finalmente, os testes de Neutralização “*in vitro*” em células L929 colaboraram para a completa identificação do vírus isolado em nosso laboratório, uma vez que demonstram forte atividade neutralizante dos soros hiperimunes tanto nas reações específicas como nas reações cruzadas. A diferença reportada em relação às diluições dos anticorpos deve ser atribuída à variações inerentes à própria técnica ou talvez a uma quantidade maior de partículas de MHV-CAM inadvertidamente misturadas com os anti-soros. A possibilidade de utilização do Teste de Neutralização “*in vitro*” como um teste diagnóstico para detecção de possíveis infecções pelo MHV nos biotérios também pode ser considerada.

Em conclusão, o vírus isolado de nossas amostras de *Trypanosoma cruzi* mostrou, por diferentes métodos, similaridades estruturais e antigênicas com o MHV-3, sendo, portanto, altamente provável que pertença à esta estirpe de Coronavírus.

Nossos resultados reforçam, ainda, o alerta de que dados obtidos em diferentes protocolos experimentais que utilizam camundongos mantidos de modo convencional devem ser interpretados com cautela, uma vez que os Coronavírus são altamente contagiosos, apresentam distribuição mundial e, principalmente, têm uma bem documentada capacidade de interferir com a pesquisa biomédica.

VI. CONCLUSÕES

- O Vírus MHV-CAM foi adaptado com sucesso para a replicação em culturas de células, o que possibilitou, além de seu isolamento e purificação, a obtenção de um modelo interessante para o estudo das interações vírus-células;
- A perda da habilidade do MHV-CAM em induzir doença aguda em animais susceptíveis após sua adaptação em cultura de células, refletindo ou o acúmulo de partículas virais defeituosas ou a seleção de variantes, possibilita o estudo dos mecanismos celulares envolvidos na perda da patogenicidade dos vírus;
- De acordo com os resultados experimentais obtidos, o vírus MHV-CAM apresentou similaridades estruturais e antigênicas com o Vírus da Hepatite Murina tipo3 (MHV-3). É altamente provável, portanto, que o vírus contaminante, detectado em nossos estoques de *Trypanosoma cruzi*, seja, como previsto inicialmente, o MHV-3;
- As técnicas de “Immunoblotting” e os Testes de Neutralização *in vitro* mostraram-se eficientes para detecção de possíveis contaminações em animais de laboratório mantidos de modo convencional, e
- Nossos dados ainda alertam para o fato de que muitos resultados obtidos na infecção chagásica experimental e, s.m.j., em outros protocolos experimentais que utilizam camundongos mantidos de forma convencional como ferramenta de trabalho, devem ser interpretados com cautela uma vez que os Coronavírus possuem uma bem documentada história de interferência nas pesquisas biomédicas, principalmente na área de Imunologia, devido a sua capacidade imuno-modulatória.

VII . ABSTRACT

Grippe, M. C. **IDENTIFICATION AND CHARACTERIZATION OF A MURINE CORONAVIRUS (MHV-CAM) IN COMPARISON WITH MURINE HEPATITES VIRUS TYPE 3.** Tese de Mestrado, Departamento de Microbiologia e Imunologia, Instituto de Biologia, UNICAMP.

Recently, we have detected a contaminant virus in some stocks of *Trypanosoma cruzi*, the causative agent of Chagas' disease. This virus, provisionally named MHV-CAM, was isolated in juvenile susceptible mice followed by establishment in cell culture for characterization.

Four cell lines of mice origin were tested for susceptibility to infection and L929 and NCTC 1469 cells showed to support growth of this virus.

Viral particles and structural proteins, purified from the supernatant medium over L929 cells, were analyzed by (i) Transmission Electron Microscopy, (ii) SDS-PAGE, (iii) Immunoblotting, and (iv) Virus Neutralization Assay. In all experiments, MHV-CAM showed structural and antigenic relationship including cross protection (blocking reaction) with Murine Hepatitis Virus type 3 (MHV-3). Therefore, our results present evidences sustaining that the contaminant virus in our *T. cruzi* stocks is, most likely a MHV type 3 or a very close related specie which should deserve a confirmation by molecular analysis.

In parallel, this study indicates that some stocks of parasites can be contaminated with MHV-3, a highly contagious Coronavirus infecting laboratory mouse worldwide, and that some data obtained in experimental Chagas' disease should be interpreted with caution since the major adverse effect of MHV infection is immunomodulation.

VIII . REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Barthold, S.W. & Smith, A.L. 1984. Mouse hepatitis virus strain-related patterns of tissue tropism in suckling mice. **Archives of Virol.** **81**:103-112.

Barthold, S.W. & Smith, A.L. 1992. Viremic dissemination of mouse hepatitis virus JHM following intranasal inoculation of mice. **Arch. Virol.** **122**: 35-44.

Bond, C.W.; Leibowitz, J.L. & Robb, J.A. 1979. Pathogenic mouse coronaviruses. II. Characterization of virus-specific proteins of mouse coronaviruses: MHV- JHM and MHV-A59. **Virology.** **94**: 371-384.

Boorman, G.A.; Luster, M.I.; Dean, J.H. *et al.* 1982. Peritoneal macrophage alterations caused by naturally occurring mouse hepatitis virus. **Am. J. Pathol.** **106**: 110-117.

Broderson, J.R.; Murph, F.A. & Hierholzer, J.C. 1976. Lethal enteritis in infant mice caused by mouse hepatitis virus. **Lab. Anim. Sci.** **26**: 824-832.

Chaloner-Larsson, G. & Johnson- Lussemburg, C.M. 1981. Establishment and maintenance of a persistent infection of L132 cells by human coronavirus strain 229E. **Arch. Virol.** **69**: 117-129.

De Souza, M.S.; Smith, A.L. & Bottomly, K. 1991. Infection of BALB/cByJ mice with JHM strain of mouse hepatitis virus alters *in vitro* splenic T cell proliferation and cytokine production. **Lab. Anim. Sci.** **41**: 99-105.

Dempsey, W.L.; Smith, A.L. & Morahan, P.S. 1986. Effect of inapparent mouse hepatitis virus infection on macrophages and host resistance. **J. Leuk. Biol.** **39**: 559-565.

Foster, H.L; Small. J.D & Fox, J.G. 1982. The mouse in biomedical research. **London, Academic Express**

Gilioli, R.; Sakurada, J.K.; Andrade, L. & Rangel, H.A.. 1996. Virus infection in rat and mouse colonies reared in Brazilian animal facilities. **Lab. Anim. Sci.** **46**: 582-584.

Kraft, V. & Meyer, B.1986. Diagnosis of murine infections in relation to test methods employed. **Lab. Anim. Sci.****36 (3)**: 271-276

Knobler, R.L. & Oldstone, M.B.A. 1987. Infection and involution of mouse thymus by MHV4. **Adv. Exp. Med. Biol**: 218: 451-455.

Kyuwa, S.; Yagamuch, K.; Toyoda, Y. Fujiwara, K. & Hilger, J. 1992. Acute and late disease induced by mouse coronavirus, strain JHM, in a series of recombinant inbred strains between BALB/cHeA and STS/A mice. **Microb. Pathog.** **12**: 95-104.

Heegaard, N.H.H & Bjerrum,O. 1988. Immunoblotting – General Principles and Procedures. **Handbook of Immunoblotting of Proteins**: 1-15.

Holmes, K. V. & Lai, M. M.C. 1996. Coronaviridae: The viruses and Their Replication. *In*: B.N.Fields , D. M. Knipe, P. M. Howley, et al. (eds) **Fields Virology**. Lippincott-Raven Publishers, Philadelphia. 1996, pp 1075-1093.

Laemmli, U.K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature** **227**:680-685.

Lamontagne, L.M. & Dupuy, J. 1984. Persistent Infection with Mouse Hepatitis Virus 3 in Mouse Lymphoid Cells. **Infect. Immun.** **44 (3)**: 716-723

Lamontagne, L.; Dupuy, C.; Leray, D.; Chausseau, J.P. & Dupuy, J.M. 1985. Coronavirus-induced immunosuppression: role of mouse hepatitis virus 3-lymphocyte interaction. **Prog. Leuk. Biol.** **1**: 29-35.

Lamontagne, L.M.; Descoteaux, J.P. & Jolicoeur, P. 1989. T and B lymphotropisms of mouse hepatitis virus 3 correlate with viral pathogenicity. **J. Immunol.** **142**: 4458-4469.

Le Prévost, C.; Levy-Leblond, B.; Virelizier, J.L. & Dupuy, J.M. 1975. Immunopathology of mouse hepatitis virus type 3 infection. I. Role of humoral and cell-mediated immunity in resistance mechanism. **J. Immunol.** **117**: 221-230.

Lussier, G.& Descoteaux J.P. 1990. Prevalence rates of natural viral infections in laboratory rats and mice used in Canada: A three-year study. **CALAS Newsletter.** **23**: 6-11.

Massalki, A; Coulter-Mackie, M & Knobler, R.L. 1982. *In vivo* and *in vitro* models of demyelinating diseases. V. Compararison of the assembly of mouse hepatitis virus, strain JHM, in two murine cell lines. **Intervirology**. **18**: 135-146.

Rangel, H.A.; Verinaud, L.; Camargo, I.J.B.; Giglioli, R. & Sakurada, J.K. 1994a. *Trypanosoma cruzi*: murine virus contaminant of the experimental infection. **Exp. Parasitol.** **78**: 429-431.

Rangel, H.A.; Verinaud, L.; Camargo, I.J.B.; Giglioli, R. & Sakurada, J.K.. 1994b. Murine virus contaminant of *Trypanosoma cruzi* experimental infection. **Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo**. **36**: 423-431.

Reed, L.J. & Muench, H. 1938. A simple method of estimating fifty percent end points. **Am. J. Hyg.** **27**: 493-497

Sebesteny, A. & Hill, A.C. 1974. Hepatitis and lesions due to mouse hepatitis virus accompaigned by wasting in nude mice. **Lab. Anim. Sci.** **8**: 317-326.

Smith, A.L. ;Winograd, D.F. & Souza, M.S. 1991. *In vitro* splenic T cell responses of diverse mouse genotypes after oronasal exposure to mouse hepatitis virus, strain JHM. **Lab. Anim. Sci.** **41**: 106-111.

Spaan, W. J. M.; Rottier, P. J. M.; Horzinek, M.C. & Van Der Zeijst, A.M. 1981. Isolation and Identification of Virus –Specific mRNAs in Cells Infected with Mouse Hepatitis Virus (MHV-59). **Virology**. **108**: 424-434.

Stott, D.I. 1989. Immunoblotting and dot blotting. **J. Immunol. Methods**. **119**: 153-187.

Taguchi, F.; Makino, S. & Fujiwara, K. 1982. Antigenic differentiation of mouse hepatitis viruses by neutralization test. **Microbiol. Immunol**. **26**: 741-745.

Trexler, P.C. 1959. The use of plastics in the design of an isolator system. **Ann. N. Y. Acad. Sci**. **78**: 29-36.

Verinaud L., Camargo, I.J.B., Vassallo, J., Sakurada, J.K., Rangel, H.A. 1999. Lymphoid Organ Alterations Enhanced by sub-lethal doses of Coronaviruses in Experimentally induced *Trypanosoma cruzi* infection in mice. **Lab. Anim. Sci**. **49**: 35-41.