



**INSTITUTO LATINO-AMERICANO DE CIÊNCIAS  
DA VIDA E DA NATUREZA (LACVN)**

**CIÊNCIAS BIOLÓGICAS – ECOLOGIA E  
BIODIVERSIDADE**

**ANÁLISE DA INFECTIVIDADE DO VÍRUS PARAINFLUENZA BOVINA TIPO 3  
EM LINHAGEM CELULAR**

**JORGE IGNACIO RAMOS URIA**

Foz do Iguaçu - PR  
2023



**INSTITUTO LATINO-AMERICANO DE CIÊNCIAS  
DA VIDA E DA NATUREZA (LACVN)**

**CIÊNCIAS BIOLÓGICAS – ECOLOGIA E  
BIODIVERSIDADE**

**ANÁLISE DA INFECTIVIDADE DO VÍRUS PARAINFLUENZA BOVINA TIPO 3  
EM LINHAGEM CELULAR**

**JORGE IGNACIO RAMOS URIA**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao Instituto Latino-Americano de Ciências da Vida e da Natureza da Universidade Federal da Integração Latino-Americana, como requisito parcial à obtenção do título de Bacharel em Ciências Biológicas – Ecologia e Biodiversidade, sob orientação do Prof. Dr. Kelvinson Fernandes Viana.

Foz do Iguaçu - PR  
2023



## ATA DE DEFESA DO TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO

Ao dia 31 do mês de Outubro do ano de 2023, realizou-se a apresentação pública de defesa do Trabalho de Conclusão de Curso, intitulado **ANÁLISE DA INFECTIVIDADE DO VÍRUS PARAINFLUENZA BOVINO TIPO 3 EM LINHAGEM CELULAR**, apresentado pelo discente Jorge Ignacio Ramos Uria, do curso de Ciências Biológicas. Os trabalhos foram iniciados às 16:00 pelo docente orientador Kelvinson Fernandes Viana, presidente da banca examinadora, juntamente com o docente Flávio Tavares e a Médica Veterinária Ms. Natália S. Teixeira.

### Observações da Banca Examinadora:

--

A Banca Examinadora, ao término da apresentação oral e da arguição do acadêmico, encerrou os trabalhos às 9:30 Os examinadores atribuíram as seguintes notas:

orientador(a)	nota final: 9	Média final: 9.0
docente	nota final: 9	
docente	nota final: 9	

Proclamado o resultado pelo presidente da banca examinadora, encerraram-se os trabalhos e, para constar, eu Kelvinson Fernandes Viana lavrei a presente Ata que assino juntamente com os demais membros da banca.

Foz do Iguaçu, 31 de Outubro de 2023.

### Assinaturas:

Natália Soares Teixeira	Hospital Veterinário Popvet	
Flávio Tavares	UNILA	
Kelvinson Fernandes Viana	UNILA	



## AGRADECIMENTOS

Em primeiro lugar, quero expressar minha sincera gratidão à minha amada família. Vocês são meu alicerce e sou extremamente grato todos os dias por tê-los ao meu lado. Cada palavra de incentivo, abraço e apoio que recebi de vocês desempenhou um papel fundamental na minha jornada até aqui. A minha amada mãe, Angela, meu pai Vicente e meu irmão Christian, vocês são minha maior fonte de inspiração, proporcionando suporte de todas as formas possíveis e inimagináveis. Sua presença constante em minha vida foi fundamental para eu chegar até este momento.

Gostaria também de expressar meu profundo agradecimento ao meu querido avô Félix, que infelizmente não está mais entre nós após a pandemia de Covid-19. Ele foi um pilar para a escolha deste trabalho e sua partida, embora dolorosa, não me afastou do mundo da virologia. Pelo contrário, sua ausência me inspirou a me dedicar ainda mais e a me tornar um profissional comprometido na área. Espero, no futuro, contribuir para o estudo e combate de futuras doenças, honrando a memória do meu amado avô.

Não posso deixar de expressar minha profunda gratidão ao meu orientador, professor Kelvinson Fernandes Viana. Agradeço por acreditar em mim, por sua paciência e por me proporcionar a oportunidade de trabalhar no laboratório, dedicando-me à minha área de pesquisa. Sua orientação e apoio foram fundamentais para o desenvolvimento deste trabalho e para o meu crescimento acadêmico e profissional.

À minha querida amiga Valeria Maciel, quero expressar minha gratidão pelo apoio incondicional que você me deu ao longo desse processo. Sua ajuda e contribuição foram inestimáveis não apenas para o trabalho em si, mas também para a minha vida na faculdade e pessoal. Você me deu forças e fez com que eu sorrisse nos momentos em que mais precisei.

Agradeço também à minha amiga Laura Reis, que trouxe felicidade em meio ao estresse e à preocupação que enfrentei ao longo do curso. Sua companhia foi e continua sendo muito especial para mim. Você tem um lugar especial no meu coração e sou grato por todas as memórias compartilhadas.

Não posso deixar de mencionar com carinho a Adrieli Barboza de Souza e o Angelo Vidal. Sua companhia, conhecimento e disposição em me ajudar no laboratório, especialmente nos momentos de dúvida, foram essenciais para a realização dos experimentos e para o sucesso deste trabalho.

Aos professores que compuseram a minha banca, quero expressar minha gratidão

especial. O fato de vocês terem dedicado seu tempo para revisar meu trabalho significa muito para mim. Vocês são professores que deixaram uma marca indelével em minha trajetória na biologia, expandindo minha perspectiva nas áreas celular, microbiológica e molecular.

Por fim, quero expressar minha gratidão a todos os professores do meu curso. Vocês acompanharam minha jornada ao longo do caminho, dedicando-se ao conhecimento e proporcionando experiências valiosas ao longo desses cinco anos. Agradeço de coração.

RAMOS URIA, Jorge Ignacio. **ANÁLISE DA INFECTIVIDADE DO VÍRUS PARAINFLUENZA BOVINA TIPO 3 EM LINHAGEM CELULAR.** 43 Páginas. Trabalho de Conclusão de Curso II (Ciências Biológicas – Ecologia e Biodiversidade) – Universidade Federal da Integração Latino-Americana, Foz do Iguaçu, 2023.

### RESUMO

O vírus bPIV-3 pertence à família Paramyxoviridae, sendo notório por causar diversos sintomas em bovinos infectados, variando de pneumonia a febre de embarque. Essa variação sintomática despertou grande interesse na área veterinária, especialmente na pesquisa de tratamentos e vacinas, devido ao impacto direto na produção pecuária brasileira. Essa infecção resulta em perdas econômicas significativas para os fazendeiros, decorrentes dos custos de tratamento e das medidas necessárias para conter a disseminação do vírus. Portanto, a compreensão da capacidade infecciosa desse vírus é essencial para o desenvolvimento eficaz de tratamentos. Assim, este trabalho procura analisar a capacidade infecciosa do vírus bPIV-3, com foco na sua reativação a partir de tecidos celulares e na subsequente infecção de uma nova linhagem celular. Inicialmente, realizou-se o cultivo de células MDBK previamente infectadas e criopreservadas com bPIV-3 em meio RPMI. Para a manutenção do cultivo, foram efetuadas trocas de meio a cada três dias. Paralelamente, coletou-se sangue bovino para o isolamento e extração de células PBMC. O processo de isolamento envolveu várias centrifugações com Ficoll para obter uma separação por gradiente de densidade. Uma vez isoladas, as células PBMC foram contadas na câmara de Neubauer para alcançar a concentração desejada e, em seguida, foram cultivadas em uma placa de cultivo de vinte e quatro poços onde os primeiros quatro poços verticalmente conteriam as células PBMC com meio RPMI. O cultivo prosseguiu até atingir 100% de confluência nos poços. Posteriormente, a amostra viral foi obtida do sobrenadante gerado a partir do cultivo de células MDBK infectadas. No teste de unidades formadoras de placa, foi necessário realizar uma diluição seriada da amostra viral, utilizando 500 µl da mesma. Foram usadas diluições com exponenciais de  $10^{-3}$ ,  $10^{-4}$ ,  $10^{-5}$  e  $10^{-6}$ , a fim de obter placas isoladas. Essas diluições foram aplicadas nos quatro poços do cultivo de células PBMC e aguardou-se um período de sete dias para a formação de placas virais. Após esse prazo, a presença das placas geradas por apoptose foi verificada e os títulos virais foram calculados, evidenciando a capacidade de infecção do vírus após a reativação.

**Palavras-chave:** Cultivo celular; Parainfluenza bovina tipo 3; Infectividade; Títulos virais

RAMOS URIA, Jorge Ignacio. **ANÁLISE DA INFECTIVIDADE DO VÍRUS PARAINFLUENZA BOVINA TIPO 3 EM LINHAGEM CELULAR.** 43 Páginas. Trabalho de Conclusão de Curso II (Ciências Biológicas – Ecologia e Biodiversidade) – Universidade Federal da Integração Latino-Americana, Foz do Iguaçu, 2023.

#### **ABSTRACT**

The bPIV-3 virus belongs to the Paramyxoviridae family and is known for causing various symptoms in infected cattle, ranging from pneumonia to shipping fever. This symptomatic variation has sparked significant interest in the veterinary field, especially in the research of treatments and vaccines, due to its direct impact on Brazilian livestock production. This infection results in significant economic losses for farmers due to treatment costs and the necessary measures to contain the virus's spread. Therefore, understanding the infectious capacity of this virus is crucial for the effective development of treatments. Thus, this study aims to analyze the infectious capacity of the bPIV-3 virus, focusing on its reactivation from cellular tissues and subsequent infection of a new cell lineage. Initially, previously infected and cryopreserved MDBK cells with bPIV-3 were cultured in RPMI medium. For the maintenance of the culture, medium changes were performed every three days. In parallel, bovine blood was collected to isolate and extract PBMCs. The isolation process involved multiple centrifugations with Ficoll to obtain a density gradient separation. Once isolated, PBMCs were counted in a Neubauer chamber to achieve the desired concentration and were then cultured in a twenty-four-well culture plate, with the top four wells containing PBMCs with RPMI medium. The culture continued until it reached 100% confluence in the wells. Subsequently, the viral sample was obtained from the supernatant generated from the culture of infected MDBK cells. In the plaque assay, a serial dilution of the viral sample was necessary, using 500 µl of the sample. Dilutions with exponentials of  $10^{-3}$ ,  $10^{-4}$ ,  $10^{-5}$ , and  $10^{-6}$  were used to obtain isolated plaques. These dilutions were applied to the four wells of the PBMC cell culture, and seven days was waited for the formation of viral plaques. After this period, the presence of plaques generated by apoptosis was verified, and viral titers were calculated, demonstrating the infective capacity of the virus after reactivation.

**Key-words:** Cell culture; Bovine Parainfluenza Type 3; Infectivity; Viral titers



RAMOS URIA, Jorge Ignacio. **ANÁLISE DA INFECTIVIDADE DO VÍRUS PARAINFLUENZA BOVINA TIPO 3 EM LINHAGEM CELULAR.** 43 Páginas. Trabalho de Conclusão de Curso II (Ciências Biológicas – Ecologia e Biodiversidade) – Universidade Federal da Integração Latino-Americana, Foz do Iguaçu, 2023.

### RESÚMEN

El virus bPIV-3 pertenece a la familia Paramyxoviridae y es conocido por causar una variedad de síntomas en el ganado bovino, que van desde neumonía hasta fiebre de embarque. Esta variación en los síntomas ha despertado un gran interés en el campo de la veterinaria, especialmente en la investigación de tratamientos y vacunas, debido a su impacto directo en la producción ganadera en Brasil. Esta infección resulta en pérdidas económicas significativas para los ganaderos, debido a los costos de tratamiento y las medidas necesarias para contener la propagación del virus. Por lo tanto, comprender la capacidad infecciosa de este virus es esencial para desarrollar tratamientos efectivos.

En este trabajo, se busca analizar la capacidad infecciosa del virus bPIV-3, centrándose en su reactivación a partir de tejidos celulares y en la posterior infección de una nueva línea celular. Inicialmente, se realizó el cultivo de células MDBK previamente infectadas y criopreservadas con bPIV-3 en medio RPMI. Para mantener el cultivo, se realizaron cambios de medio cada tres días. Al mismo tiempo, se recogió sangre de ganado bovino para el aislamiento y la extracción de células PBMC. El proceso de aislamiento implicó múltiples centrifugaciones con Ficoll para obtener una separación por gradiente de densidad. Una vez aisladas, las células PBMC se contaron en una cámara de Neubauer para alcanzar la concentración deseada. Luego, se cultivaron en una placa de cultivo de veinticuatro pocillos, donde los primeros cuatro pocillos contenían células PBMC con medio RPMI de manera vertical. El cultivo continuó hasta que los pocillos alcanzaron el 100% de confluencia.

Posteriormente, la muestra viral se obtuvo del sobrenadante generado a partir del cultivo de células MDBK infectadas. En el test de placa, fue necesario realizar una dilución en serie de la muestra viral, utilizando 500 µl de la misma. Se utilizaron diluciones con exponenciales de  $10^{-3}$ ,  $10^{-4}$ ,  $10^{-5}$  y  $10^{-6}$  para obtener placas aisladas. Estas diluciones fueron aplicadas en los cuatro pozos del cultivo de células PBMC y se esperó un período de siete días para la formación de placas virales. Después de este plazo, se verificó la presencia de placas generadas por apoptosis y se calcularon los títulos virales, evidenciando la capacidad infectiva del virus después de la reactivación.

**Palabras calve:** Cultivo celular; Parainfluenza bovina tipo 3; Infectividad; Títulos virales

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

<b>Figura 1 –</b>	Fluxos de trabalho com células PBMC .....	19
<b>Figura 2 –</b>	Separação de PBMC .....	20
<b>Figura 3 –</b>	Materiais de cultivo para células MDBK .....	25
<b>Figura 4 –</b>	Troca de meio para as células MDBK .....	26
<b>Figura 5 –</b>	Tubo Falcon com sangue bovina e ficoll em proporção 1:1 .....	28
<b>Figura 6 –</b>	Separação de PBMC .....	28
<b>Figura 7 –</b>	Formação do pellet .....	29
<b>Figura 8 –</b>	Contagem celular na câmara de Neubauer .....	30
<b>Figura 9 –</b>	Placa de cultivo celular de PBMC .....	31
<b>Figura 10 -</b>	Formação de placas virais nos poços de cultura de PBMC .....	34

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1</b> – Contagem de células em quatro quadrantes da câmara de Neubauer	30
<b>Tabela 2</b> – Número de placas virais contadas	33
<b>Tabela 3</b> – Cálculo de PFU/ml das diluições correspondentes.	35

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ABNT	Associação Brasileira de Normas Técnicas
ACD	Ácido Cítrico Dextrosa
BHV-1	Herpesvírus bovino tipo 1
bPIV-3	Vírus da parainfluenza bovina tipo 3
BoHV-1	Alphaherpesvirus-1
BRSV	Doença respiratória e sincicial bovina
BVDV	Vírus da diarreia bovina tipo 3
CD25	Grupo de diferenciação 25
CD44	Grupo de diferenciação 44
CD69	Grupo de diferenciação 69
CRB	Complexo de doenças respiratórias de bovinos
DMEM	Meio Modificado de Águia de Dulbecco
DMSO	Dimetilsulfóxido
DNA	Ácido desoxirribonucleico
EDTA	Ácido etilendiaminotetraacético
ELISA	Ensaio de imunoabsorção ligado a enzimas
ELISPOT	Do inglês: Enzyme-Linked ImmunoSpot
FBS	Soro fetal Bovino
ICS	Coloração intracelular de citocinas
ICTV	Do inglês: International Committee on Taxonomy of Viruses
IgG	Inmunoglobina G
MDBK	Do inglês: Madin-Darby Bovine Kidney Cells
ml	Mililitros
MOI	Multiplicidade de Infecção
mRNA	RNA mensageiro
PBMC	Células sanguíneas uninucleadas periféricas
PBS	Solução Salina Tamponada com Fosfato
PCR	Reação em Cadeia da Polimerase
RT-PCR	Reação em Cadeia da Polimerase com Transcrição Reversa
PFU	Unidades formadoras de placa

pH	Potencial hidrogeniônico
PIB	Produto interno bruto
RNA	Ácido ribonucleico
rpm	Rotação por minuto
RPMI	Do inglês: Roswell Park Memorial Institute
NK	Natural Killer
UV	Radiação ultravioleta
°C	Graus Celsius
CO <sub>2</sub>	Dióxido de Carbono
μl	Microlitros

## SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO .....	13
2 REFERENCIAL TEÓRICO .....	15
2.1 PARAMYXOVÍRUS E B-PIV-3.....	15
2.2 CULTIVO CELULAR.....	15
2.3 LINHAGEM MDBK.....	17
2.4 CELULAS MONONUCLEARES DE SANGUE PERIFERICO (PBMC).....	17
2.5 INFECTIVIDADE .....	21
2.6 ENSAIO DE PLACA .....	21
3 OBJETIVOS .....	24
3.1 OBJETIVO GERAL.....	24
3.2 OBJETIVOS ESPECIFICOS .....	24
4 METODOLOGIA.....	25
4.1 LOCAL DA PESQUICA .....	25
4.2 CULTIVO DE CELULAS MDBK.....	25
4.3 ISOLAMENTO DE PBMC.....	27
4.4 CONTAGEM CELULAR E CULTIVO DE CELULAS PBMC .....	29
4.5 ENSAIO DE PLACA.....	31
5 RESULTADOS.....	33
6 DISCUSSION .....	36
7 CONSIDERACOES FINAIS .....	39
REFERÊNCIAS.....	40

## 1 INTRODUÇÃO

No Brasil a relevância econômica proveniente da pecuária é muito importante, sendo que o país é um dos principais na produção e comércio de carne bovina no mundo, representando 6% do PIB brasileiro, sendo um reflexo de uma elevada produtividade e qualidade do produto brasileiro (DA COSTA GOMES; FEIJÓ; CHIARI, 2017).

Conseqüentemente, uma causa importante de morbidade, mortalidade e perdas econômicas em sistemas pecuários existentes é o complexo das doenças respiratórias de bovinos (CRB) que está associada a vários agentes patogênicos (BETANCUR HURTADO; ORREGO URIBE; GONZÁLEZ TOUS, 2010). Os prejuízos na economia gerados pela CRB vêm da infecção do trato respiratório dos animais, usualmente em animais jovens, gerando perdas significativas de peso, e gasto adicional em medicamentos para o tratamento (HEIDMANN; DO NACIMENTO; DE CASTRO, 2021).

O CRB pode ter origem viral, bacteriana ou pode ser o resultado de uma associação entre ambos, esta doença, podendo atuar de maneira isolada ou associada, assim como de forma primária ou secundária. Dentre os agentes infecciosos dos agentes virais mais relevantes temos, o vírus da doença respiratória e sincicial bovina (BRSV), e vírus da parainfluenza bovina tipo 3 (bPIV-3), herpesvírus bovino tipo 1 (BHV-1) e o vírus da diarreia viral bovina (BVDV) (HEIDMANN; DO NACIMENTO; DE CASTRO, 2021).

O vírus da parainfluenza bovino tipo 3 (bPIV-3) é um vírus pertencente à família Paramyxoviridae e ao gênero Paramyxovirus. (HEIDMANN; DO NACIMENTO; DE CASTRO, 2021). Este vírus está conformado por uma nucleocápside proteica e um genoma dado por uma cadeia simples de RNA, o vírus realiza sua transmissão por via aerógena por meio de gotículas contaminadas pelo patógeno. Este vírus de RNA é amplamente estudado por seu efeito em bovinos devido aos sintomas associados a ele, podendo causar problemas pulmonares, já que infecta macrófagos broncoalveolares e é mais propenso a ter efeitos imunossupressores no sistema imunológico bovino. Esta doença está associada a possíveis mudanças bruscas de temperatura, umidade relativa do ar, qualidade do ar e outros fatores que podem comprometer o sistema imunológico do indivíduo, apresentando secreções nasais fluidas nos primeiros dias (ELLIS, 2001).

Os efeitos das infecções respiratórias geradas por este vírus em ovinos e bovinos são variados, experimentalmente é caracterizado por febre, lacrimejamento, descarga nasal se-

rosa abundante, depressão, dispneia e tosse. Vários dos animais infectados apresentam sinais clínicos mais leves, levando a uma recuperação em poucos dias. Assim a doença é caracterizada por baixa morbidade e com rara mortalidade, sendo a faixa etária mais afetada indivíduos jovens de dois meses de idade. Taxas de morbidade e mortalidade mais elevadas são associados a casos de coinfeções com agentes virais ou bacterianos (HEIDMANN; DO NACIMENTO; DE CASTRO, 2021).

Consequentemente a infectividade é um fator de extrema importância dado o grau de patogenicidade que pode corresponder ao vírus, pois espera-se que o vírus mantenha a infectividade ao longo da replicação. Para esta análise utilizamos a linhagem celular MDBK (Madin-Darby Bovine Kidney Cells), que são células imortais, aderentes por natureza na presença de soro fetal bovino e são amplamente estudada para seu uso relacionado a estudos médicos de virologia e produção de vacinas pela semelhança a células bovinas in vivo (MADIN; DARBY, 1958). Outra linhagem celular utilizada foram as células mononucleares de sangue periférico (PBMC) extraídas de sangue bovino que contêm células com núcleos redondos correspondentes a leucócitos, como linfócitos, monócitos, células NK (natural killer) e células dendríticas que são separadas do plasma e células polimorfonucleares por meio de uma centrifugação gradual (KLEIVELAND, 2015).

Para apresentar se a infectividade do vírus foi mantida de uma linhagem para outra, realizou-se um cultivo de células MDBK infectadas com bPIV-3 para a reativação do vírus e o crescimento do mesmo em garrafas de cultivo celular. Posteriormente realizou-se o isolamento de células PBMC obtidas de uma amostra de sangue bovino, e se realizou o cultivo das células. Uma vez ambas culturas estavam preparadas coletou-se o sobrenadante, contendo a amostra viral do cultivo de células MDBK, e foi realizada uma diluição seriada correspondente ao ensaio de placa para contagem viral, finalmente as diferentes diluições da amostra viral foram inseridas nos poços da placa de cultivo de células PBMC. Após sete dias foi conferido a formação de títulos virais para conferir se a infectividade do vírus bPIV-3 foi mantida.



## 2 REFERENCIAL TEÓRICO

### 2.1 PARAMYXOVÍRUS E b-PIV-3

Os Paramyxovírus são vírus correspondentes à família Paramyxoviridae, são pleomórficos com formas esferoidais, onde sua partícula viral é composta por seu nucleocapsídeo proteico e seu genoma é dado por uma cadeia simples de RNA com polaridade negativa que codifica seis proteínas estruturais e duas não estruturais por meio da transcrição da RNA-polimerase do virion, formando seis mRNA (MOREDO; LARSEN; STANCHI, 2018). A infecção se refere à colonização ou invasão do hospedeiro por meio de microrganismos patogênicos (TORTORA; FUNKE; CASE, 2005). Dessa forma, os Paramyxovírus costumam realizar sua transmissão por via aerógena com o uso de gotículas contaminadas pelo patógeno. Uma vez que atingem o trato respiratório e o tecido linfático associado a mucosa, replicam-se até atingir os pulmões e brônquios pelas vias aéreas, permitindo, após maiores replicações, sua disseminação por todo o corpo através do sangue (MOREDO; LARSEN; STANCHI, 2018).

No que diz respeito à patogênese do vírus da Parainfluenza de tipo 3 Bovina, a bPIV-3 afeta o epitélio alveolar e utiliza macrófagos como células hospedeiras para sua replicação, atribuindo um efeito negativo ao mecanismo mucociliar. Isso permite que as bactérias floresçam na região e gerem possíveis infecções, dando lugar à febre de embarque (GÓMEZ, 2015). O vírus foi isolado pela primeira vez nos Estados Unidos apresentando sintomas de febre de embarque. No entanto, é conhecido que os sintomas gerados podem ser febre, lacrimejamento, descarga nasal serosa abundante, depressão, dispneia, tosse e até pneumonia intersticial. O tempo de incubação varia de 5 a 10 dias, com transmissão por contato direto ou indireto de gotículas no ar provenientes de secreções nasais, afetando principalmente animais entre dois a cinco meses ou animais em espaços pouco ventilados (HEIDMANN; DO NASCIMENTO, 2021).

A parainfluenza tipo 3 é um vírus que foi classificado pelo ICTV (International Committee on Taxonomy of Viruses, ICTV, 2018) dentro do gênero Respirivirus e corresponde à família Paramyxoviridae como parte da ordem Mononegavirales. Por pertencer ao gênero Respirivirus, seu mecanismo de replicação viral se deve ao reconhecimento dado pela proteína âncora viral e à união de receptores celulares do hospedeiro que contêm ácido siálico com as partículas virais (MOREDO; LARSEN; STANCHI, 2018).

A parainfluenza tipo 3 (bPIV-3) é caracterizada por alta morbidade e baixa mortalidade e, por sua vez, possui células bovinas (ocasionalmente bovinos e ovinos) como hospedeiro e reservatório, permitindo uma distribuição geográfica quase global do vírus (GÓMEZ, 2015). Alguns meios de controle contra esse vírus (profilaxia) são o uso de vacinas atenuadas e inativadas para aplicação parenteral, controle da entrada de animais e redução de fatores que afetam o sistema imunológico dos bovinos, como o estresse. Às vezes, os antibióticos são usados como tratamento apenas no caso de uma complicação bacteriana secundária (MOREDO; LARSEN; STANCHI, 2018).

## 2.2 CULTIVO CELULAR

A cultura celular de tecidos animais é um processo que implica o isolamento de células amplamente diversificadas, prevendo o crescimento de células de tecidos e órgãos em um ambiente artificial que simula as condições naturais. Existem muitos tipos celulares que podem ser cultivados e de diferentes tecidos como tecidos conjuntivos, fibroblastos, esqueléticos, cardíacos, tecidos epiteliais, músculo liso, células neurais, células endócrinas e muitos tipos de células tumorais (CHANDRA, 2022).

O cultivo *in vitro* tem se tornado um método valioso e amplamente utilizado em estudos biológicos e médicos por sua importância no crescimento e estudo de células em um ambiente controlado fora do seu organismo de origem. O cultivo *in vitro* consiste na manutenção e propagação de células em um recipiente de cultivo, sendo o mais utilizado uma placa de cultivo ou uma garrafa com a capacidade de fornecer nutrientes, fatores de crescimento e condições adequadas para a sobrevivência e proliferação das células. Na cultura celular *in vitro*, as células são extraídas de um tecido ou organismo e colocadas em um meio de cultivo que contém uma solução nutritiva que fornece os nutrientes essenciais para o crescimento celular, como aminoácidos, vitaminas, minerais e glicose. Além disso, o meio de cultivo pode conter soro fetal bovino ou outros suplementos que fornecem fatores de crescimento e hormônios necessários para o crescimento celular ideal (HELGASON; MILLER, 2005; RYAN, 2008).

Inúmeras vantagens são geradas pelo cultivo celular para a pesquisa, permitindo como anteriormente mencionado o estudo de células em um ambiente controlado, o que facilita a observação dos efeitos de diferentes condições experimentais ou substâncias nas células. Além disso, fornece uma fonte abundante de células para realizar experimentos e ensaios, evitando assim a necessidade de utilizar animais vivos em determinadas etapas de

investigação. Também permite a realização de experimentos mais precisos e repetíveis, já que as células cultivadas *in vitro* podem ser submetidas a condições experimentais idênticas.

Outras vantagens das técnicas de cultivo celular *in vitro* são relevantes no avanço de numerosos campos da biologia e da medicina. Permitindo o estudo detalhado dos botões celulares e moleculares, a identificação de novas terapias e fármacos, a produção de proteínas recombinantes, a engenharia de tecidos e órgãos, entre outros. Além disso, a cultura celular *in vitro* tem sido uma ferramenta inestimável para compreender e combater doenças neurodegenerativas e terapia celular (ALVES, 2010)

Existem diferentes tipos de cultivos celulares *in vitro*, como os cultivos primários, que se obtêm diretamente de um tecido fresco, e as linhas celulares, que são células que foram cultivadas durante várias gerações e se tornaram imortais no laboratório. Além disso, pode-se utilizar diferentes técnicas de cultivo celular, como o cultivo em monocamadas, onde as células aderem a uma superfície plana, ou o cultivo em suspensão, onde as células se mantêm em um meio líquido sem aderir a nenhuma superfície. (ALVES, 2010; RYAN 2008)

### 2.3 LINHAGEM MDBK

As células MDBK (Madin-Darby Bovine Kidney) são uma linha celular derivada de tecido de rim bovino. Estas células foram obtidas pela primeira vez em 1958 pelos pesquisadores Madin e Darby a partir de rins de bezerros saudáveis. As células MDBK têm sido amplamente utilizadas em estudos de pesquisa em biologia e medicina devido à sua capacidade de proliferação e à sua semelhança com células renais bovinas *in vivo*. As células MDBK são aderentes por natureza em meio que contém soro fetal bovino (WANG, 2021). Estas células são uma linhagem celular imortalizada amplamente utilizada para diagnóstico sorológico de doenças virais em bovinos, que reduz o diagnóstico por vírus-neutralização em vírus como alphaherpesvirus-1 (BoHV-1) e diarreia viral bovina (BVDV) (NETO; VJ CARNEIRO, 2015).

As células MDBK são usadas como um modelo *in vitro* para investigar uma variedade de processos biológicos e doenças. Por exemplo, um estudo publicado na revista "Vaccines" em 2021 menciona como a linhagem celular é usada para a produção de vacinas de alphaherpesvirus-1 bovino (BoHV-1), e a linhagem celular é escolhida sobre outras pela facilidade de subcultivo que proporcionam e pela rapidez de produção na hora de realizar vacinas, reduzindo o custo de produção (WANG, 2021).

Além disso, as células MDBK também têm sido utilizadas nas análises e produção de vacinas. Um estudo publicado na “Pesquisa Veterinária Brasileira” em 2002 descreveu o uso de vacinas para testar a proteção fetal contra o vírus da diarreia viral bovina usando células MDBK para produção de antígeno viral. No contexto inserido, podemos observar que as células MDBK são uma linha celular derivada do rim bovino amplamente utilizada em pesquisas biológicas e biomédicas para estudar processos celulares, doenças virais e bacterianas, bem como para produção de vacinas (BRUM, 2002).

#### 2.4 CELULAS MONONUCLEARES DE SANGUE PERIFERICO (PBMC)

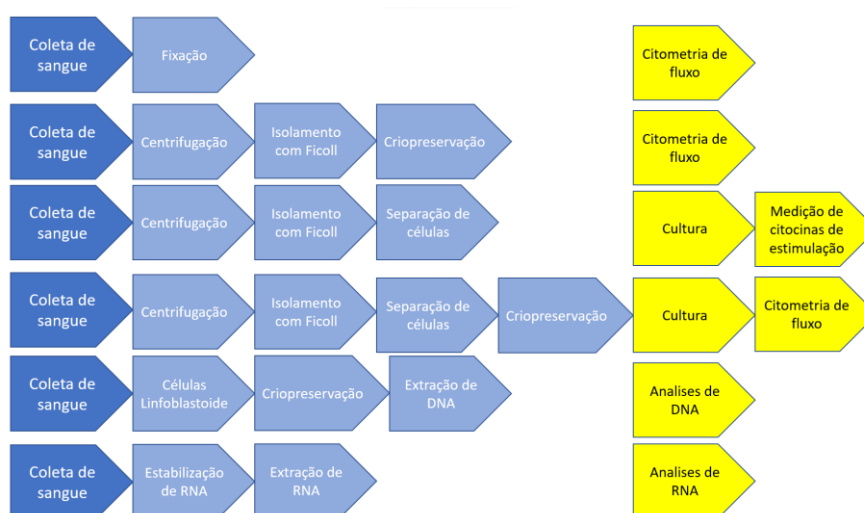
A cultura de células PBMC (Células Mononucleares do Sangue Periférico) é uma ferramenta valiosa na pesquisa biomédica, particularmente em estudos de imunologia e virologia. As PBMC são uma população heterogênea de células imunes que circulam na corrente sanguínea e desempenham um papel crucial na resposta imune contra patógenos. Estas incluem todos os leucócitos mononucleares, como linfócitos, monócitos, células NK (natural killer), células dendríticas, tendo em comum a presença de um núcleo redondo. Estas células podem ser extraídas do sangue por meio de um polissacarídeo hidrofílico chamado ficoll, que separa as camadas de sangue por meio de centrifugação em gradiente, permitindo a obtenção de uma camada superior de plasma, a segunda com as PBMC e a camada inferior contendo células polimorfonucleares que são removidas como eritrócitos e granulócitos (KLEIVELAND, 2015).

A maioria das PBMC são células em repouso sem funções efetoras, já que existe uma ausência de uma resposta imune contínua. Um exemplo são as células T que correspondem à maior fração das PBMC quando isoladas. Estas células T são virgens (se encontram na fase G0) ou de memória, o que significa que apresentam a ausência de marcadores de ativação como CD25, CD44 ou CD69, e não encontram seu antígeno cognato (KLEIVELAND, 2015). Assim, a avaliação em células mononucleares do sangue periférico (PBMC) é um método que oferece vantagens para a avaliação da imunocompetência ou estado de resposta específica (SIUCE, 2021). No entanto, cabe ressaltar que em alguns casos, como as células B que também fazem parte das células PBMC virgens, se apresentam com receptores de antígeno ancorados, que podem ativar a célula B se encontrar um antígeno e, conseqüentemente, se diferenciar em uma célula capaz de produzir anticorpos (KLEIVELAND, 2015).

A avaliação da resposta imune pela imunocompetência das PBMC tem sido utilizada para vários grupos animais, como em camelos e alpacas, tanto para avaliação da resposta

imune contra imunógenos bacterianos ou proteínas simples quanto para avaliação de vacinas. Assim, em bovinos, utilizando a mesma metodologia, avaliou-se a capacidade de resistência e/ou suscetibilidade a doenças de algumas raças (SIUCE, 2021).

Entre as aplicações das PBMC, o uso destas células, sejam elas íntegras ou processadas de alguma forma (como classificadas ou transformadas), é sempre direcionado a fins analíticos, alimentando duas categorias de testes. A primeira categoria abrange ensaios que não exigem células viáveis, como análises genéticas baseadas em DNA e análises de expressão gênica baseadas em RNA. A segunda categoria engloba ensaios que requerem células intactas ou viáveis, como imunofenotipagem e ensaios funcionais. Os ensaios funcionais abrangem uma variedade de testes, como ensaios de radiosensibilidade em linhagens celulares de linfócitos B imortalizados, análise baseada em cromossomos para detecção de genotoxicidade, monitoramento da atividade autofágica, ensaios de quimiotaxia, ensaios de citotoxicidade por células natural killer (NK), avaliação de recrutamento de leucócitos e interações adesivas com células endoteliais, ensaios de supressão imunológica, além de ensaios que avaliam a resposta específica ao antígeno, como ensaios de proliferação de linfócitos, coloração intracelular de citocinas (ICS) e ensaios imunoenzimáticos (ELISPOT) que servem para estudos de vacinas, permitindo a quantificação de células B secretoras de IgG, a avaliação da atividade de células B de memória e frequências relativas e as assinaturas de citocinas de células T (Figura 1) (BETSOU 2019).

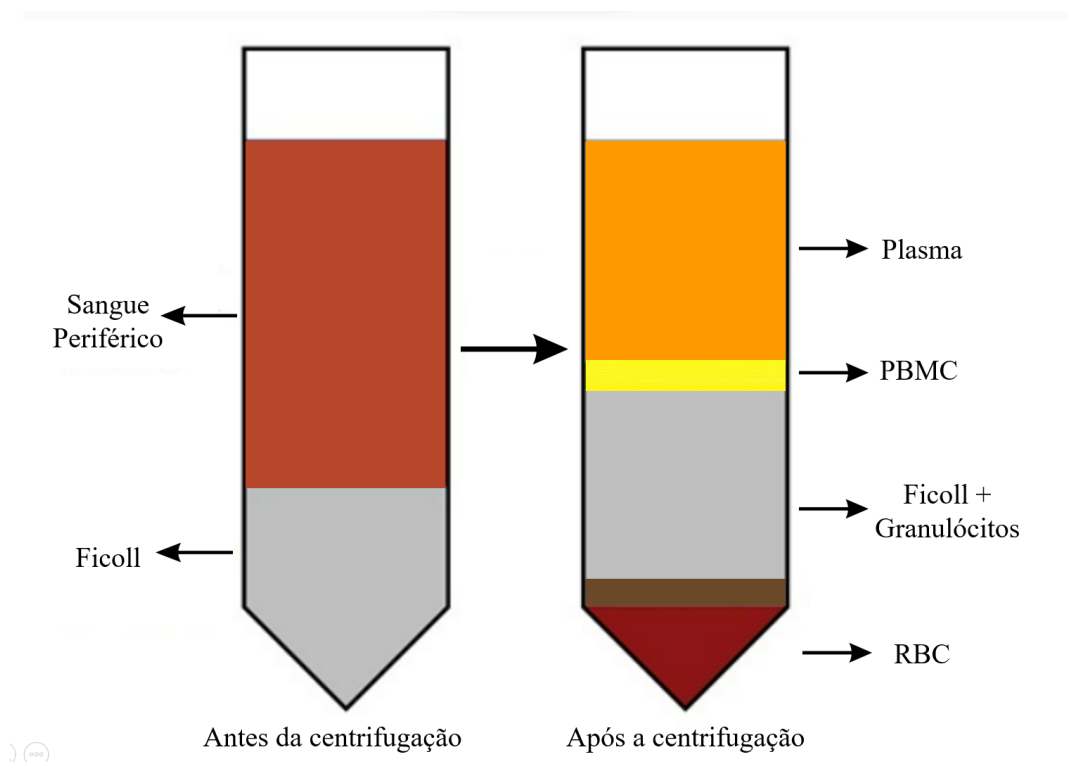


**Figura 1** - Exemplos de fluxos de trabalho com células PBMC, mostrando a distinção entre métodos analíticos e de processamento desde a coleta de sangue. Apresentando a saída dos métodos de processamento (azul) e a entrada dos métodos analíticos (amarelo) desde a coleta de sangue. Fonte:

Adaptado de BETSOU, 2019.

O isolamento e cultivo das PBMC são realizados em várias etapas para a obtenção funcional destas células, aproveitando a diferença de densidade celular dos componentes do sangue. Primeiramente, amostras de sangue são coletadas de doadores bovinos usando técnicas estéreis. Anticoagulantes, como heparina, EDTA ou ACD, são adicionados para prevenir a coagulação do sangue. Estes anticoagulantes mostram ter diferenças pouco significativas para recuperação e viabilidade de PBMC em um retardo de pré-centrifugação de 24 horas (BETSOU 2019).

O sangue é então processado para separar as PBMC de outros componentes do sangue, como glóbulos vermelhos e granulócitos. O método mais usado para isolar PBMC é a centrifugação em gradiente de densidade. A amostra de sangue é cuidadosamente colocada em um meio de gradiente de densidade, com Ficoll, em um tubo de centrífuga. Após a centrifugação, as PBMC formam uma camada distinta acima do meio de gradiente de densidade, permitindo seu isolamento. A camada de PBMC é então coletada, lavada e ressuspensa em um meio de cultura apropriado (Figura 2) (RIEDHAMMER; HALBRITTER; WEISSERT, 2016).



**Figura 2** - Separação das PBMC por meio da centrifugação com ficoll por um gradiente de densidade. Fonte: Elaborado pelo autor, 2023.

O meio de cultura usualmente usado em estudos com células PBMC é o meio RPMI-1640, suplementado com antibióticos, fatores de crescimento e soro fetal bovino (SFB), que fornece diferentes nutrientes e fatores necessários para o crescimento e viabilidade das células PBMC. Antibióticos são adicionados para prevenir a contaminação bacteriana, enquanto fatores de crescimento, como interleucinas ou citocinas, podem ser incluídos para apoiar funções celulares específicas ou promover respostas imunes (RIEDHAMMER; HALBRITTER; WEISSERT, 2016).

Uma vez que as células PBMC são ressuspensas no meio de cultura, elas são semeadas em vasos de cultura de tecidos, como placas de Petri ou placas multipoços. As células são então incubadas a uma temperatura controlada (geralmente 37°C) em um ambiente umidificado com 5% de CO<sub>2</sub> (RIEDHAMMER; HALBRITTER; WEISSERT, 2016).

## 2.5 INFECTIVIDADE

A infectividade é a capacidade de um agente infeccioso causar uma nova infecção em um hospedeiro suscetível, o que é extremamente importante, já que para o agente infeccioso se estabelecer em um novo indivíduo e garantir a sobrevivência de sua espécie, é necessário constantemente encontrar e infectar novos indivíduos suscetíveis (BARRETO; TEIXEIRA; CARMO, 2006). Portanto, a infectividade não é absoluta porque depende pelo menos de dois fatores extrínsecos: o hospedeiro e a presença de outros vírus (SAN-JUÁN, 2018).

Quando esse agente consegue ter um contato eficiente após a transferência eficaz até o hospedeiro, ocorre a infecção. No entanto, um dos fatores que influenciam o surgimento e a gravidade da doença é a dose infecciosa, referente ao número de unidades de agente infeccioso necessário para causar a doença. No entanto, quando um agente é transmitido a um novo hospedeiro, a ocorrência ou não da doença depende de muitos fatores além da dose de infecção, sendo um dos mais importantes a suscetibilidade (BARRETO; TEIXEIRA; CARMO, 2006).

Outros fatores que são importantes para o sucesso da invasão de um agente dependem de um grande número de fatores relativos ao hospedeiro. Parâmetros como a genética, a idade, o sexo, o estado nutricional e a exposição anterior ao agente têm um efeito no resultado do desenvolvimento da resistência do hospedeiro dada pela imunidade do mesmo (BARRETO; TEIXEIRA; CARMO, 2006).

Para a pesquisa com vírus, tradicionalmente se conhece como o agente considerado a unidade de infectividade mínima os vírions ou partículas virais. No entanto, a maioria de

vírions geralmente não são infecciosos. Os títulos virais obtidos a partir do ensaio de unidades formadoras de placa (PFU) representam as partículas infecciosas, que são dezenas ou até centenas de vezes menores do número total de partículas virais em uma dada suspensão. A presença de altas quantidades de vírions e poucas PFU usualmente é atribuída à ausência de algum material genético dentro do vírion, defeitos estruturais na cápside e/ou envelope, ou mutações letais (SANJUÁN, 2018).

## 2.6 ENSAIO DE PLACA

O ensaio de placa é conhecido amplamente pela contribuição para estudos de virologia; este foi desenvolvido por d'Herelle em 1915-1917 em estudos com bacteriófagos (JAMES; JD, 2017). O ensaio de placa é um método comum usado como ensaio de infectividade; consiste na contagem de "centros infecciosos" discretos. Para realizar essa contagem, são usadas amostras contendo vírus, que são diluídas em série, e alíquotas de cada diluição são adicionadas a uma placa de cultura celular (ou uma folha de planta no caso de um vírus de planta) (PAYNE, 2017). As células infectadas pelo vírus irão apresentar lise celular e acabarão espalhando a infecção para as células adjacentes; eventualmente, a repetição do ciclo de infecção até a lise irá formar uma placa visível. Observe-se que o ensaio de placa é restrito aos vírus que induzem lise ou morte celular, como picornavírus, vírus influenza e herpesvírus (WANG-SHICK, 2017).

Assim, o objetivo de realizar as diluições seriadas é atingir um número contável de placas na monocamada celular, porque se houver muitas partículas infecciosas presentes, muito possivelmente as células individuais estarão infectadas com mais de um vírus, ou as placas individuais podem se fundir e formar grandes áreas sem células. Além disso, os gráficos apresentando o número de placas versus o fator de diluição são lineares se um vírion for suficiente para iniciar um ciclo de replicação (PAYNE, 2017).

Os resultados dos ensaios de placa são relatados como unidades formadoras de placa (PFU) por volume de medida, que geralmente é dada em ml (PAYNE, 2017). Esse resultado representa o número de partículas infecciosas na amostra, assumindo que cada placa é causada por uma única partícula viral infecciosa (WANG-SHICK, 2017). Mas devemos ressaltar que o termo PFU reconhece que não podemos saber com certeza se as placas visualizadas foram formadas por infecção com um único vírus de interesse. No entanto, o PFU também está associado às mudanças no cultivo, como o tipo de meio, concentração de íons no meio, tipo de célula hospedeira e pH, que afetam a concentração do vírus no meio (PAYNE, 2017). Também devemos ter em consideração que o teste também possui certas limitações; entre



estas, encontramos a existência de um período de espera significativo para o desenvolvimento das placas visíveis, levando de 4 a 10 dias para se desenvolverem, dependendo do vírus. Outra desvantagem é que a contagem das placas também induz erro humano e apresenta variação do operador; ainda o uso da contagem digital seja mais rápida e consistente, a pontuação da máquina nem sempre identifica as placas com precisão (DULBECCO; VOGT, 1953).

Outra unidade de medida usada como unidades de títulos virais é o MOI, que se refere ao número de partículas de vírus carregadas por célula para o experimento de infecção, onde um MOI baixo é usado para o experimento onde apenas um subconjunto de células precisa ser infectado. Em contraste, MOI alto é usado para o experimento onde a grande maioria das células precisa ser infectada (WANG-SHICK, 2017).

### **3 OBJETIVOS**

#### **3.1 OBJETIVO GERAL**

Determinar se a infectividade do vírus bPIV-3, que afeta tanto bovinos como ovinos, é mantida após a reativação e a passagem de uma linhagem para outra.

#### **3.2 OBJETIVOS ESPECIFICOS**

- Desenvolver o uso do teste de placa como uma ferramenta para determinar se a infectividade do vírus bPIV-3 é mantida ao longo do tempo.
- Padronizar a técnica de cultivo celular utilizando duas linhagens de células provenientes de diferentes tecidos bovinos.

## 4 METODOLOGIA

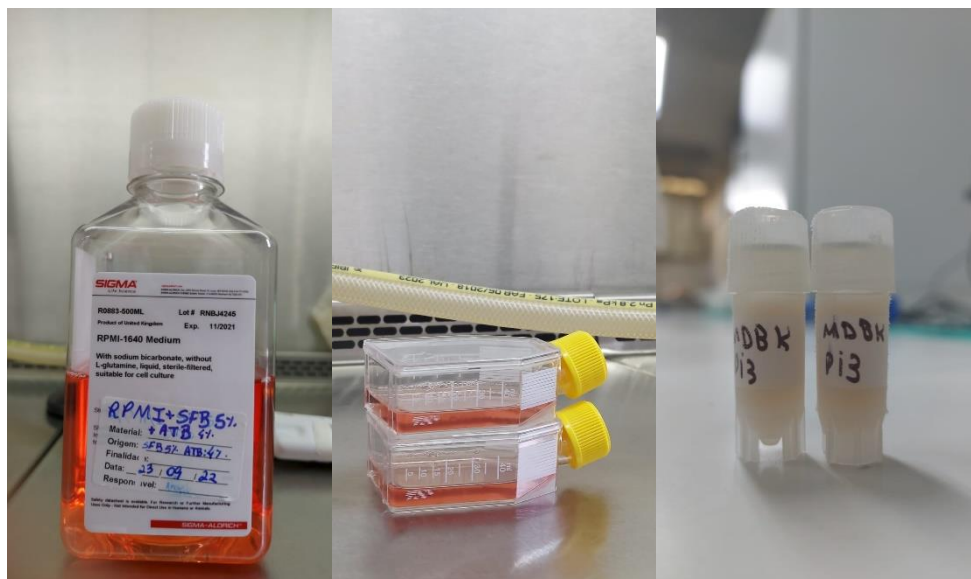
### 4.1 LOCAL DA PESQUICA

O local de execução do projeto de pesquisa foi o Laboratório de Bioquímica e Microbiologia, localizado no campus: Jardim Universitário da UNILA (Universidade Federal da Integração Latino-Americana), em Foz do Iguaçu, PR. O presente estudo se figura como uma pesquisa de tipo experimental.

### 4.2 CULTIVO DE CELULAS MDBK

As células renais bovinas MDBK infectadas com o vírus bPIV-3 foram fornecidas pelo Laboratório de Bioquímica e Microbiologia da UNILA. Após o descongelamento, as células foram transferidas para duas garrafas estéreis de crescimento celular de 50 ml<sup>2</sup> contendo 15 ml<sup>2</sup> de meio de cultura RPMI-1640 R0883 da marca SIGMA, que contém incluso soro fetal bovino (5%) e antibióticos (4%).

As garrafas de cultura foram suplementadas com 40% de soro fetal bovino, 20% de meio de cultura RPMI-1640 R0883 e 40% de dimetilsulfóxido (DMSO) para ajudar a taxa de sobrevivência celular após o descongelamento (LENOCH, 2015). Em seguida, as garrafas foram incubadas 37°C, juntamente com 5% de dióxido de carbono (CO<sub>2</sub>), em uma incubadora da marca Heal Force (modelo HF212UV) (Figura 3).



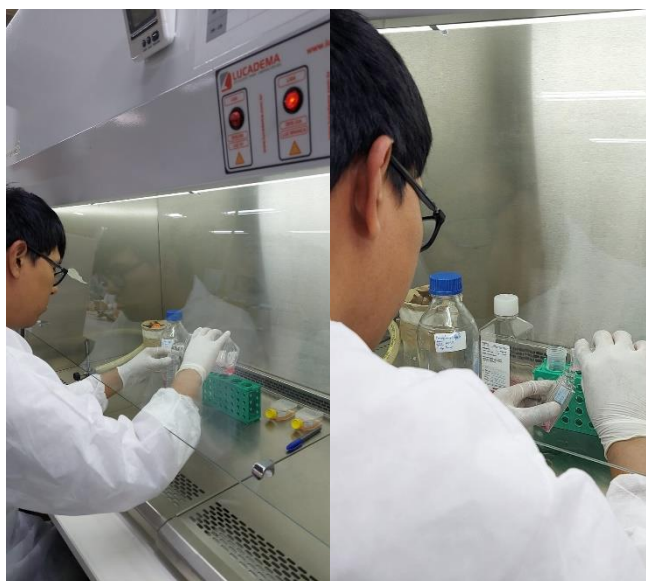
**Figura 3** – Materiais para cultivo de células MDBK infectadas com bPIV-3. Meio RPMI-1640 R0883, garrafas de cultivo e as amostras de células MDBK infectadas com bPIV-3 usadas na metodologia.

Após sete dias, quando as células atingiram 100% de confluência, foi realizada a subcultura com uma proporção de 1:4 utilizando tripsina. A tripsinização foi feita despreendendo as monocamadas de células com uma solução de tripsina a uma concentração de 0,10-0,59%

Para a manutenção das células, um protocolo rigoroso de troca de meio foi seguido, com a substituição sendo realizada a cada três dias. Para esse procedimento, era levado cabine de fluxo laminar os seguintes materiais: tubos Falcon com os respectivos suportes, meio de cultivo RPMI-1640 R0883, antifúngico, um tubo de ensaio Becker para descarte e ponteiros de 1000 µl, além das micropipetas. As garrafas de cultivo contendo as células MDBK de 50 ml<sup>2</sup> eram retiradas cuidadosamente da incubadora Heal Force HF212UV e transportadas para a cabine de fluxo.

Antes de iniciar a troca de meio, um cuidadoso procedimento de esterilização era realizado para garantir a integridade da cultura celular. Se realizou uma limpeza da cabina com álcool 70% e o material era exposto à luz UV por 20 minutos, proporcionando uma eficiente esterilização.

Uma vez os materiais preparados, 20 µl de antifúngico e 30 ml de meio RPMI eram adicionados a um tubo Falcon para serem homogeneizados. Enquanto isso, com extremo cuidado para evitar qualquer risco de contaminação, as tampas das garrafas de cultivo das células MDBK eram removidas. Em seguida, o meio antigo era descartado e substituído por 15 ml do novo meio previamente preparado no tubo Falcon (Figura 4).



**Figura 4** – Troca de meio realizada a cada três dias para as células MDBK.

Com todo o procedimento de troca de meio concluído, as garrafas de cultivo eram cuidadosamente colocadas de volta na incubadora a 37°C, onde permaneciam juntamente com 5% de dióxido de carbono (CO<sub>2</sub>).

#### 4.3 ISOLAMENTO DE PBMC

Para isolar as células PBMC, foi coletado sangue necessário para o processo em quatro tubos de coleta de citrato para posteriormente ser encaminhado ao laboratório para dar continuidade aos procedimentos.

Uma vez no laboratório foram seguidos procedimentos rigorosos de higienização e preparação do equipamento. Inicialmente, realizou-se a limpeza minuciosa de todo o material, usando hipoclorito de sódio e álcool a 70%. Após essa etapa, o material foi introduzido na cabine de fluxo laminar, onde a desinfecção final foi realizada por meio da exposição à luz UV por 20 minutos.

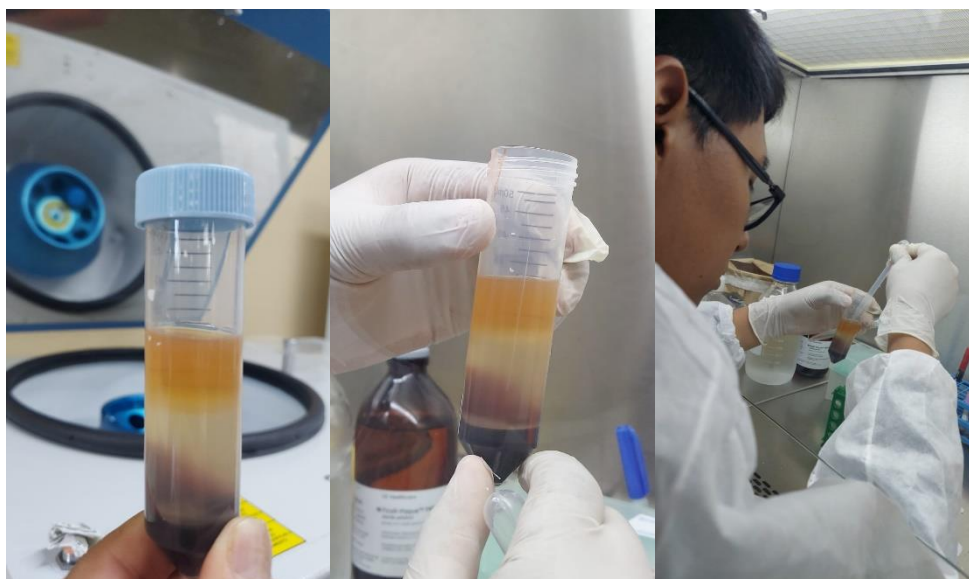
Em seguida, alíquotas específicas foram executadas: 30 ml de PBS estéril foram cuidadosamente transferidos para um tubo Falcon de 50 ml, identificado como "PBS"; e 10 ml de meio RPMI foram aliqüotados para outro tubo Falcon de 15 ml, sendo este identificado como "RPMI".

Com os preparativos anteriores concluídos, as etapas essenciais para o isolamento propriamente dito foram realizadas. Primeiramente, 15 ml de Ficoll foram adicionados a um tubo Falcon de 50 ml. Em seguida, 15 ml de sangue bovino, retirados dos tubos de coleta com citrato, foram cuidadosamente homogeneizados por inversão (8 vezes) e transferidos para o tubo contendo Ficoll (Figura 5). Esse processo foi realizado de maneira gradual e precisa, com o auxílio de uma micropipeta de 1000 µl, enquanto o tubo Falcon era ligeiramente inclinado. Dessa forma, as transferências foram feitas de maneira gradual, garantindo que o sangue se posicionasse na parte superior do tubo, enquanto o Ficoll ocupava a parte inferior, resultando em uma proporção equilibrada de 1:1 entre as duas substâncias. Esse tubo resultante foi então identificado como "PBMC".



**Figura 5** – Tubo Falcon contendo 15 ml de sangue bovina coletada sendo trasladada a um tubo Falcon com 15 ml de Ficoll em uma proporção 1:1 contendo 30 ml totais.

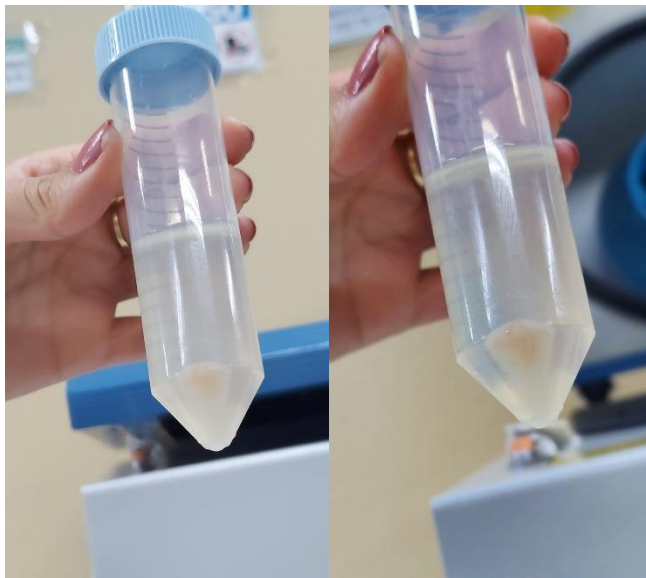
Após essa etapa, o tubo "PBMC" foi manuseado com extrema cautela para evitar qualquer mistura indesejada entre o sangue e o Ficoll. Esse tubo foi transportado para a centrífuga, onde foi submetido a um processo de centrifugação a 1500 rpm e 4°C por um período de 40 minutos. Esse procedimento visou à separação das PBMC e resultou na divisão do conteúdo do tubo em quatro fases claramente distintas. (Figura 6).



**Figura 6** – Separação de PBMC. Tubo denominado "PBMC" contendo Ficoll e o sangue bovino após a centrifugação apresentando a separação de PBMC por gradiente de densidade

A nuvem branca que se formou no meio do Falcon foi a região onde as células de interesse estavam localizadas. Essa região foi separada e coletada usando uma pipeta e transferida para o tubo previamente identificado como "PBS", que continha 30 ml de PBS esterilizado. Esse tubo passou a ser designado como "Lavagem".

O tubo "Lavagem" foi então submetido à centrifugação a 2000 rpm por 10 minutos, a uma temperatura de 4°C (Figura 7). Após cada uma das três repetições desse processo, um pellet se formou no fundo do tubo, acompanhado de sobrenadante. O sobrenadante foi descartado, e em seguida, mais 30 ml de PBS foram adicionados ao tubo. Esse passo foi realizado para desfazer o pellet, utilizando o auxílio de um vórtex. Na terceira repetição, após o descarte do sobrenadante, a ressuspensão foi realizada utilizando 1 ml de meio RPMI-1640 R0883, e o pellet foi homogeneizado com um vórtex até que fosse completamente desfeito. Após esses procedimentos, o tubo foi colocado em gelo e identificado como "PBMC 2".



**Figura 7** – Formação do pellet. Tubo designado “Lavagem” contendo o pellet após a centrifugação a 2000rpm por 10 minutos

#### 4.4 CONTAGEM CELULAR E CULTIVO DE CELULAS PBMC

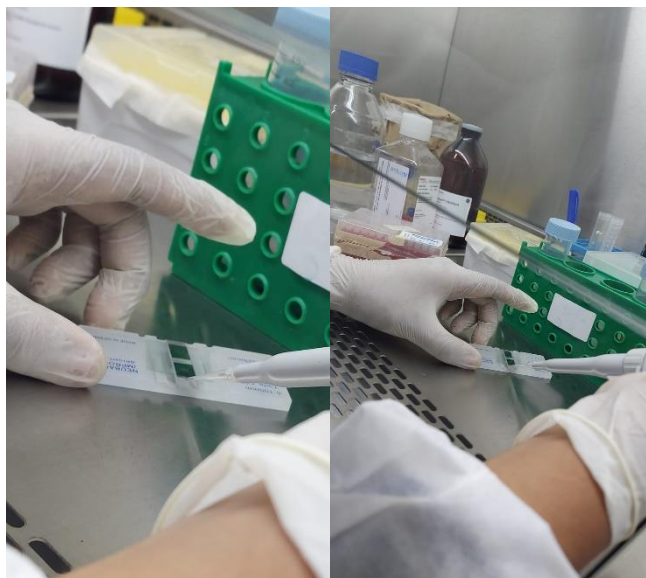
Para a contagem celular foi pipetado 190 µl de PBS em um Eppendorf e foi adicionado 10 µl da solução resuspendida anteriormente no tubo identificado como “PBMC 2”, gerando uma diluição com proporção de 1:20. Posterior a pipetagem o tubo foi homogeneizado.

A câmara de Neubauer é limpada com delicadeza para evitar riscar o vidro, depois é colocada uma lamínula entre a câmara superior e inferior. Depois foi pipetada 10 µl da solução diluída anteriormente embaixo da lamínula na câmara inferior (Figura 8). Finalmente no microscópio, foi realizada a contagem de células nos quadrantes em um aumento de 40x (Tabla 1).

**Tabela 1** – Contagem de células em quatro quadrantes da câmara de Neubauer

Número de células contadas			
Quadrante 1	Quadrante 2	Quadrante 3	Quadrante 4
31	36	15	14
<b>Total de células contadas: 96</b>			

Fonte: Elaborado pelo autor, 2023.



**Figura 8** – 10 µl da solução sendo transferida para a câmara de Neubauer

Depois da contagem foi realizado o cálculo do número total de células por ml levando em consideração que usamos 4 quadrantes contados, um valor de diluição de 1:20 (20) e o fator de correção de 10.000.

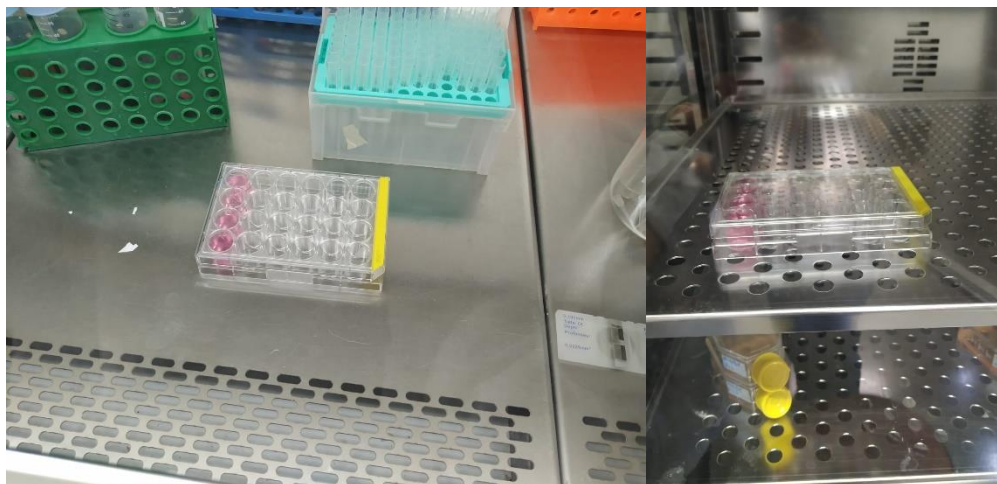
$$96 / 4 \times 20 \times 10.000 = 4.8 \times 10^6 \text{ células/ml}$$



Após saber o número de células por ml realizamos o cálculo para saber quanto da solução de PBMC e meio RPMI devia ser pipetada por poço para que cada poço apresente  $1 \times 10^6$  células.

$$1 \text{ ml} \times 1 \times 10^6 \text{ células} / 4.8 \times 10^6 \text{ células} = 0.20 \text{ ml}$$

Posteriormente para cada poço de cultivo da placa foi pipetado 0.20 ml da solução de PBMC e 1.8 ml de meio RPMI. Finalmente a placa foi levada para a estufa de cultivo a  $37^\circ\text{C}$  e 5% de  $\text{CO}_2$  durante 5 dias para aderência (Figura 9).



**Figura 9** – Placa de cultivo celular com quatro poços, contendo 0,20 ml da solução com as células PBMC e 1,8 ml de meio RPMI.

#### 4.5 ENSAIO DE PLACA

Para o ensaio de placa foi necessário conferir a confluência da placa de cultivo para os quatro poços após os 5 dias de cultivo, uma vez foi observado o 100% de confluência no microscópio invertido (Nikon Ti) foi preparado mais uma vez a cabina de fluxo laminar e a limpeza do material, seguindo os protocolos de higienização e preparação do equipamento, limpando o material com hipoclorito de sódio e álcool a 70%. E realizando a exposição do material a luz UV por 20 minutos dentro do fluxo.

Uma vez preparado o material, foi realizado uma diluição seriada do material viral, para esse proposito foi retirado 500ul do sobrenadante da cultura original de células MDBK em um tubo Eppendorf. Este tubo foi identificado como bPIV-3

Posteriormente foi preparado 6 tubos Falcon de 15 ml e foram identificados como  $10^{-1}$ ,  $10^{-2}$ ,  $10^{-3}$ ,  $10^{-4}$ ,  $10^{-5}$  e  $10^{-6}$  respectivo a proporção da diluição que iriam conter. No tubo  $10^{-1}$  foi adicionado os 500  $\mu\text{l}$  da amostra viral e 4,5 ml de médio de cultura RPMI-1640 e

homogeneizamos, gerado uma proporção de 1:10. Para a segunda diluição realizada foi retirado 500 µl da diluição  $10^{-1}$  e foi colocado no tubo denominado  $10^{-2}$ , foi adicionado 4,5 ml de meio RPMI-1640 e posteriormente homogeneizado para gerar uma proporção de 1:100. No seguinte tubo foi transferido 500 µl desta diluição (1:100) para nosso próximo tubo de diluição, misturamos foi obtida a diluição  $10^{-3}$ ; O procedimento foi continuado até que foi gerado os seis tubos de diluição, sendo o último aquele com a diluição  $10^{-6}$  (1:1000000).

Uma vez as diluições seriadas foram realizadas, foi adicionado 200 µl das diluições  $10^{-3}$ ,  $10^{-4}$ ,  $10^{-5}$  e  $10^{-6}$  para os quatro poços de cultivo das células PBMC, identificando os poços respectivamente em ordem decrescente. Uma vez foi terminado o procedimento, a placa de 24 poços contendo as células PBMC com as diluições da amostra viral foi levada para a incubadora Heal Force (HF212UV) a 37°C com 5% de CO<sub>2</sub> por 7 dias.

## 5 RESULTADOS

Uma semana depois, procedeu-se à contagem das placas virais formadas no ensaio de placa para verificar se o vírus teve sucesso ao se reativar, gerando espaços vazios devido à apoptose celular na cultura de células de tecido primário PBMC, a fim de avaliar a capacidade de reativação do vírus.

Para a contagem de placas, o cultivo foi retirado da incubadora da HealForce e levado ao microscópio invertido (Nikon Ti) para observação das placas virais nos quatro poços, cada um com suas respectivas diluições prévias. Foram identificadas várias placas em cada uma das diluições correspondentes, seguindo uma ordem decrescente.

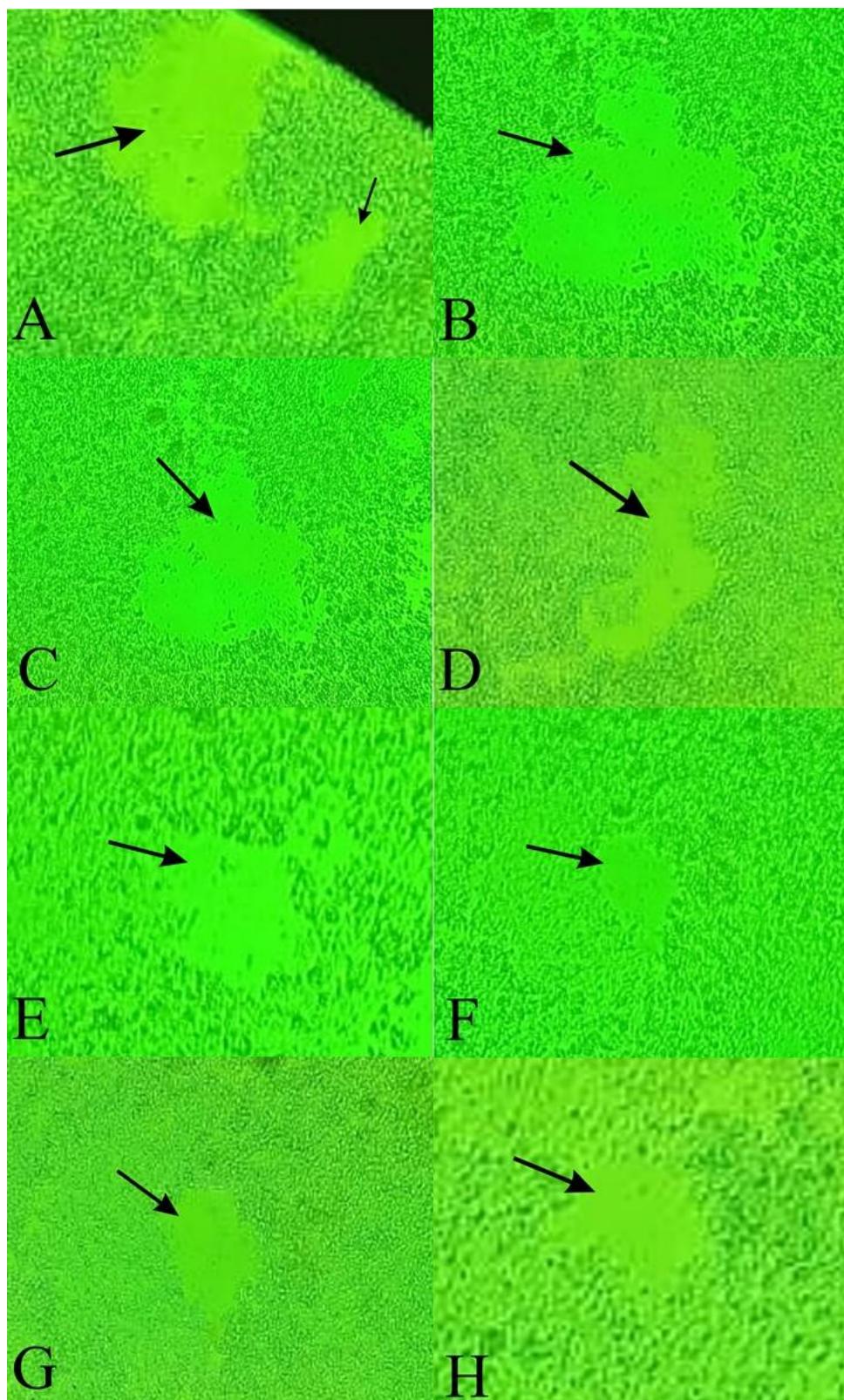
**Tabela 2** - Numero de placas virais contadas nos poços de cada diluições de  $10^{-3}$  a  $10^{-6}$ .

<b>Diluição da Amostra</b>	<b>Número de Placas Virais Contadas</b>
$10^{-3}$	14
$10^{-4}$	12
$10^{-5}$	11
$10^{-6}$	10

Fonte: Elaborado pelo autor, 2023.

A relação observada demonstra a diminuição no número de placas à medida que a diluição corresponde a uma proporção maior. Isso sugere que o vírus é menos infeccioso em concentrações menores, como esperado em uma diluição seriada, onde um menor número de vírus resulta na formação de menos placas.

Por outro lado, podemos observar que as placas evidenciam a infectividade do vírus, uma vez que são geradas a partir da apoptose das células do tecido. Isso confirma que as células MDBK foram infectadas com a amostra viral contendo bPIV-3. Portanto, para as duas linhagens celulares, sabemos que até a diluição realizada, o vírus manteve seu potencial infeccioso (Figura 10).



**Figura 10** – As setas apontam a diferentes exemplos de placas virais geradas por apoptose celular, onde A y B correspondem à diluição  $10^{-3}$ , C e D à diluição  $10^{-4}$ , E y F à diluição  $10^{-5}$  e G y H à diluição  $10^{-6}$ . Fonte: elaborado pelo autor, 2023.

Para calcular o PFU/ml, foi necessário conhecer o número inicial da amostra e a diluição utilizada, representando o número de unidades formadoras de placa por mililitro (Tabela 3).

**Tabela 3** – Cálculo de PFU/ml das diluições correspondentes.

<b>Diluição da amostra</b>	<b>PFU/ml</b>
$10^{-3}$	$7 \times 10^4$ PFU/ml
$10^{-4}$	$6 \times 10^5$ PFU/ml
$10^{-5}$	$5.5 \times 10^6$ PFU/ml
$10^{-6}$	$5 \times 10^7$ PFU/ml

Fonte: Elaborado pelo autor, 2023

As PFU geradas atribuem capacidade infecciosa a cada concentração apresentando o número de partículas virais viáveis e infecciosas presentes na amostra, corroborando uma vez mais a capacidade infecciosa do vírus, e o aumento da mesma em diluições menores.

## 6 DISCUSSION

Sabe-se que a pecuária brasileira é reconhecida como um elemento muito importante na economia Brasileira, chegando a representar 6% do PIB apresentando um faturamento de 6 bilhões de reais e contendo o 3% das importações do país. O incremento na produtividade evidente nos últimos anos é associado a vários elementos importantes no cuidado do rebanho, como o aumento e peso dos animais, aumento da taxa de natalidade e diminuição da taxa de mortalidade. Estes elementos receberam melhorias após a adoção de diferentes métodos e tecnologias utilizados pelos produtores rurais com efeitos principais na alimentação, genética, manejo e saúde animal (DA COSTA GOMES; FEIJÓ; CHIARI, 2017).

Conseqüentemente a saúde animal é um pilar importante da qualidade de produção, sendo este podendo ser afetado por múltiplos tipos de doenças, pois enxergamos as doenças como uma das maiores ameaças para a estabilidade para os fatores produtivos, gerando 20% das perdas na produção animal no mundo inteiro, com conseqüências de grandes perdas e aumento de taxas de pobreza considerando atualmente 1 milhão de agricultores dependem da produção, apresentando perdas de oportunidades comerciais em distintos países pelo status sanitário, evitando o recebimento de investimento (ZANELLA, 2016).

Uma das enfermidades conhecidas responsáveis por ser um grande problema para a cadeia de produção pecuária é o Complexo de Doenças Respiratórias de Bovinos (CRB), estudos apresentam que representa uma grande ameaça, sendo caracterizada como a causa principal de morbidade e mortalidade em confinamentos nos Estados Unidos. Um dos agentes infecciosos desta enfermidade é o bVIP-3, este afeta diretamente a produção na indústria pecuária, influenciando a produção de carne e leite e aumentando os custos de tratamento dos proprietários. Os indivíduos infectados podem desenvolver conseqüências graves, principalmente afetando jovens de dois a seis meses, e são responsáveis por diversas doenças respiratórias em bovinos e ovinos (HEIDMANN; DO NASCIMENTO; DE CASTRO 2021).

A saúde animal dos infectados pode ser assintomática ou ser afetada por vários sintomas, sendo a pneumonia e a febre de embarque dois dos mais característicos. Isso destaca a importância do estudo do vírus para o desenvolvimento de estratégias de prevenção e controle da doença, visando melhorar a saúde de bovinos e ovinos. O monitoramento epidemiológico do bPIV-3 é essencial para o controle da doença, e o estudo do vírus auxilia na compreensão das cepas virais predominantes e no desenvolvimento de medidas de controle adequadas. Entre os fatores mais importantes na prevalência do vírus, é conhecido que o

compartilhamento de pasto entre rebanhos no manejo pode incrementar o contato e, posteriormente, a prevalência. Também são conhecidos outros fatores que influenciam de maneira negativa, como um espaço reduzido para o número de indivíduos e uma área com pouca ventilação, que correspondem a rebanhos com uma maior prevalência do vírus (SPONCHIADO, 2014).

Diante deste cenário, é crucial entender a infectividade do vírus. Quando a infectividade permanece constante ao longo do tempo dentro de um rebanho, isso indica que os métodos de tratamento não estão sendo suficientemente eficazes na prevenção da disseminação do vírus. Consequentemente, é necessário considerar a possibilidade de adotar medidas mais eficazes, como o uso de vacinas. Uma das ferramentas mais amplamente utilizadas para avaliar a infectividade é o teste de placa. Este método é usado para a contagem viral. No entanto, ao contrário de outros métodos, como PCR em Tempo Real (RT-PCR), Western Blot, ELISA e citometria de fluxo, o teste de placa consegue medir as atividades biológicas do vírus (HEIDER; METZNER, 2014). Para investigar a infectividade do vírus, são realizados usualmente ensaios *in vitro* como o teste de placa (SMITHER, 2013), permitindo a possibilidade de avaliar a capacidade neutralizante de candidatos a anticorpos, bem como a eficácia de medicamentos antivirais e até antibióticos de algumas bactérias intracelulares que crescem nas placas geradas (EDOUARD; RAOULT, 2013).

Conforme Virology Research Services (2022), embora o ensaio de placa possua várias vantagens, como a formação de títulos virais para o desenvolvimento de vacinas e a observação não apenas com microscópio, mas também a olho nu, existem algumas desvantagens. Por exemplo, leva tempo para obter os resultados, já que o teste leva vários dias para ser concluído. Além disso, não pode ser aplicado a todos os vírus, pois a formação de placas virais depende da apoptose das células, o que pode limitar sua sensibilidade com vírus de baixa infectividade em comparação com outros testes, como o PCR (DULBECCO; VOGT, 2012). Uma dificuldade adicional com o teste é que o número de títulos virais contados pode variar dependendo do operador, sendo preferível que a contagem seja realizada pela mesma pessoa. (Virology Research Services, 2022)

Em relação à contagem de placas, é importante considerar alguns parâmetros sobre a diluição a ser usada, pois, dependendo da concentração, a visibilidade para a contagem pode se tornar ambígua. Isso ocorre devido a diluições inadequadas para a contagem, o que pode levar à fusão de múltiplas placas. Portanto, é melhor considerar os títulos virais quando as placas têm uma forma circular mais definida. Na Figura 10 dos resultados, observa-se que

as placas virais nas diluições menores de  $10^{-3}$  e  $10^{-4}$  (A, B, C, D) possuem raios maiores e formas mais irregulares, enquanto as placas virais das duas últimas diluições (E, F, G, H) apresentam formas mais circulares com raios menores. Portanto, embora a infectividade esteja confirmada, para um estudo de comparação com outras linhagens, seria mais apropriado realizar mais diluições da amostra viral (COOPER, 1962).

Uma alternativa que não é obrigatória, mas é usada em muitos estudos, é o uso de meio de overlay, que ajuda a criar uma barreira física que restringe a disseminação viral, gerando uma barreira que impede a difusão do vírus. Isso limita a infecção às células adjacentes àquelas inicialmente infectadas, facilitando a visualização de placas virais isoladas (BAER; KEHN-HALL, 2014).

Quanto à contagem de PFU/ml, ela é uma maneira de medir a capacidade de infecção e replicação do vírus. O PFU é uma ferramenta que permite a comparação da infectividade entre tecidos, onde um PFU mais alto indica uma amostra mais infecciosa do que uma amostra com PFU mais baixo (COOPER, 1962).

Sobre a escolha das linhagens celulares em este trabalho, tanto as células MDBK quanto as células PBMC são amplamente usadas em pesquisas com vírus. No entanto, a diferença está no fato de que as células MDBK são frequentemente usadas como reservatório viral (NETO; VJ CARNEIRO, 2015), enquanto as células PBMC desempenham um papel importante na imunologia e nas respostas do sistema imunológico. Elas são frequentemente usadas para estudar as interações entre vírus e células do sistema imunológico (KLEIVELAND, 2015).



## **7 CONSIDERAÇÕES FINAIS**

Em este trabalho foi possível realizar o ensaio de placa como um método para obter as unidades formadoras de placa como indicadores de apoptose viral de bPIV-3, que afeta tanto bovinos como ovinos. Consequentemente foi possível determinar a infectividade do vírus após a reativação. Os resultados apresentados foram atingidos utilizando células MDBK previamente isoladas e criopreservadas, e células PBMC isoladas de sangue bovino. Uma recomendação futura é o uso de meio de overlay para obter placas virais mais definidas e um maior número de réplicas experimentais sendo recomendadas duas ou três.

## REFERÊNCIAS

ALVES, Emanuele Amorim et al. Cultivo celular. 2010

BARRETO, Mauricio L.; TEIXEIRA, Maria Glória; CARMO, Eduardo Hage. Infectious diseases epidemiology. **Journal of Epidemiology & Community Health**, v. 60, n. 3, p. 192-195, 2006.

BAER, Alan; KEHN-HALL, Kylene. Viral concentration determination through plaque assays: using traditional and novel overlay systems. *JoVE (Journal of Visualized Experiments)*, n. 93, p. e52065, 2014.

BETANCUR HURTADO, César; ORREGO URIBE, Alberto; GONZÁLEZ TOUS, Marco. Estudio seroepidemiológico del virus de parainfluenza 3 en bovinos del municipio de Montería (Colombia) con trastornos reproductivos. **Revista de Medicina Veterinaria**, n. 20, p. 63-70, 2010.

BETSOU, Fay et al. Biospecimen science of blood for peripheral blood mononuclear cell (PBMC) functional applications. **Current Pathobiology Reports**, v. 7, p. 17-27, 2019.

BRUM, Mário et al. Proteção fetal frente a desafio com o vírus da Diarréia Viral Bovina (BVDV) em ovelhas imunizadas com duas amostras de vírus modificadas experimentalmente. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 22, p. 64-72, 2002.

CHANDRA, Vikas et al. Animal Cell Culture: Basics and Applications. In: **Industrial Microbiology and Biotechnology**. Singapore: Springer Singapore, 2022. p. 691-719.

COOPER, P. D. The plaque assay of animal viruses. In: *Advances in virus research*. Academic Press, p. 319-378, 1962.

DA COSTA GOMES, Rodrigo; FEIJÓ, Gelson Luiz Dias; CHIARI, Lucimara. Evolução e qualidade da pecuária brasileira. **EMBRAPA, Nota Técnica. Campo Grande**, 2017.

DULBECCO, Renato; VOGT, Marguerite. Some problems of animal virology as studied by the plaque technique. In: **Cold Spring Harbor symposia on quantitative biology**. Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1953. p. 273-279, 2012.

EDOUARD, Sophie; RAOULT, Didier. Use of the plaque assay for testing the antibiotic susceptibility of intracellular bacteria. *Future Microbiology*, v. 8, n. 10, p. 1301-1316, 2013.

ELLIS, John A. The immunology of the bovine respiratory disease complex. **Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice**, v. 17, n. 3, p. 535-550, 2001.

GÓMEZ, Arenaedith Solis. Parainfluenza Bovina tipo 3. [S. l.], 22 mar. 2015. Disponível em: <https://prezi.com/bhUUqmqmukfQf/parainfluenza-BOVINA-tipo-3/>. Acesso em: 28 jun. 2022.

HEIDER, Susanne; METZNER, Christoph. Quantitative real-time single particle analysis of virions. *Virology*, v. 462, p. 199-206, 2014.

HEIDMANN, Maycon Junior; DO NASCIMENTO, Cristiano Grisi; DE CASTRO, Bruno Gomes. Complexo respiratório bovino no contexto da sanidade animal. **Scientific Electronic Archives**, v. 14, n. 4, 2021.

HELGASON, Cheryl D.; MILLER, Cindy L. (Ed.). **Basic cell culture protocols**. Totowa, NJ, USA:: Humana Press, 2005.

JAMES, N.; JD, Edward. Fenner's veterinary virology. **Chapter**, v. 24, p. 17-45, 2017.

KLEIVELAND, Charlotte R. Peripheral blood mononuclear cells. **The impact of food bioactives on health**, p. 161-167, 2015.

LENOCH, Camila Yamaguti. ESTRATÉGIAS PARA CRIOPRESERVAÇÃO DE CÉLULAR TRONCO MESENQUIMAIS DE TECIDO ADIPOSEO BOVINO. 2015.

MADIN, S. H.; DARBY JR, N. B. Established kidney cell lines of normal adult bovine and ovine origin. **Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine**, v. 98, n. 3, p. 574-576, 1958.

MOREDO, Fabiana; LARSEN, Alejandra Edith; STANCHI, Néstor Oscar. Patogenicidad microbiana en Medicina Veterinaria. *Series: Libros de Cátedra*, 2018.

NETO, VJ CARNEIRO et al. Avaliação da produção de células da linhagem MDBK sob diferentes concentrações de soro fetal bovino - Resultados preliminares. **Ars Veterinaria**, v. 31, n. 2, p. 17, 2015.

PAYNE, Susan. Methods to study viruses. **Viruses**, p. 37, 2017.

RYAN, John A. Introduction to animal cell culture. Technical Bulletin, 2008.

RIEDHAMMER, Christine; HALBRITTER, Dagmar; WEISSERT, Robert. Peripheral blood mononuclear cells: isolation, freezing, thawing, and culture. *Multiple Sclerosis: Methods and Protocols*, p. 53-61, 2016.

SANJUÁN, Rafael. Collective properties of viral infectivity. **Current Opinion in Virology**, v. 33, p. 1-6, 2018.

SIUCE, Juan et al. Desarrollo de una proteína recombinante fimbrial F17 de Escherichia coli y respuesta inmune frente a células mononucleares periféricas sanguíneas (PBMC) de alpaca. **Revista de Investigaciones Veterinarias del Perú**, v. 32, n. 2, 2021.

SMITHER, Sophie J. et al. Comparison of the plaque assay and 50% tissue culture infectious dose assay as methods for measuring filovirus infectivity. *Journal of virological methods*, v. 193, n. 2, p. 565-571, 2013.

SPONCHIADO, Daniella. Prevalência dos principais vírus respiratórios em bovinos da raça holandesa, no estado do Paraná. 2014.

TORTORA, Gerald J.; FUNKE, Berdell R.; CASE, Christine L. Principios de Doença Epidemiológica. *In: Microbiologia*. 8ª Edição. ed. São Paulo: ARTMED EDITORA S.A., 2005. cap. Capítulo14, p. 408-409.

**Virology Research Services. The plaque assay.** Disponível em: <https://virologyresearchservices.com/2022/08/10/the-plaque-assay>. Acesso em: 26 de outubro de 2023.

WANG, Pengpeng et al. Establishment of a suspension MDBK cell line in serum-free medium for production of bovine Alpha herpesvirus-1. **Vaccines**, v. 9, n. 9, p. 1006, 2021.

WANG-SHICK, R. et al. Molecular virology of human pathogenic viruses. **Academic Press**, v. 34, n. 2, p. 31-45, 2017.

ZANELLA, Janice Reis Ciacci. Zoonoses emergentes e reemergentes e sua importância para saúde e produção animal. **Pesquisa agropecuária brasileira**, v. 51, p. 510-519, 2016.