FACULDADES SÃO JOSÉ
CURSO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

THAINARA RAMOS PINTO

O USO DE BIOINDICADORES COMO FERRAMENTAS DE DETECÇÃO DO VÍRUS DA ENCEFALOMIELITE MURINA DE THEILER EM CAMUNDONGOS SWISS WEBSTER (TMEV).

Rio de Janeiro

2017

THAINARA RAMOS PINTO

O USO DE BIOINDICADORES COMO FERRAMENTAS DE DETECÇÃO DO VÍRUS DA ENCEFALOMIELITE MURINA DE THEILER EM CAMUNDONGOS SWISS WEBSTER (TMEV).

Projeto de pesquisa apresentado para a Disciplina de TCC I, sob a orientação do prof. Cleber Hooper

Rio de Janeiro

2017

SUMÁRIO

Página

1. INTRODUÇÃO..... 4
2. OBJETIVOS..... 5
   2.1. OBJETIVO GERAL.....5
   2.2. OBJTIVOS ESPECÍFICOS.....5
3. JUSTIFICATIVA..... 5
4. HIPÓTESE..... 6
5. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA..... 6
   5.1. HISTÓRICO..... 6
   5.2. CEPAS E PATOGÊNESE VIRAL..... 7
   5.3. TRANSMISSÃO E SINAIS CLÍNICOS..... 8
   5.4. TMEV COMO MODELO DE ESCLEROSE MÚLTIPLA..... 9
   5.5. STATUS SANITÁRIO DE ANIMAIS DE LABORATÓRIO..... 10
6. METODOLOGIA..... 11
7. CRONOGRAMA..... 13
8. REFERÊNCIAS..... 13

1. INTRODUÇÃO

Atualmente, a ciência de animais de laboratório representa um campo de evolução contínua sob aspecto biotecnológico. Para tal, o aspecto evolutivo se dá pela estruturação de barreiras sanitárias adequadas, cujo objetivo principal, é manter a integridade sanitária dos animais que são criados em colônias bioprotegidas. (Andrade, 2002 p.19)

Entretanto, há ocorrências devido a problemas com agentes infecciosos em grandes colônias de animais de laboratório, onde o mesmo é citado como barreiras em pesquisas atualmente. São vários os microrganismos que podem trazer tais transtornos, e dentre estes, os patogênicos são os que mais trazem preocupações, pois podem induzir a sinais clínicos e causarem infecções sintomáticas. As preocupações se dão porque esses agentes podem modificar resultados importantes na linha de pesquisa, dando-lhes um resultado falso-positivo ou então levando ao óbito antes mesmo das devidas conclusões. Neste caso, vê-se a importância da certificação de animais limpos para as experimentações, colônias livres de qualquer tipo de patógeno que possa atrapalhar, com isso, vem sendo necessária a implementação de biotérios que possuam barreiras sanitárias, evitando assim a prevalência de microrganismos patogênicos (Andrade, 2002 p. 21)

Dentro dessa gama de patógenos encontrados em colônias de camundongos, temos o vírus da Encefalomielite Murina de Theiler (TMEV), descrita primeiramente por Max Theiler na década de 30 durante estudos sobre a febre amarela. O mesmo acentuou após pesquisas a fundo sobre o vírus. A paralisia flácida que ocorria nas patas posteriores dos camundongos, citada por ele como uma doença neurológica transmitida para outros camundongos saudáveis através de inoculações intracerebral, onde o vírus conseguia persistir no Sistema Nervoso Central. (Oleszak 2004)

O estudo sobre a encefalomielite murina foi intensificada após descobrirem sua semelhança clínica com a poliomielite humana (Lipton, 1975). Este também é visto como um modelo de estudo da esclerose múltipla, devido sua capacidade de desmielinização ocorrida em fase crônica do processo infeccioso. (Raymond 2010)

De acordo com o demonstrado acima, pretende-se com este trabalho responder a seguinte questão: Quais os indicadores bioquímicos e quais os índices hematimétricos com possíveis variações nos ensaios ocorridos no camundongo após infecção pelo patógeno TMEV (Vírus da Encefalomielite Murina de Theiler)?

2. OBJETIVOS

2.1. OBJETIVO GERAL

Desenvolver no SCQA, protocolos paralelos no campo da Biologia Molecular, como forma de detecção de sorotipos do vírus do Theiler, pois além da implantação de um novo diagnóstico analítico confirmatório, poderemos detectar qual o grau de virulência que podem acometer os animais de laboratórios monitorados.

2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Relacionar os valores laboratoriais resultantes de acordo com a infecção causada;
- Comparar os resultados obtidos com os valores de referência de camundongos sadios;
- Citar as patologias causadas pelo patógeno citado, caso exista;
- Justificar diferenças de status sanitário em relação a variação dos resultados laboratoriais;
- Implantar um método molecular para detecção de subtipos do vírus do Theiler.

3. JUSTIFICATIVA

O presente trabalho visa fazer a análise dos dados obtidos por meio de exames hematológicos, bioquímicos e moleculares em animais de laboratório,

comparando-os com valores de referência de animais sadios. Com isso, consegue-se determinar alterações provenientes da infecção causada pelo agente patogênico em questão.

Os mecanismos de permanência e replicação do patógeno, assim como, todo o seu aspecto clínico no animal, gera alterações nas taxas de homeostase do organismo. Desta maneira, consegue-se determinar e fechar diagnósticos prévios de doenças na fase clínica.

A importância desta pesquisa é determinar protocolos e meios para a detecção do vírus, a fim de fazer parte da cadeia de produção e insumos biotecnológicos para a população, por meio da pesquisa e confecção de vacinas, medicamentos e tratamento com base científica.

4. HIPÓTESE

Como hipótese para o tema em questão, há:

As variações ocorridas nos camundongos são dadas a partir da viremia do patógeno em questão. Parâmetros como leucócitos, poderão estar com altas taxas devido a infecção, assim como, parâmetros bioquímicos da via gastrointestinal, também poderão encontrar-se alterados devido a replicação do vírus acometer a parede intestinal. Parâmetros hepáticos e renais também poderão apresentar alterações.

5. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

5.1. HISTÓRICO

O vírus foi inicialmente designado como cepa TO (Theiler’s original), primeira vez isolado nas fezes do conteúdo intestinal de camundongos normais por Theiler & Gard em 1940. Após, frequentes estudos sobre a febre amarela, Theiler & Gard, também conseguiram isolar mais duas cepas com características diferentes da

primeira citada, eram elas denominadas GDVII e FA. As mesmas foram descritas como altamente virulentas comparadas a cepa TO, causando uma infecção aguda com sinais clínicos de uma poliomielite, podendo levar a morte. (Oleszak 2004)

Daniels em 1952 relatou a desmielinização tardia provocada por uma nova cepa identificada, denominada DA. Viu-se que a mesma causa dois tipos de lesões em camundongos adultos: uma delas é a encefalite aguda e a outra foi a infecção crônica, atacando células do Sistema Nervoso Central (SNC), causando lesão na medula espinhal e a desmielinização de quatro camundongos inoculados com a cepa viral. (Raymond 2010)

Em seus estudos com o vírus da encefalomielite murina, Lipton em 1975 designou a doença como sendo bifásica, ou seja, após inoculação intracerebral da cepa DA, houve uma infecção neural aguda com a paralisia flácida dos animais. Posteriormente, uma inflamação intensa se desenvolveu nas leptomeninges da medula espinhal e na massa branca dos camundongos paralisados sobreviventes. Com esta inflamação tardia, procedeu-se a desmielinização, o que de fato indicava que o vírus em sua fase aguda se replicava na massa cinzenta do cérebro, enquanto que em sua difusão tardia, o mesmo instalava-se na massa branca causando lesões maiores em células da microglia e menores lesões nas células dos oligodendrócitos e astrócitos. (Lipton et al. 2005)

5.2. CEPAS E PATOGÊNESE VIRAL

Após relatos e mais descobertas acerca do vírus, o TMEV foi dividido em dois grupos de acordo com a sua virulência e propriedades virais após inoculação. No primeiro grupo podemos citar as cepas TO, DA, WW, BeAn 8386, que são as menos virulentas, já no segundo grupo temos as cepas GDVII e FA, que são as altamente virulentas. (Oleszak et al. 2004)

As cepas menos virulentas causam o que chamamos de doença bifásica, onde primeiramente há a infecção do sistema nervoso central (SNC), causando uma poliomielite severa, onde posteriormente agrava-se para a desmielinização crônica. Entretanto, as cepas designadas de maior espectro viral, as virulentas, causam uma encefalite fatal nos camundongos após sua inoculação. (Lipton et al. (2005)

O Vírus da Encefalomielite murina de Theiler, é um vírus entérico encontrado em camundongos ou ratos. O mesmo faz parte do gênero *Cardiovírus,* pertencente a família *Picornaviridae*. Anteriormente o vírus foi classificado como *Enterovirus*, devido sua semelhança com o vírus da poliomielite humana. O TMEV é um vírus de RNA de fita simples com polaridade positiva, não envelopado, tamanho entre 20 a 30 nm, com forma icosaédrica. O tamanho do RNA varia entre 7,2 a 8,5 kilobases (Kb) e o genoma apresenta em torno de 8100 nucleotídeos (Raymond 2010).

Durante a infecção do TMEV no sistema nervoso central do animal, podem ser encontradas quantidades grandes de RNA e genoma viral nas células da glia e microglia, mas com pouco achado de antígeno viral, ou seja, existe uma expressão tardia de proteínas da cepa DA. Acredita-se que o sistema imunitário medeia a doença da substância branca tardia (Raymond 2010).

A cepa DA induzida pelo vírus causando a doença desmilinizante crônica é um excelente modelo de estudo de Esclerose Múltipla, pois os dois assemelham-se quanto a sua ação no SNC, causando a patologia desmilinizante onde o sistema imunológico parece contribuir em ambos os distúrbios.

Tabela 1. Diferenças fenotípicas entre subgrupos TMEV * (Raymond, 2010)

Fenótipos	GDVII	TO (exemplo, estirpe DA)
Neurovirulência	+ (= 1PFU 1LD $_{50}$)	- (> 10 ^{6} PFU)
Doença neuronal precoce	+	+/-
Infecção persistente com expressão restrita do gene do vírus	-	+
Desmielinização inflamatória tardia	-	+
* DA, estirpe Daniels; LD $_{50}$, a morte de 50% dos animais; PFU, unidades formadoras de placas; TMEV, vírus da encefalomielite de Theiler murino.		

5.3. TRANSMISSÃO E SINAIS CLÍNICOS

O TMEV infecta camundongos e ratos em todo o mundo, entretanto sua infecção não é de grande contágio, pois ele afeta a mucosa intestinal do animal, causando problemas entéricos, logo, sua transmissão é fecal-oral. Quando ocorre a viremia, o agente pode se instalar em muitos tecidos, incluindo células da medula

espinhal e parte cinzenta do cérebro. Em alguns camundongos, a viremia pode disseminar epítopos virais do intestino para outros tecidos, incluindo o fígado, baço e SNC, este último espalhando-se por transporte axonal. "A transmissão transplacentária foi documentada e as culturas de células de camundongo e de rato podem ser infectadas." (David G. Baker, 2003 p.243)

Os sinais clínicos quando infecção natural são sintomas semelhantes a patologias entéricas, podendo passar por assintomática. Quando há a viremia do mesmo, pode causar encefalite fatal, visto que raramente há desmielinização dos animais através de infecção natural. Porém, quando a infecção é feita de forma experimental, havendo inoculação do vírus diretamente, os sintomas são em forma de paralisia flácida dos membros posteriores, unilateral ou bilateral, tremor, ausência de movimentação e perda de peso. (criver.com)

Após a disseminação, as alterações patológicas podem ser observadas na medula espinhal e no cérebro e consistem em poliomielite com necrose, meningite não supurativa, microgliose, perivasculite, neuronofagia de células de corno ventral e desmielinização autoimune mediada por linfócitos T, TNF-α e IL- 1 (David G. Baker, 2003 p. 243)

Os sinais clínicos variam de acordo com a linhagem e a idade do animal. Os camundongos recém-desmamados morrem alguns dias após o desmame, sem apresentar qualquer tipo de paralisia, já em camundongos mais velhos, após mais ou menos 30 dias foi visto os sintomas, como: fraqueza nas patas, progredindo para paralisia, levando à morte do animal. (Rodrigues, 2004)

5.4. TMEV COMO MODELO DE ESCLEROSE MÚLTIPLA

O modelo do vírus TMEV como modelo de Esclerose Múltipla em humanos, vem sendo utilizado em grande escala devido a sua semelhança contagiosa no sistema nervoso central e seu processo de desmielinização.

Segundo Mecha et al. (2012), o dano do SNC é mediado por respostas imunológicas mediadas por células TCD4+ pró inflamatórias específicas de vírus, o mesmo é caracterizado pela infiltração de células do processo imunitário no SNC,

com isso, causando a desmielinização e os sinais da doença em questão. As citocinas pró-inflamatórias liberadas pelas células TCD4+ recrutam os monócitos e macrófagos no Sistema Nervoso Central e são os mesmos que causam danos a bainha de mielina. Logo, a fase crônica do TMEV é caracterizado por processos de autoimunidade devido a disseminação de epítopos virais para determinantes de mielina, caracterizando assim que o vírus pode desencadear reações de auto imunidade (Holgado et al. 2002).

5.5. STATUS SANITÁRIO DE ANIMAIS DE LABORATÓRIO

A classificação dos animais quanto ao status sanitário podem ser também conhecidas como a relação desses animais com o ambiente específico. Dentro deste ambiente específico há organismos associados - vírus, bactérias, fungos e parasitas – que podem de alguma maneira contaminar os animais contidos na colônia e assim comprometendo o uso dos mesmos no campo cientifico (Couto et al 2002 p. 59).

A utilização de animais de laboratório no campo científico tem como objetivo principal resultados de pesquisas analíticas dentro do estudo da ciência em saúde, a fim de investigar meios para controle sobre aspectos biotecnológicos. Quanto mais eficientes forem as barreiras sanitárias deste ambiente, menores as chances de contaminação dos animais e dos possíveis resultados, comprometendo o desenvolvimento tecnológico, a produção e controle de qualidade de imunobiológicos, fármacos e outros. Para o controle ideal dos animais contidos em biotério, faz-se necessário o monitoramento da qualidade animal e genética, com o intuito de satisfazer as exigências da experimentação biológica. (Andrade, 2002 p. 19)

Segundo Palotti (2008), podemos classificar os animais em alguns padrões sanitários:

Animais Convencionais: São criados em gaiola aberta com fluxo livre de pessoas, possuem microbiota indefinida por serem mantidos em ambiente desprovido de barreiras sanitárias rigorosas. (Couto 2002)

Animais Livres de Germes Patogênicos (SPF): São criados em biotérios com eficiente barreira sanitária ou em acomodações que lhe privam de potenciais agentes patogênicos. (Palotti, 2008)

Animais Axênicos: São criados e mantidos em isoladores que os mantém livres de qualquer tipo de microorganismo. (Palotti, 2008)

Animais Gnotobióticos: São criados e mantidos como os animais axênicos, mas podem apresentar alguma forma de vida associada. (Palotti, 2008)

Animais com Flora Definida (FD): São criados como axênicos e são intencionalmente contaminados com agentes patogênicos específicos, e são monitorados constantemente. (Couto, 2002)

6. METODOLOGIA

6.1. ANESTESIA

Para a obtenção dos dados hematológicos e bioquímicos, será utilizado o sangue e soro de 30 camundongos da linhagem Swiss Webster. Os animais serão separados de acordo com as salas correspondentes: 10 animais por sala A5, A10 e A13 respectivamente. Para o manejo e contenção do animal, assim como a aplicação de anestésico e coleta de sangue, será necessária a participação de uma veterinária e um técnico.

Os anestésicos utilizados serão Cetamina a 10% e Xilazina a 2%, e para Eutanásia será utilizado Tiopental sódico 1,0g (pó estéril). Os primeiros anestésicos serão administrados via punção intramuscular, enquanto a eutanásia será administrado via punção cardíaca. Os volumes utilizados se dão conforme o peso e idade do animal.

6.2. COLETA DE SANGUE

Os sangues serão coletados via punção intracardíaca por meio de seringa de insulina (1ml). As amostras serão introduzidas em micro tubos pediátricos com EDTA K2 de 0.5ml para análises hematológicas e micro tubos com ativador de coágulo de 0.5ml para análises bioquímicas, totalizando 15 amostras para cada tubo

respectivamente.

6.3. FASE ANALÍTICA HEMATOLÓGICA

Após a coleta, o sangue já homogeneizado será enviado para análise dos parâmetros hematológicos. O equipamento utilizado será o analisador automatizado hematológico Poch 100- iV DIFF (Sysmex, Kobe, Japan) de uso veterinário, o mesmo permite realizar contagem dos seguintes parâmetros hematológicos: WBC, RBC, PLT, HGB, HCT, MCV, MCH e MCHC.

6.4. FASE ANALÍTICA BIOQUÍMICA

O sangue será centrifugado a 15.000 rpm a 3 minutos para a obtenção do soro. A amostra resultante será analisada por meio do equipamento de bioquímica seca, o Vitros 250 (Ortho clinical - Jonhson & Jonhson). Os parâmetros que serão analisados serão: Albumina, Creatinina, Uréia nitrogenada do sangue (BUN), Alanina aminotrasferase, Aspartato aminotransferase, Desidrogenase láctica, Ácido úrico, Globulina, Colesterol, Proteinas totais, Fosfatase alcalina.

6.5. TESTE IMUNOENZIMÁTICO - ELISA

Para a comprovação da positividade dos animais para o patógeno em questão, é necessário que haja uma análise mais sensível, positivando que há de fato o contágio pelo vírus. Com isso utilizarei o teste imunoenzimático, onde conseguirei detectar por meio de placas sensibilizadas, as amostras reagentes. O ELISA que utilizarei será o indireto, onde há a ligação de antígeno - anticorpo.

Primeiramente, a amostra é diluída em um diluente próprio dos kits comerciais em tubos de ensaio identificados. Após diluído, as amostras são colocadas em placas de 96 poços já sensibilizadas com partes proteicas do antígeno, ao mesmo tempo destina-se a cinco poços, a inclusão de controles positivos e negativos e o branco. Encuba-se por 45 min em estufa a 37ºC, simulando um estado febril. Discorridos os minutos necessários, a placa é lavada com um tampão de lavagem para a retirada de anticorpos que não se ligaram a placa. Passado a lavagem, será colocado conjugado peroxidase, que é uma enzima que se liga aos anticorpos caso estiverem presentes nas placas, encuba-se novamente a 45 min em estufa a 37ºC. Novamente será feito a lavagem para a retirada de conjugados livres e adicionado à placa o substrato, chamado de cromógeno, que quando ligado ao complexo

antígeno - anticorpo desenvolve cor, mostrando assim as possíveis positividades.

Para o resultado final do teste realizado, a placa resultante do processo, será colocada no leitor de ELISA a fim de quantificar a densidade óptica da coloração e positivar e/ou negativar as amostras.

7. CRONOGRAMA

ATIVIDADES	JULHO	AGOSTO	SETEMBRO	OUTUBRO	NOVEMBRO	DEZEMBRO
Coleta dos dados	x					
Análise dos resultados		X	x			
Discussão dos resultados		X	x			
Revisão bibliográfica				x		
Revisão do artigo final					x	
Defesa de banca						x

8. REFERÊNCIAS

ANDRADE, A., PINTO, S. C.; OLIVEIRA, R. S.; **Animais de Laboratório: criação e experimentação**; Rio de Janeiro; Editora FIOCRUZ, 2002. 388 p.

BAKER, D. G.; **Natural Pathogens of Laboratory Animals: Their Effects on Research**; ed. 1º; E.U.A: ASM Press, 2003. 385 p.

COUTO, S. E. R. **Classificação dos animais de laboratório quanto ao status sanitário. Animais de Laboratório: criação e experimentação**. Rio de Janeiro. v.1. cap. 8. p. 59

CHARLES RIVER; **Theiloviruses (MEV [TMEV], RTV [GDVII])**; Massachusetts, EUA. 2009.

HOLGADI, E. M. et al.; **Encefalomielitis por infección con el virus de Theiler como modelo experimental de esclerosis múltiple: citocinas y posibles mecanismos patogénicos**. Revista de Neuraoogía. p. 973-978. 2002;

LIPTON, H. L.; KUMAR, A. S. M.; TROTTIER, M.; **Theiler's virus persistence in the central nervous system of mice is associated with continuous viral replication and a difference in outcome of infection of infiltrating macrophages versus oligodendrocytes.** Virus Research.; p. 214–223. 2005

MECHA, M. et al**.; Viral models of multiple sclerosis: Neurodegeneration and demyelination in mice infected with Theiler's vírus.** Progress in Neurobiology. p. 46–64. 2013.

OLESZAK, E. L. et al.; **Theiler's Virus Infection: a Model for Multiple Sclerosis.** Clinical Microbiology Reviews. p. 174–207. 2004.

PALOTTI F.A.S. et al.; **Caracterização de biotérios, legislação e padrões de biossegurança.** Revista de Ciências Farmacêutica Básica Aplicada. v. 29. p. 17-28. 2008.

RODRIGUES, D. M.*;* **Infecção por Cardiovírus (Vírus da Encafalomielite Murina de Theiler – TMEV) em colônias convencionais de ratos**. 2004. 96 f. Tese Mestrado em Genética e Biologia Molecular - Instituto de Biologia da Universidade Estadual de Campinas. São Paulo. 2004

ROOS, R. P. **Pathogenesis of Theiler's murine encephalomyelitis virus-induced disease.** Clinical and Experimental Neuroimmunology. v. 1. p. 70–78. 2010.

TSUNODA, I. FUJINAMI, R. S. **Neuropathogenesis of Theiler's Murine Encephalomyelitis Virus Infection, An Animal Model for Multiple Sclerosis.** J

Neuroimmune Pharmacol. v. 5. p. 355–369. 2010.