

UNIVERSIDADE  
ESTADUAL DE  
CAMPINAS

*mestrado*

**BC/55489**

**IB/ 81976**

INSTITUTO DE BIOLOGIA



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

DANIEL ROBERTO CORADI DE FREITAS

DETECÇÃO DE PICOBIRNAVÍRUS POR  
RT-PCR EM FEZES DE RATOS E  
SUÍNOS E POR IMUNOPEROXIDASE  
EM INTESTINOS DE RATOS.

Este exemplar corresponde à redação final  
da tese defendida pelo(a) candidato (a)  
Daniel Roberto Coradi  
de Freitas  
e aprovada pela Comissão Julgadora.

Dissertação apresentada ao  
Instituto de Biologia para  
obtenção do título de Mestre  
em Genética e Biologia  
Molecular na área de  
Microbiologia

ORIENTADOR: MARIA SILVIA VICCARI GATTI

CAMPINAS, ABRIL DE 2003

UNIVERSIDADE	ESTADUAL DE CAMPINAS
RECHAMADO	T/Unicamp
F883d	
V	EX
TOMBO DC7	55489
PROC.	1-2103
PREÇO	3/1
DATA	30/08/03
Nº CPD	

Bib id 298620

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

**F884d**

**Freitas, Daniel Roberto Coradi de**

Detecção de Picobirnavírus por RT-PCR em fezes de ratos e suínos e por imunoperoxidase em intestinos de ratos / Daniel Roberto Coradi de Freitas. -- Campinas, SP:[s.n.], 2003.

Orientadora: Maria Silvia Viccari Gatti

Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual de Campinas.

Instituto de Biologia.

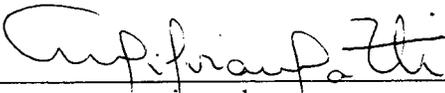
1. Virologia. 2. Diagnóstico virológico. 3. Histopatologia. I. Gatti, Maria Silvia Viccari. II. Universidade Estadual de Campinas. Instituto de Biologia. III. Título.

Data da Defesa: 11 de abril de 2003.

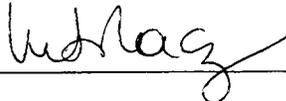
**Banca Examinadora**

**Titulares:**

Profª. Dra. Maria Silvia Viccari Gatti

  
orientadora

Profª. Dra. Maria Lúcia Barbosa de Oliveira RÁCZ



Prof. Dr. Domingos da Silva Leite



**Suplente:**

Prof. Dr. Paulo Pinto Joazeiro

\_\_\_\_\_

## **DEDICATÓRIA**

Dedico esse trabalho a todas as mulheres e homens que contribuíram com horas do seu trabalho para minha formação escolar pública e gratuita.

A esses homens e mulheres que, pelas injustiças sociais de nosso país, não podem sequer sonhar com a possibilidade de um ensino superior público e gratuito para si ou para seus filhos, fica minha dívida que espero poder honrar lutando pela democratização do saber e pela boa educação pública e gratuita para todos os trabalhadores.

## **AGRADECIMENTOS**

Começo por agradecer alguns velhos amigos pelos ótimos momentos de desconcentração e reflexão nos assuntos diversos da juventude que certamente influenciaram minhas escolhas; aos amigos Paulinho, Celso, Zé Antonio, Júlio, Carlinhos e Renato, um grande abraço.

Aos amigos que dividiram alegrias e dificuldades no decorrer da graduação em Licenciatura em Ciências Biológicas, sobretudo os moradores e agregados da D-11 (minha casa na Moradia Estudantil por cinco anos) Silvério, Gabriela, Jandui e Fred, meu muito obrigado.

Pelo companheirismo sempre presente, agradeço ao amigo Fabiano (o Careca) e aos meus irmãos e irmãs Denis, Denimar, Darlei, Dimara e Darlene.

Pela alegria que trazem, agradeço aos meus sobrinhos Rafaela, Luan, Lucas, Lia, Luê e Leon.

Pelo acolhimento fraterno em sua família, agradeço ao Sr. Kenhiro e Dona Alzira, pai e mãe de minha companheira.

Pela compreensão da minha ausência e pelo apoio incondicional às minhas escolhas, agradeço aos meus pais Décio e Marilda.

Pela iniciação na carreira científica, agradeço aos professores Carlos Fernando Salguerosa Andrade, Maria Sumiko Arita Matsuura e Carlos Francisco Sampaio Bonafé.

Pelo trabalho em grupo, forte amizade, contribuições na realização dos experimentos e nas discussões do presente trabalho, agradeço aos amigos do laboratório de Virologia Animal Ana Lúcia, Daniele, Rovilson, Sandra e Verena.

Agradeço ao Prof. Dr. Paulo Pinto Joazeiro e a Profa. Dra. Clarice Weiss Arns pelas contribuições na banca prévia a aos Prof. Dr. Domingos da Silva Leite e Profa. Dra. Maria Lúcia B. O. Rácz pela participação e contribuições na banca examinadora.

Agradeço a FAPESP pelo financiamento do projeto através da bolsa concedida e ao Parque Ecológico “Cid A. Franco” do município de Americana por ter colaborado no envio de amostras.

Pelo exemplo de trabalho, honestidade e dedicação à universidade pública e por ter me orientado nesse trabalho e na minhas escolhas profissionais e científicas, agradeço à amiga Profa. Dra. Maria Silvia Viccari Gatti.

Por fim, à Kimi, minha companheira de oito anos, que finaliza comigo essa etapa da minha vida, minha gratidão eterna que não pode ser contemplada com dizeres, mas que nossos olhares sempre saberão compreender...

“É bem verdade que nem a juventude sabe o que pode, nem a velhice pode o que sabe”

José Saramago

# ÍNDICE

SIGLAS	ix
DESIGNAÇÃO DOS QUADROS E TABELAS	x
DESIGNAÇÃO DAS FIGURAS	xi
RESUMO	01
ABSTRACT	03
1. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	05
1.1 Características Gerais dos Picobirnavírus	07
2. OBJETIVOS	16
3. MATERIAL E MÉTODOS	18
3.1 Obtenção de amostras de fezes positivas para picobirnavírus	18
3.2 Processamento de amostras de fezes e de sobrenadantes celulares e detecção do PBV em EGPA.	18
3.3 Preparo das suspensões fecais PBV positivas para infecções em ratos gnotobióticos e em linhagens celulares	20
3.4 Infecção experimental em ratos gnotobióticos	20
3.5 Análise dos possíveis órgãos alvo da infecção pelo PBV em ratos gnotobióticos experimentalmente infectados.	21
3.6 Obtenção de antissoro anti-PBV de tamanduá em cobaias.	22
3.7 Ensaio imunoenzimático tipo “dot-blot”.	23
3.8 Preparo das linhagens celulares para infecção com PBV.	24
	vii

3.9	Protocolos de infecção das linhagens celulares com PBV	26
3.10	Preparo dos lipossomos para transfecção das linhagens celulares	29
3.11	Concentração e purificação das partículas virais	30
3.12	Observação de amostras em microscopia eletrônica direta	30
3.13	Ensaio com os primers PicoB23 e PicoB45 para RT-PCR em amostras de fezes PBV positivas em EGPA	31
4.	RESULTADOS	34
4.1.	Análise das amostras de fezes	34
4.2	Análise da infecção experimental em linhagens celulares.	38
4.3	Análise dos possíveis órgãos alvo da infecção pelo PBV em ratos gnotobióticos experimentalmente infectados.	46
4.4.	Análise do anti-soro anti-PBV de tamanduá-bandeira produzido em cobaias.	47
4.5	RT-PCR em amostras de fezes PBV positivas em EGPA.	47
5.	DISCUSSÃO	54
6.	CONCLUSÕES	71
7.	BIBLIOGRAFIA	72

## SIGLAS

APBV – Picobirnavírus atípico  
CEMIB – Centro Multidisciplinar de Investigação Biológica  
DAB - Tetra-hidroclorato de 3-3'Diaminobenzidina  
DEPC – Dietilpirocarbonato  
DMSO – Dimetilsulfóxido  
DNA – ácido desoxirribonucléico  
dNTP – Nucleotídeos trifosfatados  
DOPE - dioleoil fosfatidiletanolamina  
DOTMA - N-[1-(2,3-dioleiloxi)propil]-n,n,n-trimetilamônio clorídrico  
DTT – Dietiltreitól  
ECP – Efeito citopático  
EGPA – Eletroforese em Gel de Poliacrilamida  
IB – Instituto de Biologia  
ICTV – Comitê Internacional de Taxonomia de Vírus  
MEM – Meio essencial mínimo  
MET – Microscopia Eletrônica de Transmissão  
MMLV-RT – Transcriptase reversa do vírus Maloney da leucemia murina  
ORF – Sequência aberta para leitura  
PBS - Tampão salina fosfato  
PBST – Tampão salina fosfato Tween  
PBV – Picobirnavírus  
PCR – Reação em cadeia da polimerase  
RNA – Ácido ribonucléico  
RPDR – RNA polimerase dependente de RNA  
RT-PCR – Reação em cadeia para a polimerase, associada à transcrição reversa  
SDS – Dodecilsulfato de sódio  
SFB – Soro fetal bovino  
TAE – Tampão Tris acetato EDTA  
TRIS – Tri-hidroximetil aminometano

## DESIGNAÇÃO DAS TABELAS E QUADROS

Tabela 4.1 – Amostras de fezes de tamanduá-bandeira <i>Myrmecophaga tridactyla</i> do Zoológico Municipal de Americana, coletadas entre setembro de 1999 e julho de 2000, e resultados da eletroforese em gel de poliacrilamida para a pesquisa de picobirnavírus (PBV).	35
Tabela 4.2 – Resultados da análise por eletroforese em gel de poliacrilamida, das fezes dos animais do grupo 2 de ratos gnotobióticos, experimentalmente infectados com amostras de fezes positivas para picobirnavírus (PBV).	40
Quadro 4.1 - Tamanho dos segmentos, em pares de bases, de RNA dupla fita dos picobirnavírus detectados por eletroforese em gel de poliacrilamida nas fezes dos tamanduás-bandeira <i>Myrmecophaga tridactyla</i> do Zoológico de Americana/SP.	35
Quadro 4.2 - Tamanho dos segmentos de RNA dupla fita dos picobirnavírus (PBV), em pares de bases, detectados por eletroforese em gel de poliacrilamida nas fezes dos ratos do grupo 2, infectados experimentalmente.	40
Quadro 4.3 - Resumo das tentativas de infecção do picobirnavírus (PBV) em diferentes linhagens celulares inoculadas com suspensão fecal de amostras murinas e de tamanduá, positivas para os dois segmentos do RNA dupla fita do picobirnavírus. Os testes de eletroforese em gel de poliacrilamida (EGPA) e “dot-blot” foram utilizados para detecção do PBV.	45

## DESIGNAÇÃO DAS FIGURAS

- Figura 4.1. Eletroforese em gel de poliacrilamida de RNA dupla fita de picobirnavírus (PBV), extraídos de suspensões fecais de tamanduás-bandeira, coletadas no Zoológico de Americana/SP nos anos de 1999 e 2000. 36
- Figura 4.2. Eletroforese em gel de poliacrilamida de RNA dupla fita de picobirnavírus (PBV), extraídos de amostras de fezes de ratos, da linhagem Wistar, do grupo 1 de ratos infectados experimentalmente. 39
- Figura 4.3 Eletroforese em gel de poliacrilamida de RNA dupla fita de picobirnavírus (PBV), extraídos de amostras de fezes de ratos, da linhagem Wistar, do grupo 2 de ratos infectados experimentalmente. 41
- Figura 4.4. Eletroforese em gel de poliacrilamida de RNA dupla fita de picobirnavírus (PBV) extraído de amostras de fezes de ratos da linhagem Wistar, do grupo 2 de ratos infectados experimentalmente, nove dias após infecção. 42
- Figura 4.5 – Eletroforese em gel de poliacrilamida de RNA dupla fita de picobirnavírus (PBV) extraído de sobrenadantes de culturas celulares de primeiras passagens em células J774A.1, incubadas com suspensão fecal do tamanduá-bandeira *Myrmecophaga tridactyla* em diferentes diluições. 44
- Figura 4.6 - Fotografias do intestino delgado (jejuno) de ratos gnotobióticos controle (A) e infectado (B) com suspensão fecal murina contendo o RNA dupla fita do picobirnavírus. Coloração hematoxilina-eosina. Aumento 100 X. 48
- Figura 4.7. Fotografias do intestino delgado de ratos gnotobióticos controle (A) e infectados (B, C e D) com suspensão fecal murina contendo o RNA dupla fita do picobirnavírus. Coloração hematoxilina-eosina. Aumento 100 X. 49
- Figura 4.8 Fotografias do intestino grosso de ratos gnotobióticos controle (A) e infectados (B e C) com suspensão fecal murina contendo o RNA dupla fita do picobirnavírus. Coloração hematoxilina-eosina. Aumento 200 X. 50
- Figura 4.9 Fotografias do intestino delgado (jejuno) de ratos gnotobióticos controle (A) e infectado (B) com suspensão fecal murina contendo o RNA dupla fita do picobirnavírus. Reação de imunoperoxidase. Aumento 100 X. 51
- Figura 4.10 Fotografias do intestino grosso de rato gnotobiótico infectado com suspensão fecal murina contendo o RNA dupla fita do picobirnavírus. Reação de imunoperoxidase. Fotografia A: aumento 100 X. Fotografia B: aumento 200 X. 52
- Figura 4.11 Eletroforese em gel de agarose de amostras de picobirnavírus (PBV) de ratos, suínos e de tamanduás bandeira, submetidas à reação em cadeia da polimerase associada à transcrição reversa (RT-PCR), utilizando os *primers* PicoB25 e PicoB43. 53

## RESUMO

Os picobirnavírus (PBV) foram identificados pela primeira vez em eletroforese em gel de poliacrilamida (EGPA) em estudos para identificação de rotavírus em fezes de crianças. São vírus com 30 a 40 nm de diâmetro, sem estruturas definidas de superfície e com RNA dupla fita bissegmentado. Os PBV foram detectados nas fezes de aves e mamíferos. Sua patogenicidade não está esclarecida, mas estes vírus têm sido incluídos em estudos epidemiológicos de agentes causadores de diarreia. Testes utilizando RT-PCR têm sido propostos para detecção do PBV em fezes de pacientes com gastroenterites. A maior sensibilidade desta técnica comparada à EGPA pode contribuir para esclarecer o seu papel em infecções entéricas. Apesar do PBV ter sido identificado sempre nas fezes dos seus hospedeiros, não se conhece os órgãos alvo e também não se encontrou um modelo de linhagem celular para replicação *in vitro* do PBV. Para melhor caracterização desse vírus foram realizadas tentativas de adaptação do PBV de rato e de tamanduá bandeira nas linhagens celulares Vero, J774A.1, MDBK, HT-29, SK-6 e 3T3. Lipossomos foram complexados com PBV de rato e de tamanduá bandeira (*Myrmecophaga tridactyla*) para transfecção nas linhagens Vero, HT-29 e CaCo-2. Estudos morfológicos e imunohistoquímicos dos intestinos de ratos gnotobióticos, inoculados com PBV de rato, foram realizados. Além disso, os *primers* PicoB25 e PicoB43, descritos para detecção do PBV em fezes de humanos, foram testados em RT-PCR com fezes positivas em EGPA de ratos, suínos e tamanduá. Nos testes em linhagens celulares, com ou sem lipossomos, não se obteve a replicação do PBV. A EGPA dos sobrenadantes de primeira passagem das células J774A.1 revelou a presença do RNA do PBV, mas não se visualizou partículas virais em microscopia eletrônica, nem se detectou antígenos do PBV por “dot-blot”. Estudos histomorfológicos revelaram edema nas túnicas mucosa e submucosa dos intestinos delgado (jejuno) e grosso. Notou-se também descamações celulares do ápice das vilosidades do jejuno e marcação positiva com peroxidase nos enterócitos do ápice das vilosidades do intestino delgado e das dobras do intestino grosso. Nos testes de RT-PCR foi possível detectar *amplicons* do PBV com cerca de 200 pares de base nas fezes de ratos e de suínos, mas não nas amostras de tamanduá. Os testes negativos com culturas celulares confirmaram a dificuldade na adaptação do PBV ao cultivo *in vitro*. As análises histomorfológicas e imunohistoquímicas indicam que o PBV infecta enterócitos do intestino de

ratos gnotobióticos. Esse achado reforça a hipótese que o PBV replica-se em células animais. O teste da RT-PCR com os *primers* PicoB25 e PicoB43 recomendam sua utilização na detecção do PBV em amostras de fezes de suínos e de ratos. A identidade de regiões no genoma que permitem a utilização de um mesmo conjunto de *primers* para detecção em RT-PCR de PBV de humanos, ratos e suínos sugere a possibilidade de uma origem comum do PBV desses hospedeiros.

## ABSTRACT

Picobirnavirus (PBV) were first identified by polyacrylamide gel electrophoresis (PAGE) in a study undertaken to detect rotavirus in children's stools. These viruses are 30 to 40 nm in diameter, without evident surface structures. Their genome is bisegmented, with double strand RNA. PBV were detected in the stools of birds and mammals. Their role as a pathogen is not clear, but this virus has been included in epidemiological studies of diarrhea causative agents. RT-PCR has been proposed to detect PBV in people with gastroenteritis. The greater sensibility of RT-PCR in relation to PAGE may clarify the role of PBV in enteric infections. Although PBV has always been identified in stool samples, the PBV infected organs are unknown. A cell model for the replication of PBV *in vitro* is also unknown. To characterize PBV, cells of the following lineages, Vero, J774A.1, MDBK, HT-29, SK-6 and 3T3 were incubated with rat and the anteater, *Myrmecophaga tridactyla*, faecal suspensions, which were positive for PBV. Liposomes were used to transfect PBV to three cell lineages: Vero, HT-29 and CaCo-2. The large and small intestines of gnotobiotic rats, experimentally infected with murine PBV, were analyzed to obtain morphological information and immunoperoxidase reactions. The stool samples of Wistar rats, swine and anteaters, positive to PBV, as detected by PAGE, were also assayed by RT-PCR with PicoB25 and PicoB43 *primers*, used to detect human PBV. Proximal small intestine (jejunum) from experimentally infected rats revealed an inflammatory reaction in the mucus and submucus layer and desquamation of epithelial cells at the villous apice. An inflammatory reaction was also observed in histologic sections of the mucus and submucusl layer of the large intestine, without epithelial cell alterations. Positive immunoperoxidase reaction was observed in the enterocytes of the small and large intestines. Cell lineages incubated with PBV do not result in viral replication. Liposomes were unable to induce PBV replication. The EGPA of first passage supernatant in J774A.1 cells detected PBV double strand RNA but particles were not visualized by electron microscopy nor were antigens detected by dot blot reaction. RT-PCR tests with swine and rat stool samples, using PicoB25 e PicoB43 primers, show the presence of PBV *amplicons* with about 200 base pairs. The same test was unable to detect PBV in anteater stool samples. The histomorphological and immunoperoxidase analysis of histologic sections denote PBV replication in the enterocytes of the rat intestine. This finding emphasizes the hypothesis that

PBV replication occurs in animal cells. Negative results for PBV replication in cell lineages, with or without the use of liposomes, confirms the difficulty of *in vitro* PBV adaptation. The RT-PCR test is recommended to detect PBV in stool samples of swine and rats. Identical regions of the genome that permit PicoB23 and PicoB45 primers to detect PBV in stool samples suggest a possible common origin for human, rat and swine PBV.

## 1. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Atualmente, de acordo com o ICTV – sigla em inglês para “*International Committee on Taxonomy of Viruses*” – existem classificadas sete famílias de vírus que apresentam genoma composto de RNA dupla fita: *Reoviridae* (nove gêneros), *Birnaviridae* (três gêneros), *Totiviridae* (três gêneros), *Cystoviridae* (um gênero), *Partitiviridae* (três gêneros), *Hypoviridae* (um gênero) e *Chrysoviridae* (um gênero) (van Regenmortel *et. al.*, 2000).

Os membros da família *Reoviridae*, apesar de se dividirem em nove gêneros, têm como características gerais segmentação do genoma em dez, onze ou doze segmentos e partícula viral esférica sem envoltório, com duplo ou triplo capsídeo protéico. Dentro desta família estão alguns importantes patógenos de interesse médico e veterinário como os vírus do gênero *Rotavirus*, causadores de gastroenterite em aves e em diversos mamíferos (incluindo o homem). Também os gêneros *Orbivirus* e *Coltivirus* pertencem à família *Reoviridae*. São vírus causadores de várias doenças em mamíferos e sua importância em termos sanitários tem aumentado consideravelmente. Três gêneros dessa família infectam plantas de grande interesse econômico como a cana-de-açúcar (infectadas por *Fijivirus*), arroz (*Oryzavirus* e *Phytoreovirus*) e trigo (*Phytoreovirus*). Membros dessa família também foram encontrados infectando o fungo *Cryphonectria parasitica* que parasita a castanheira americana (Fields, 1996).

Os *Cystovirus*, único gênero da família *Cistoviridae*, são bacteriófagos de *Pseudomonas*. Apresentam-se como partículas de 86 nm, com envoltório e possuem três segmentos genômicos (Rosen *et al.*, 2000).

Na família *Totiviridae* há vírus que infectam protozoários e fungos (Park *et al.*, 1996). Seu tamanho varia de 30 a 40 nm de diâmetro, não apresentam envoltório e possuem um segmento genômico que pode variar de 4,6 a 7,0 kilopares de bases (kpb). As partículas virais podem carregar ainda um RNA dupla fita adicional defectivo (Rosen *et al.*, 2000).

Os fungos são os hospedeiros dos vírus do gênero *Hypovirus* da família *Hypoviridae* (Preisig *et al.*, 1998). São vírus pleomórficos que formam vesículas de 50 a 80 nm, com envoltório, e apenas um segmento de RNA dupla fita de 10,0 a 13,0 kpb, podendo também conter um RNA dupla fita adicional defectivo (Rosen *et al.*, 2000).

Na família *Partitiviridae* há vírus que infectam plantas e fungos. As partículas apresentam diâmetro de 30 a 40 nm, sem envoltório, e seu genoma possui dois segmentos que podem variar de 1,4 a 3,0 kpb. Os vírus desta família têm cada segmento do seu genoma encapsidado em partículas separadas (Rosen *et al.*, 2000).

Os membros da família *Birnaviridae* têm como características comuns o genoma bi-segmentado, podendo variar de 3,1 a 3,2 kpb para o segmento maior e 2,7 a 2,85 kpb para o segmento menor. As partículas virais possuem tamanho de 60 a 65 nm de diâmetro, sem envoltório, e com densidade, obtida por ultracentrifugação em CsCl, de 1,32 - 1,35 g/mL. Os membros desta família infectam peixes, aves, moluscos e insetos (Rosen *et al.*, 2000; Chandra, 1997).

Há ainda o gênero *Varicosavirus*, sem família ainda definida. Esses vírus são em formato de bastão com 18 nm x 300-340 nm e possuem uma molécula de RNA dupla fita de 6,0 a 7,0 kbp. O único representante já definido desse gênero é o vírus da grande veia da alface [van Regenmortel, 2002 (online)].

Além destas famílias descritas e classificadas no ICTV, há ainda três outros grupos de vírus de RNA dupla fita que ainda não foram devidamente classificados: o vírus de RNA dupla fita do *Cryptosporidium parvum* (Gallimore *et al.*, 1995a; Khramtsov *et al.*, 1997), o picotrimavírus (Leite *et al.*, 1990; Volotao *et al.* 2001) e os picobirnavírus (Pereira *et al.*, 1988a).

Para o vírus de RNA dupla fita do *Cryptosporidium parvum* ainda não foi possível visualizar uma partícula viral. Ele foi descrito por Gallimore *et al.* (1995a) que encontraram uma relação significativa entre amostras positivas para a presença associada de um vírus bi-segmentado de RNA dupla fita e do protozoário *Cryptosporidium sp.* Seu genoma bi-segmentado de 1786 e 1374 pares de bases permanece livre de partículas virais no citoplasma do protozoário na fase esporozoíta, tendo sido observado por hibridização *in situ* (Khramtsov *et al.*, 1997). Este vírus, que foi chamado de picobirnavírus atípico (APBV) por Gallimore *et al.* (1995a), apresenta um perfil eletroforético do RNA dupla fita diferente daqueles encontrados para os picobirnavírus. Green *et al.* (1999) utilizaram os *primers* indicados no trabalho de Khramtsov *et al.* (1997) para realização da reação em cadeia da polimerase com transcrição reversa (RT-PCR), com amostras de APBV e obtiveram a amplificação de fragmentos de 1264 e 497 pares de bases. O sequenciamento dos nucleotídeos desses fragmentos mostrou homologia de aproximadamente

93% para o fragmento maior e de cerca de 96% para o menor, comparando os APBVs e as moléculas de RNA dupla fita encontradas por Khramtsov *et al.* (1997) nos *Cryptosporidium parvum*. Esses resultados indicam que os dois vírus são bastante relacionados. Porém, não há similaridades entre as seqüências de nucleotídeos do segmento maior do PBV de coelho e entre os segmentos do vírus de RNA dupla fita do *Cryptosporidium parvum*. Green *et al.* (1999) indicam que deve haver dois grupos distintos de vírus bissegmentados de RNA dupla fita encontrado em fezes.

Os picotriNAVÍRUS se apresentam como partículas de 32 a 35 nm de diâmetro, sem envoltório e, como o nome diz (Tri-RNA-vírus), possuem três segmentos de RNA dupla fita. Estes vírus foram detectados em fezes de aves (galinhas) (Leite *et al.*, 1990), de humanos (crianças) (Ludert & Liprandi, 1993) e de cães (Volotao *et al.*, 2001).

Picobirnavírus é o grupo mais estudado entre os três grupos de vírus de RNA dupla fita não classificados e é o objeto de estudo do presente trabalho.

### **1.1 Características gerais dos picobirnavírus**

Os picobirnavírus (PBV) foram descritos primeiramente em 1988 por Pereira *et al.*(a), em um estudo da incidência de rotavírus em fezes de crianças no Brasil. Neste estudo os autores detectaram através da técnica de eletroforese em gel de poliacrilamida (EGPA), um perfil eletroforético de RNA dupla fita diferente dos normalmente encontrados para outros vírus. Ainda neste trabalho os autores conseguiram visualizar em microscopia eletrônica o novo vírus que chamaram então de picobirnavírus, fazendo referência às suas características: Pico = pequeno e bi-rna = dois segmentos de RNA.

Apesar de também possuírem o genoma bi-segmentado de RNA dupla fita, como os membros da família *Birnaviridae*, os picobirnavírus não estão incluídos nesta família por diferirem dos primeiros em muitas características. O PBV possui genoma que pode variar de 1,33 a 1,9 kpb para o segmento menor e de 2,3 a 2,6 kbp para o segmento maior, enquanto os birnavírus apresentam genoma de 3,1 a 3,2 para o segmento maior e 2,7 a 2,85 para o segmento menor (Chandra, 1997; Rosen *et al.*, 2000). A densidade dos picobirnavírus, obtida em gradiente de cloreto de césio (CsCl), varia de 1,38 - 1,42 g/mL e dos birnavírus de 1,32 a 1,35 g/mL. Observado em Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET), os birnavírus possuem 60 a 65 nm

de diâmetro (Chandra, 1997; Rosen *et al.*, 2000); o PBV apresenta forma esférica, de conformação provavelmente icosaédrica, variando de 30 a 40 nm de diâmetro, sem estruturas definidas de superfície (Pereira *et al.*, 1988a, Pereira, 1991; Ludert *et al.*, 1991; Chandra, 1997; Haga *et al.*, 1999; Rosen *et al.*, 2000).

Com relação aos hospedeiros, os PBV foram encontrados, até o momento, em fezes de mamíferos e aves (Pereira *et al.*, 1988a; Pereira *et al.*, 1988b; Gatti *et al.*, 1989; Vanopdenbosch & Wellemans, 1990; Alfieri *et al.*, 1988; Haga *et al.*, 1999)

Em humanos, as detecções foram relatadas em vários trabalhos (Pereira *et al.*, 1988a; Gallimore *et al.*, 1995a e 1995b; Grohmann *et al.*, 1993; Cascio *et al.*, 1996; González *et al.*, 1998). Estudos sobre seu papel em patologias humanas também foram realizados. Ludert & Liprandi (1993) analisaram duzentas e catorze amostras de fezes diarréicas de crianças com gastroenterite e encontraram em apenas uma amostra (0,5% do total) a presença das duas bandas típicas do PBV. Os autores consideraram, se não inexistente, de pequena importância o papel do PBV como agente da doença. Por outro lado, Grohmann *et al.* (1993), analisando fezes de pacientes portadores do vírus da imunodeficiência humana (HIV), observaram que o PBV foi detectado com diferença significativa em pacientes com diarreia comparado ao grupo sem o quadro clínico. Porém, os autores afirmam que estes dados não concluem pelo seu papel associado a diarreias devido ao prolongado período de liberação dos vírus e sua associação, em alguns casos, com outro patógeno entérico. Todavia, mesmo o PBV não sendo definitivamente relacionado à ocorrência de diarreia em humanos, ele tem sido incluído em estudos etiológicos dessa doença (Cox *et al.*, 1994).

Os relatos do PBV em fezes de suínos foram feitos por Gatti *et al.* (1989), Ludert *et al.* (1991) e Solis *et al.* (1998). Não há concordância entre os autores sobre o papel dos picobirnavírus como causadores de diarreias nesses animais. Gatti *et al.* (1989) detectaram diferença significativa para a presença de PBV em fezes de suínos com e sem diarreia em granjas do Brasil, sugerindo ser este um novo agente causador de diarreia em porcos. Porém, estes dados não foram confirmados por Ludert *et al.* (1991) estudando granjas na Venezuela. Outros animais de importância na pecuária, como bovinos (Vanopdenbosch & Wellemans, 1990) e cavalos (Browning *et al.*, 1991), também são hospedeiros do PBV. Em galinhas as detecções foram apresentadas por Alfieri *et al.* (1988) e por Leite *et al.* (1990).

Em animais utilizados em laboratórios o PBV foi detectado em ratos (Gatti, 1994), coelhos (Gallimore *et al.*, 1993; Ludert *et al.*, 1995), hamsters (Pereira *et al.*, 1988a) e cobaias (Pereira *et al.*, 1989).

Há ainda dois relatos de PBV em fezes de animais silvestres, ambos no Brasil. O primeiro foi apresentado por Pereira *et al.* (1988b), que detectaram PBV nas fezes do rato selvagem *Oryzomys nigripes*, capturados em armadilhas. Haga *et al.* (1999), procurando por novos hospedeiros do PBV em animais silvestres mantidos em cativeiros, relataram a presença do PBV nas fezes do tamanduá-bandeira, o *Myrmecophaga tridactyla*.

Por ser detectado, até o momento, somente nas fezes dos hospedeiros acima citados, há muita cautela nos trabalhos publicados sobre o PBV em afirmar que esses vírus realmente parasitam células desses animais. Sugere-se que bactérias, fungos ou protozoários da microbiota, ou parasitas do intestino possam ser os hospedeiros do picobirnavírus (Gallimore *et al.*, 1993; Ludert *et al.*, 1995; Chandra, 1997; Rosen *et al.*, 2000).

Alguns dados da literatura corroboram com a hipótese da origem animal do PBV tais como: a liberação do vírus nas fezes por um período definido, embora haja relatos isolados de longos períodos de eliminação em humanos e coelhos (Ludert *et al.*, 1995; Grohmann *et al.*, 1993); a não detecção do PBV em animais convivendo com animais portadores, sob as mesmas condições de manejo e alimentação (Ludert *et al.*, 1991; Gallimore *et al.*, 1993; Gatti, 1994); a detecção desses vírus em suínos (Ludert *et al.*, 1991) e cobaias (Pereira *et al.*, 1989) em fase de amamentação; resposta imunológica aos picobirnavírus em estudos de infecção em suínos (Ludert *et al.*, 1991) e coelhos (Gallimore *et al.*, 1993).

Experimentos de infecção experimental em ratos gnotobióticos e em linhagens celulares também reforçam a hipótese que o PBV se replica em células animais. Pereira *et al.* (1989) e Vicentini (1998) obtiveram infecção por PBV em cultura de células de origem animal na primeira passagem. Gatti (1994) desenvolveu um protocolo para infecção em laboratório de ratos gnotobióticos pelo PBV, onde foi possível detectar, por EGPA, RNA característico do PBV nas fezes dos animais. A autora manteve os animais gnotobióticos em sistema de barreira através de isoladores, e os inoculou, por via oral, com suspensão fecal murina positiva para PBV e livre de bactérias, fungos e protozoários.

A infecção em ratos gnotobióticos da linhagem Wistar com PBV se constitui em uma alternativa bem sucedida para obtenção de picobirnavírus em laboratório, pois ainda não foi possível adaptar esses vírus em linhagens celulares. Além disso, a observação das células e tecidos, por métodos morfológicos e imunohistoquímicos desses animais pode fornecer evidências sobre os órgãos e células alvo da infecção pelo PBV.

### *1.1.1 Caracterização das proteínas do PBV*

No que diz respeito às proteínas do PBV, Ludert & Liprandi (1992) identificaram dois polipeptídeos em SDS-EGPA, sendo o maior, em tamanho e quantidade (80% do total de proteínas), com 50 kDa e o outro com 33 kDa. Em outro estudo, Gatti (1994) obteve, a partir de PBV purificado em gradiente de CsCl, três polipeptídeos com 77, 16,5 e 13 kDa, analisados também por SDS-EGPA. O sequenciamento dos nucleotídeos do segmento maior do genoma do PBV de coelho (Green *et al.*, 1999) revelou três ORF's. Com a sequência deduzida dos aminoácidos de cada ORF os autores conseguiram calcular a massa molecular dos polipeptídeos codificadas por estas ORF's e encontraram a massa molecular de 65,8 - 6,0 e 11,9 kDa para as ORF's 1, 2 e 3, respectivamente. Estes valores estão próximos aos obtidos por Gatti (1994). Além disso, os autores compararam a estrutura primária destas proteínas com RNA polimerases dependentes de RNA (RPDR) e não encontraram nenhuma homologia. É provável que o segmento maior do PBV de coelho seja responsável pela codificação de proteínas estruturais (Green *et al.*, 1999). O conhecimento das proteínas estruturais do PBV pode resultar em técnicas de diagnóstico, utilizando anticorpos monoclonais ou policlonais, mais rápidas e baratas que a EGPA e MET, as mais utilizadas até o momento.

Em 1998, Haga conseguiu padronizar um teste do tipo “dot-blot” para a detecção de antígenos do PBV a partir de suspensão fecal. O autor imunizou coelhos com PBV de origem murina, purificado em gradiente de CsCl, e obteve um soro policlonal que reagiu no teste “dot-blot” com PBV presente nas fezes de origem murina, suína e de tamanduá, demonstrando a ocorrência de antígenos ou epítomos comuns entre os três vírus estudados. Haga concluiu que o seu teste “dot-blot” apresentou valores de especificidade de 81% e predição positiva de 78% em um total de 190 amostras fecais de suínos, ratos e tamanduá analisadas, quando comparado à técnica de EGPA, feitas as ressalvas deste tipo de comparação.

A obtenção de PBV proveniente de culturas celulares poderia vir a favorecer o estabelecimento de técnicas diagnósticas para o PBV, baseadas em reações antígeno-anticorpo. A produção de partículas virais em maior número, associada à técnica de purificação, seria uma fonte para obtenção de soros policlonais com maior título e especificidade, ou mesmo anticorpos monoclonais. Assim, as técnicas baseadas nas reações antígeno-anticorpo poderiam ter maior sensibilidade, sendo possível realizar estudos imunohistoquímicos nos tecidos e órgãos infectados pelo PBV em animais de laboratório ou em hospedeiros naturalmente infectados.

### *1.1.2 Caracterização genotípica do PBV*

O sequenciamento total do genoma do PBV é outra busca dos pesquisadores deste vírus. Este conhecimento é essencial para o desenvolvimento de técnicas moleculares para seu diagnóstico, como a RT-PCR, possibilitando estudos mais esclarecedores a respeito do seu papel como agente etiológico de diarreias, pois é uma técnica mais sensível que a EGPA.

Além disto, o conhecimento do genoma do PBV permitirá traçar as relações filogenéticas entre estes vírus e as diversas famílias de vírus de RNA dupla fita, auxiliando na sua classificação.

Até o momento os estudos têm mostrado que os picobirnavírus apresentam variabilidade genotípica (Rosen *et al.*, 2000; Green *et al.*, 1999) e variações no tamanho dos segmentos do RNA dupla fita (Haga, 1998; Gatti *et al.*, 1989; González *et al.*, 1998; Gallimore *et al.*, 1993; Vanopdenbosch & Wellemans, 1990).

Com relação ao tamanho dos segmentos Gatti *et al.* (1989) apresentam em um trabalho com PBV de suínos dezesseis diferentes perfis eletroforéticos de migração dos dois segmentos do PBV, em EGPA. Ludert *et al.* (1991) também encontraram variações no tamanho dos segmentos dos PBV de suínos. Dois padrões de migração do genoma do PBV também foram encontrados em fezes de coelhos (Gallimore *et al.*, 1993). Vanopdenbosch & Wellemans (1990) relataram ainda três diferentes perfis de migração para o PBV encontrado por eles em fezes bovinas e Haga (1998) encontrou variação no tamanho do segmento maior do PBV de ratos.

Avanços têm sido obtidos na revelação das variabilidades genotípicas do PBV. Até o momento foram descritas a seqüência do segmento maior do PBV de coelhos (Green *et al.*, 1999), a seqüência parcial do segmento maior de uma linhagem de PBV de humanos e a

seqüência quase total do segmento menor de PBV de humanos de várias amostras de diferentes lugares do mundo (Rosen, *et al.*, 2000).

Alguns esclarecimentos foram obtidos quanto a função de cada um dos segmentos dos PBV. Green *et al.* (1999) encontraram na seqüência do segmento maior do PBV de coelho três ORF's e não encontraram nenhuma semelhança entre a estrutura primária deduzida das proteínas codificadas por este segmento e outras proteínas já descritas, nem mesmo para RNA Polimerase Dependente de RNA (RPDR) de outros vírus de RNA. Rosen *et al.* (2000) realizaram a comparação da seqüência parcial do segmento maior do PBV de humano (linhagem 3-GA-91) com o segmento maior do PBV de coelho (Green *et al.*, 1999). Estes autores observaram que há regiões limitadas de identidades nas sequências obtidas e que as regiões com maior identidade ocorrem entre os nucleotídeos 670 a 797 do PBV de humano linhagem 3-GA-91 e os nucleotídeos 1523 a 1650 do PBV de coelhos. Essas regiões de 127 nucleotídeos apresentaram identidade de 54,7%. Rosen *et al.* (2000) também obtiveram a seqüência do segmento menor de duas linhagens de PBV de humanos. Análise desta seqüência revelou três “motifs” característicos de genes que codificam RPDR para vírus de RNA fita simples e dupla fita. Portanto, os resultados têm mostrado que o segmento menor é responsável pela codificação da RPDR e o segmento maior pelas proteínas estruturais do PBV.

Rosen *et al.* (2000) testaram dois conjuntos de *primers* derivados do segmento menor de duas linhagens de PBV isolado de fezes de humano. Com os *primers* PicoB25 e PicoB43, obtidos da seqüência da linhagem chinesa 1-CHN-97, foi possível amplificar segmentos genômicos, utilizando a técnica da RT-PCR para outras amostras de PBV de humano (uma amostra identificada na Argentina, duas amostras Venezuelanas e seis outras nos EUA, além da própria amostra chinesa).

Com o outro conjunto de *primers*, denominados PicoB23 e PicoB24, que foi obtido da seqüência da amostra 4-GA-91 americana, foi possível amplificar apenas outras amostras oriundas do mesmo indivíduo que forneceu a amostra 4-GA-91: um paciente HIV positivo que liberou PBV nas fezes por vários meses (Grohmann *et al.*, 1993).

A análise da seqüência do genoma do PBV mostrou que esses vírus não se assemelham a nenhum dos vírus que possuem de um a três segmentos de RNA dupla fita já descritos. É provável que os picobirnavírus pertençam a uma nova família de vírus (Rosen *et al.*, 2000).

Apesar dos avanços obtidos na caracterização genotípica do PBV, nada se conhece sobre seu ciclo de replicação e muito pouco sobre suas proteínas.

Para que se caminhe nesse sentido é necessária a adaptação e manutenção do PBV em culturas celulares.

### *1.1.3 Estudos de adaptação do PBV em culturas celulares*

Os estudos da biologia de um vírus e suas interações com suas células hospedeiras se tornam mais abrangentes com a adaptação desse vírus em culturas celulares. Por esse motivo busca-se adaptar o PBV à multiplicação *in vitro*.

Vanopdenbosch & Wellemans (1990) obtiveram sucesso nos experimentos de replicação em culturas celulares de um vírus icosaédrico, sem envoltório, com diâmetro de 40 nm, isolado de amostras fecais de bovinos, por eles denominado “*birna type virus*”. Os pesquisadores utilizaram cultura secundária de células de rim fetal bovino, nas quais os vírus produziram efeito citopático e foram detectados por MET, mesmo após a segunda passagem. Este experimento foi posteriormente reproduzido por Chandra (1997), que não obteve resultados que confirmassem os achados anteriores.

Ludert *et al.* (1995) utilizaram cultura primária de células de rim de coelho e PBV isolado de fezes do mesmo animal na tentativa de adaptação do vírus ao crescimento nessas células, mas também não obtiveram êxito.

Vicentini (1998), em seu trabalho visando adaptar o PBV ao cultivo em culturas celulares, considerou, na realização de seus experimentos, características em comum entre PBV e outros vírus entéricos, principalmente os rotavírus. Vicentini utilizou culturas primárias de rim de ratos e camundongos, linhagens estabelecidas de rim de símios - LLC-MK2 e MA104 - e linhagens de células intestinais de humanos - HT29 e CaCo2. Seguindo o modelo para infecção *in vitro* de rotavírus, Vicentini utilizou tripsina e pancreatina como promotores de ativação do PBV. Para otimizar a adsorção viral às células, três diferentes métodos foram utilizados: agitação periódica, centrifugação e sistemas *roller* de cultura. As amostras de PBV eram obtidas a partir de amostras fecais de suínos e murinos, sendo que as últimas apresentaram melhores resultados. Porém, os dois segmentos do RNA viral foram detectados apenas em sobrenadantes de primeira passagem

nas células HT-29, CaCo-2 e LLC-MK-2 e cultura primária de rim de rato. Não foi possível definir se a introdução de proteases nos sistemas seria ou não fundamental.

A detecção em sobrenadantes de primeira passagem do RNA do PBV já havia sido relatada por Pereira *et al.* (1989), que sugeriram um ciclo de replicação abortivo nas células por ele utilizadas, onde ocorreria apenas a produção do RNA viral ou partículas virais defectivas. Os autores obtiveram esses resultados em células de cultura primária de embrião de cobaia, cultura primária ou secundária de rim de macaco, células da linhagem MRC-5 (fibroblasto humano) e da linhagem HEp-2.

Nada se conhece a respeito do ciclo de replicação do PBV, seu receptor celular ou os mecanismos de interação com sua célula hospedeira. Dos estudos dos mecanismos de replicação de outros vírus e suas interações com a célula hospedeira pode-se tecer algumas considerações a respeito dos ciclos não produtivos do PBV nas células estudadas e dos possíveis mecanismos de restrição dessas células à infecção pelo PBV. Sabe-se, por exemplo, que a restrição de uma célula a um vírus pode estar relacionada à ausência de receptores e/ou dos co-fatores adequados para a ligação desse vírus à célula hospedeira.

E, de fato, um dos maiores determinantes de um vírus para especificidade a hospedeiros, e tropismo por determinado tipo celular, envolve as interações dos receptores de membrana das células hospedeiras com as partículas virais (Innes *et al.*, 1990). Vários estudos têm mostrado que uma célula não permissiva torna-se permissiva a um determinado vírus se a célula for transformada geneticamente para expressar um receptor para o vírus ou o vírus for introduzido para o interior do citoplasma utilizando, por exemplo, lipossomos como carreadores. Células da linhagem HeLa tornam-se susceptíveis ao Vírus da Imunodeficiência Humana (HIV) quando são transfectadas com o gene que codifica CD4 (Maddon *et al.*, 1986), que é uma das proteínas celulares utilizadas como receptores por esse vírus. Bass *et al.* (1992) descobriram que a não permissividade de algumas linhagens celulares aos rotavírus do grupo A é devida à impossibilidade de adsorção e/ou penetração dos vírus à célula. Utilizando lipossomos como mediadores de infecção viral em linhagens permissivas e não permissivas, eles conseguiram obter o mesmo título viral, tanto nas linhagens permissivas como nas não permissivas.

Lipossomos são vesículas constituídas por lipídeos anfipáticos que, quando submetidos a meio aquoso formam bicamada lipídica semelhante às membranas celulares (Garçon & Six,

1991). Eles têm sido amplamente utilizados como ferramenta para induzir transformação em linhagens celulares, carregando genes para dentro da célula. Esta técnica é chamada transfecção mediada por lipossomos e utiliza lipídeos catiônicos como constituintes dos lipossomos, associados ou não a lipídeos neutros (Budker *et al.*, 1996). Os lipossomos formados por lipídeos catiônicos podem reagir espontaneamente com moléculas de DNA, formando complexos lipídeo-DNA, provavelmente devido a interações entre as cargas positivas e negativas dos lipídeos e DNA, respectivamente (Felgner *et al.*, 1987).

Lipossomos catiônicos podem liberar macromoléculas dentro da célula diretamente através da membrana plasmática ou via formação de compartimentos endossômicos (Budker *et al.*, 1996), dependendo da composição molecular dos lipossomos (Felgner *et al.*, 1987; Zhou & Huang, 1994).

Além da utilização dos lipossomos para transfecção em linhagens celulares, transfecção *in vivo* tem sido realizada (Willems *et al.*, 1992). Porém, sua principal aplicação *in vivo* é a terapia gênica (Hodgson, 1995).

Quando complexados com diferentes antígenos protéicos, bem como com haptenos, os lipossomos têm se mostrado eficientes para induzir resposta imune humoral, constituindo também uma alternativa para vacinação (Garçon & Six, 1991).

Lipossomos catiônicos contendo DOTMA {N-[1-(2,3-dioleiloxi)propil]-n,n,n-trimetilamônio clorídrico} foram sintetizados primeiramente por Felgner *et al.* (1987) e são muito utilizados em experimentos de transferência de DNA, mas também são capazes de formar complexos com RNA (Malone *et al.*, 1989). Este tipo de lipossomo tem sido utilizado para aumentar a infectividade viral em células permissivas, bem como para induzir infecção viral em células naturalmente não permissivas.

Konopka *et al.* (1990) observaram aumento da infectividade do HIV-1 em células das linhagens A3.01 e H9 (linfócitos T humanos), quando os vírus foram incubados previamente com lipossomos catiônicos contendo DOTMA. Wilson *et al.* (1977) obtiveram replicação de poliovírus em células da linhagem CHO, que naturalmente não são permissivas à infecção por este vírus, quando estes foram previamente incubados com lipossomos. Lipossomos também mediaram a infecção de partículas sem o envoltório (somente o nucleocapsídeo), portanto, não infectivas, de Sindbis virus (Alfavírus) (Kondorosi & Duda, 1982).

Células infectadas com retrovírus são resistentes à infecção por outros retrovírus relacionados, fenômeno chamado interferência. O nucleocapsídeo do vírus Maloney do sarcoma murino (MSV) foi capaz de infectar, quando complexado com lipossomos, células de linhagens M-NIH e M-13 (que são permanentemente infectadas com o vírus Maloney da leucemia murina) que, em condições normais, são pouco permissivas à infecção pelo MSV (Faller & Baltimore, 1984).

Innes *et al.* (1990) relataram que vírus da leucemia murina, incubados previamente com Lipofectin™ [um preparado comercial contendo DOTMA e DOPE (dioleoil fosfatidiletanolamina)], promoveram infecção em células não permissivas. Experimento semelhante foi realizado por Bass *et al.* (1992) utilizando rotavírus do grupo A.

Portanto, lipossomos podem ser uma ferramenta importante na indução de replicação *in vitro* para vírus não adaptados ao cultivo em cultura de células, como os picobirnavírus.

Diante do exposto, fica evidente a necessidade de tentar melhor caracterizar biologicamente os picobirnavírus, uma vez que desde o seu primeiro relato em 1988 ainda não foi possível sua classificação.

Para isso, pretende-se atingir os objetivos abaixo citados:

## 2. OBJETIVOS

1. Utilizar as linhagens celulares MDBK, SK-6, Vero, J774A.1, HT-29 e 3T3 para tentativas de infecção direta com suspensão fecal de tamanduá e de rato, positivas para picobirnavírus, na eletroforese em gel de poliacrilamida;
2. Utilizar as linhagens celulares Vero, Caco-2 e HT-29 para tentativas de infecção mediada por lipossomos (Lipofectin™) com suspensão fecal de tamanduá e de rato, positivas para picobirnavírus na eletroforese em gel de poliacrilamida;
3. Detectar alterações celulares e a presença de antígenos virais nos tecidos dos intestinos de ratos gnotobióticos infectados experimentalmente com picobirnavírus de ratos, através de microscopia óptica convencional e imunohistoquímica;

4. Testar a capacidade do conjunto de *primers* PicoB25 e PicoB43, desenvolvidos a partir do genoma do picobirnavírus de humanos, de detectar o genoma de picobirnavírus presentes em fezes de suínos, murinos e de tamanduá bandeira, através da técnica da RT-PCR.

### **3. MATERIAL E MÉTODOS**

#### **3.1 Obtenção de amostras de fezes positivas para picobirnavírus.**

*Obtenção de amostras fezes de tamanduá-bandeira (Myrmecophaga tridactyla).*

Foram obtidas dez amostras de fezes de dois tamanduás do Parque Ecológico “Cid A. Franco”, do Município de Americana/SP (Zoológico de Americana). Em sete delas foi possível coletar separadamente de dois animais (um macho e uma fêmea) do recinto. De cada amostra fez-se suspensão fecal a 10% em PBS 0,01M pH 7,4 que foram submetidas ao método de extração de RNA dupla fita viral (item 3.2). As suspensões fecais foram armazenadas a 4°C até sua utilização em infecções de culturas celulares e experimentos de RT-PCR.

*Obtenção de amostras de fezes de ratos*

Foram coletadas sessenta amostras de fezes de ratos em gaiolas de biotérios do Instituto de Biologia da UNICAMP. Nas fezes acrescentou-se volume suficiente de PBS 0,01M pH 7,4 para homogeneização. De cada amostra fez-se suspensão fecal a 10% em PBS 0,01M pH 7,4 que foram submetidas ao método de extração de RNA dupla fita viral (item 3.2). Todas as amostras positivas foram armazenadas a 4°C até sua utilização para as infecções experimentais em células e em ratos gnotobióticos e para experimentos de RT-PCR.

*Obtenção de amostras de fezes suínas*

Amostras de fezes suínas de diferentes granjas da região de Campinas foram enviadas ao laboratório de Virologia da UNICAMP para diagnóstico, por EGPA, de vírus de RNA dupla fita. De cada amostra fez-se suspensão fecal a 10% em PBS 0,01M pH 7,4 que foram submetidas ao método de extração de RNA dupla fita viral (item 3.2). As amostras positivas foram armazenadas a 4°C em câmara fria até sua utilização nos experimentos da reação de RT-PCR.

#### **3.2 Processamento de amostras de fezes e de sobrenadantes celulares e detecção do PBV em EGPA.**

*Preparo das suspensões fecais*

Amostras de fezes foram mantidas a 4°C e diluídas a aproximadamente 10% em PBS 0,01M pH 7,4. Após homogeneização, as amostras foram centrifugadas a 1.500 g durante 10 minutos (Rotor JA-14, centrífuga JA21-Beckmann®) e os sobrenadantes foram recolhidos e estocados a 4°C.

#### *Extração do RNA dupla fita do PBV*

A extração do RNA dupla fita foi realizada seguindo as recomendações de Herring *et al.*, (1982).

Em alíquotas de 500 µL de sobrenadante das culturas celulares, inoculadas com PBV, e de suspensão fecal foram adicionados 50 µL de solução de duodecil sulfato de sódio (SDS) a 10% dissolvido em água destilada; estas misturas foram incubadas durante 30 minutos a 37°C. Após incubação foram então adicionados 500 µL de solução fenol/clorofórmio e as misturas foram agitadas por 3 minutos em "vortex"; as soluções foram centrifugadas a 15.000 g durante 10 minutos a 4°C (centrífuga Eppendorf® 5402). A fase aquosa resultante foi coletada e acrescida de 50 µL de cloreto de sódio (NaCl) a 20% em água destilada e 1,0 mL de etanol absoluto a 4°C. As frações coletadas foram armazenadas a -20°C durante 18 horas, visando a posterior precipitação do RNA viral por centrifugação a 15.000 g por 10 minutos a 4°C. Os sobrenadantes foram descartados e aos precipitados foram adicionados 20 µL de mistura dissociante (0,0625 M de Tris/HCl pH 6,8; 5,0 M de uréia; 5% de 2-mercaptoetanol; 3% de SDS e 0,01% de azul de bromofenol). Posteriormente as amostras foram incubadas a 56°C durante 10 minutos e aplicadas em gel de poliacrilamida a 7,5%.

Os controles positivos foram feitos com rotavírus do grupo A (SA-11), cultivado em células MA-104 ou CaCo-2, e receberam o mesmo tratamento que as suspensões fecais.

#### *Detecção do RNA dupla fita em Eletroforese em Gel de Poliacrilamida (EGPA)*

As amostras foram submetidas à EGPA, segundo as recomendações de Laemmli (1970), com algumas modificações (Herring *et al.*, 1982). Foram utilizados géis de poliacrilamida a 7,5% com tempo de corrida de 18 horas a 10 mA ou 4 horas a 40 mA ou ainda, para cubas menores, 20

mA por 1 hora e 45 minutos. Após a corrida eletroforética, o gel foi submetido ao método de impregnação por prata, seguindo as observações de Sammons *et al.* (1981).

#### *Análise do tamanho dos segmentos genômicos*

O tamanho dos segmentos do RNA viral do PBV foi determinado baseando-se nos tamanhos dos segmentos genômicos da amostra SA-11 de rotavírus (Fields *et al.*, 1996) e utilizando o software Image Master TotalLab<sup>®</sup> (versão 1.11), desenvolvido pela Amersham Pharmacia Biotech.

### **3.3 Preparo das suspensões fecais PBV positivas para infecções em ratos gnotobióticos e em linhagens celulares.**

Suspensões fecais de ratos e de tamanduá a 10% em PBS 0,01M pH 7,4, positivas para PBV em EGPA, foram filtradas em ambiente estéril com membrana de 0,45 µm (MilliPore<sup>®</sup>) e os filtrados foram testados novamente em EGPA quanto a presença do PBV. As amostras positivas foram utilizadas nos experimentos de infecção em ratos gnotobióticos (amostras murinas) e nas infecções em linhagens celulares (amostras murinas e de tamanduá).

### **3.4 Infecção experimental em ratos gnotobióticos**

As infecções em vinte e um ratos gnotobióticos da linhagem Wistar foram realizadas segundo as determinações de Gatti (1994). Esses animais foram obtidos do Centro Multidisciplinar de Investigação Biológica (CEMIB) da UNICAMP, desmamados no décimo oitavo dia e transferidos para isoladores pressurizados e com ambiente controlado. Os animais foram alimentados com água e ração previamente esterilizadas com vapor sob pressão (127°C por 40 minutos) em autoclave vertical. Durante o período de aclimação pré-inoculação (um a quatro dias), as fezes desses animais foram analisadas por eletroforese em gel de poliacrilamida (EGPA) para verificar a presença do RNA dupla fita do PBV. Foram mantidos ainda sete animais como controles negativos.

Três grupos de seis e um grupo de três ratos gnotobióticos foram inoculados com suspensão fecal murina (filtrada em membrana MilliPore<sup>®</sup> de 0,45 µm) através de cânulas introduzidas pela boca até o esôfago. Os animais escolhidos como controles negativos do experimento (dois ratos

para os grupos de seis animais inoculados e um rato para o grupo de três) foram acondicionados em isoladores separados e receberam solução salina filtrada em membrana 0,45 µm (MilliPore®). Um dia após a inoculação se iniciaram as coletas de fezes, que foram realizadas duas vezes ao dia, de cada animal inoculado e dos controles, sendo estas fezes processadas e analisadas por EGPA para a detecção do RNA dupla fita do PBV conforme item 3.2.

### **3.5 Análise dos possíveis órgãos alvo da infecção pelo PBV em ratos gnotobióticos experimentalmente infectados.**

A escolha dos órgãos se deve a característica do PBV de sempre ser detectado nas fezes de seus hospedeiros. Três animais mantidos como controle nos experimentos e quatro animais infectados, nos quais detectou-se nas fezes os dois segmentos do RNA dupla fita do PBV por EGPA, foram sacrificados para coleta dos órgãos do sistema digestivo. Fragmentos do fígado e pâncreas foram processados para detecção do RNA dupla fita do PBV por EGPA. Segmentos do jejuno e intestino grosso foram analisados macroscopicamente e fragmentos desses órgãos foram processados para confecção de preparados histológicos.

#### *Detecção do RNA dupla fita do PBV em fragmentos de fígado e pâncreas*

Fragmentos do fígado e do pâncreas dos ratos controle e infectados experimentalmente com PBV foram triturados em tampão Tris (100 mM Tris-HCl 1,5 mM Ca<sup>++</sup>, pH 7,4). Essa solução foi incubada com 0,1% de Triton X-100 por 30 minutos a 37°C, foi adicionado igual volume de clorofórmio, agitada por 5 minutos e centrifugada a 3000 g por 10 minutos (Rotor JA-14, centrífuga JA-21 Beckmann®). O sobrenadante foi coletado e submetido à extração e detecção do RNA viral conforme item 3.2

#### *Processamento histológico para Microscopia de Luz*

Após laparotomia, os segmentos do jejuno e do intestino grosso de quatro animais infectados e três controles foram fixados por imersão em solução de formol 10% (Merk®), dissolvido em Tampão Fosfato 0,1 M pH 7,2 a 4°C, durante 24 horas. A seguir os espécimes foram desidratados em gradiente de etanol à temperatura ambiente, diafanizados em xilol e embebidos em parafina à temperatura de 65°C. Cortes de 5,0 µm foram corados pela técnica

histológica clássica com emprego de hematoxilina de Harris e eosina para estudo ao microscópio de luz.

#### *Método imunohistoquímico*

Após desparafinizar os cortes de tecidos fixados em formol e levá-los até água destilada, as lâminas foram incubadas de acordo com as recomendações de Alves *et al.* (1999) nas etapas que se sucedem: lavagem em PBS 0,01 M pH 7,6 durante cinco minutos à temperatura ambiente; bloqueio da peroxidase endógena com Peróxido de Hidrogênio (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) 0,3% em PBS durante 30 minutos à temperatura ambiente; lavagem em PBS durante cinco minutos; bloqueio de sítios de reações inespecíficas com 2% de soro fetal bovino dissolvido em PBS 0,01 M pH 7,6 durante 30 minutos à temperatura ambiente, em câmara úmida; incubação com o anticorpo primário anti-PBV de rato produzido em coelho na diluição 1:20 em tampão PBS, durante vinte minutos em câmara úmida à temperatura ambiente; lavagem em PBS durante quinze minutos à temperatura ambiente; incubação com anticorpo secundário (anti-imunoglobulinas de coelho - Sigma<sup>®</sup>) e conjugado com peroxidase, durante trinta minutos à temperatura ambiente; incubação em solução reveladora da peroxidase, recentemente preparada, contendo 6,0 mg de DAB (Tetra-hidroclorato de 3-3'Diaminobenzidina, Sigma<sup>®</sup>) dissolvidos em 10 mL de Tris 0,05 M pH 7,6 com 100 mM de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, em durante 5 minutos. Após rápida lavagem em água destilada e contracoloração com hematoxilina de Harris os preparados foram desidratados e montados em meio sintético.

#### **3.6 Obtenção de anti-soro anti-PBV de tamanduá em cobaias.**

Suspensão fecal de tamanduá a 10% em PBS 0,01M pH 7,4, positiva para PBV em EGPA, foi concentrada por ultracentrifugação em colchão de sacarose, purificada por ultracentrifugação em gradiente de CsCl (item 3.11) e as frações positivas foram dialisadas em PBS e utilizadas como antígeno.

As cobaias foram sangradas para obtenção do soro pré-imune e receberam inoculação intradérmica de 0,1 mL do antígeno, acrescido de um volume de adjuvante completo de Freud e dois volumes de Tween 80 (0,1%) em PBS. Decorridos sete dias, os animais foram inoculados com o mesmo conteúdo da primeira inoculação, porém com inoculação intramuscular. No décimo quarto dia repetiu-se novamente o procedimento do sétimo dia e no vigésimo primeiro

dia os animais sofreram sangria branca. O sangue coletado foi deixado coagular e o soro obtido após centrifugação a 2.000 g (rotor JA-14 centrífuga JA-21 Beckmann®) por 10 minutos a 4°C. O sobrenadante foi incubado durante 30 minutos a 56 °C para inativação do complemento.

Para verificação da presença de anticorpos anti-PBV foi utilizada a técnica de “dot-blot”.

### **3.7 Ensaio imunoenzimático tipo “dot-blot”.**

*Deteção de anticorpos anti-PBV no soro de cobaias inoculadas com PBV de tamanduá.*

O ensaio foi realizado seguindo as recomendações de Gouvea *et al.*, (1987) e Haga (1998).

A membrana de nitrocelulose foi cortada e colocada em placa de vinte e quatro cavidades. Foram utilizados como antígenos suspensão fecal de tamanduá PBV-positiva, suspensão fecal de tamanduá PBV-negativa (controle negativo) e frações PBV-positivas obtidas da ultracentrifugação em CsCl. O soro obtido da sangria branca foi utilizado como anticorpo primário.

As amostras (10 µL) foram aplicadas diretamente sobre a membrana de nitrocelulose. Após a secagem das membranas, foi feito o bloqueio das mesmas pela adição de soro fetal bovino a 3% em PBST (PBS 0,01M pH 7,4 mais 0,05% de Tween 20) durante 2 horas. As membranas foram então lavadas com PBST por três vezes e posteriormente incubadas por mais duas horas com o anti-soro anti-PBV, obtido em cobaias, em diluições seriadas de 1:2 a 1:64. Após três lavagens com PBST, as membranas foram incubadas durante duas horas com anticorpo anti-IgG de cobaia, produzido em coelho e conjugado com peroxidase (Sigma), diluído 1:5.000 em PBST. As membranas foram lavadas novamente com PBST e incubadas com substrato para a reação (5,0 mg de diaminobenzidina em 30 mL de PBST), acrescido de 150 µL de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 30 volumes. A reação foi interrompida pela retirada do substrato e adição de PBST.

Como controles foram incluídos na reação testes com soro pré-imune como anticorpo primário, além de controles para o anticorpo secundário (conjugado).

*Verificação da presença de antígenos do PBV em sobrenadantes de culturas celulares*

Como substrato para a reação utilizou-se recortes de membrana de nitrocelulose distribuídos em placas de 24 cavidades. Os sobrenadantes celulares, positivos para PBV em EGPA, foram diluídos 1:1 em Tampão Carbonato-Bicarbonato 0,25M pH 9,6. Sobrenadantes das

células controles foram utilizados como controles negativos e o inóculo viral, preparado conforme item 3.3, foi utilizado como controle positivo. As amostras (10 µL) foram aplicadas diretamente sobre a membrana de nitrocelulose. Após a secagem das membranas, foi feito o bloqueio das mesmas pela adição de soro fetal bovino a 3% em PBST (PBS 0,01M pH 7,4 mais 0,05% de Tween 20) durante 2 horas. As membranas foram então lavadas com PBST por três vezes e posteriormente incubadas por mais duas horas com o anti-soro anti-PBV, obtido em coelhos, diluído 1:10. Após três lavagens com PBST, as membranas foram incubadas durante duas horas com anticorpo anti-IgG de coelho conjugado com peroxidase (Sigma) diluído 1:5000 em PBST. As membranas foram lavadas novamente com PBST e incubadas com substrato para a reação (5,0 mg de diaminobenzidina em 30 mL de PBST), acrescido de 150 µL de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 30 volumes. A reação foi interrompida pela retirada do substrato e adição de PBST.

### **3.8 Preparo das linhagens celulares para infecção com PBV.**

Células cultivadas em garrafas ou placas de plástico foram mantidas sempre em estufa com atmosfera de 5% de CO<sub>2</sub> a 37° C, enquanto células cultivadas em garrafas ou tubos de vidro foram cultivadas em estufa úmida a 37° C.

As informações relativas a cada linhagem celular foram obtidas, quando não citada a referência, da sétima edição do Catálogo de Linhagens Celulares e Hibridomas da *American Type Culture Collection (ATCC)*.

#### *Linhagem celular J774A.1.*

Esta linhagem é procedente de células de sarcoma reticular de camundongo BALB/c e apresenta propriedades relativas a macrófagos como morfologia, aderência, receptores para imunoglobulina, lise de células mediada por anticorpos e fagocitose (Ralph & Nakin, 1975). As células foram gentilmente doadas pela Profa. Dra. Selma Giorgio do Departamento de Parasitologia, IB – UNICAMP. Foram cultivadas com meio Iscovis suplementado com 12% de Soro Fetal Bovino (SFB) e antibióticos (100 U de penicilina e 10 µg de estreptomicina por mililitro de meio) e incubadas até confluência parcial da monocamada celular. Essas células ainda foram cultivadas em tubos de vidro, onde 2,5x10<sup>4</sup> células foram colocadas em 2,0 mL de

meio Iscovich, suplementado com 12% de Soro Fetal Bovino (SFB) e antibióticos (100 U de penicilina e 10 µg de estreptomicina por mililitro de meio).

#### *Linhagem celular SK-6.*

A linhagem SK-6 (Suine Kidney) é proveniente de células normais de rim suíno. Estas células foram cultivadas com meio Eagle (MEM), suplementado com 10% de Soro Fetal Bovino (SFB) e antibióticos (100 U de penicilina e 10 µg de estreptomicina por mililitro de meio). As células foram incubadas até a confluência da monocamada.

#### *Linhagem celular Vero.*

As células da linhagem Vero foram iniciadas em 27 de março de 1962 por Yasumura e Kawakita no Japão e são provenientes do rim normal de um macaco verde africano adulto. Estas células foram adquiridas do Instituto Adolf Lutz (São Paulo) e cultivadas em placas de seis cavidades com meio Eagle (MEM), suplementado com 10% de Soro Fetal Bovino (SFB) e antibióticos (100 U de penicilina e 10 µg de estreptomicina por mililitro de meio) até confluência de 70% da monocamada celular quando, então, foram utilizadas nos experimentos com lipossomos. Para os experimentos de infecção sem lipossomos as células Vero foram cultivadas em garrafas de vidro até a confluência da monocamada.

#### *Linhagem celular HT-29.*

As células da linhagem HT-29 foram isoladas de um adenocarcinoma primário de cólon humano em 1964 por J. Fogh. Estas células foram gentilmente cedidas pela Profa. Dra. Maria Lúcia B. O. Rácz do Instituto de Ciências Biomédicas da USP e cultivadas com meio McCoy, suplementado com 12% de Soro Fetal Bovino (SFB) e antibióticos (100 U de penicilina e 10 µg de estreptomicina por mililitro de meio), até confluência parcial da monocamada celular quando, então, foram utilizadas nos experimentos de infecção. Células cultivadas em placas de seis cavidades nas mesmas condições anteriores, formando monocamada semiconfluente, foram utilizadas nas infecções utilizando lipossomos.

### *Linhagem celular MDBK.*

A linhagem MDBK (Madin and Darbi Bovine Kidney) é proveniente de células normais de rim bovino e acredita-se que tenha sido a primeira linhagem celular permanente a ser estabelecida a partir de um animal doméstico de grande porte. A linhagem foi obtida junto ao Instituto Adolf Lutz, São Paulo. Estas células foram cultivadas com meio Eagle (MEM), suplementado com 10% de Soro Fetal Bovino (SFB) e antibióticos (100 U de penicilina e 10 µg de estreptomicina por mililitro de meio) e incubadas até a confluência da monocamada.

### *Linhagem celular CaCo-2*

A linhagem CaCo-2 é proveniente de carcinoma de cólon humano e foram gentilmente cedidas pela Profa. Dra. Maria Lúcia B. O. RácZ do Instituto de Ciências Biomédicas da USP. Estas células foram utilizadas somente para infecção mediada por lipossomos visto que já tinham sido testadas para infecção direta com PBV suíno e murino por Vicentini (1998). Elas foram cultivadas em placas de seis cavidades com meio Eagle (MEM), suplementado com 12% de Soro Fetal Bovino (SFB) e antibióticos (100 U de penicilina e 10 µg de estreptomicina por mililitro de meio) até atingirem aproximadamente 60% de confluência.

### *Linhagem celular 3T3*

As células da linhagem 3T3 são originadas de fibroblastos de embrião de camundongos e foram cultivadas com meio Eagle (MEM), suplementado com 10% de Soro Fetal Bovino (SFB) e antibióticos (100 U de penicilina e 10 µg de estreptomicina por mililitro de meio) e incubadas até a confluência da monocamada. Estas células foram gentilmente cedidas pelo CEMIB/UNICAMP.

## **3.9 Protocolos de infecção das linhagens celulares com PBV**

Para infecção das linhagens celulares foram utilizadas suspensões fecais murinas e de tamanduá preparadas conforme item 3.3. Em todas as linhagens celulares, a cada passagem do experimento, foram feitas observações periódicas de 24 horas, visando a detecção de alterações celulares sugestivas de efeito citopático (ECP). Foram utilizados seis diferentes protocolos, sendo que os protocolos de 1 a 4 foram aplicados somente nas células da linhagem J774A.1. O protocolo 5 foi aplicado nas linhagens MDBK, Vero, HT-29, 3T3 e SK-6 e o protocolo 6, onde se

utilizou lipossomos para transfecção de partículas virais, foi aplicado nas linhagens Vero, HT-29 e CaCo-2.

**Protocolo 1:** Suspensão fecal murina foi diluída a 1:20 em meio Eagle (MEM) e foi utilizada como inóculo. As células J774A.1 foram lavadas uma vez com PBS 0,01 M pH 7,4 e incubadas com 0,5 mL do inóculo por uma hora, sendo agitadas levemente a cada 10 minutos visando aumentar o contato entre partículas virais e possíveis receptores celulares. Decorrida uma hora, foram acrescentados meio Eagle (MEM) mais antibióticos (100 U de penicilina e 10 µg de estreptomicina por mililitro de meio).

Após 24 horas, duas frações de 0,5 mL do sobrenadante celular foram coletados sendo repostos o mesmo volume de meio. Estas frações foram submetidas ao processo de extração e detecção do RNA viral (item 3.2). Decorridas 36 horas, a monocamada celular foi propositalmente descolada e três alíquotas de 1,0 mL foram coletadas. Duas alíquotas foram congeladas e descongeladas por três vezes e centrifugadas a 1500g por 10 minutos. Uma delas foi levada para análise da presença do PBV por EGPA, enquanto a outra foi usada para infecção posterior (segunda passagem).

A alíquota restante, que não foi congelada, também foi utilizada diretamente na infecção em segunda passagem, visando observar se o congelamento da amostra interfere na infecção em passagens posteriores. O mesmo protocolo foi seguido para mais duas passagens.

**Protocolo 2:** Suspensão fecal de tamanduá foi diluída a 1:50, 1:100, 1:200 em meio Iscovi's e foi utilizada como inóculo. As células J774A.1 cultivadas em garrafas foram lavadas uma vez com PBS 0,01 M pH 7,4 e incubadas com 0,5 mL do inóculo por uma hora, sendo agitadas levemente a cada 10 minutos. Decorrida uma hora, foram acrescentados meio Iscovi's mais antibióticos (100 U de penicilina e 10 µg de estreptomicina por mililitro de meio). Após 24 horas, duas frações de 0,5 mL do sobrenadante celular foram coletadas sendo repostos o mesmo volume de meio. Estas frações foram submetidas ao processo de extração e detecção do RNA viral por EGPA. Decorridas 48 horas, as garrafas foram congeladas e descongeladas por três vezes, uma alíquota de 0,5 mL foi centrifugada a 1500 g por 10 minutos e processada para análise

da presença do PBV por EGPA. Outra alíquota de 0,5 mL foi utilizada na infecção em segunda passagem, e assim sucessivamente, até a quarta passagem.

**Protocolo 3:** À monocamada semi-confluyente das células J774A.1 cultivadas em garrafa foram acrescentados 2,0 mL de meio Iscovis com 5% de SFB e antibióticos (100 U de penicilina e 10 µg de estreptomicina por mililitro de meio). Promoveu-se o descolamento das células e ainda com as células em suspensão foi acrescentado 0,5 mL de suspensão fecal de tamanduá (amostra Z715) nas diluições 1:50, 1:100 e 1:200 mais 5,5 mL do meio Iscovis com 5% de SFB e antibióticos (100U de penicilina e 10µg de estreptomicina por mililitro de meio). Após 24 horas as garrafas foram congeladas e descongeladas por 3 vezes. Uma alíquota de 0,5 mL foi submetida à extração e detecção do RNA viral enquanto outra alíquota de 0,5 mL foi utilizada para infecção em segunda passagem e assim sucessivamente, até a quarta passagem.

**Protocolo 4:** Nas células J774A.1 cultivadas no sistema *roller*, após 24 horas, acrescentou-se 0,1 mL de suspensão fecal de tamanduá nas diluições 1:50, 1:100 e 1:200. As células foram mantidas a 37°C por mais 24 horas com observações a cada 12 horas. Neste experimento foi realizada apenas mais uma passagem.

**Protocolo 5:** Para esse protocolo foram utilizadas as linhagens celulares MDBK, SK-6, HT-29, 3T3 e Vero. Suspensão fecal de tamanduá foi diluída 1:10 e 1:50 em meio Eagle (MEM) e 0,5 mL foi utilizado para a infecção. As células permaneceram incubadas por três horas com este volume de inóculo, sendo agitadas levemente a cada 10 minutos. Após, meio de cultura, acrescido de antibióticos (100 U de penicilina e 10 µg de estreptomicina por mililitro de meio ) e 2% de SFB, foi adicionado. Com 24 horas após inoculação 2,5 mL do sobrenadante celular foi coletado e o um novo volume de meio de cultura foi adicionado à garrafa. Após 48 horas da infecção as células foram congeladas e descongeladas três vezes e uma alíquota de cada coleta (com 24 e 48 horas) foi submetida à extração do RNA viral. O sobrenadante celular obtido após 48 horas da infecção foi utilizado para inoculação da passagem posterior e assim por diante, mantendo-se o mesmo protocolo de observação, coleta e análise do RNA viral. Uma garrafa controle foi mantida como parâmetro de comparação para observação de possível ECP.

**Protocolo 6:** Foi realizado utilizando-se a técnica de transfecção com lipossomos para carrear o PBV para o interior das células. As linhagens celulares utilizadas nesse protocolo foram CaCo-2, HT-29 e Vero. Células cultivadas em placas de 6 cavidades 60 a 80% confluentes foram lavadas três vezes com meio Eagle (MEM) e, em seguida, cada concavidade foi coberta com os 300 µL da solução C (ver item 3.10), permanecendo assim incubadas por 8 horas<sup>1</sup>. Após este período o inóculo foi removido, as células foram lavadas duas vezes com PBS e 2,0 mL de meio Eagle contendo 5% de SFB foram adicionados em cada concavidade. Três cavidades foram utilizadas para incubar as células com a solução C e as outras três como controles do experimento a saber: (i) 300 µL da Solução A – suspensão fecal -, (ii) 300 µL de Solução B – lipossomos – e, (iii) 300 µL de meio Eagle (MEM). Após 24 horas da remoção do inóculo as células foram congeladas e descongeladas por três vezes e o sobrenadante celular foi analisado quanto a presença do RNA do PBV por EGPA.

### 3.10 Preparo dos lipossomos para transfecção das linhagens celulares

As infecções por PBV mediadas por lipossomos seguiram as recomendações de Bass *et al.*, (1992) com algumas modificações anotadas pelo fabricante. Foram utilizadas nestes ensaios amostras, positivas em EGPA, de tamanduá (Z725) e de rato (RD-2).

Preparo da Solução A.

Suspensão fecal de tamanduá ou de ratos a 10% em PBS 0,01 M pH 7,4, filtradas em membranas de 0,45 µm (MilliPore®), foi diluída em meio Eagle (MEM), sem SFB e antibióticos, na proporção 1:20.

Preparo da Solução B.

Para cada concavidade a ser transfectada, foram diluídos 7,5 µL do reagente Lipofectin™ (preparado comercial contendo DOTMA e DOPE) em 92,5 µL de meio Eagle (MEM) sem SFB e antibióticos. Esta mistura foi agitada levemente e incubada em temperatura ambiente por 45 minutos.

Preparo da Solução C.

---

<sup>1</sup> Segundo recomendações do fabricante, a transfecção pode ocorrer num intervalo de 5 a 12 horas após a adição dos lipossomos nas células

Após o tempo de incubação da Solução B, 200 µL da solução A mais 100 µL da solução B foram misturados. Esta mistura, contendo lipossomos em meio Eagle mais suspensão fecal, foi chamada Solução C. Esta solução foi agitada suavemente e incubada em temperatura ambiente por mais 15 minutos, sendo em seguida colocada na monocamada celular.

### **3.11 Concentração e purificação das partículas virais**

#### *Concentração das partículas virais por ultracentrifugação em colchão de sacarose.*

Sobrenadantes celulares e algumas suspensões fecais de ratos positivas em EGPA para o PBV, foram submetidas à concentração sobre uma solução de sacarose a 30%, com ultracentrifugação por 4 horas a 200.000g no rotor SW41Ti a 4°C [centrífuga Beckmann® L8-80M]. O sobrenadante foi descartado e o precipitado ressuspense em volume mínimo de tampão Tris-HCl 0,1M pH 7,4, mais 0,0015 M de CaCl<sub>2</sub> (Haga, 1998).

#### *Purificação das partículas virais por ultracentrifugação em gradiente de cloreto de cério (CsCl).*

Ao precipitado ressuspense em tampão Tris-HCl, oriundo da concentração em colchão de sacarose, foi adicionada solução de CsCl, com densidade ajustada para 1,41 g/mL, e ultracentrifugado a 120.000 g no rotor SW41Ti (centrífuga Beckmann L8-80M) durante 60 horas a 4°C. Após este tempo, de cada tubo foram coletadas frações de 0,7 mL e um volume de 100 µL de cada alíquota foi pesado para determinação de sua densidade. As frações entre os intervalos de densidade de 1,35 a 1,45 foram dialisadas por 18 horas a 4°C contra tampão Tris-HCl mais CaCl<sub>2</sub>. Alíquotas de 100 µL de cada fração foram acrescidas de 400 µL de tampão Tris-HCl e submetidas à extração do RNA e detecção por EGPA, conforme descrito no item 3.2 (Haga, 1998).

### **3.12 Observação de amostras em microscopia eletrônica direta**

A técnica utilizada para observação de amostras em microscopia eletrônica direta foi o método da gota reversa (Humphrey *et al.*, 1990)

Grades de cobre de 300 mesh recobertas com película de formvar e carbono foram colocadas sobre gotas, dispostas em parafilme, da amostra a ser observada. Após adsorção por 30 minutos, a grade de cobre foi colocada sobre uma gota de contrastante para microscopia

eletrônica (fosfotungstato de sódio a 2%, pH 6,4), permanecendo nele por dois minutos. Decorrido o tempo, a grade foi retirada, secou-se o excesso de corante em papel filtro e levou-se para observação no microscópio eletrônico Zeiss modelo LEO-906, operando a 80 kv.

### **3.13 Ensaio com os primers PicoB23 e PicoB45 para RT-PCR em amostras de fezes PBV positivas em EGPA**

#### *Extração de RNA total*

O RNA total da suspensão fecal de quatro amostras suínas, três de tamanduá bandeira e quatro amostras de ratos, PBV positivas em EGPA para os dois segmentos do RNA dupla fita do PBV, foi extraído através da utilização de Trizol<sup>®</sup> LS (10296-010 - GIBCO), conforme técnica descrita pelo fabricante.

Foram aliqüotados 900 µl de Trizol<sup>®</sup> para cada 300 µl da amostra. Esta mistura foi incubada durante 5 minutos à temperatura ambiente, foram adicionados 200 µl de clorofórmio, incubando-se a mesma durante mais 5 minutos à temperatura ambiente. Após a incubação, as amostras foram centrifugadas a 12.000 g durante 15 minutos a 4°C (centrífuga Eppendorf<sup>®</sup> 5402) e coletou-se a fase aquosa.

A essa fase aquosa adicionou-se isopropanol gelado (volume/volume) seguindo, incubação durante 10 minutos à temperatura ambiente. Logo em seguida, esta mistura foi centrifugada a 12.000 g durante 10 minutos a 4°C (centrífuga Eppendorf<sup>®</sup> 5402) e o sobrenadante descartado. O precipitado, ressuspensão em Etanol 75%, foi agitado em vortex e centrifugado a 12.000 g durante 45 minutos a 4°C (centrífuga Eppendorf<sup>®</sup> 5402). Em seguida, o RNA foi ressuspensão em 30 µl de dietilpirocarbonato (DEPC) a 1% em água deionizada estéril, e aquecido a 55°C durante 10 minutos. Essa solução foi chamada de RNA total. A concentração de RNA total foi determinada pela medida da densidade óptica com  $\lambda = 260$  nm em espectrofotômetro Beckmann<sup>®</sup> DU-65.

#### *Transcrição reversa associada à reação em cadeia da polimerase (RT – PCR)*

O protocolo de RT-PCR foi realizado de acordo com o método descrito por Rosen *et al.*, 2000, com modificações.

O RNA total, extraído com Trizol<sup>®</sup>, de suspensão fecal de tamanduá, suínos e ratos foi utilizado para sintetizar o cDNA. O volume final de cada reação de transcrição reversa foi de 25 µL. Todos os reagentes utilizados foram obtidos da Invitrogen Life Technologies<sup>®</sup>, exceto onde indicado de modo diferente. Cada um dos *primers* PicoB25 (TGG TGT GGA TGT TTC) e PicoB43 [A(GA)T G(CT)T GGT GCA ACT T] foi utilizado na concentração de 25 pmoles adicionados de dimetilsulfóxido (DMSO-Merck<sup>®</sup>) na concentração final de 5%. Aos *primers* adicionou-se 1,0 µL do RNA total, previamente incubado a 55°C durante 10 minutos em banho-maria, e essa solução foi aquecida a 94°C durante 5 minutos. A seguir, com a solução em banho de gelo, adicionou-se 500 nM de dNTP, 10 nM de DTT, 4,0 U/µL da enzima MMLV-RT. A reação de transcrição reversa ocorreu durante 60 minutos à temperatura de 37°C em banho-maria. Decorridos esse tempo, a solução foi incubada a 70°C durante 15 minutos e no mesmo tubo foram adicionados 25 µL de outra solução de reação, para a amplificação do cDNA, contendo o tampão de reação para PCR, 2,0 mM de cloreto de magnésio (MgCl<sub>2</sub>), 200 µM de dNTP, 50 pmoles de cada um dos *primers* PicoB25 e PicoB43 e 2,5 U da enzima Taq polimerase. A reação de amplificação ocorreu de acordo com o esquema abaixo:

Temperatura	Tempo	
94°C	2 minutos – uma vez	
94°C	1 minuto -	40 CICLOS
49°C	2 minutos	
72°C	3 minutos	
72°C	7 minutos – uma vez	
4°C	∞	
Tempo total de amplificação: 05h20min		

Como controles negativos da reação foram utilizados os mesmos reagentes das amostras testadas e o volume de RNA total e cDNA foi substituído pelo mesmo volume de solução de dietilpirocarbonato (DEPC) a 1% em água deionizada estéril. Não houve a introdução de

controles positivos para os testes, pois o laboratório não possui amostras humanas já testadas para os *primers* em questão.

O produto amplificado foi aplicado em gel de agarose 1,5% em tampão Tris-acetato 2,0 M contendo EDTA 0,5 M (Tampão TAE) pH 8,0. Fez-se uma solução de 10  $\mu$ L de solução da reação de amplificação com 2  $\mu$ L da solução corante (azul de bromofenol 0,25%, xileno cianol 0,25%, glicerol 30% em água destilada). Uma alíquota de 10  $\mu$ L dessa mistura foi aplicada no gel de agarose. Como marcador de peso molecular utilizou-se o 100pb DNA Ladder (Pharmacia Biotech®). A corrida eletroforética procedeu em 60 minutos. A visualização das bandas correspondentes à amplificação foi realizada imergindo o gel em solução de brometo de etídio e observação sob luz ultravioleta. A fotodocumentação foi realizada no aparelho Image Master ToolLab (Amershan Pharmacia Biotech).

## 4. RESULTADOS

### 4.1. Análise das amostras de fezes

#### *Amostras de fezes murinas coletadas de biotérios de experimentação da Unicamp*

Das sessenta amostras murinas coletadas oito (13,3%) foram positivas para PBV na análise em EGPA. O padrão de migração dos dois segmentos do RNA dupla fita na EGPA foi semelhante ao já apontado por Gatti (1994), ou seja, os segmentos de RNA do PBV localizando-se entre o terceiro e quinto segmentos do perfil eletroforético do RNA dupla fita de rotavírus do grupo A, exceto por uma amostra em que foram observadas quatro segmentos equimolares, sendo que dois deles ficaram localizados entre o quarto e o quinto segmentos do rotavírus do grupo A (dados não demonstrados).

#### *Amostras de fezes de tamanduá bandeira (Myrmecophaga tridactyla)*

No recinto dos tamanduás do Zoológico de Americana há um macho e uma fêmea. Foi solicitado ao zoológico que nos enviasse as amostras de fezes identificando o animal de origem, quando possível. Em sete das dez amostras enviadas nos anos de 1999 e 2000 foi possível identificar sua origem. A Tabela 4.1 apresenta o resultado das análises das amostras enviadas nesse período pelo Zoológico de Americana.

O macho apresentou o PBV em pelo menos três das coletas efetivadas e as fezes apresentavam um aspecto líquido pastoso, sugerindo diarreia. A fêmea teve duas amostras positivas para o PBV, sem evidências de diarreia.

Em cinco amostras coletadas durante o presente trabalho foi realizada a análise do tamanho dos segmentos do RNA dupla fita do PBV. Encontrou-se pequenas variações na quantidade de pares de bases, exceto por uma amostra, a Z726. Essa amostra foi coletada do recinto, sem possibilidade, portanto, de identificação do animal, e apresentou em EGPA três bandas de RNA dupla fita (Figura 4.1). Há uma variação no tamanho do segmento menor do RNA dupla fita (Quadro 4.1).

Tabela 4.1 – Amostras de fezes de tamanduá-bandeira *Myrmecophaga tridactyla* do Zoológico Municipal de Americana/SP, coletadas entre setembro de 1999 e julho de 2000, e resultados da eletroforese em gel de poliacrilamida para a pesquisa de picobirnavírus (PBV).

Animal de Origem	Identificação da Amostra	Data da Coleta	PBV	Diarréia <sup>(1)</sup>
MACHO	Z 617	20/10/1999	+	+
	Z 715	17/11/1999	+	+
	Z 725	15/12/1999	+	+
	Z 784	28/07/2000	-	-
FÊMEA	Z 618	20/10/1999	+	-
	Z 724	15/12/1999	-	-
	Z 782	28/07/2000	+	-
Indeterminado	Z 549	22/09/1999	+	-
	Z 649	20/10/1999	-	-
	Z 726	01/04/2000	+	+

(1) – Amostras de fezes com aspecto líquido ou pastoso

Quadro 4.1 - Tamanho dos segmentos, em pares de bases, de RNA dupla fita dos picobirnavírus detectados por eletroforese em gel de poliacrilamida nas fezes dos tamanduás-bandeira *Myrmecophaga tridactyla* do Zoológico de Americana/SP.

Rotavírus SA-11*	PBV	Z618	Z715	Z725	Z726	Z782	
1ºseg	3302						
2ºseg	2690						
3ºseg	2591						
4ºseg	2362						
		1ºseg	2140	2112	2118	2142	2165
		2ºseg	1603	1607	1600	1601	1612
5ºseg	1581	2ºseg			1573		

\* Segundo Fields *et al.*, 1996.

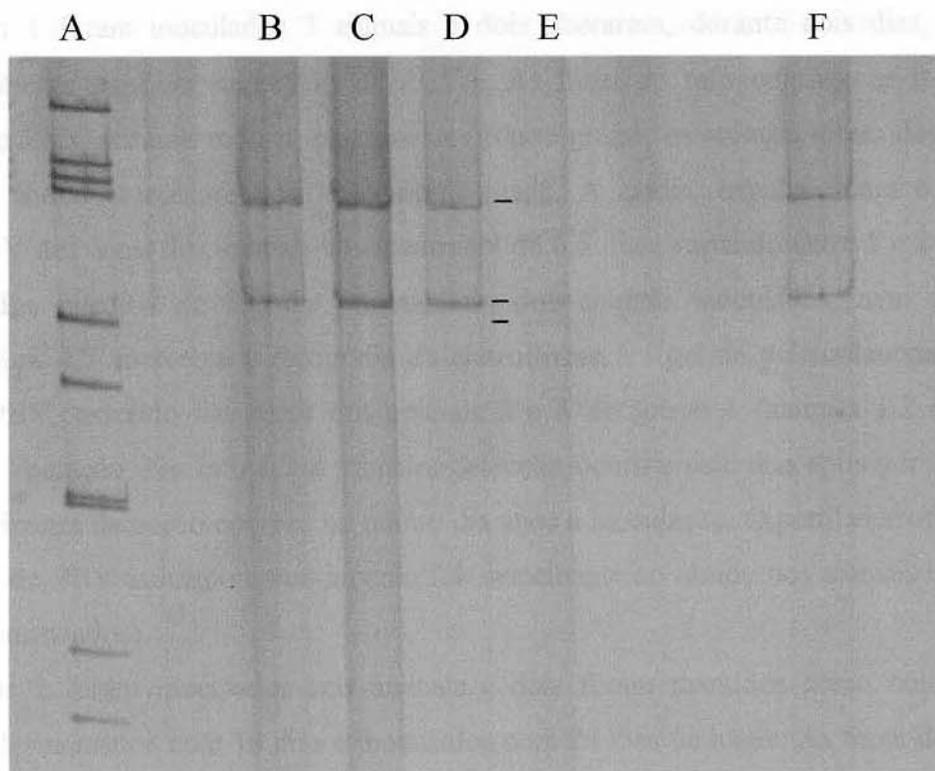


Figura 4.1. Eletroforese em gel de poliacrilamida de RNA dupla fita de picobirnavírus (PBV), extraídos de suspensões fecais de tamanduás-bandeira, coletadas no Zoológico de Americana/SP nos anos de 1999 e 2000.

Canaleta A – RNA dupla fita de rotavírus do grupo A (SA11)

Canaleta B – RNA dupla fita de PBV - amostra Z618

Canaleta C – RNA dupla fita de PBV - amostra Z715

Canaleta D – RNA dupla fita de PBV - amostra Z725

Canaleta E – RNA dupla fita de PBV - amostra Z726

Canaleta F – RNA dupla fita de PBV - amostra Z782

### *Amostras de fezes das infecções experimentais em ratos gnotobióticos*

Nos experimentos de infecção em ratos gnotobióticos foram inoculados 20 animais divididos em 4 grupos. Em dois grupos foi possível detectar os dois segmentos do RNA dupla fita do PBV nas fezes dos ratos inoculados com suspensão fecal positiva para PBV.

No grupo 1 foram inoculados 3 animais e dois liberaram, durante dois dias, PBV em quantidade suficiente para ser detectado na EGPA. As fezes do rato controle se mantiveram negativas para o PBV durante todo o experimento. Nesse grupo, os animais foram desmamados com 18 dias e foram inoculados com 22 dias de idade. A média, em dias, para o início da detecção do PBV nas fezes dos animais inoculados foi de 6,5 dias, variando entre 5 e 8 dias. Não foram observados eventos de diarreia em nenhum dos animais inoculados, nem no animal controle. A Figura 4.2 apresenta a fotografia da eletroforese em gel de poliacrilamida do RNA dupla fita do PBV, extraído das fezes dos animais 2 e 3 do grupo 1 (animais 1.2 e 1.3), no primeiro dia de liberação. No rato 1.2 a primeira detecção ocorreu sete dias após a inoculação e no rato 1.3 a primeira detecção ocorreu no quinto dia após a inoculação. O perfil eletroforético do RNA dupla fita do PBV utilizado como inóculo foi semelhante ao obtido dos animais inoculados (dados não demonstrados).

No grupo 2 foram inoculados seis animais e dois foram mantidos como controles. Os animais foram desmamados com 18 dias e inoculados com 24 dias de idade. As fezes dos animais controle mantiveram-se negativas durante todo o experimento. A Tabela 4.2 apresenta o resultado da infecção dos animais inoculados. Não foi possível calcular a média em dias de liberação de PBV nas fezes, pois os animais positivos foram sendo sacrificados ao longo do experimento para laparotomia e coleta de material para estudos morfológicos e imunohistoquímicos. Não foram observados eventos de diarreia nos animais inoculados e no animal controle.

Todos os animais inoculados liberaram o PBV nas fezes. Contudo, apesar da amostra inoculada apresentar em EGPA apenas duas bandas de RNA dupla fita do PBV, em cinco animais foi possível visualizar variações no tamanho dos segmentos. Na Figura 4.3 tem-se a eletroforese em gel de poliacrilamida do genoma do PBV extraído da amostra utilizada como inóculo (Coluna D), dos genomas de PBV obtidos da extração das fezes do rato 2.2 (Coluna A) no décimo dia pós-inoculação e das fezes do rato 2.4 (Coluna B) no oitavo dia pós-inoculação. A amostra utilizada como inóculo evidenciou em EGPA somente os dois segmentos do RNA dupla

fitas características do PBV, o qual foi liberado pelos animais 2.1 e 2.6. Nos outros animais inoculados foram observados perfis eletroforéticos dos segmentos do RNA dupla fita viral diferentes daquele do inóculo. Foi possível observar a presença de três segmentos genômicos, coincidentes ou não em tamanho, com os segmentos do inóculo. Esses perfis eletroforéticos sugerem misturas de PBV. Também observou-se amostras com apenas dois segmentos, porém não coincidentes com os segmentos do inóculo. Alguns deles demonstraram uma distância menor entre os dois segmentos. Este perfil eletroforético foi denominado curto. Esse padrão curto de migração pode ser observado na coluna B da Figura 4.3 e nas colunas C e D da Figura 4.4.

A Figura 4.4 apresenta a eletroforese em gel de poliacrilamida com amostras coletadas no nono dia após inoculação dos ratos gnotobióticos do grupo 2 e o Quadro 4.2 apresenta a análise dos tamanhos dos segmentos, em quantidade de pares de bases. É possível observar variação no tamanho do segmento maior do PBV e praticamente dois tamanhos diferentes do segmento menor. Essa variação no tamanho dos segmentos tinha sido observada durante a análise das amostras coletadas nos biotérios.

Na intenção de caracterizar e fotografar em microscópio eletrônico o PBV curto, foram realizadas tentativas de concentração de partículas virais utilizando amostras de fezes do rato 2.5. Contudo tais tentativas não foram bem sucedidas, visto que os precipitados obtidos das ultracentrifugações em colchão de sacarose forneceram bandas muito tênues na EGPA (dados não demonstrados). Alíquotas desta amostra concentrada foram analisadas em microscopia eletrônica direta, mas não foi possível visualizar partículas virais. Foi realizada uma tentativa de purificação de partículas virais em gradiente de CsCl e em nenhuma faixa de densidade foram detectados os dois segmentos do RNA viral.

#### **4.2 Análise da infecção experimental em linhagens celulares.**

Foram utilizadas sete diferentes linhagens celulares para as tentativas de adaptação do PBV à replicação em cultura de tecidos com quatro diferentes amostras de fezes PBV positivas, sendo duas de tamanduá-bandeira e duas de ratos. As infecções em cultura de células foram executadas seguindo seis diferentes protocolos, conforme relatado na seção Material e Métodos, item 3.9.

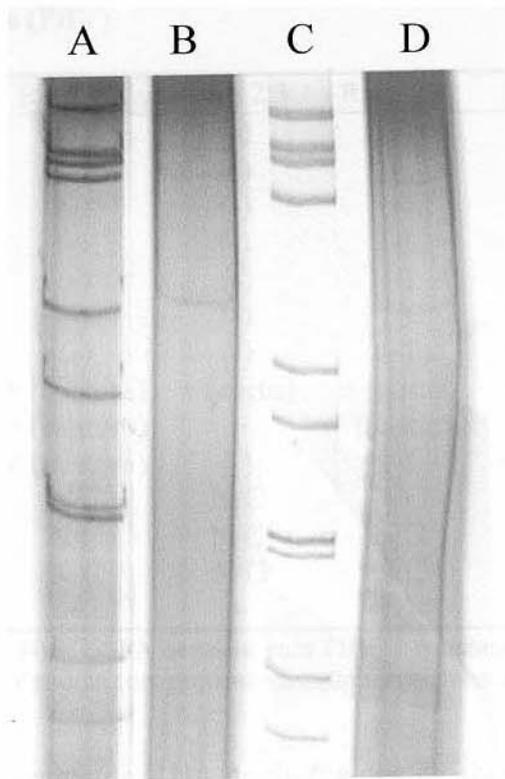


Figura 4.2. Eletroforese em gel de poliacrilamida de RNA dupla fita de picobirnavírus (PBV), extraídos de amostras de fezes de ratos da linhagem Wistar, do grupo 1 de ratos infectados experimentalmente.

Canaletas A e C – RNA dupla fita de rotavírus suíno do grupo A.

Canaleta B – RNA dupla fita de PBV obtido do rato 1.3, no sétimo dia após a inoculação.

Canaleta D – RNA dupla fita de PBV obtido do rato 1.2, no quinto dia após a inoculação.

Tabela 4.2 – Resultados da análise por eletroforese em gel de poliacrilamida, das fezes dos animais do grupo 2 de ratos gnotobióticos, experimentalmente infectados com amostras de fezes positivas para picobirnavírus (PBV).

Dias pós-inoculação	Rato 2.1	Rato 2.2	Rato 2.3	Rato 2.4	Rato 2.5	Rato 2.6
1	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
2	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
3	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
4	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
5	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	+
6	+	(-)	(-)	(-)	+ (curto)	+
7	+	(-)	(-)	(-)	+ (curto)	(-)
8	+ †	+ (mistura)	+ (curto)	+ (curto)	+ (curto)	+
9		+ (mistura)	+	+ (mistura)	+ (curto)	+ (variação)
10		+ (mistura)	(-)	(-)	+ (curto) †	+ †
11		N/C	N/C	N/C		
12		N/C	N/C	N/C		
13		N/C	N/C	N/C		
14		+	+	(-)		

+ = EGPA positiva para PBV padrão; (-) = EGPA negativa para PBV; † = animal sacrificado; mistura = PBV padrão mais PBV curto; variação = PBV padrão com pequena variação no tamanho dos segmentos; N/C = amostra não coletada

Quadro 4.2 - Tamanho dos segmentos de RNA dupla fita dos picobirnavírus (PBV), em pares de bases, detectados por eletroforese em gel de poliacrilamida nas fezes dos ratos do grupo 2, infectados experimentalmente.

Rotavírus	PBV	rato 2.2	rato 2.3	rato 2.4	rato 2.5	rato 2.6	inóculo	PBV
SA-11 <sup>(1)</sup>								curto <sup>(2)</sup>
1ºseg 3302								
	1º seg	2792	2860					
2ºseg 2690	1º seg			2693		2641	2640	
3ºseg 2591								
4ºseg 2362								
	1º seg			2230	2224			2152
	2º seg	1692		1783	1781	1703	1741	1953
	2º seg		1621		1684			
5ºseg 1581								

(1) Segundo Fields *et al.*, 1996. (2) PBV com padrão curto de migração identificado em fezes de coelhos por Gallimore *et al.*, (1993). As amostras provenientes do rato 2.1 não foram analisadas

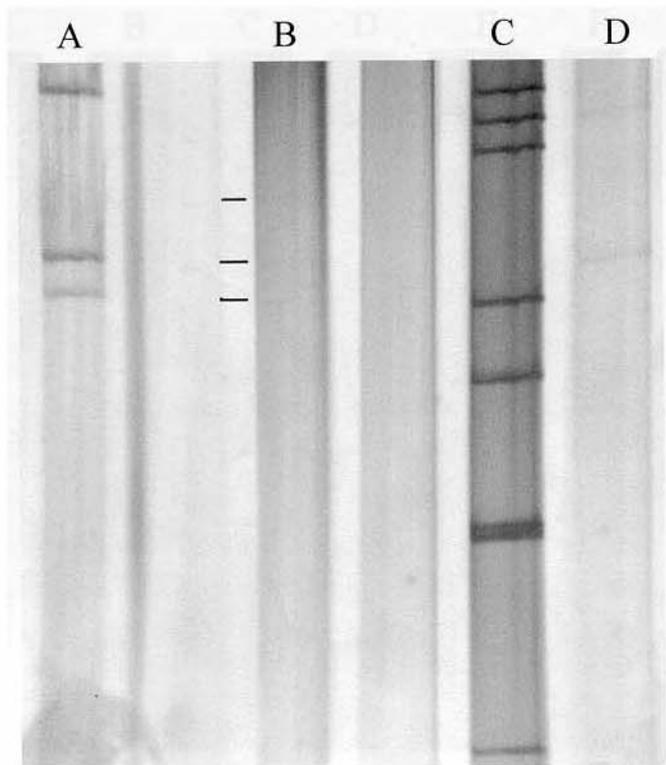


Figura 4.3 Eletroforese em gel de poliacrilamida de RNA dupla fita de picobirnavírus (PBV), extraídos de amostras de fezes de ratos, da linhagem Wistar, do grupo 2 de ratos infectados experimentalmente.

Canaleta A – RNA dupla fita de PBV obtido do rato 2.2, no décimo dia após inoculação

Canaleta B – RNA dupla fita de PBV obtido do rato 2.4, no oitavo dia após inoculação

Canaleta C – RNA dupla fita de rotavírus do grupo A

Canaleta D – RNA dupla fita de PBV obtido do inóculo

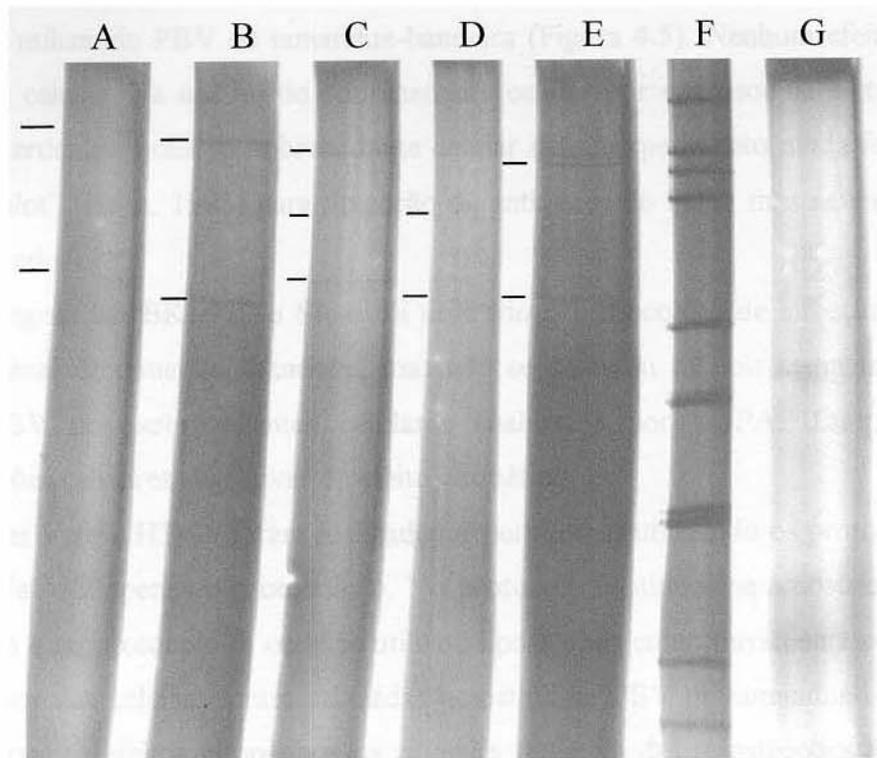


Figura 4.4. Eletroforese em gel de poliacrilamida de RNA dupla fita de picobirnavírus (PBV) extraídos de amostras de fezes de ratos, da linhagem Wistar, do grupo 2 de ratos infectados experimentalmente, nove dias após infecção.

- Canaleta A – RNA dupla fita de PBV obtido do rato 2.3
- Canaleta B – RNA dupla fita de PBV obtido do rato 2.2
- Canaleta C – RNA dupla fita de PBV obtido do rato 2.4
- Canaleta D – RNA dupla fita de PBV obtido do rato 2.5
- Canaleta E – RNA dupla fita de PBV obtido do rato 2.6
- Canaleta F – RNA dupla fita de rotavírus suíno do grupo A
- Canaleta G – Controle do experimento (controle 2).

Para a linhagem celular J774A.1 foram utilizados quatro protocolos diferentes, sendo possível detectar os segmentos do RNA dupla fita do PBV na primeira passagem do experimento com protocolo 2, utilizando PBV de tamanduá-bandeira (Figura 4.5). Nenhum efeito citopático foi observado nas células. Na análise do sobrenadante celular por microscopia eletrônica direta não se detectou partículas virais. O sobrenadante celular desse experimento ainda foi submetido ao teste de “dot-blot” (Haga, 1998) para detecção de antígenos do PBV, mas nenhum resultado positivo foi observado.

Para as linhagens MDBK, 3T3 e SK-6 foi utilizado o protocolo 5 de infecção, inoculadas com suspensão fecal de tamanduá-bandeira, mas não se detectou os dois segmentos do RNA dupla fita do PBV nos sobrenadantes celulares analisados por EGPA. Tampouco foram observadas alterações celulares sugestivas de efeito citopático.

Nas linhagens Vero e HT-29 foram realizados experimentos utilizando os protocolos 5 e 6 e para a linhagem CaCo-2 apenas o protocolo 6. No protocolo 5 utilizou-se amostras de PBV de tamanduá-bandeira e no protocolo 6, onde se utilizou lipossomos como ferramenta para carrear o vírus para o interior das células, foram utilizadas amostras de PBV de tamanduá-bandeira e de rato. Foram observados efeitos citopáticos na primeira tentativa das transfecções (protocolo 6) utilizando as linhagens celulares HT-29 e Vero e amostras de tamanduá bandeira. Em ambos os casos, a monocamada celular de uma das três cavidades inoculadas foi completamente destruída, enquanto os controles e as outras duas cavidades incubadas com a suspensão fecal permaneceram normais. Porém, em nenhum dos experimentos com as células HT-29, Vero e CaCo-2 foi possível detectar os dois segmentos do RNA dupla fita do PBV por EGPA.

O Quadro 4.3 resume os resultados dos experimentos de infecção com as sete linhagens celulares utilizadas e seus diferentes protocolos.

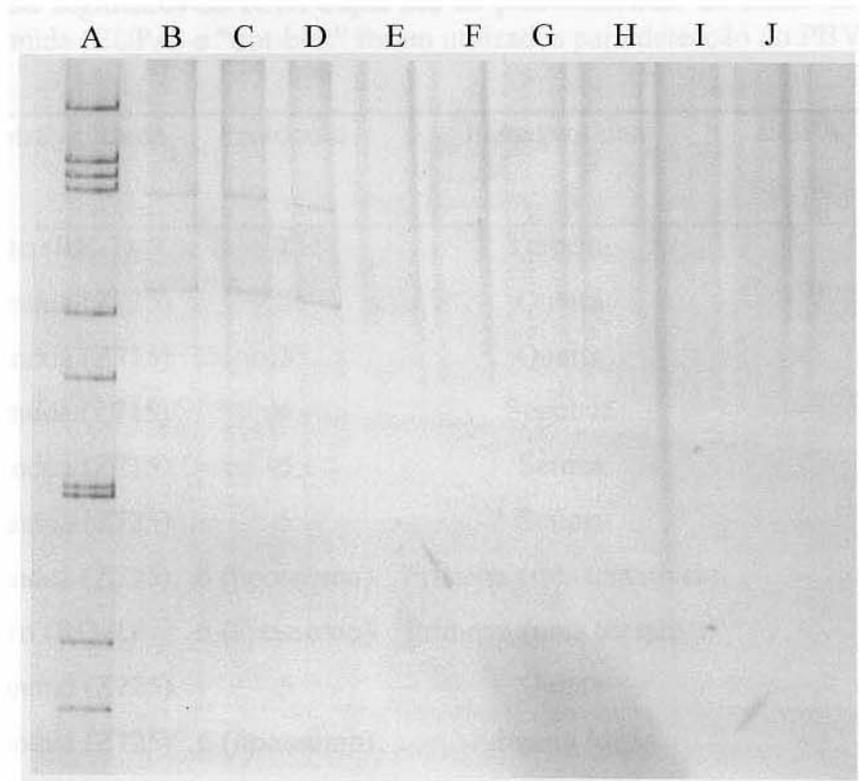


Figura 4.5 – Eletroforese em gel de poliacrilamida de RNA dupla fita de picobirnavírus (PBV) extraído de sobrenadantes de culturas celulares de primeiras passagens em células J774A.1, incubadas com suspensão fecal do tamanduá-bandeira *Myrmecophaga tridactyla* em diferentes diluições.

Canaleta A – RNA dupla fita de rotavírus do grupo A (SA11)

Canaleta B – RNA dupla fita de PBV: diluição do inóculo de 1:200.

Canaleta C – RNA dupla fita de PBV: diluição do inóculo de 1:100.

Canaleta D – RNA dupla fita de PBV: diluição do inóculo de 1:50.

Canaletas E, F e G – Segunda passagem, na mesma ordem de diluição.

Canaletas H, I e J – Terceira passagem, na mesma ordem de diluição.

Quadro 4.3 - Resumo das tentativas de infecção do picobirnavírus (PBV) em diferentes linhagens celulares inoculadas com suspensão fecal de amostras murinas e de tamanduá, positivas para os dois segmentos do RNA dupla fita do picobirnavírus. Os testes de eletroforese em gel de poliacrilamida (EGPA) e “dot-blot” foram utilizados para detecção do PBV.

Linhagem celular	Amostra utilizada	Protocolo	Passagem final	EGPA	Dot-blot
J774A.1	Rato (RE-1)	1	Terceira	-	-
J774A.1	Tamanduá (Z725)	2	Quarta	+(1)	-
J774A.1	Tamanduá (Z715)	3	Quarta	-	-
J774A.1	Tamanduá (Z715)	4	Segunda	-	-
MDBK	Tamanduá (Z715)	5	Sétima	-	N/R <sup>(2)</sup>
Vero	Tamanduá (Z725)	5	Sétima	-	N/R <sup>(2)</sup>
Vero	Tamanduá (Z725)	6 (lipossomo)	Primeira (três tentativas)	-	N/R <sup>(2)</sup>
Vero	Rato (RD-2)	6 (lipossomo)	Primeira (uma tentativa)	-	N/R <sup>(2)</sup>
HT-29	Tamanduá (Z725)	5	Quinta	-	N/R <sup>(2)</sup>
HT-29	Tamanduá (Z725)	6 (lipossomo)	Primeira (duas tentativas)	-	N/R <sup>(2)</sup>
HT-29	Rato (RD-2)	6 (lipossomo)	Primeira (uma tentativa)	-	N/R <sup>(2)</sup>
3T3	Tamanduá (Z725)	5	Décima	-	N/R <sup>(2)</sup>
SK-6	Tamanduá (Z725)	5	Décima	-	N/R <sup>(2)</sup>
CaCo-2	Tamanduá (Z725)	6 (lipossomo)	Primeira (duas tentativas)	-	N/R <sup>(2)</sup>
CaCo-2	Rato (RD-2)	6 (lipossomo)	Primeira (uma tentativa)	-	N/R <sup>(2)</sup>

(1) - Positiva apenas na primeira passagem. O sobrenadante obtido foi observado em microscopia eletrônica, não sendo visualizada nenhuma partícula viral.

(2) - Não realizado

### **4.3 Análise dos possíveis órgãos alvo da infecção pelo PBV em ratos gnotobióticos experimentalmente infectados.**

Os ratos gnotobióticos experimentalmente infectados foram utilizados para estudos morfológicos dos tecidos e células do trato intestinal na busca de possíveis lesões causadas pelo vírus. Além disso, utilizou-se o soro anti-PBV de ratos, produzido por Haga (1998) em coelhos, para realizar também reações imunohistoquímicas nos cortes histológicos, buscando antígenos do PBV nas células. No total, foram infectados vinte e um ratos gnotobióticos, divididos em quatro grupos. Nos grupos 1 e 2 foi possível obter fezes positivas para os dois segmentos do RNA dupla fita do PBV, em EGPA, dos animais inoculados. Os animais mantidos como controles do experimento permaneceram negativos em todos os grupos.

Quatro ratos infectados pelo PBV e três mantidos como controles na infecção experimental foram laparotomizados e seus órgãos utilizados para estudos morfológicos e imunohistoquímicos.

Amostras do fígado e pâncreas foram processadas para extração de RNA dupla fita, mas a eletroforese em gel de poliacrilamida não mostrou bandas características do vírus (resultado não demonstrado).

As análises macroscópicas dos intestinos delgado e grosso não revelaram alterações evidentes entre os animais infectados e controles.

Nos preparados histológicos, corados com HE, do jejuno e intestino grosso dos animais controles, foi possível observar a integridade morfológica de cada um dos segmentos. No jejuno pode-se verificar as vilosidades longas e o revestimento epitelial completo, sem sinais evidentes de edema ou infiltrado inflamatório na mucosa, ou ainda outro dano tecidual nas túnicas submucosa, musculares ou serosa (Figuras 4.6.A, 4.7.A). De modo semelhante, observa-se no intestino grosso dos animais controle o mesmo grau de preservação morfológica na mucosa e submucosa, sem sinais evidentes de edema ou infiltrado inflamatório (Figura 4.8.A)

Os cortes histológicos dos segmentos do intestino de ratos inoculados com suspensões fecais contendo os dois segmentos do RNA dupla fita do PBV mostram vários graus de edema. No jejuno o edema é mais evidente nas vilosidades, que se encontram edemaciadas e curtas, com claros sinais de vacuolização e descamação do ápice (Fig 4.6.B e 4.7.B,C e D). Embora os sinais de edema se mostrem mais evidentes no jejuno, eles também são notados nas dobras da mucosa no intestino grosso (Figura 4.8.B e C).

As expressões de antígenos relacionados ao PBV foram detectados pelo método imunohistoquímico tanto no jejuno quanto no intestino grosso dos ratos infectados. No jejuno, a reação mostra-se positiva no ápice das vilosidades, coincidentemente onde se observam sinais de vacuolização e descamação (Fig. 4.9.B). No intestino grosso a marcação se limita às células epiteliais da mucosa (Fig. 4.10.A e B).

#### **4.4. Análise do anti-soro anti-PBV de tamanduá-bandeira produzido em cobaias.**

Como os soros anti-PBV estocados no laboratório produzidos por Haga apresentavam baixos títulos para a reação, eles foram totalmente consumidos nos experimentos de “dot-blot” e imunohistoquímica. Tentou-se a produção de anti-soro anti-PBV de tamanduá-bandeira em cobaias com o objetivo de continuar os estudos imunohistoquímicos com um número maior de ratos. Porém, não foi possível obter este anti-soro nas cobaias inoculadas. A análise dos soros obtidos das cobaias, através da técnica do “dot-blot”, mostrou que o soro pré-imune respondia aos antígenos tanto quanto o soro após a inoculação, demonstrando inespecificidade ou infecção prévia do animal pelo PBV.

#### **4.5 RT-PCR em amostras de fezes PBV positivas em EGPA.**

##### *Análise da concentração de RNA total*

As soluções resultantes da extração de RNA total das suspensões fecais positivas em EGPA para os dois segmentos do RNA dupla fita do PBV foram analisadas em espectrofotômetro com  $\lambda = 260 \text{ nm}$ . Os resultados das análises apresentaram valores próximos a  $2,5 \text{ ng}/\mu\text{L}$  para todas as amostras.

##### *Resultados da transcrição reversa associada à reação em cadeia da polimerase (RT – PCR)*

Em três amostras murinas e nas quatro amostras suínas foi possível visualizar bandas no gel de agarose com tamanho de aproximadamente 200 pares de bases.

Nas amostras de tamanduá não foi visualizada nenhuma banda característica de produto de amplificação.

Os controles permaneceram negativos para todas as etapas do experimento. A Figura 4.11 mostra as fotografias das eletroforeses em gel de agarose para os testes realizados.

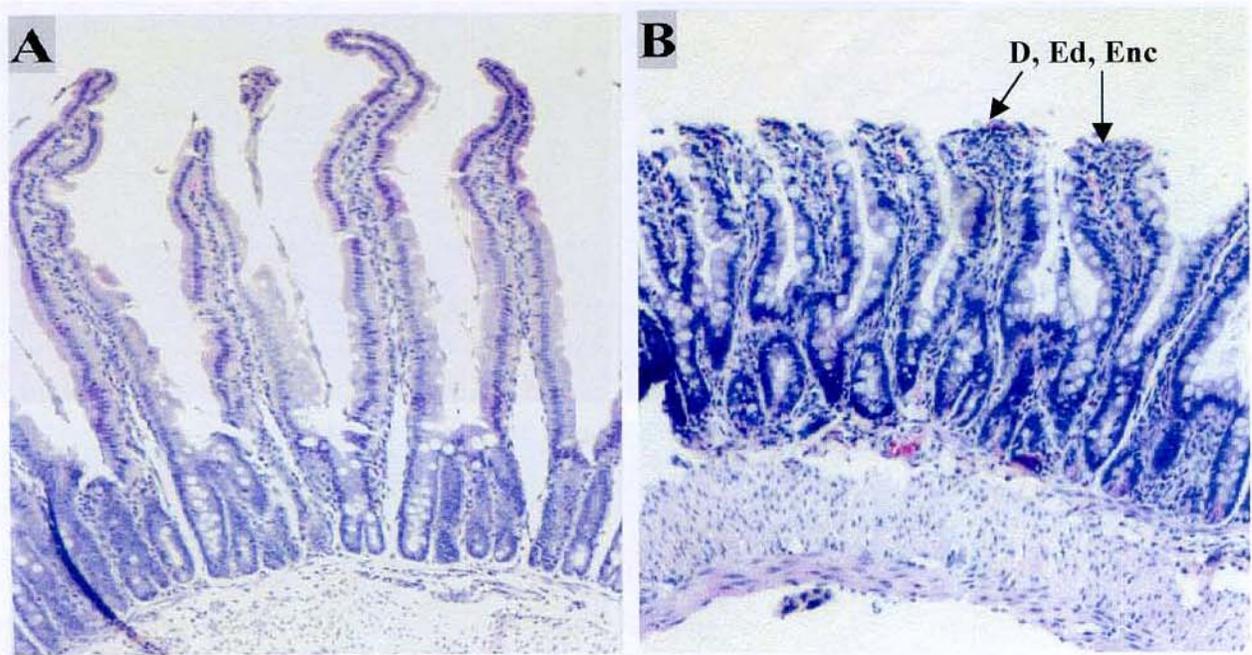


Figura 4.6. Fotografias do intestino delgado (jejuno) de ratos gnotobióticos controle (A) e infectado (B) com suspensão fecal murina contendo o RNA dupla fita do picobirnavírus.

Coloração hematoxilina-eosina. Aumento 100 X.

D = descamação; Ed = edema; Enc = Encurtamento

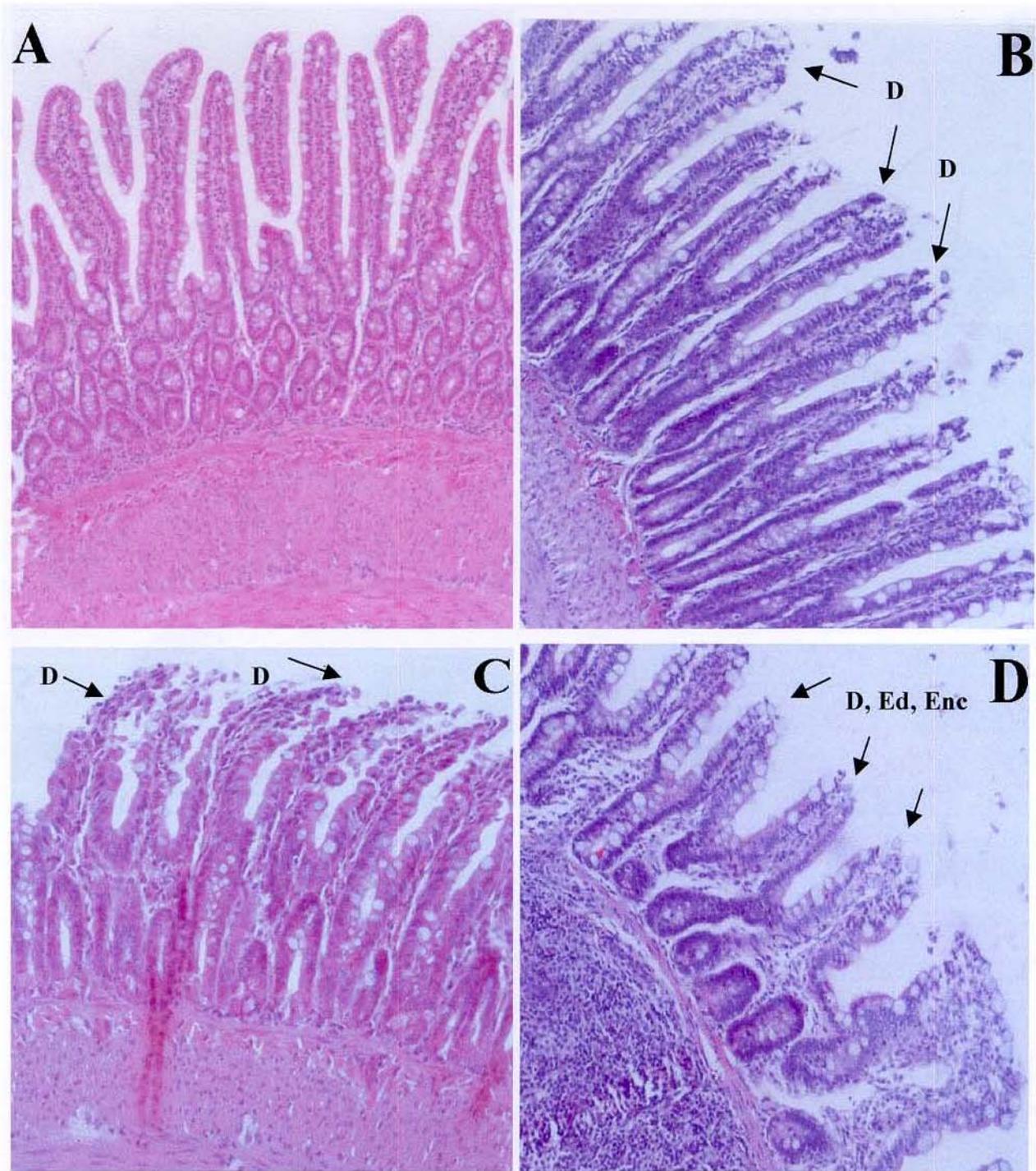


Figura 4.7. Fotografias do intestino delgado de ratos gnotobióticos controle (A) e infectados (B, C e D) com suspensão fecal murina contendo o RNA dupla fita do picobirnavírus. Coloração hematoxilina-eosina. Aumento 100 X. D = descamação; Ed = edema; Enc = Encurtamento

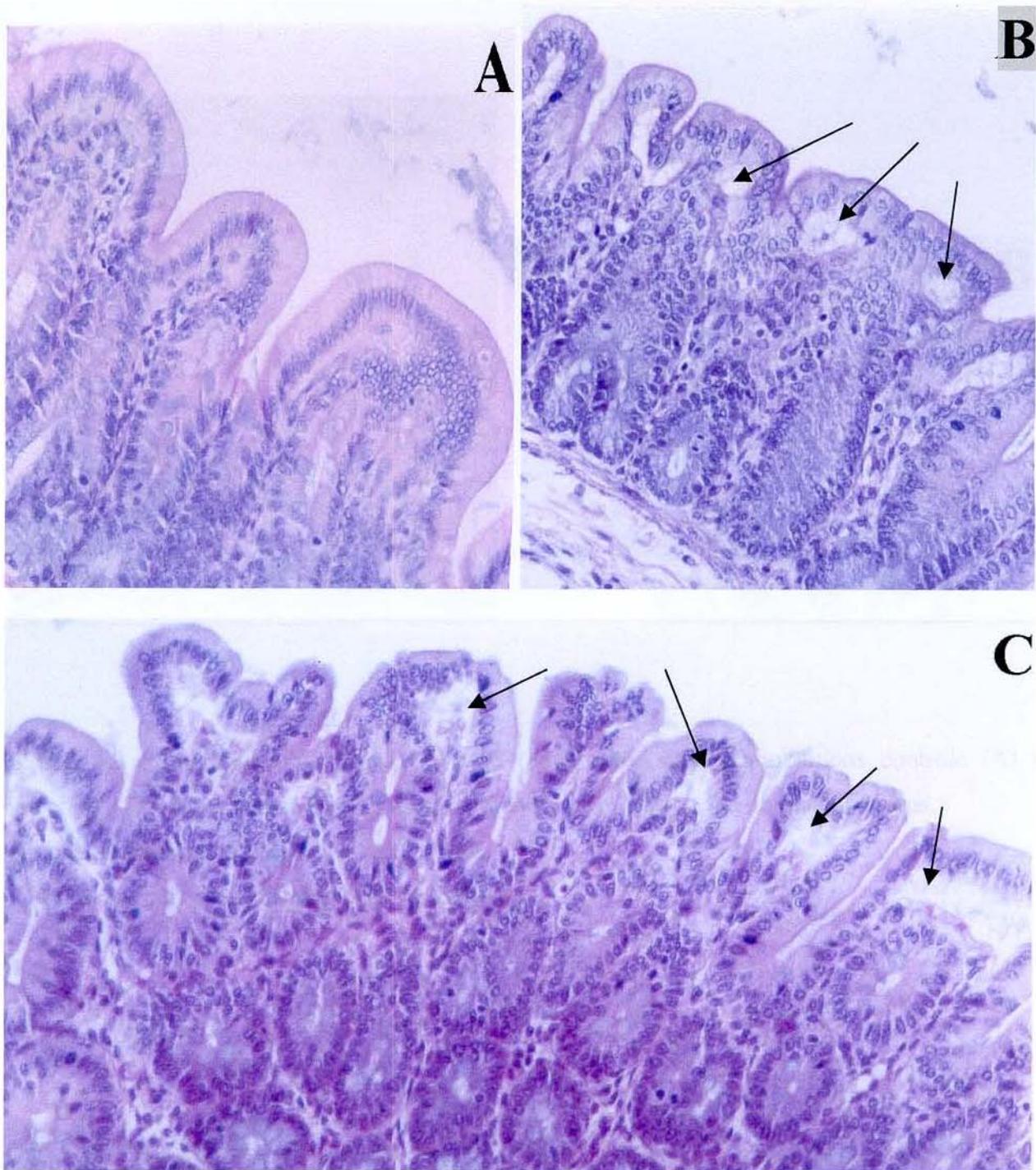


Figura 4.8 Fotografias do intestino grosso de ratos gnotobióticos controle (A) e infectados (B e C) com suspensão fecal murina contendo o RNA dupla fita do picobirnavírus.

Coloração hematoxilina-eosina. Aumento 200 X. As setas indicam locais com edema

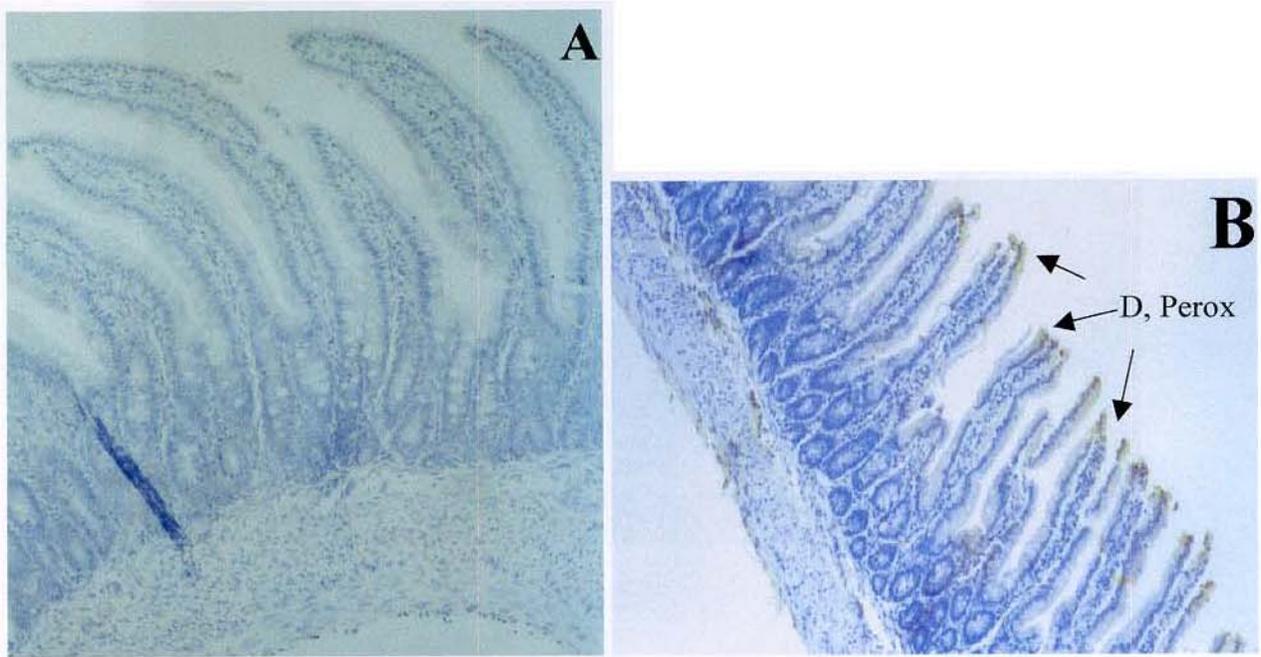


Figura 4.9 Fotografias do intestino delgado (jejuno) de ratos gnotobióticos controle (A) e infectado (B) com suspensão fecal murina contendo o RNA dupla fita do picobirnavírus.

Reação de imunoperoxidase. Aumento 100 X.

D = descamação; Perox = reação da peroxidase

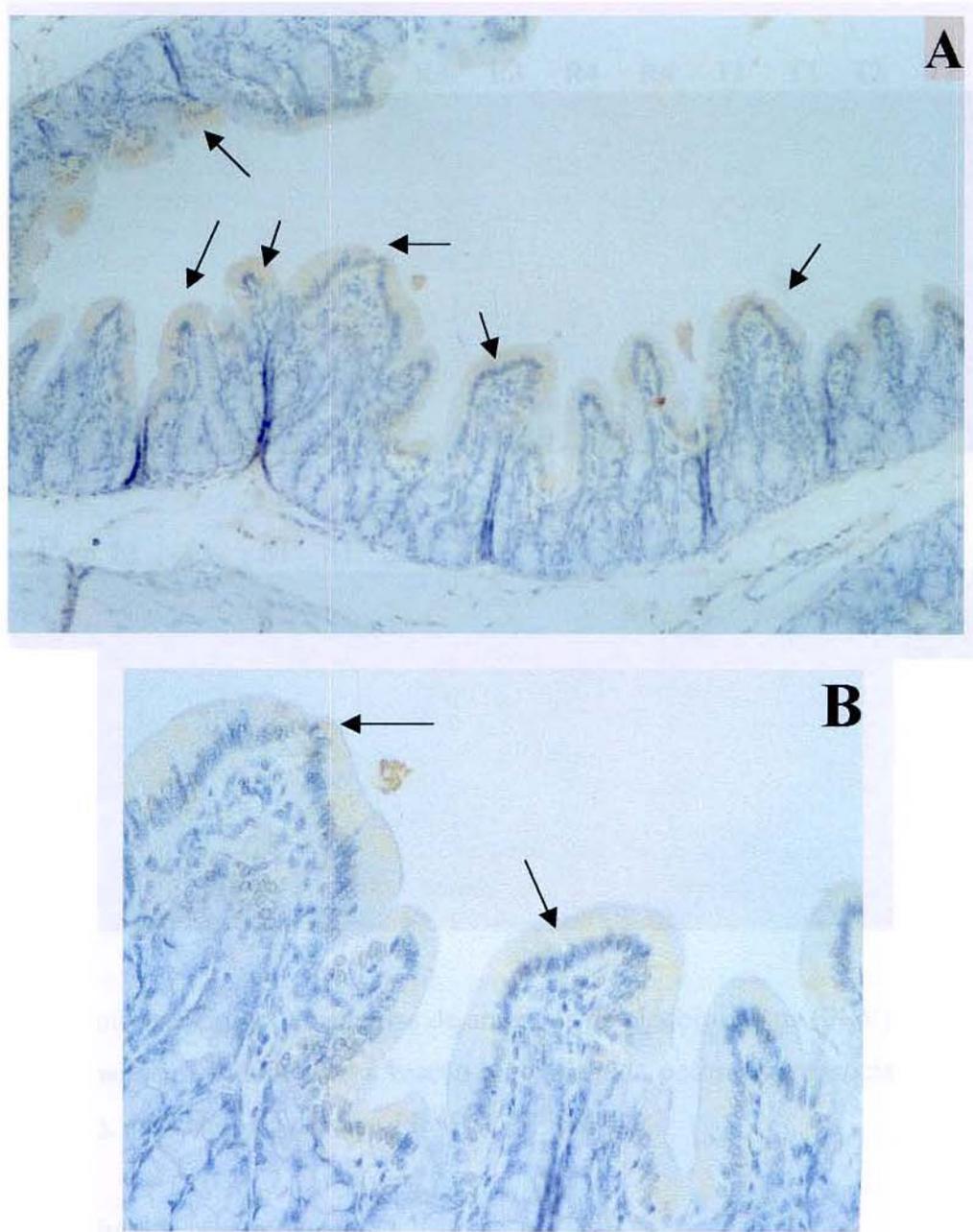


Figura 4.10 Fotografias do intestino grosso de rato gnotobiótico infectado com suspensão fecal murina contendo o RNA dupla fita do picobirnavírus.

Reação de imunoperoxidase. Fotografia A: aumento 100 X. Fotografia B: aumento 200 X.

As setas indicam reação positiva da peroxidase

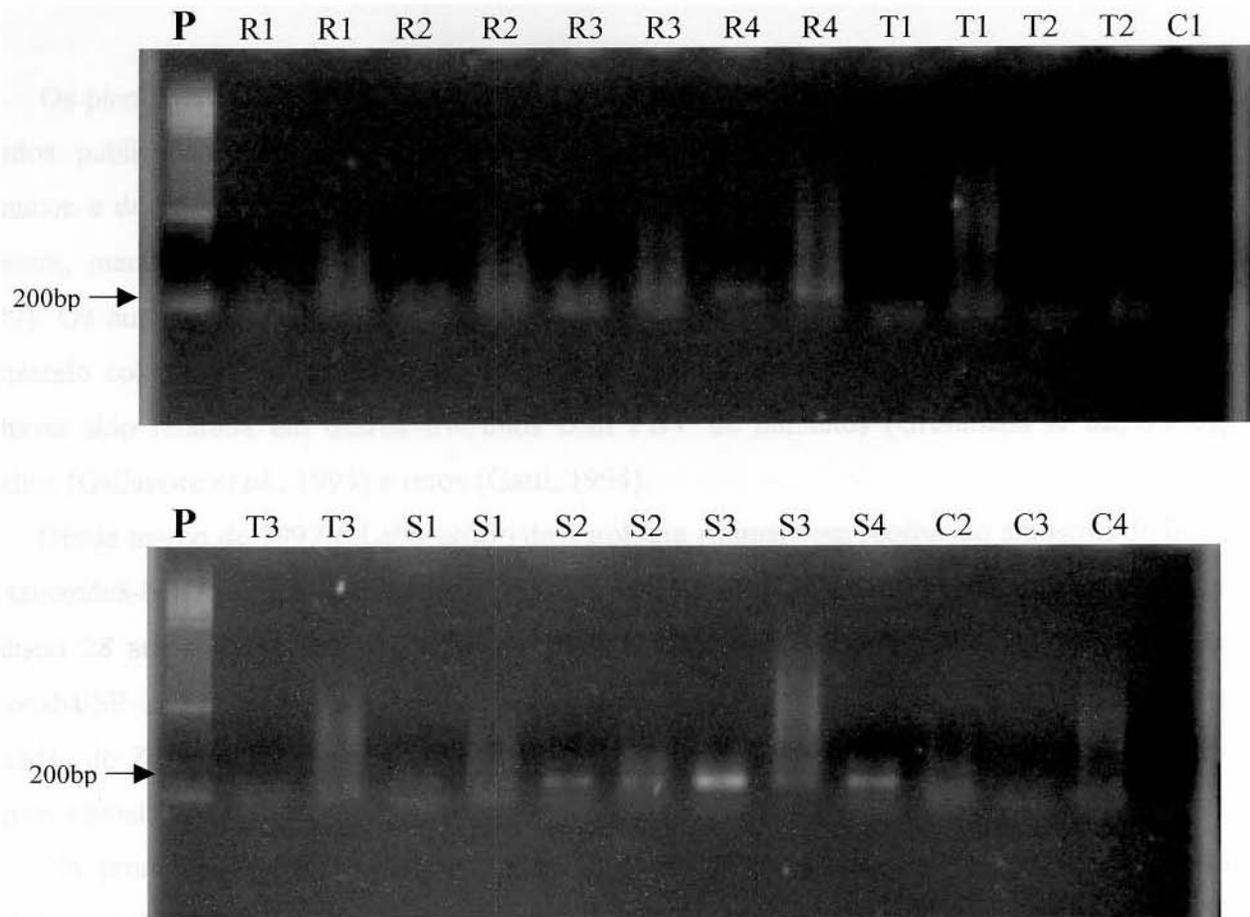


Figura 4.11 Eletroforese em gel de agarose de amostras de picobirnavírus (PBV) de ratos, suínos e de tamanduás bandeira, submetidas à reação em cadeia da polimerase associada à transcrição reversa (RT-PCR), utilizando os *primers* PicoB25 e PicoB43.

Canaletas P – Padrão de peso molecular

Canaletas R – Amostras de ratos. Os números representam as quatro amostras testadas

Canaletas T – Amostras de tamandua bandeira. Os números representam as três amostras testadas

Canaletas S – Amostras de suínos. Os números representam as quatro amostras testadas

Canaletas C – Controles do negativos experimento (C1=Controle da RT; C2=PCR do C1;

C3=Controle da PCR; C4=Repetição da PCR

## 5. DISCUSSÃO

Os picobirnavírus foram descritos pela primeira vez em 1988 por Pereira *et al.* Até 1999 os estudos publicados com esse vírus se limitavam à descrição de suas características físico-químicas e de novos hospedeiros. O mais novo hospedeiro descrito para o PBV foi um animal silvestre, mantido em cativeiro, o tamanduá bandeira *Myrmecophaga tridactyla* (Haga *et al.*, 1999). Os autores detectaram PBV nas fezes desses animais por um período de quatro meses, realizando coletas semanais. Essa característica de infecção persistente, ou por longos períodos, já havia sido relatada em outros trabalhos com PBV de humanos (Grohmann *et al.*, 1993), coelhos (Gallimore *et al.*, 1993) e ratos (Gatti, 1994).

Desde março de 1997 o Laboratório de Virologia Animal vem recebendo amostras de fezes de tamanduá-bandeira de alguns zoológicos da região de Campinas. No total, o laboratório analisou 28 amostras ao longo de quatro anos (25 amostras de Americana/SP, 2 amostras de Sorocaba/SP e 1 amostra de Paulínia/SP). Foram positivas para PBV somente as amostras oriundas do Zoológico Municipal de Americana. Contudo, não havia a identificação da amostra com os animais do recinto.

Na presente dissertação, dez amostras de fezes de tamanduá-bandeira, procedentes dos mesmos animais estudados por Haga *et al.* (1999) foram analisadas por EGPA para detecção do RNA dupla fita do PBV. Foi solicitado ao zoológico que identificasse de qual animal do recinto as fezes estavam sendo coletadas, havendo lá dois animais: um macho e uma fêmea. Com a possibilidade de identificação do animal, pode-se perceber que as fezes dos animais mostravam-se ora positivas para o vírus, ora negativas. As amostras de fezes do macho encontravam-se sempre pastosas, sugerindo diarreia; na fêmea as fezes encontravam-se sempre sólidas. O pequeno número de amostras analisado, além da ausência de pesquisa para outros patógenos, não permite inferências sobre o papel do PBV no quadro de diarreia do tamanduá-bandeira macho.

É interessante notar o longo período que os animais do recinto liberaram o PBV nas suas fezes. O laboratório tem recebido amostras de fezes dos mesmos animais desde fevereiro de 1997, quando o PBV do tamanduá foi detectado pela primeira vez em EGPA. As últimas amostras analisadas foram em julho de 2000, onde apenas a amostra coletada da fêmea estava positiva para o PBV. Nesse intervalo, em algumas amostras não foi possível detectar os dois

segmentos do RNA dupla fita do PBV por EGPA, mas o vírus pode estar sendo liberado continuamente nas fezes dos tamanduás em quantidades muito baixas que não podem ser detectados por esta técnica, apesar de ser bastante sensível [detecta cerca de 300 a 400pg de RNA (Herring *et al.*, 1982)].

Pode-se inferir que o PBV tenha sido introduzido no recinto através de água ou alimentos contaminados, ou através de outros animais como ratos, que são hospedeiros para o PBV (Pereira *et al.*, 1988b; Gatti, 1994). Esse roedores podem visitar o recinto para se alimentar dos restos de alimentos deixados pelos tamanduás. Outra hipótese é que os tamanduás tenham vindo contaminados do seu local de origem. Nesse caso, a infecção pelo PBV pode ser permanente nos tamanduás-bandeira, sugerindo que estes animais sejam reservatório natural desse vírus. Estudos em animais silvestres no seu habitat natural são necessários para elucidar a ocorrência de possíveis reservatórios naturais do PBV, pois além do tamanduá bandeira, o rato silvestre *Oryzomys nigripes* também está identificado como hospedeiro do PBV (Pereira *et al.*, 1988b).

São nas fezes dos animais domesticados pelo homem que estão a maior quantidade de relatos de detecção do PBV. Foram detectados em fezes de suínos (Gatti *et al.*, 1989; Ludert *et al.*, 1991; Solis *et al.*, 1998), bovinos (Vanopdenbosch & Wellemans, 1990), equinos (Browning *et al.*, 1991), galinhas (Alfieri *et al.*, 1988; Leite *et al.* 1990), ratos da linhagem Wistar (Gatti, 1994), coelhos (Gallimore *et al.*, 1993; Ludert *et al.*, 1995), hamsters (Pereira *et al.*, 1988a) e cobaias (Pereira *et col.*, 1989).

Atualmente, o rato da linhagem Wistar é o único modelo animal estabelecido para obtenção do PBV em laboratório (Gatti, 1994). Nesse sentido, vinte e um ratos gnotobióticos, divididos em quatro grupos, foram inoculados com suspensão fecal de ratos filtrada em membrana de 0,45 µm, contendo os dois segmentos do RNA dupla fita do PBV detectados por EGPA. As amostras utilizadas como inóculo foram coletadas nos biotérios do Instituto de Biologia da UNICAMP e revelaram variabilidade nos tamanhos dos segmentos genômicos do PBV. Essa variabilidade também foi relatada por Gatti (1994) e Haga (1998), quando trabalharam com amostras provenientes de ratos.

As amostras utilizadas como inóculo em todos os grupos de animais infectados nesse trabalho apresentavam apenas as duas bandas características do RNA dupla fita do PBV.

Nos grupos 1 e 2 foi possível detectar os segmentos do RNA dupla fita do PBV, por EGPA.

No grupo 1 dos animais inoculados, as fezes analisadas por EGPA mostraram os dois segmentos do RNA dupla fita do PBV em dois dos três animais, com um perfil de migração dos dois segmentos semelhante ao observado no inóculo (Figura 4.2).

Já no grupo 2 foi possível detectar, por EGPA, os dois segmentos do RNA dupla fita do PBV em todos os seis animais inoculados. Os animais revelaram amostras de PBV com variabilidade no tamanho dos segmentos do RNA genômico, conforme pode ser observado nas Figuras 4.3 e 4.4. A amostra inoculada apresentava um perfil eletroforético (Figura 4.3), enquanto que, nos animais inoculados do experimento, foram observados três perfis eletroforéticos diferentes (Figuras 4.3 e 4.4).

Variações no tamanho dos segmentos do RNA dupla fita do PBV, especialmente no segmento maior, foram relatadas anteriormente por Haga (1998) e Gatti (1994) para PBV de ratos, por Gatti *et al.* (1989) para PBV de suínos e por González *et al.* (1998) para PBV de humanos. Gallimore *et al.* (1993), inoculando PBV de coelhos nesta mesma espécie, descreveram resultados semelhantes ao obtido no grupo 2 de animais infectados experimentalmente. Inicialmente coelhos foram inoculados com PBV de humanos e em um animal foi possível detectar os dois segmentos do RNA dupla fita do PBV por EGPA. As fezes desse animal foram utilizadas para inocular outros dez coelhos. Desse experimento, três animais liberaram PBV com perfil eletroforético do RNA dupla fita diferente do inóculo. Esse novo padrão de migração, observado para PBV de coelhos, foi chamado de “narrow” pelos autores, traduzido como “padrão curto de migração”, pela maior proximidade dos dois segmentos, principalmente pela redução no número de pares de bases do segmento maior. O padrão curto de migração para o PBV foi descrito, até o momento, somente em fezes de coelhos.

Entre os perfis eletroforéticos encontrados para o PBV nas fezes dos ratos do grupo 2, puderam ser identificadas amostras de PBV com o padrão curto de migração dos segmentos de RNA dupla fita, relatado por Gallimore *et al.* (1993) para PBV de coelhos. Gatti, em comunicação pessoal, relata a ocorrência em fezes de ratos do PBV com padrão curto de migração dos segmentos de RNA dupla fita. A análise do tamanho dos segmentos genômicos do PBV de ratos, com o padrão curto de migração, revelou similaridade com os segmentos do PBV

dos coelhos com padrão curto de migração. O PBV das fezes de coelhos com padrão curto de migração dos segmentos genômicos apresenta seu genoma com 2,15 e 1,95 kpb, aproximadamente. Conforme Quadro 4.2, o PBV das fezes de ratos com padrão curto de migração (ratos 2.4 e 2.5) apresenta seus segmentos com tamanhos de 2,2 e 1,7 kpb, com pequena variação no segmento menor (1,78 a 1,68 kpb).

Esse resultado confirma que o PBV com padrão curto de migração dos segmentos genômicos está presente também nas fezes de ratos.

O padrão curto de migração foi observado, no presente trabalho, em apenas uma das sessenta amostras murinas coletadas nos biotérios. Gatti (1994) coletou 85 amostras de fezes murinas no Centro Multidisciplinar de Investigação Biológica (CEMIB) da Unicamp e outras 140 amostras em biotérios sem sistemas de barreiras. Das três amostras PBV positivas detectadas dentre os ratos do CEMIB, nenhuma delas apresentou o padrão curto de migração do PBV, o mesmo ocorrendo para as outras amostras coletadas em outros biotérios. A autora relata pequenas variações nos tamanhos dos dois segmentos, porém nada relativo ao padrão curto de migração. Portanto, parece que o PBV com este tipo de perfil de migração dos segmentos genômicos seria muito pouco freqüente nestes animais. Por outro lado, experimentos de inoculação experimental podem favorecer a multiplicação destes vírus, principalmente em ratos gnotobióticos.

Podemos concluir pelo primeiro relato dessa variante do PBV em ratos que pode, inclusive, se tratar de um novo vírus.

Tentativas de purificação do PBV padrão curto de migração foram frustrantes. Há uma grande dificuldade em manter amostras positivas com o PBV que apresenta este perfil. Com o decorrer do tempo foi possível observar, pela eletroforese em gel de poliacrilamida, que a concentração de ácido ribonucléico dos vírus vai reduzindo (dados não mostrados). Fezes positivas, armazenadas em geladeira (4°C) ou congeladas a - 20°C, tornam-se negativas após um curto período de tempo. As suspensões fecais mantidas da mesma maneira também tornam-se negativas rapidamente. Como a amostra de PBV padrão curto de migração é pouco freqüente nos biotérios, realizar algum tipo de trabalho com esse PBV torna-se muito difícil. Assim, a infecção experimental em ratos gnotobióticos, confirma-se como uma alternativa para a obtenção do PBV de rato em suas diferentes variações no que tange ao perfil de migração do seu ácido nucléico em EGPA.

Este mesmo modelo pode também ser usado para estudos histológicos visando pesquisar os locais de replicação do PBV.

De acordo com Middleton (1996) os vírus entéricos causadores de gastroenterites, em geral, se replicam no epitélio colunar das vilosidades do intestino delgado. Os principais vírus implicados em gastroenterites em humanos são os do gênero *Rotavirus*, os da família *Adenoviridae* (gênero *Mastadenovirus*), membros da família *Caliciviridae* (como o vírus Norwalk), os *Astrovirus*, *Coronavirus*, *Citomegalovirus* e também os picobirnavírus. Membros de alguns desses grupos infectam também ratos ou camundongos, causando gastroenterites (Bhatt *et al.*, 1986; Percy & Barthold, 2001).

O vírus IDIR (sigla para *Infectious Diarrhea of Infant Rats*) pertence ao gênero *Rotavirus* do grupo B e causa diarreia grave em ratos neonatos. Histologia do intestino delgado de ratos infectados experimentalmente com vírus IDIR mostrou que ele infecta as células do epitélio colunar do ápice das vilosidades. A infecção promove atrofia e necrose das vilosidades. Além disso, os enterócitos se fundem no ápice das vilosidades, formando sincícios com inclusões eosinofílicas, característica anatomopatológica que é patognomônica para o vírus IDIR. As lesões são mais frequentes e severas no terço apical das vilosidades e, em geral, as células da cripta não são afetadas. A lâmina própria sofre edema havendo dilatação dos vasos linfáticos (Vonderfecht *et al.*, 1984, Percy & Barthold, 2001).

Entre os *Coronavirus*, as espécies habitualmente não infectam o trato gastrointestinal de ratos, mas o vírus da hepatite de camundongos (MHV) possui variantes enterotrópicas provocando gastroenterite em camundongos neonatos. Inoculado experimentalmente, o MHV enterotrópico provoca alta mortalidade em camundongos neonatos, sendo observada necrose severa do epitélio intestinal. A gravidade das lesões e a mortalidade diminuem com o avançar da idade dos animais. As lesões ocorrem de forma segmentada no intestino delgado, com atenuação das vilosidades, formação de sincícios de enterócitos e necrose da mucosa intestinal. Essas lesões são mais frequentes na porção terminal do intestino delgado, ceco e cólon ascendente (Bhatt *et al.*, 1986; Percy & Barthold, 2001).

Achatamento e alargamento das vilosidades do intestino delgado são características das infecções entéricas causadas por vírus Norwalk em humanos. Biópsias jejunais de pessoas

infectadas revelaram que as mucosas não sofrem alterações, nem ocorre destruição de enterócitos (Oliveira, 1994)

Os picobirnavírus não causam diarreias em ratos (Gatti, 1994), o que não exclui seu possível papel em casos de gastroenterites. Assim como outros vírus entéricos, o PBV poderia levar a lesões inflamatórias desde que pudesse replicar em células do epitélio intestinal.

Nos experimentos de infecção experimental realizados nesse trabalho, as fezes dos animais foram sempre sólidas, inclusive as que tiveram os dois segmentos do RNA dupla fita do PBV detectados por EGPA. Quatro animais em que foi possível detectar os dois segmentos do RNA dupla fita do PBV nas fezes, por EGPA, foram sacrificados, laparotomizados para coleta e análise morfológica dos intestinos, visando a possível observação de áreas que pudessem estar relacionadas a processos inflamatórios, indicativos da presença de multiplicação do PBV. Como não se observou sintomas de diarreia nos animais, não se esperava alterações histológicas contundentes nos tecidos analisados. Além disso, a quantidade de PBV liberado nas fezes dos animais infectados foi sempre pequena<sup>2</sup>.

Assim, no jejuno dos animais infectados experimentalmente foram observadas descamações discretas no ápice das vilosidades, sugerindo que os enterócitos podem ser o alvo de infecção do PBV (Fig 4.6 e 4.7). As lesões não são extensivas a todos os cortes analisados, podendo caracterizar lesões segmentadas, como aquelas observadas na infecção por MHV em camundongos (Percy e Barthold, 2001).

Esse achado é concordante com as observação de Middleton (1996) que afirma que os vírus entéricos causadores de gastroenterites infectam prioritariamente as porções apicais das vilosidades do intestino delgado. O vírus MHV enterotrópico, por outro lado, provoca lesões mais contundentes nas vilosidades do intestino delgado, nas regiões do íleo e no ceco e cólon ascendente (Bhatt *et al.*, 1986; Percy e Barthold, 2001). Os resultados obtidos do intestino delgado mostram que a região com alterações morfológicas mais evidentes foi o jejuno, sendo observado infiltrado celular característico de reação inflamatória (edema) nas camadas mucosa e submucosa e descamações do ápice das vilosidades, sugerindo intensa replicação viral nessa área. Esse resultado foi coincidente com a imunohistoquímica, onde também foi possível visualizar

---

2 - Apesar de não ter sido realizada quantificação do RNA dupla fita, amostras de rato dificilmente apresentam bandas de RNA dupla fita em EGPA impregnadas mais fortemente pela prata que amostras de PBV de tamanduá e de rotavírus de suínos ou de humanos analisadas no laboratório.

descamação epitelial e marcação positiva pela peroxidase em células epiteliais do ápice das vilosidades, próximos da região da descamação (Figura 4.9). O animal controle manteve seu epitélio intestinal sem alterações que sugerissem por infecções virais e sem imunomarcação das vilosidades intestinais.

Nos cortes histológicos do intestino grosso foi observado edema na túnica submucosa das dobras sem descamação do epitélio colunar da mucosa intestinal (Figura 4.8). Nas lâminas preparadas para imunohistoquímica foi possível visualizar regiões segmentadas do intestino grosso marcadas positivamente com a reação da peroxidase (Figura 4.10).

Portanto, a infecção *in vivo* do PBV em ratos gnotobióticos causa uma enteropatia auto limitada, caracterizada por alterações histológicas da arquitetura dos vilos do jejuno e inflamação das túnicas submucosas e mucosas do jejuno e intestino grosso. Contudo, não foi possível esclarecer os mecanismos de patogenicidade do PBV que levam às alterações histológicas observadas. Os achados histológicos e imunohistoquímicos apontam que o PBV multiplica-se nas células epiteliais do ápice das vilosidades do intestino delgado e nos enterócitos das dobras do intestino grosso de ratos gnotobióticos. Esses resultados reforçam a hipótese de que o PBV é um vírus que infecta e se replica em células animais.

Testes subseqüentes poderão ser realizados visando melhor caracterização destes achados, com um número maior de animais infectados e com outros hospedeiros, tanto para observação morfológica e imunohistoquímica, como para observações em microscopia eletrônica dos tecidos e células dos intestinos.

Com o objetivo de ampliar a quantidade de testes envolvendo reações antígeno-anticorpo, foram realizadas tentativas de obtenção de anti-soros anti-PBV de tamanduá bandeira. Essa escolha se pautou na observação de que as amostras de tamanduá, positivas para PBV em EGPA, mostraram maior concentração dos dois segmentos de RNA dupla fita que as amostras de ratos ou suínos, quantificação essa baseada na intensidade da impregnação pela prata. Porém, não foi possível obter anti-soro com a especificidade desejada para executar a imunoperoxidase e a imunomicroscopia eletrônica para um número maior espécimes. Novas tentativas de produção de anti-soro anti-PBV são necessárias para que as pesquisas imunohistoquímicas avancem.

A adaptação do PBV em linhagens de células seria importante para o fornecimento de maior quantidade de vírus para a produção de soros anti-PBV com títulos maiores que os obtidos

até o momento. Além disso, os estudos do ciclo de replicação do PBV avançariam com a adaptação desse vírus em linhagens celulares.

Muitas linhagens celulares e diferentes culturas celulares primárias foram testadas com PBV de diversas origens com o propósito de adaptar esse vírus à replicação *in vitro* (Pereira *et al.*, 1989; Vicentini, 1998). Vicentini utilizou diversas amostras de PBV de suínos e de murinos em tentativas de adaptação desses vírus em diferentes linhagens celulares e também em culturas celulares primárias. O autor conseguiu registrar oito detecções do RNA do PBV por EGPA em sobrenadantes de primeira passagem das culturas, sendo três detecções em cultura primária de rim de rato (PBV de murino), uma detecção na linhagem LLC-MK2 (PBV de murino), três detecções em células HT-29 (PBV de murino e suíno) e uma em CaCo-2 (PBV de murino). Com exceção da linhagem CaCo-2, todas as outras detecções foram obtidas utilizando como metodologia para adsorção a agitação periódica. Na célula CaCo-2 a detecção se deu quando o autor utilizou-se do sistema “roller” para a adsorção.

As células já utilizadas são originárias de diferentes órgãos animais e as linhagens onde foram possíveis as detecções do RNA dupla fita do PBV em sobrenadantes celulares de primeira passagem foram HT-29, CaCo-2, LLC-MK2 (Vicentini, 1998), MRC-5, Hep-2 (Pereira *et al.*, 1989) e, no presente trabalho, J774A.1. Em culturas celulares primárias, os segmentos do RNA dupla fita do PBV foram detectados na primeira passagem em cultura de embrião de cobaia, cultura primária de rim de macaco (Pereira *et al.*, 1989) e cultura primária de rim de rato (Vicentini, 1998). Em nenhum dos sistemas celulares utilizados foi relatada a visualização de partículas virais por microscopia eletrônica nos sobrenadantes de primeira passagem positivos em EGPA para o PBV, o que leva a crer que todas essas células apresentam uma permissividade parcial ao PBV, que não consegue concluir seu ciclo de replicação.

Dentre todos os estudos realizados até o momento, incluindo esta dissertação, visando a adaptação do PBV ao crescimento em culturas celulares, foram utilizadas quatorze diferentes linhagens celulares<sup>3</sup> e seis diferentes culturas primárias<sup>4</sup>.

---

<sup>3</sup> Linhagens Vero, MA104, BHK-21, MRC-5, IBRS-2, Hep-2 e C6/36 utilizadas por Pereira *et al.* (1989). Linhagens MA104, HT-29, CaCo-2 e LLC-MK-2 utilizadas por Vicentini (1998). Linhagens HT-29, MDBK, Vero, SK-6, J774A.1, CaCo-2 e 3T3 utilizadas no presente trabalho.

<sup>4</sup> Cultura de células de embrião de cobaias e cultura primária de rim de macaco utilizadas por Pereira *et al.* (1989). Culturas primárias de rim de camundongo e ratos utilizadas por Vicentini (1998). Culturas primárias de rim e

Células originárias do rim mostram-se susceptíveis à replicação do ácido nucléico do PBV (Pereira *et al.*, 1989, Vicentini, 1998). Em cultura primária de rim de rato infectada com PBV de rato detectou-se os dois segmentos do RNA dupla fita do PBV em primeira passagem. Também na linhagem celular LLC-MK-2, originada de rim de macaco, foi possível detectar os dois segmentos do RNA do PBV em primeira passagem, mas o teste de imunofluorescência indireta não detectou proteínas do PBV nos sobrenadantes positivos para os dois segmentos do RNA viral. Vale ressaltar que na linhagem celular MA104, originária de rim de fetos de macaco rhesus, e na cultura primária de rim de pinto, não foi possível detectar os dois segmentos do RNA do PBV (Vicentini, 1998, Gatti, comunicação pessoal). Também nas células da linhagem SK-6 de rim suíno, MDBK de rim bovino e Vero de rim de macaco Rhesus, utilizadas nessa dissertação, infectadas com PBV de tamanduá, foram realizadas várias passagens e não foram detectados os dois segmentos do RNA do PBV em nenhuma delas.

Pelo fato dos PBV serem encontrados sempre em fezes de animais infectados, e baseando-se nos achados histológicos, tentativas de adaptar estes vírus em células de origem intestinal seriam adequadas. De fato, duas linhagens celulares de origem intestinal mostraram-se permissivas na primeira passagem à replicação do ácido nucléico viral, CaCo-2 e HT-29. Mas, cultura primária de intestino de pinto, infectadas com PBV de rato, não foram permissivas à replicação do PBV (Vicentini, 1998). No presente trabalho estas duas linhagens foram utilizadas e, como poderá ser visto adiante, não resultaram em evidências da multiplicação do PBV. Dados não apresentados neste trabalho, utilizando culturas primárias de intestino de fetos de ratos não puderam ser concluídos pela dificuldade de obtenção e manutenção destas células.

Nas células da linhagem J774A.1, utilizadas neste trabalho, foi possível detectar os dois segmentos do RNA dupla fita do PBV por EGPA na primeira passagem, utilizando o protocolo 2 (células inoculadas com PBV de tamanduá, com adsorção estimulada por agitação periódica). Contudo, não foi possível encontrar partículas virais na análise em microscópio eletrônico do sobrenadante da primeira passagem. O teste de “Dot-Blot”, padronizado por Haga (1998), para detecção de proteínas do PBV foi utilizado no sobrenadante das células J774A.1, mas o resultado

---

intestino de pintos utilizadas pela Prof.a Dra Maria Silvia Viccari Gatti, Laboratório de Virologia – IB/UNICAMP (comunicação pessoal).

foi negativo. Também não se detectou os dois segmentos do RNA do PBV em passagens posteriores à primeira.

Nos experimentos com células J774A.1, inoculadas com PBV de murino (protocolo 1), não foram detectados os dois segmentos do RNA viral em nenhuma das três passagens realizadas. Essas mesmas células mantidas em sistema *roller* também foram incubadas com PBV de tamanduá, mas também não foram detectados os segmentos do RNA dupla fita viral em nenhuma das diluições utilizadas.

Algumas hipóteses podem ser levantadas para explicar as diferenças obtidas nos três experimentos.

A origem das amostras e a quantidade de partículas virais infectivas presentes nelas podem determinar por resultados positivos ou não nos cultivos celulares. Somente as amostras de tamanduá resultaram na produção de RNA viral em primeira passagem nas células J774A.1. Como as amostras apresentavam em EGPA bandas de RNA dupla fita mais fortemente impregnadas pela prata, foi considerado que teriam maior concentração de partículas virais. Por outro lado, uma crítica que se pode fazer ao protocolo utilizado foi a diluição (1:50, 1:100 e 1:200) das amostras de fezes para a inoculação em monocamadas de células. Apesar destas diluições terem sido realizadas visando diminuir a toxicidade do inóculo para as células, e acreditando que, dada a maior concentração do PBV, estar-se-ia ajustando para uma melhor relação entre o número de partículas virais e o número de receptores celulares, estas diluições teriam como conseqüência a redução da quantidade de vírus realmente infectivo. Logo, resultados de primeira passagem nestas células e em outras que nem mesmo foram positivas para o ácido nucléico viral do PBV, estariam sendo comprometidos.

Pode-se aventar ainda a possibilidade de os segmentos de RNA dupla fita detectado por EGPA na infecção das células J774A.1, no protocolo 2, ser do próprio inóculo utilizado. Para questionar tal possibilidade apresenta-se o fato de que, quando da utilização dos protocolos 3 e 4, não foi possível detectar os dois segmentos do RNA dupla fita do PBV na EGPA, apesar das diluições serem as mesmas ou menores ainda.

Também seria possível que as células J774A.1 não permitissem a replicação do PBV de ratos, sendo permissivas somente para o PBV de tamanduá e, neste caso, não promovendo a produção de progênie viral infectiva. Diferenças de receptores celulares e/ou virais, assim como

outros mecanismos inerentes às etapas da multiplicação viral, podem ser responsáveis pela não interação entre vírus e células.

Na dissertação de Vicentini (1998), o autor sugere que sejam realizados experimentos de infecção do PBV em culturas celulares utilizando lipossomos como ferramenta para ultrapassar algumas barreiras celulares que estariam impedindo a replicação do PBV. Como afirma Innes *et al.* (1990), um dos maiores determinantes de um vírus para especificidade a hospedeiros e tropismo por determinado tipo celular, envolve as interações dos receptores de membrana das células hospedeiras com as partículas virais. De fato, o uso de lipossomos para induzir replicação viral em células não permissivas foi realizado com sucesso em diversos experimentos (Bass *et al.*, 1992; Konopka *et al.*, 1990; Innes *et al.*, 1990; Faller & Baltimore, 1984; Kondorosi & Duda, 1982; Wilson *et al.*, 1977)

A indução da replicação de um vírus utilizando a transfecção por lipossomos como ferramenta é utilizada na tentativa de auxiliar o vírus a ultrapassar duas fases necessárias para completar seu ciclo de replicação: a adsorção e a penetração.

Neste trabalho os lipossomos foram utilizados para transfecção do PBV de tamanduá e de rato nas células das linhagens CaCo-2, HT-29 e Vero. A escolha dessas linhagens celulares se deu pelo fato de que as células CaCo-2e HT-29, além de serem de origem intestinal, haviam sido relatadas por Vicentini (1998) como permissivas, em primeira passagem ao PBV. Com relação às células Vero a escolha se deu pelo fato de que Bass *et al.* (1992) relataram a permissividade desta célula ao rotavírus, um vírus entérico, somente quando transfectados pelos lipossomos.

Apesar do sucesso obtido por estes autores com rotavírus, não foi possível detectar os dois segmentos do RNA dupla fita do PBV na EGPA de sobrenadantes celulares das diversas tentativas de transfecção realizadas.

Não foi possível introduzir no experimento nenhuma forma de controle positivo, pois não há nenhum modelo celular permissivo a infecção pelo PBV. Por isso, para a realização do experimento duas premissas tiveram que ser consideradas: i) o PBV foi devidamente complexado com os lipídeos do reagente, formando os lipossomos contendo vírus a ele agregados; ii) os lipossomos reagiram com as membranas celulares e liberaram o PBV no interior das células.

O trabalho de Bass *et al.* (1992) apresentou fortes evidências que os lipossomos formados com Lipofectin™ fundem-se na membrana celular, liberando os rotavírus diretamente no

citoplasma. Os autores partiram do pressuposto de que, apesar de ainda não ser consenso entre os pesquisadores, há evidências fortes que o rotavírus penetra nas suas células hospedeiras diretamente pela membrana, isto é, alcança o citoplasma sem passar por vesículas endossômicas (Kaljot *et al.*, 1988; Susuki *et al.*, 1986). Kaljot *et al.* (1988) mostraram também que se o rotavírus é internalizado utilizando a via de formação de endossomos, o processo de infecção é abortado. A restrição celular à infecção por rotavírus parece estar relacionada à via de entrada do vírus na célula, via essa que depende da ligação do vírus com o receptor celular adequado. Quando os rotavírus são transfectados com lipossomos formados a partir da Lipofectin™, células não permissivas, ou pouco permissivas, tornam-se permissivas ao vírus, produzindo progênie viral em quantidade idêntica àquela de células permissivas. Portanto, se o rotavírus é colocado diretamente dentro das célula por um lipossomo, ele consegue completar seu ciclo. Fazendo analogia com esse raciocínio de Bass *et al.* (1992), PBV complexados com lipossomos foram liberados diretamente no citoplasma das células.

Considerando que as duas premissas acima foram cumpridas, em todos os experimentos com lipossomos, algumas inferências podem ser feitas acerca dos mecanismos de restrição ao PBV nas células utilizadas.

Para muitos vírus, a ligação ao receptor celular é essencial para desencadear o processo de desnudamento. Os picornavírus ligam-se a uma proteína celular semelhante a uma imunoglobulina (*Ig-like*) e essa ligação promove mudanças conformacionais no capsídeo viral que permite a entrada do RNA simples fita do vírus no citoplasma. Não se sabe se há endocitose da partícula, com formação de endossomos. O que se conhece é que inibidores de proteínas transportadoras de prótons, necessárias para acidificação dos endossomos, não impedem a infecção da célula pelos picornavírus. Portanto, o desnudamento do genoma viral não é ácido-dependente, como ocorre nos adenovírus (Flint *et al.*, 2000). Estes vírus, após a ligação do vírus ao receptor celular, são endocitados para o citoplasma celular. O endossomo formado é acidificado pela entrada de prótons no seu interior. A diminuição do pH promove mudanças conformacionais no capsídeo viral, permitindo que o nucleocapsídeo acesse o citoplasma celular. Como os adenovírus replicam seu genoma no núcleo da célula, o nucleocapsídeo é levado para a membrana nuclear por proteínas celulares e se liga a proteínas dos poros nucleares. Essa ligação

promove novamente mudança conformacional do nucleocapsídeo permitindo a penetração do DNA viral no interior do núcleo (Flint *et al.*, 2000).

Há outros vírus que, além da formação de endossomos acidificados, necessitam que enzimas proteolíticas celulares promovam a clivagem das proteínas do capsídeo, para que assim ocorra a penetração do nucleocapsídeo no citoplasma. É o caso de alguns reovírus. Após a ligação do vírus ao receptor celular, ocorre a endocitose com acidificação do endossomo através da fusão com lisossomo celular. A acidez característica dos lisossomos promove ativação das proteases lisossomais que acabam removendo proteínas do capsídeo e modificando outras, formando partículas subvirais infecciosas. As proteínas do capsídeo da partícula subviral infecciosa interagem com a membrana do lisossomo, liberando o nucleocapsídeo no citoplasma (Fields *et al.*, 1996; Flint *et al.*, 2000)

Mesmo que um vírus consiga penetrar no citoplasma celular, o sucesso da replicação dependeria do desnudamento adequado, transcrição e tradução dos genes virais, replicação do genoma viral, montagem, liberação e maturação das partículas. Todas essas fases, com exceção da maturação viral, podem necessitar da participação de proteínas celulares para que ocorram efetivamente (Flint *et al.*, 2000).

É possível que a penetração direta do PBV no citoplasma não seja o mecanismo utilizado naturalmente por esse vírus para o desnudamento do genoma. O PBV pode necessitar passar por endossomos acidificados, ou por lisossomos com proteases, para que ocorra o correto desnudamento e ativação da síntese de RNA, a exemplo do que acontece com os reovírus e os adenovírus (Fields *et al.*, 1996; Flint *et al.*, 2000). Também seria possível que, baseando-se no que acontece com os poliovírus, seja fundamental para um adequado desnudamento a ligação do receptor do vírus à célula, que desencadearia mudanças conformacionais para a exposição do ácido nucléico. Ao mesmo tempo, poderia ser que houvesse a necessidade de atividade de enzimas celulares atuando sobre o capsídeo que não seriam ativadas enquanto as partículas virais não fossem adequadamente expostas no citoplasma (Fields *et al.*, 1996; Flint *et al.*, 2000).

As células HT-29, apesar de permitirem a replicação do PBV de murino nos experimentos realizados por Vicentini (1998), não responderam da mesma maneira com os lipossomos, reforçando as hipóteses suscitada no parágrafo anterior. Talvez se fosse utilizado um número maior de amostras murinas, suínas ou de tamanduá, a exemplo do que fez Vicentini (1998),

algum sucesso na transfecção mediada por lipossomos poderia ter sido obtido. Também sugere-se o pré-tratamento das suspensões fecais com proteases e/ou soluções com pH ácido, anteriormente à formação dos complexos PBV-lipossomos, buscando esclarecer se é necessário que o capsídeo do PBV sofra algum processamento anterior a etapa de ligação ao receptor celular.

O que é definitivo é que as linhagens celulares utilizadas neste trabalho para infecção com PBV diretamente ou complexados com lipossomos, não se mostraram susceptíveis à replicação desse vírus. Nas células J774A.1 pode ter havido replicação do ácido nucléico do PBV sem, contudo, terem sido encontradas partículas virais na análise por microscopia eletrônica ou antígenos virais em testes “Dot-Blot”.

De maneira geral, os resultados negativos acima citados podem ser atribuídos a: i) baixa infectividade das amostras utilizadas; ii) aos tipos celulares utilizados; iii) à origem da amostra utilizada com maior frequência nos experimentos (tamanduá).

No que diz respeito à infectividade das amostras, todos os cuidados padrões para manutenção da mesma em vírus foram seguidos. As fezes foram conservadas a 4°C e as suspensões fecais foram armazenadas a -20°C, sendo descongeladas somente no momento da inoculação nas células. Mesmo assim, por EGPA, pode-se observar uma redução na quantidade de RNA das amostras congeladas por longo tempo, até mesmo para as amostras de tamanduá. Para PBV de ratos, especialmente os de padrão curto de migração, a degradação do RNA é ainda mais rápida, o que dificulta muito o trabalho com esses vírus (resultados não demonstrados).

Os tipos celulares utilizados certamente são variáveis importantes no processo de infecção *in vitro*. A presença de um receptor celular para a adsorção do vírus é o primeiro passo para iniciar o processo de infecção viral. É possível que as células utilizadas, com exceção da J774A.1, não apresentem o receptor adequado para o PBV do tamanduá ou utilizem-se de outros mecanismos de restrição para inibir a replicação do ácido nucléico viral.

Com relação à origem da amostra, ressalta-se que no trabalho de Vicentini (1998) as células da linhagem HT-29 se mostraram susceptíveis ao PBV de rato e suíno, mas não se observou o mesmo resultado no presente trabalho para o PBV de tamanduá, incubados diretamente ou complexados com lipossomos. As amostras de PBV de ratos também não se replicaram em nenhuma das linhagens utilizadas.

No caso das tentativas de infecção direta com amostras de tamanduá nas células da linhagem HT-29, se a restrição à replicação ocorreu na ligação do vírus à célula, então seria possível que o PBV do tamanduá necessitasse de um receptor celular diferente do requerido pelo PBV murino e suíno para sua ligação.

Como citado anteriormente, a adaptação do PBV em culturas celulares é essencial para avanços no conhecimento do ciclo de replicação e dos fenômenos de interação entre o vírus e sua célula hospedeira. Contudo, tal necessidade tem sido contornada para os estudos da caracterização molecular do PBV.

Dados da caracterização molecular do PBV foram obtidos nos anos de 1999 e 2000, quando dois trabalhos foram publicados. Green *et al.* (1999) descreveram a sequência do segmento maior do PBV identificado a partir de fezes de coelhos. Em 2000, Rosen *et al.* publicaram a sequência parcial do segmento maior de uma linhagem de PBV de humanos e a sequência quase total do segmento menor de PBV de humanos, trabalhando com amostras de diferentes lugares do mundo. Neste último trabalho foi possível apontar que o segmento menor do PBV é o que apresenta o gene para a produção da RNA polimerase dependente de RNA (RPDR), característico dos vírus com genoma de RNA. Os autores também testaram dois conjuntos de *primers* (PicoB25-Picob43 e PicoB23- PicoB24) para detecção do PBV através da técnica da RT-PCR. Esses conjuntos foram escolhidos com base na sequência de nucleotídeos do segmento menor de duas amostras de PBV de humanos: a 1-CHN-97 para o primeiro conjunto e a 4-GA-91 para o segundo conjunto. Os conjunto PicoB25-Picob43 reagiram positivamente com amostras humanas de quatro países (China, Venezuela, Argentina, e Estados Unidos), enquanto que o segundo conjunto reagiu apenas com outras amostras do mesmo indivíduo de onde se obteve a amostra 4-GA-91. As amostras humanas detectadas pelos *primers* PicoB25-Picob43 revelaram origem filogenética única, após análise da sequência da região amplificada, enquanto que a amostra 4-GA-91 mostrou-se suficientemente diferente em sua sequência de nucleotídeos das demais amostras analisadas, o que justificaria sua origem em outro genogrupo do PBV (Rosen *et al.*, 2000). Em nenhuma amostra foi possível detectar o PBV com os dois conjuntos de *primers*, podendo significar que os *primers* apresentam especificidade para os possíveis genogrupos do PBV.

Baseado nesses fatos, optou-se no presente trabalho pela utilização do conjunto de *primers* PicoB25-PicoB43 para os testes de RT-PCR para detecção do RNA do PBV. Foram testadas amostras de fezes de tamanduá-bandeira, suínos e ratos. Todas as amostras utilizadas apresentavam-se positivas para os dois segmentos do RNA dupla fita do PBV em EGPA (resultado não demonstrado).

Os testes de RT-PCR permitiram detectar o ácido nucléico do PBV nas amostras suínas e murinas, pois a eletroforese em gel de agarose da solução final da reação mostrou amplificados com tamanho semelhante ao obtido por Rosen *et al* (2000) para amostras humanas (200 pares de bases). Como não foi realizado o sequenciamento dos segmentos amplificados, não foi possível estabelecer comparações filogenéticas entre as amostras humanas, de suínos e murinos. Mas a detecção dessas amostras pelos *primers* PicoB23 e PicoB45 indicam que há semelhanças na sequência de nucleotídeos dessa região selecionada para a amplificação entre as amostras humanas, de suínos e murinos, o mesmo não ocorrendo com as amostras de tamanduá bandeira.

De fato, os vírus de RNA apresentam grande diversidade genética e um dos fenômenos responsáveis por essa diversidade é a característica da RNA polimerase dependente de RNA (RPDR). Essa enzima, codificada apenas por genomas virais, não possui capacidade de correção de erros que ocorrem na adição de nucleotídeos durante duplicação do RNA, como fazem as DNA polimerases. O erros de leitura ou na adição de nucleotídeos ocorrem naturalmente durante o processo de adição de bases (Flint *et al.*, 2000). Esses erros, que acontecem na frequência de uma base para cada  $10^3$  a  $10^4$  bases incorporadas (mil vezes maior que na replicação de DNA), associados a outros fenômenos como *reassortment* (troca de moléculas inteiras de RNA entre vírus com genoma segmentado e geneticamente relacionados) e recombinação, são responsáveis pela grande diversidade genética observada nos vírus de RNA (Flint *et al.*, 2000).

O PBV é um vírus de RNA dupla fita segmentado estando, portanto, sujeito a todos os fenômenos mencionados no parágrafo anterior para apresentar grande diversidade genética. É provável que a diversidade presente no PBV, que pode ser observada fenotipicamente pela variação no tamanho dos segmentos do RNA dupla fita em EGPA, seja acompanhada por grande variabilidade genotípica graças aos fenômenos de recombinação e da incapacidade de correção da RPDR. Isso pode explicar a formação de diferentes genogrupos e a dificuldade de se obter um conjunto de *primers* único para detecção do PBV nos seus vários hospedeiros.

Trabalhos de sequenciamento de diferentes amostras de PBV de diferentes hospedeiros, além de ampliação do número de amostras a serem testadas pelos conjuntos de *primers* existentes, são necessários para avanços no conhecimento da diversidade e de uma possível classificação desses vírus como uma nova família.

## 6. CONCLUSÕES

1. A inoculação experimental de ratos gnotobióticos, com amostras de picobirnavírus (PBV) de fezes de ratos, produziu edema na camada mucosa e submucosa e descamações celulares no ápice das vilosidades do intestino delgado, região do jejuno, e edema nas túnicas mucosa e submucosa do intestino grosso;
2. As células MDBK, SK-6, Vero, HT-29 e 3T3 não permitiram a multiplicação do PBV nos protocolos de infecção utilizados;
3. As células da linhagem J774A.1, cultivadas em monocamadas, permitiram a detecção do RNA dupla fita do PBV em primeira passagem, quando incubadas com suspensão fecal de tamanduá bandeira, positivas para PBV em EGPA, e submetidas a agitações periódicas para a adsorção viral;
4. Lipossomos do tipo Lipofectin<sup>TM</sup> não foram capazes de induzir permissividade nas células HT-29, Caco-2 e Vero para a multiplicação do PBV;
5. Em testes de RT-PCR os *primers* PicoB25 e PicoB43 podem ser usados para detectar o PBV nas fezes de ratos e de suínos, mas não para as fezes de tamanduá bandeira *Myrmecophaga tridactyla*.

## 7. BIBLIOGRAFIA

1. ALFIERI, A.F.; ALFIERI, A.; RESENDE, J.S.; RESENDE, M. A new bisegmented double stranded virus in avian feces. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.* **40**: 437-440, 1988.
2. ALVES, V.A.F.; BACCHI, C.E.; VASSALLO, J. **Manual de imuno-histoquímica**. Brasília: Sociedade Brasileira de Patologia, 1999.
3. BASS, D.M.; BAYLOR, R.M.; CHEN, C.; MACKOW, E.M.; BREMONT, M.; GREENBERG, H.B. Liposome-mediated transfection of intact viral particles reveals that plasma membrane penetration determines permissivity of tissue culture cells to rotavirus. *J. Clin. Invest.* **90**: 2313-2320, 1992.
4. BHATT, P.N.; JACOBY, R.O.; MORSE III, H.C.; NEW, A.E. **Viral and mycoplasmal infections of laboratory rodents: effects on biomedical research**. Londres: Academic Press Inc. Ltd., 1986.
5. BROWNING, G.F.; CHALMERS, R.M.; SNODGRASS, D.R.; BATT, R.M.; HART, C.A.; ORMAROD, S.E.; LEADON, D.; STONEHAM, S.J.; ROSSDALE, P.D. The prevalence of enteric pathogens in diarrheic thoroughbred foals in Britain and Ireland. *Equine Vet. J.* **23**: 405-409, 1991.
6. BUDKER, V.; GUREVICH, V.; HAGSTROM, J.E.; BORTZOV, F.; WOLFF, J.A. pH-sensitive, cationic liposomes: a new synthetic virus-like vector. *Nat. Biotechnol.* **14**: 760-764, 1996.
7. CASCIO, A.; BOSCO, M.; VIZZI, E.; GIAMMANCO, A.; FERRARO, D.; ARISTA, S. Identification of picobirnavirus from faeces of Italian children suffering from acute diarrhea. *Eur. J. Epidemiol.* **12**: 545-547, 1996.
8. CHANDRA, R. Picobirnavirus, a novel group of undescribed viruses of mammals and birds: a minireview. *Acta Virol.* **41**: 59-62, 1997.
9. COX, G.J.; MATSUI, S.M.; LO, R.S.; HINDS, M.; BOWDEN, R.A.; HACKMAN, R.C.; MEYER, W.G.; MORI, M.; TARR, P.I.; OSHIRO, L.S.; LUDERT, J.E.; MEYERS, J.D.; McDONALD, G.B. Etiology and outcome of diarrhea after marrow transplantation: a prospective study. *Gastroenterology* **107**: 1398-1407, 1994.
10. DALES, S E.; CHARDONNET, Y. Early events in the interaction of Adenoviruses with HeLa cells. *Virology.* **56**: 465-483, 1973.
11. FALLER, D.V.; BALTIMORE, D. Liposome encapsulation of retrovirus allows efficient superinfection of resistant cell lines. *J. Virol.* **49**: 269-272, 1984.

12. FELGNER, P.L.; GADEK, T.R.; HOLM, M.; ROMAN, R.; CHAN, H.W.; WENZ, M., NORTHROP, J.P.; RINGOLD, G.M.; DANIELSEN, M. Lipofection: a highly efficient, lipid-mediated DNA-transfection procedure. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **84**: 7413-7417, 1987.
13. FIELDS N.B. *et al.* **FIELDS VIROLOGY**, 3<sup>a</sup> ed. Philadelphia: Lippincott-Raven Publishers, 1996 (v. 2).
14. FLINT, S.J.; ENQUIST, L.W.; KRUG, R.M.; RACANIELLO, V.R.; SKALKA, A.M. **Principles of virology: molecular biology, pathogenesis and control**. Washington DC: ASM Press, 2000.
15. GALLIMORE, C.I.; GREEN, J.; CASEMORE, D.P.; BROWN, D.W.G. Detection of a picobirnavirus associated with *Cryptosporidium* positive stools from humans. *Arch. Virol.* **140**: 1275-1278, 1995a.
16. GALLIMORE, C.; APPLETON, H.; LEWIS, D.; GREEN, J.; BROWN, D.W.G. Detection and characterization of bisegmented double-stranded RNA viruses (picobirnavirus) in human faecal specimens. *J. Med. Virol.* **45**: 135-140, 1995b.
17. GALLIMORE, C.; LEWIS, D.; BROWN, D. Detection and characterization of novel bisegmented double-stranded RNA virus (picobirnavirus) from rabbit faeces. *Arch. Virol.* **133**: 63-73, 1993.
18. GARCON, N.M.J.; SIX, H.R. Universal vaccine carrier. Liposome that provide T-dependent help to weak antigens. *J. Immunol.* **146**: 3697-3702, 1991.
19. GATTI, M.S.V. **Picobirnavirus: um novo vírus animal. Características gerais, infecção experimental em ratos e estudos epidemiológicos em suínos**. São Paulo, SP, 1994. Tese (Doutorado em Microbiologia e Imunologia) UNIFESP.
20. GATTI, M.S.V.; PESTANA DE CASTRO, A.F.; FERRAZ, M.M.G.; FIALHO, A.M.; PEREIRA, H.G. Viruses with bisegmented double-stranded RNA in pig faeces. *Res. Vet. Sci.* **47**: 397-398. 1989.
21. GONZÁLES, G.G.; PUJOL, F.H.; LIPRANDI, F.; DEIBIS, L.; LUDERT, J.E. Prevalence of enteric viruses in human immunodeficiency virus seropositive patients in Venezuela. *J. Med. Virol.* **55**: 288-292, 1998.
22. GOUVEA, V.S.; de CASTRO, L.; PEREIRA, H.G. A combined dot nitrocellulose-enzyme immunoassay for rotavirus and adenovirus. *J. Virol. Methods* **18**: 57-65, 1987.

23. GREEN, J.; GALLIMORE, C.I.; CLEWLEY, J.P.; BROWN, D.W.G. Genomic characterization of the large segment of a rabbit picobirnavirus and comparison with the atypical picobirnavirus of *Cryptosporidium parvum*. *Arch. Virol.* **144**: 2457-2465, 1999.
24. GROHMANN, G.S.; GLASS, R.I.; PEREIRA, H.G.; MONROES, S.S.; HIGHTOWER, A.W.; WEBER, R.; BRYAN, R.T. Enteric viruses and diarrhea in HIV infected patients. *N. Engl. J. Med.* **329**: 14-20, 1993.
25. HAGA, I.R.; MARTINS, S.S.; HOSOMI, S.T.; VICENTINI, F.; TANAKA, H.; GATTI, M.S.V. Identification of a bisegmented double-stranded RNA virus (picobirnavirus) in faeces of giant anteaters (*Myrmecophaga tridactyla*). *Vet. J.*, **158**: 234-236, 1999.
26. HAGA, I.R. **Picobirnavirus: pesquisa de novos hospedeiros animais, identificação através de ensaio de "dot-blot" e métodos de purificação.** Campinas, SP, 1998. Dissertação (Mestrado em Microbiologia e Imunologia), Instituto de Biologia, UNICAMP.
27. HERRING, A.J.; INGLIS, N.F.; OJEN, C.K.; SNODGRASS, D.R.; MENZIES, J.D. Rapid diagnosis of rotavirus infection by direct detection on viral nucleic acid in silver stained polyacrylamid gels. *J. Clin. Microbiol.* **29**: 473-477, 1982.
28. HODGSON, C.P. The vector void in gene therapy. *Biotechnology* **13**: 222-225, 1995.
29. HUMPHREY, C.D.; COOK JR, E.H.; BRADLEY, D.W. Identification of enterically transmitted hepatitis virus particles by solid phase immune electronmicroscopy. *J. Med. Virol.* **29**: 177-188, 1990.
30. INNES, C.L.; SMITH, P.B.; LANGENBACH, R.; TINDALL, K.R.; BOONE, L.R. Cationic liposomes (lipofectin) mediate retroviral infection in absence of specific receptors. *J. Virol.* **64**: 957-961, 1990.
31. KALCKAR, H.M. Differential spectrophotometry of purine compounds by means of specific enzymes. *J. Biol. Chem.* **167**: 461-475, 1947.
32. KALJOT, K.T.; SHAW, R.D.; RUBIN, D.H.; GREENBERG, H.B. Infectious Rotavirus enters cells by direct cell membrane penetration, not by endocytosis. *J. Virol.* **62**, 1136-1144, 1988.
33. KHRAMTSOV, N.V.; WOODS, K.M.; NESTERENKO, M.V.; DYKSTRA, C.C.; UPTON, S.J. Virus-like, double-stranded RNAs in the parasitic protozoan *Cryptosporidium parvum*. *Mol. Microbiol.* **26**, 289-300, 1997.
34. KONDOROSI, E. and DUDA, E. Infection of cells with Sindbis virus nucleocapsids entrapped into liposomes. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **107**: 367-373, 1982.

35. KONOPKA, K.; DAVIS, B.R.; LARSEN, C.E.; ALFORD, D.R.; DEBS, R.J.; DÜZGÜNES, N. Liposomes modulate human immunodeficiency virus infectivity. *J. Gen. Virol.* **71**: 2899-2907, 1990.
36. LAEMMLI, U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature (London)* **227**: 680-685, 1970.
37. LEITE, J.P.G.; MONTEIRO, S.P.; FIALHO, A.M.; PEREIRA, H.G. A novel avian virus with trisegmented double-stranded RNA and further observations on previously described similar viruses with bisegmented genome. *Virus Res.* **16**: 119-126, 1990.
38. LUDERT, J.E.; ABDUL-LATIFF, L.; LIPRANDI, A.; LIPRANDI, F. Identification of picobirnavirus, viruses with bisegmented double-stranded RNA in rabbit faeces. *Res. Vet. Sci.* **59**: 222-225, 1995.
39. LUDERT, J.E.; LIPRANDI, F. Identification of viruses with bi and trisegmented double-stranded RNA genome in faeces of children with gastroenterites. *Res. Virol.* **144**: 219-224, 1993.
40. LUDERT, J.E.; LIPRANDI, F. Picobirnavirus de porcinos. In: Anais do VI Encontro Nacional de Virologia. São Lourenço, MG, 1992.
41. LUDERT, J.E.; HIDALGO, M.; GIL, F.; LIPRANDI, F. Identification in porcine faeces a novel virus with a bisegmented double-stranded RNA genome. *Arch. Virol.* **117**: 97-107, 1991.
42. MADDON, P.J.; DALGLEISH, A.G.; McDOUGAL, J.S.; CLAPHAN, P.R.; WEISS, R.A.; AXEL, R. The T4 gene encodes the AIDS virus receptor and is expressed in the immune system and the brain. *Cell* **47**: 333-348, 1986.
43. MALONE, R.W.; FELGNER, P.L.; VERMA, I.M. Cationic liposome-mediated RNA transfection. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **86**: 6077-6081, 1989.
44. MIDDLETON, P.J. Viruses that multiply in the gut and cause endemic and epidemic gastroenteritis. *Clin. Diagn. Virol.* **6**: 93-101, 1996.
45. MUNDT, E.; VAKHARIA, V. Synthetic transcripts double-strand birnavirus genome are infectious. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **93**: 11131-11136, 1996.
46. OLIVEIRA, L.G.S. **Virologia Humana**. Rio de Janeiro: Cultura Médica, 1994.
47. PARK, C.; LOPINSKI, J.D.; MASUDA, J.; TZENG, T.; BRUENN, J.A. A second double-strand RNA virus from yeast. *Virology*, **216**: 451-454, 1996.

48. PERCY, D.H.; BARTHOLD, S.W. **Pathology of laboratory rodents & rabbits**. 2 ed. Iowa: Iowa State University Press, 2001.
49. PEREIRA, H.G. Double stranded RNA virus. *Semin. Virol.* **2**: 39-53, 1991.
50. PEREIRA, H.G.; DE ARAUJO, H.P.; FIALHO, A.M.; DE CASTRO, L.; MONTEIRO, S.P. A virus with bi-segmented double-stranded RNA genome in guinea pig intestines. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* **84**: 137-140, 1989.
51. PEREIRA, H.G.; FIALHO, A.M.; FLEWETT, T.H.; TEIXEIRA, J.M.S.; ANDRADE, Z.P. Novel virus in human faeces. *Lancet*, **09 jul**, 103-104, 1988a.
52. PEREIRA, H.G.; FLEWETT, T.H.; CANDEIAS, J.A.N.; BARTH, O.M. Virus with bi-segmented double-stranded RNA in rats faeces. *J. Gen. Virol.* **69**: 2749-2754, 1988b.
53. PREISIG, O., WINGFIELD, B.D.; WINGFIELD, M.J. Coinfection of a fungal pathogen by two distinct double-strand RNA viruses. *Virology*, **252**, 399-406, 1998.
54. RALPH, P.; NAKOINZ, I. Phagocytosis and cytolysis by a macrophage tumor and its cloned cell line. *Nature*, **257**, 393-394, 1975.
55. ROSEN, B.I.; FANG, Z.Y.; GLASS, R.I.; MONROE, S.S. Cloning of human picobirnavirus genomic segments and development of an RT-PCR detection assay. *Virology*, **277**: 316-329, 2000.
56. SAMMONS, D.N.; ADDANS, L.D.; MISHIKAWA, E.E. Ultrasensitive silver base color staining of polypeptides in polyacrylamide gels. *Electrophoresis* **2**: 135-141, 1981.
57. SOLIS, M.P.; MANZANO, F.I.P.; GONZALEZ, N.V.; LOSA, M.D.R.G; MARTIN, G.P. Picobirnavirus: new viral agent as cause of acute infection disease in pig farms in the state of Yucatan, Mexico. *Veterinaria Mex. City* **28**: 309-311, 1998.
58. SOMOGYI, P.; DOBOS, P. Virus-specific RNA synthesis in cells infected by infectious pancreatic necrosis virus. *J. Virol.* **33**: 129-139, 1980.
59. SUSUKI, H., KITAOKA, S, SATO T, KONNO, T, IWASAKI, Y, NUMAZAKI, Y. E.; ISHIDA, N. Further investigation on the mode of human rotavirus into cells. *Arch. Virol.* **91**:135-144, 1986.
60. van Regenmortel, M.H.V; Fauquet, C.M; Bishop, D.H.L.; Carstens, E.B.; Estes, M.K.; Lemon, S.M.; Maniloff, J.; Mayo, M.A.; McGeoch, D.J.; Pringle, C.R.; Wickner, R.B. **Virus Taxonomy. Classification and Nomenclature of Viruses, Seventh Report of the International Committee on Taxonomy Virus Taxonomy**. Academic Press, SanDiego, 2000.

61. VANOPDENBOSCH, E.; WELLEMANS, G. Bovine birna type virus: a new etiological agent of neonatal calf diarrhoea? *Vlaams Diergeneesk D. Tijdschr* **59**: 137-140, 1990.
62. VICENTINI, F. Utilização de culturas celulares para a replicação de picobirnavírus. Campinas, SP, 1998. Dissertação (Mestrado em Microbiologia e Imunologia), Instituto de Biologia, UNICAMP.
63. VOLOTAO, E.M.; SOARES, C.C.; ALBUQUERQUE, M.C.M.; DA SILVA, F.M.; CARVALHO, T.R.B.; MARINS, L.P.; D'OLIVEIRA, I.C.C.; SANTOS, N. First evidence of a trisegmented double-stranded RNA virus in canine faeces. *Vet. J.* **161**: 205-207, 2001.
64. VONDERFECHT, S.L.; HUBER, A.C.; EIDEN, J.; MADER, L.C.; YOLKEN, R.H. Infectious diarrhea of infant rats produced by a rotavirus-like agent. *J. Virol.* **52**: 94-98, 1984.
65. WILLEMS, L.; PORTETELLE, D.; KERKHOFS, P.; CHEN, G.; BURNY, A.; MAMMERICKX, M. and KETTMANN, R. *In vivo* transfection of bovine leukemia provirus into sheep. *Virology* **189**: 775-777, 1992.
66. WILSON, T.; PAPAHAJIOPOULOS, D.; TABER, R. Biological properties of poliovirus encapsulated in lipid vesicles: antibody resistance and infectivity in virus-resistant cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **74**: 3471-3475, 1977.
67. ZHOU, X.; HUANG, L. DNA transfection mediated by cationic liposomes containing lipopolylysine: characterization and mechanism of action. *Biochim. et Biophys. Acta* **1189**: 195-203, 1994.