

REPLICAÇÃO DE SENDAI VIRUS EM CÉLULAS EPITELIAIS PRIMÁRIAS DE CAMUNDONGO (1)

Luis I. B. KANZAKI (2)

RESUMO

Células epiteliais primárias obtidas do trato respiratório de camundongos jovens foram infectadas com o Vírus Hemaglutinante do Japão (HVJ, Sendai Virus) e, a progénie viral, tratada ou não com tripsina foi titulada através do método de Imunofluorescência Indireta. A progénie de Sendai Virus obtida de células epiteliais primárias de camundongo apresentou um título considerável, demonstrando-se que há ativação das partículas virais, capazes de infectar células LLC-MK-2, nas quais, a progénie viral foi titulada.

UNITERMOS: Sendai virus; Vírus hemaglutinante do Japão.

INTRODUÇÃO

De acordo aos trabalho de HOMMA et al., o epitélio bronquial de camundongos é altamente susceptível à infecção por HVJ (Hemagglutinating Virus of Japan, Sendai Virus). Para confirmar este achado, células primárias do trato respiratório de camundongos foram preparadas e infectadas com Sendai Virus multiplicado em ovo embrionado de galinha e, o vírus produzido, tratado ou não com tripsina, foi testado quanto à infecção e, titulado através da técnica de Imunofluorescência Indireta.

MATERIAL E MÉTODOS

Células. Células LLC-MK-2 (células de rim de macaco rhesus) foram cultivadas em Meio Mínimo Essencial (MEM, Nissui Pharmaceutical Co., Ltd. Tokyo, Jpn) com 1% de L-glutamina (Wako Pure Chemical Ind, Ltd., Osaka, Jpn) e 10% de Soro Bovino. Células epiteliais primárias foram preparadas pela excisão de traquéia e partes do brônquio de camundongos

jovens, 4-5 semanas de idade, linhagem Jcl:ICR (Nippon Clea, Osaka, Jpn), tratadas com enzima e passadas em gradiente de dupla camada, e o sedimento cultivado em MEM D-Valina (Gibco Lab., Grand Island, N.Y., U.S.A.), 15% de Soro Bovino Fetal dialisado (Gibco, Lab. Grand Island, N.Y., U.S.A.), 2% de Aminoácidos Não Essenciais e 1% de L-Glutamina em Salina Fosfatada (PBS).

Estoque de Vírus. A cepa Fushimi de Sendai Virus multiplicado em ovo embrionado de galinha foi coletada da cavidade corioalantóica, após 10 dias de incubação, inoculado com Sendai Virus previamente ao terceiro dia de incubação.

O estoque viral apresentou o título de 2,560 UH/ml (unidades hemaglutinantes por mililitro).

A traquéia e partes do brônquio foram cortados transversalmente entre os anéis cartilagosos de sua porção membranosa, lavados em meio fresco e digeridos durante 5 minutos por

- (1) Este trabalho foi realizado na Universidade de Kobe, Faculdade de Medicina, Departamento de Microbiologia sob os auspícios do Governo Japonês (bolsa de estudos), Ministério de Educação, Ciência e Cultura, no período de 1983/85.
- (2) Instituto Evandro Chagas, Fundação Serviços de Saúde Pública. Av. Almirante Barroso, 492, Caixa Postal 621. CEP 66000 Belém, Pará, Brasil.

agitação com barra magnética em solução de termolisina (Thermolysin protease type X, Sigma Chemical Co., St. Louis, Mo., U.S.A.) (8.080 U/mg de termolisina em solução a 0,01% em 0,1 M de TRIS pH 8.0 mais 0.002 M de CaCl₂·2H₂O) diluída a 1:10 em Salina Fosfatada, pH 7,3. A solução digerida foi disposta sobre um gradiente de dupla camada (a camada inferior foi composta de 5 ml de Salina Fosfatada com 3% de Soro Albumina Bovina e 9 mg de glucose e 10⁻⁶M de EDTA; a camada superior consistia de 3 ml de termolisina diluída a 1:16 em Salina Fosfatada como o mesmo usado para digerir os tecidos), e sedimentado por centrifugação durante 3 minutos a 400Xg. O sobrenadante foi desprezado e sobre as células sedimentadas disposta uma segunda dupla camada de gradiente sobre a qual mais células digeridas foram colocadas. Este processo foi repetido totalmente por 5 vezes.

As células sedimentadas obtidas foram lavadas 2 vezes com 10 ml de 1% de Soro Albumina Bovis (Cohn Fraction V, Armour Pharm. Co., Bioch. Div., Kankakee, IL, U.S.A.) em Salina Fosfatada e ressuspendida em MEM D-Valina, Aminoácidos Não Essenciais e antibióticos (100 U de Penicilina e 100 mg de Estreptomicina), pH 7,3. O meio de cultivo celular foi trocado apenas em sua metade do volume, a cada 2 dias, incubado a 37°C em uma atmosfera de 95% de ar e 5% de CO₂.

O meio MEM D-Valina foi usado em substituição a MEM L-Valina para que houvesse o crescimento seletivo de células epiteliais dentre populações mistas de células obtidas da traquéia e porções do brônquio. É sabido que as células epiteliais possuem a enzima D-aminoacido oxidase capaz de metabolizar a D-valina enquanto outras células, como os fibroblastos, não possuem esta enzima.

As células epiteliais primárias de camundongo exibindo uma camada única após 4 dias de semeio foram inoculadas com Sendai Virus obtido de ovo embrionado, a uma multiplicidade de infecção (M.O.I) 1.0. As células inoculadas foram incubadas por 1 hora a 37°C, em uma atmosfera de 95% de ar e 5% de CO₂, gentilmente agitadas a cada 15 minutos para distribuir uniformemente o inóculo viral sobre a superfície da camada celular. Ao fim do período

de incubação, o inóculo foi desprezado e a camada celular lavada 3 vezes para remover o inóculo viral residual. A intervalos de cada 3 horas até 48 horas após a infecção viral, o fluido celular foi colhido e o novo meio de cultivo foi repostado.

Camadas únicas de células LLC-MK-2 semeadas em "Lab-Tek 8 chamber" foram inoculadas com as amostras de fluido coletadas das células epiteliais primárias infectadas com Sendai Virus.

Após 36 horas da inoculação, as células foram testadas pelo método de Imunofluorescência Indireta usando soro imune de coelho contra Sendai Virus (obtido por hiperimunização de coelho com Sendai Virus purificado) e isotiocianato de Fluoresceína conjugado a antisoro de coelho produzido em cabra (Medical and Biological Lab., Nagoya, Jpn).

Os fluidos de células epiteliais primárias infectadas foram tratadas com ou sem tripsina (Type III, Sigma Chem., Co., St. Louis, Mo., U.S.A.) a concentração de 16 ng/ml e testadas para infectividade através da Técnica de Imunofluorescência Indireta, por contagem de células imunofluorescentes. A reação enzimática foi bloqueada pela adição de "Soybean Trypsin Inhibitor" (Sigma Chem., Co., St. Louis, Mo., U.S.A.) aos 6 minutos de tratamento.

A progénie viral obtida de células LLC-MK-2 infectadas com Sendai Virus foi tratada com o fluido de células epiteliais primárias não infectadas e examinadas pela Técnica de Imunofluorescência Indireta.

RESULTADOS

As células epiteliais primárias de camundongo infectadas com Sendai Virus apresentaram efeito citopático 20 horas após a infecção; as células se fundiram, formando sincícios, e citoplasma colaborou-se evidenciando o núcleo celular. A camada celular tornou-se uma rede esgarçada e quebradiça. Após 48 horas de infecção as células destacaram-se da superfície da microplaca, totalmente destruídas.

O teste de Hemadsorção utilizando-se hemácias de galinha foi realizado resultando positivo. Entretanto as hemaglutininas do fluido de cultura infectado não foram detectadas

O objetivo deste trabalho foi verificar se Sendai Virus multiplicado em células epiteliais primárias era capaz de reter seu poder infeccioso; pode-se concluir que a progénie viral de células epiteliais primárias de camundongo apresentaram título considerável, medido por Imunofluorescência Indireta em células LLC-MK-2, aproximadamente $1,6 \times 10^6$ c.f./ml (células fluorescentes por mililitro) e a comparação entre a progénie viral de células epiteliais primárias de camundongo, antes e depois do tratamento com tripsina não exibiu diferenças significativas, demonstrando que a progénie viral estava em uma forma ativa. (Ver Fig. 1).

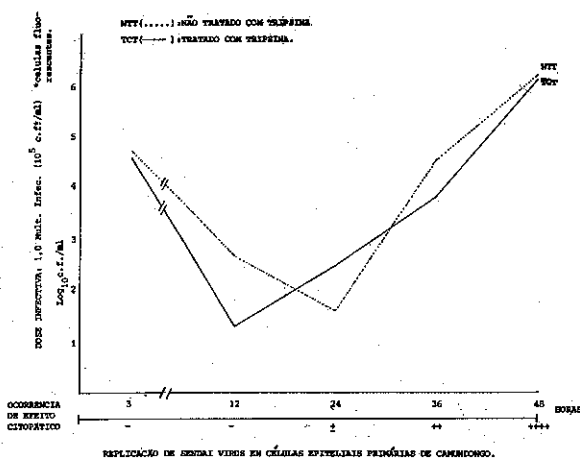


Fig. 1 — Replicação de Sendai virus em células epiteliais primárias de camundongo.

Aparentemente o fluido de células epiteliais primárias de camundongo não tem atividade sobre Sendai Virus inativado obtido de células LLC-MK-2, embora originado primariamente de ovos embrionados de galinha.

DISCUSSÃO

O Sendai Virus tem 2 tipos de glicoproteína em seu envelope, uma das quais é convencionalizada como glicoproteína F. Ao multiplicar-se o virus em ovos embrionados, a glicoproteína F é clivada em duas subunidades de glicoproteínas, F1 e F2, conferindo o caráter infeccioso as partículas virais.

A progénie viral de linhagens celulares estabelecidas, como LLC-MK-2, HeLa e células L são defectivas, ou seja, não produzem progénie viral infectiva, devido a grande quantidade

de glicoproteína F vir em uma forma não clivada.

Supõe-se que a partir dos resultados obtidos, a progénie viral de células epiteliais primárias de camundongo tenha a forma clivada da glicoproteína F (subunidades F1 e F2), sendo capaz de infectar células LLC-MK-2. Sabe-se que em fluido corioalantóico de ovos embrionados e em células epiteliais do aparelho respiratório o mesmo pode ser descrito.

O mecanismo pelo qual a progénie viral de células epiteliais primárias de camundongo são ativadas não é ainda bem compreendido. Inicialmente, supunha-se que as células epiteliais liberavam no fluido de cultivo, tripsina ou enzima similar, embora ainda não se tenha provado experimentalmente. Poderia ser suposto também que as partículas virais são ativadas durante o processo de brotamento através da membrana celular em presença de tripsina ou enzima similar.

SUMMARY

Sendai virus replication in primary epithelial cells of mice

The Epithelial primary cells harvested from the respiratory tract of young mice were infected with HVJ (Hemagglutinating Virus of Japan, Sendai Virus) and, the progeny virus, trypsin treated or not, were titrated by the Indirect Immunofluorescent Technique. The progeny virus of HVJ obtained from mouse epithelial primary cells presented a considerable titer, demonstrating that the viral particles are activated, being capable of infecting LLC-MK-2 cells, in which, the progeny virus were titrated.

AGRADECIMENTOS

Agradecemos ao Chefe de Departamento de Microbiologia, Dr. Morio Homma e ao Professor Hakku Hotta na orientação científica e redação original deste trabalho.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. GOLDMAN, W. E. & BASEMAN, J. B. — Selective isolation and culture of a proliferating epithelial cell population from the hamster trachea. *In Vitro*, 16: 313-319, 1980.

2. GILBERT, S. F. & MIGEON, B. R. — D-Valine as a selective agent for normal human and rodent epithelial cells in culture. *Cell*, 5: 11-14, 1975.
3. HOMMA, M. & TASHIRO, M. — Evidence of proteolytic activation of Sendai virus in mouse lung. *Arch. Virol.*, 77: 127-137, 1983.
4. HOMMA, M. — Trypsin action on the growth of Sendai virus in tissue culture cells. I. Restoration of the infectivity for L cells by direct action of trypsin on L cell borne Sendai virus. *J. Virol.*, 8: 619-629, 1971.
5. HOMMA, M. — Trypsin action on the growth of Sendai virus in tissue culture cells. II. Restoration of the hemolytic activity of L cell borne Sendai virus by trypsin. *J. Virol.*, 9: 829-835, 1972.
6. HOMMA, M. & OHUCHI, M. — Trypsin action on the growth of Sendai virus in tissue culture cells. III. Structural difference of Sendai viruses grown in eggs and tissue culture cells. *J. Virol.*, 12: 1457-1465, 1973.
7. HOSAKA, Y.; SEMBA, T. & FUKAI, K. — Artificial assembly of envelope particles of HVJ (Sendai Virus). Fusion activity of envelope particles. *J. gen. Virol.*, 25: 391-404, 1974.
8. HOSAKA, Y. & HOSOI, J. — Study of negatively stained images of Sendai virus nucleocapsids using minimum-dose system. *J. Ultrastruct. Res.*, 84: 140-150, 1983.
9. ISHIDA, N. & HOMMA, M. — Sendai Virus. *Advanc. Virus Res.* 23: 347-383, 1978.
10. MURAMATSU, M. & HOMMA, M. — Trypsin action on the growth of Sendai virus in tissue culture cells. V. An activating enzyme for Sendai virus in the ChorioAllantoic fluid of the embryonated chicken egg. *Microbiol. Immunol.*, 24: 113-122, 1980.
11. NAGATA, I.; MAENO, K.; YOSHII, S. & MATSUMOTO, T. — Plaque formation by HVJ in calf kidney cells. *Arch. ges. Virusforsch.*, 15: 257-259, 1965.
12. OGURA, H.; SATO, H.; TANAKA, J.; KAMIYAMA, S.; YOSHIE, T. & HATANNO, M. — Synthesis of M protein of HVJ (Sendai virus) in rat glial cells in selectively restricted at a non-permissive temperature. *J. gen. Virol.*, 65: 639-643, 1984.
13. OHUCHI, M. & HOMMA, M. — Trypsin action on the growth of Sendai virus in tissue culture cells. IV. Evidence for activation of Sendai virus by cleavage of a glycoprotein. *J. Virol.*, 18: 1147-1150, 1976.
14. SHIGETA, S. — Plaque formation and growth characteristics of Sendai virus in chicken kidney cell cultures. *Tohoku J. exp. Med.*, 83: 114-120, 1964.
15. SUGAWARA, K.; TASHIRO, M. & HOMMA, M. — Intermolecular association of HANA glycoprotein of Sendai virus in relation to the expression of biological activities. *Virology*, 117: 444-455, 1982.
16. TASHIRO, M. & HOMMA, M. — Pneumotropism of Sendai virus in relation to protease. Mediated activation in mouse lungs. *Infect. Immun.*, 39: 879-888, 1983.

Recebido para publicação em 4/3/1986.