

UNIVERSIDADE ESTADUAL DO CEARÁ
PRO – REITORIA DE PÓS-GRADUAÇÃO E PESQUISA
FACULDADE DE VETERINÁRIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS

Cesarino Junior Lima Aprígio

**UTILIZAÇÃO DA ÁGUA DE COCO COMO MEIO ALTERNATIVO PARA CULTIVO
DE CÉLULAS FIBROBLÁSTICAS NÃO INFECTADAS E INFECTADAS COM
VÍRUS MAEDI-VISNA CEPA K1514 (MVV-K1514)**

Fortaleza - Ceará

2003

UNIVERSIDADE ESTADUAL DO CEARÁ
PRO – REITORIA DE PÓS-GRADUAÇÃO E PESQUISA
FACULDADE DE VETERINÁRIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS

Cesarino Junior Lima Aprígio

**UTILIZAÇÃO DA ÁGUA DE COCO COMO MEIO ALTERNATIVO PARA CULTIVO
DE CÉLULAS FIBROBLÁSTICAS NÃO INFECTADAS E INFECTADAS COM
VÍRUS MAEDI-VISNA CEPA K1514 (MVV K1514)**

Dissertação ao programa de Pós-graduação em Ciências Veterinárias da Faculdade de Veterinária da Universidade estadual do Ceará, como requisito parcial para a obtenção do grau de mestre em Ciências Veterinárias
Área de concentração: Medicina Veterinária Preventiva

Orientadora: Maria de Fátima da Silva Teixeira

Fortaleza - Ceará
2003

A654u Aprígio, Cesarino Junior Lima.

Utilização da água de coco como meio alternativo para cultivo de células fibroblásticas infectadas com Vírus Maedi-Visna (MVV)/Cesarino Junior Lima Aprígio. ____ Fortaleza: FAVET/UECE, 2003.

62p. ; 31 cm

Orientadora: Dra Maria Fátima da Silva Teixeira
Dissertação (Mestrado em ciências veterinárias) - Universidade Estadual do Ceará, Faculdade de Veterinária (FAVET – UECE)

1. Água de coco 2. Célula fibroblásticas 3. Caprino I.
Universidade Estadual do Ceará, Faculdade de Veterinária

CDD:634.61

UNIVERSIDADE ESTADUAL DO CEARÁ
PRÓ-REITORIA DE PÓS-GRADUAÇÃO E PESQUISA
FACULDADE DE VETERINÁRIA
PROGRAMA DE PÓS - GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS

Título do Trabalho: Utilização da água de coco como meio alternativo para cultivo de células fibroblásticas não infectadas e infectadas com Vírus Maedi-Visna cepa K1514 (MVV K1514)

Autor: Cesarino Junior Lima Aprígio

Aprovada em __/__/__

Banca Examinadora:

Profa. Dra. M^a Fátima da Silva Teixeira
Orientadora

Prof. Dr. Roberto Soares Castro
Co-orientador/Examinador

Dr. Raymundo Rizaldo Pinheiro
Examinador

Profa. Dra M^a Izabel Florindo Guedes
Examinadora

AGRADECIMENTOS

Primeiramente a DEUS, pelo do Dom da vida, e por estar sempre me guiando e mostrando os melhores caminhos a seguir.

A minha namorada, Ana Clara, pela compreensão, companheirismo e carinho. Com muito amor.

Á Dra. Maria Fátima da Silva Teixeira, professora, orientadora e amiga, por sua dedicação, empenho, ensinamentos ao longo do decorrer deste trabalho e, principalmente pela amizade e confiança.

Ao Dr. Roberto Soares Castro, pela Co-orientação e contribuição para o desenvolvimento deste trabalho.

Ao Dr. José Ferreira Nunes e Dr. Gondin pelo auxílio prestado no decorrer do trabalho.

Ao amigo, mestrando Ney de Carvalho Almeida, pelo convívio agradável, ajuda e colaboração na realização do trabalho.

Aos integrantes do laboratório de virologia da UECE, Cristina, Jarbas, Tânia, Suzana, Galileu, Livia e Adriana pela amizade.

As colegas de mestrado Viviane Moura, Maria Vivina, Maria Helena e Luziana Braga, pela agradável convivência durante todo o curso e amizade disposta.

A todos os colegas de curso pelos novos laços de amizades formados.

Aos meus amigos, Frederico Bruno, Carlos Manoel, Francisco Edmar, Francisco Marcelo, Emanuel Patrício, Jorge Ricardo, Leonardo Martins, Aécio Neto,

Nadia de Melo e Roberta Sousa, pelo companheirismo e apoio nos momentos mais difíceis.

À Universidade Estadual do Ceará, pela oportunidade de realização do curso de Mestrado em Ciências Veterinárias.

Aos Professores do Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias da UECE pelos ensinamentos.

À coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal do Ensino Superior – CAPES, pela concessão de bolsa durante todo o curso de mestrado.

A todos que ajudaram direta e indiretamente para a realização deste trabalho.

Dedico,

Aos meus pais Cesarino e Aldenisia, as pessoas mais importantes da minha vida, pelo incentivo e ajuda dados durante a minha formação profissional e amor que nunca me faltaram mesmo separado pela distância.

Ofereço,

Aos meus irmãos Tircianne, Plínio e sobrinho Tirciano.

SUMARIO

LISTAS DE ABREVIACOES.....	10
RESUMO.....	11
ABSTRACT.....	12
1. INTRODUÇÃO GERAL.....	13
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	14
2.1 gua de coco.....	14
2.2 Fibroblasto.....	17
2.3 Vírus Maedi Visna.....	18
2.3.1 Histórico.....	18
2.3.2 Estrutura virica.....	19
2.3.3 Replicação viral.....	21
2.3.4 Sintomatologia e transmissão.....	22
2.3.5 Diagnóstico.....	23
3. JUSTIFICATIVA.....	25
4. OBJETIVOS.....	26
4.1 Objetivo Geral.....	26
4.2 Objetivos específicos.....	26
5. CAPITULO ÚNICO:Uso da água de coco no cultivo de células da membrana sinovial caprina infectadas ou não com Vírus Maedi-Visna (MVV) Cepa K1514.....	28
Resumo.....	28
Abstract.....	29
Introdução.....	31
Material e métodos.....	32
Resultados.....	35
Discussão.....	41
Conclusão.....	45
Agradecimentos.....	46

Referências bibliográficas.....	46
6. CONCLUSÕES GERAIS.....	49
7. PERSPECTIVAS.....	50
8. BIBLIOGRAFIA GERAL.....	51

Listas de abreviaturas

mL – Mililitro

μL – Microlitro

μm - Micrometro

nm – Nanômetro

mg – Miligrama

μg – Micrograma

°C – Grau Celsius ou centígrados

% - Por cento

CO₂ – Dióxido de Carbono

RNA – Ácido ribonucléico

DNA – Ácido desoxirribonucléico

SFB – Soro Fetal Bovino

MOsM – Miliosmol

pH – Pontencial de hidrogênio

IDGA - Imunodifusão de Gel de Agorose

PCR - Polymerase Chain Reaction (Reação em cadeia de Polimerase)

ELISA – Enzyme Linked Immunosorbent assay

MEM – Meio Essencial Mínimo

TCID₅₀ – Dose para infectar 50% de cultivo tecidual

LTR – Longo terminal repetidor

RESUMO

Este trabalho teve por objetivo avaliar a água de coco no cultivo primário de células da membrana sinovial caprina (MSC) infectadas ou não com o Vírus Maedi Visna. Para isto as células foram cultivadas, no experimento 1, em meio controle e testes M₁, M₂, M₃ com diferentes concentrações de água de coco e Meio Essenciais Mínimo (MEM). No experimento 2 as células foram mantidas em MEM (controle), água de coco *in natura* (T₁); água de coco com pH 7,5 (T₂); com osmolaridade de 275 mOsm (T₃) e com pH de 7,5 e osmolaridade de 270 mOsm (T₄). Nestes experimentos foram adicionados Soro Fetal Bovino, glutamina e antibióticos. Em seguida, cultivados por até 120 horas, incubadas com azul de tetrazólio (MTT) e lidas no espectrofotômetro. O experimento 3 utilizou microplacas contendo monocamada subconflente de células da MSC infectadas com o vírus Maedi-Visna cepa K1514. Neste experimento as células foram cultivadas em meio controle e teste G₁, G₂, G₃, G₄ contendo diferentes concentrações de MEM e água de coco, e suplementados com 2 % SFB, glutamina e antibióticos. As microplacas foram mantidas por um período de até 7 dias. Depois, foram coradas pelo método de May-Grumwald e Giemsa, respectivamente, nos dias 2, 3, 5 e 7 após a inoculação para visualizar o efeito do vírus nas células de MSC. O controle do experimento 1 apresentou uma maior absorção de MTT assim como um maior crescimento celular. Nos meios testes M₁ e M₂, houve um crescimento satisfatório das células mantidas durante os 5 dias de cultivo. No experimento 2 houve degeneração da monocamada celular em 48 horas em todos os tratamentos. Na inoculação viral, experimento 3, foi observado no controle a produção de efeito citopático característico de sincício e nos meios testes G₂ e G₃ destruição da monocamada celular após o 4^o dia de inoculação. Em conclusão, a água de coco pode ser utilizada na proporção de 1:1 com MEM para o crescimento das células de MSC por um período de até 5 dias. Além disso, na concentração de até 50% de água de coco no meio o Vírus Maedi Visna foi capaz de manter sua capacidade de replicação por um período de até quatro dias.

ABSTRACT

The present paper had the objective to evaluate the coconut water on the primary cultivation of cells of the Caprine Synovial Membrane (CSM) infected and not by the Maedi Visna Virus Strain K1514. In order to do this the cells were cultivated, on the experiment 1, with control MEM and different concentrations of Coconut Water and MEM: M₁, M₂, M₃. On the Experiment 2 the cells were kept in MEM (control), coconut Water *in natura* (T₁); coconut water with pH 7,5 (T₂); with osmolarity of 275mOsm (T₃) and pH of 7,5 and osmolarity 270 mOsm (T₄). In These experiments were supplemented with Fetal Calf Serum (FCS), glutamine and antibiotics. Later cultivated for up to 120 hours, incubated with Tetrazolium Blue (MTT) and observed on the spectrophotometer in a wavelength of 600nm. On the experiment 3, it was utilized microtiter plates containing subconfluent monolayers of the cells from CSM that were infected by MVV and then kept in media with Coconut Water G₁ and different concentrations of Coconut Water and MEM: G₂, G₃, G₄, later, supplemented with 2% FCS, glutamine and antibiotics. On the experiment 3 the microtiter were sustained for a period of up to 7 days, where a plate stained with May-Gruwald e Giemsa on days 2,3,5 and 7 after the inoculation to visualize the viral effect on the cell CSM. The MEM control presented, on the experiment 1, a greater absorption of MTT and happened a satisfactory growth of the cells kept on the test media M₁ and M₂ during the 5 days of cultivation. On the experiment 2, happened degeneration of the cell monolayer in 48 hours in all the treatments realized on this experiment. On the viral inoculation, it was observed in control (MEM + 2% of FCS) a production of cytopathic effect proper of syncytium of the virus in the media tests G₂ and G₃ destruction of the monolayer after the 4th day of inoculation. Concluding, the coconut water can be utilized in the rate of 1:1 with MEM to the growth of the cells of CSM for a period up to 5 days. Moreover, the concentration up to 50% of coconut water on the Maedi Visna Virus was capable to keep its capacity of replication for a period up to 4 days.

1. INTRODUÇÃO

Células embrionárias e de tecido de animais adultos podem ser cultivados *in vitro* desde que acrescidos de nutrientes adequados. Para o cultivo de células de mamíferos, os meios devem possuir glicose, aminoácidos, vitaminas, soro fetal bovino, sais minerais, fatores de crescimento, antibióticos e um indicador de pH, que é normalmente o vermelho de fenol (ALBERTS *et al.*, 1997). Contudo, há no mercado meios elaborados especificamente para cultivar um determinado tipo de célula. Estes meios são caros e seus componentes normalmente importados o que inviabiliza o uso rotineiro de cultivo celular. Havendo, portanto, uma necessidade de utilizar meios alternativos, práticos e de fácil obtenção.

A água de coco surge como uma opção por ser uma solução natural estéril que apresenta em sua constituição compostos que poderiam ser utilizados pelas células.

A produção brasileira de coco ocupa aproximadamente uma área de 300 mil hectares onde o nordeste brasileiro concentra as maiores plantações do país contribuindo com cerca de 96% da produção nacional (LAGUNA & NUNES, 1992). Além disso, a água de coco apresentou bons resultados na área biomédica e nas biotecnologias da reprodução, podendo ser utilizada em cultivos de bactérias e de vírus vegetais.

Um vírus que vem merecendo destaque em nossa região e, que não foi suficientemente explorado, é um RNA vírus, pertencente a família *Retroviridae* e gênero *Lentivirus*, denominado de Maedi-Visna. Este vírus causa a Pneumonia Progressiva, podendo apresentar um quadro nervoso, mamite e artrite com longo período de incubação em ovinos e caprinos de ambos sexos, todas as raças e idades (HAASE, 1986). O diagnóstico desta enfermidade baseia-se, sobretudo, em testes laboratoriais, sendo o diagnóstico sorológico rotineiramente usado o da técnica de Imunodifusão em Gel de Agarose (IDGA). Para a complementação do mesmo faz-se necessário o isolamento do vírus em cultivo de células.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Água de coco

A água do fruto *Cocos nucifera* representa aproximadamente 25% do peso total. Ela é uma solução natural estéril e ácida, composta de sais minerais, açúcares, proteínas, fatores de crescimento e gorduras neutras, apresentando constituintes semelhantes aos meios comerciais de cultivo de células animais (MARQUES, 1979, NUNES, 1997), como mostra o quadro 1 e 2. Contudo, a sua composição e volume mudam consideravelmente durante o processo de maturação e germinação do fruto (CHILD, 1964; FRÉMOND *et al.*, 1966).

Quadro 1. Composição da água de coco maduro

1. Aminoácidos	µg/mL	2. Açúcares	Mg/mL
Aspártico	5,4	Sacarose	8,6
Glutâmico	78,7	Glicose	2,46
Serina	65,8	Frutose	2,51
Glicina	13,9	3. Vitaminas	mg/mL
Asparagina	10,4	Ácido nicotínico	0,64
Treanina	26,3	Ácido pantotéico	0,52
Glutamina	177,1	Biotina	0,02
Alanina	13,4	Riboflavina	0,01
Lisina	22,5	Ácido Fólico	0,003
Argenina	16,8	Tiamina e Piridoxina	Traços
Prolina	21,6	4. Minerais	mg/100mL
Valina	21,6	Potássio	312,0
Leucina	15,1	Cloro	183,0
Fenilalanina	10,2	Sódio	105,0
Tirosina	3,1	Fósforo	37,0
Aminobutírico	168,8	Magnésio	30,0
Homoserina	5,2	Enxofre	24,0
Histidina	Traços	Ferro	0,10
Metionina	Traços	Cobre	0,04
Hidróxido Prolina	Traços	Cálcio	traços

Quadro 2. Comparação dos constituintes entre a água de coco de frutos imaturos da variedade anã com o Meio essencial mínimo Eagle.

1. Aminoácidos	Água de coco	MEM - Eagle	2. Açúcares	Água de coco	MEM - Eagle
Cisteína	Ausente	Presente	Sacarose	Presente	
Aspártico	Presente	Ausente	Glicose	Presente	
Glutâmico	Presente	Ausente	Frutose	Presente	Presente
Serina	Presente	Ausente			
Glicina	Presente	Ausente	3. Vitaminas		
Asparaginina	Presente	Ausente	Tiamina	Traços	Presente
Treonina	Presente	Presente	Ácido nicotínico	Presente	Presente
Glutamina	Presente	Ausente	Ácido pantoteico	Presente	Presente
Alanina	Presente	Ausente	Clorido de colina	Ausente	Presente
Lisina	Presente	Presente	Biotina	Presente	Presente
Triptofano	Ausente	Presente	Riboflavina	Presente	Presente
Argenina	Presente	Presente	Ácido Fólico	Presente	Presente
Prolina	Presente	Ausente	I-Inositol	Ausente	Presente
Valina	Presente	Presente	Piridoxina	Traços	Presente
Isoleucina	Ausente	Presente			
Leucina	Presente	Presente	4. Minerais		
Fenilalanina	Presente	Presente	Potássio	Presente	Presente
Tirosina	Presente	Presente	Cloro	Presente	Presente
Aminobutirico	Presente	Ausente	Sódio	Presente	Presente
Homoserina	Presente	Ausente	Fósforo	Presente	Presente
Histidina	Traços	Presente	Magnésio	Presente	Presente
Metionina	Traços	Presente	Enxofre	Presente	Presente
Hidróxido Prolina	Traços	Ausente	Ferro	Presente	Presente
			Cobre	Presente	Presente
			Cálcio	traços	Presente

A água de coco imaturos com até cinco meses de idade contém substâncias que induzem a diferenciação das células em estado de dormência (VAN OVERBEEK, 1942; LAGUNA, 1996). O princípio ativo destas substâncias apresenta propriedades semelhantes às auxinas e citocininas que regulam o crescimento e estimulam a divisão celular nas plantas, fungos, algas, e alguns protozoários (PREVOT, 1968). Há na água de coco outros compostos que possuem boa atividade biológica, sendo considerados excelentes para as células animais. Dentre estes compostos está a 1,3 difeniluréia, que é um derivado da purina (METIVER, 1979).

Na Índia, DUA & CHAMDRA (1993) isolaram e identificaram na água de coco várias citocininas endógenas, auxinas (ácido 3-idolacético) e duas giberelinas, todas são substâncias promotoras de crescimento.

FERRI (1979) estudando vários extratos e sucos, observou que a água de coco demonstrou melhor atividade na divisão celular, devido a presença de fatores necessários ao crescimento de tecidos cultivados *in vitro*. NUNES & COMBARNOUS (1994) isolaram o ácido 3-indol-acético, uma auxina e observaram uma ação benéfica sobre a motilidade e porcentagem de espermatozoides móveis em sêmen de caprinos e ovinos .

Na botânica, a água de coco tem utilização prática na produção de orquídeas por clones (PREVOT, 1968); atua na cultura de tecidos vegetais , induzindo a divisão celular; pode ser usada para o desenvolvimento de meristemas vegetais e florais e, ainda, como fornecedora de fatores de crescimento para cultivo de tecidos destinados ao estudo de vírus fitopatogênicos (De MARTIN *et al.*, 1980).

Na microbiologia a água de coco pode ser utilizada como meio sólido (2-3% de Agar-agar) ou líquido no cultivo fungos causadores de micoses pulmonares, fungos fitopatogênicos e leveduras; serve, também, como um bom meio de crescimento para bacterióides, bactérias fitopatogênicas, bacilos lácticos e quando alcalinizada para a multiplicação de bactérias intestinais. E, também, pode funcionar como diluente na produção da vacina de Newcastle (DARMINTO *et al.*, 1994). Já em parasitologia, observou-se que as larvas da mosca das frutas se desenvolviam bem em tubos com Agar água de coco (PICADO, 1942).

Em cultivo de células animais a água de coco diluída em salina Hanks foi satisfatória na manutenção de células renais de humanas (SCHATZMAYR *et al.*, 1970). NOGUEIRA & VASCONCELOS (2000) observaram que a água de coco obteve resultados significativos na conservação de córneas de coelhos durante 14 dias. Quando utilizada nas biotecnologias da reprodução, a água de coco apresenta bons resultados como diluidor de sêmen caprino (NUNES, 1997), ovino (SOUSA *et al.*, 1994), suíno (TONIOLLI, 1989) e canino (MONTEZUMA *et al.*, 1994). Tem boa atividade crioprotetora em sêmen de humanos (CONTI, *et al.*, 1997) e caninos (CARDOSO *et al.*, 2002). É eficiente em preservar os folículos pré-antrais por um período de 24 horas (SILVA *et al.*, 2000); capaz de prolongar a sobrevivência do sêmen de abelha por até 5 meses aumentando o aproveitamento em até 30% (CAMARGO, 1978) e funcionar como meio de cultivo e crioprotetor de embriões de muríneos (BLUME, 1994).

2.2 Fibroblasto

No início de 1900 demonstrou-se que células embrionárias e de tecido de animais adultos poderiam ser cultivados *in vitro* desde que acrescidos de nutrientes adequados (HOLTZAM & NIVIKOFF, 1985). Uma das células que vem sendo utilizada em cultivo são os fibroblastos. Elas pertencem a um grupo de família denominada de células do tecido conjuntivo. Os fibroblastos são os mais numerosos deste tecido, sendo responsáveis pela produção de substâncias intercelulares como fibras e substância fundamental amorfa do tecido conjuntivo (PROVENZA, 1974); tem habilidade de isolar e reparar tecidos lesados e como é uma das células menos especializada é capaz de interconvesão, diferenciando-se em outras células do mesmo grupo (ALBERTS *et al.*, 1991).

Morfológicamente, são células grandes, achatadas, freqüentemente ovóides ou fusiformes, com processos ramificantes e núcleos ovais ligeiramente achatados (BAILEY, 1982, YU *et al.*, 2003). Alguns investigadores denominam de fibroblasto a célula em plena atividade e de fibrócito as células relativamente inativas (COMARCK, 1984). Devido as suas características as células fibroblásticas têm tido

grande importância na biologia molecular e medicina preventiva, pois podem ser utilizadas para o estudo do ciclo e apoptose celular (YU *et al.*, 2003); na manutenção e proliferação em cultivos do vírus da Aujeszky (ZANG *et al.*, 1996), no estudo do Poxvírus, servir como meio de crescimento para o vírus da doença de Newcastle na produção de vacina (CUNNINGHAM, 1971), no cultivo de microsporídeo (THOMAS *et al.*, 1997), estudo da infecção *in vitro* de tripomastigotas do *Trypanosoma cruzi* (HENRÍQUEZ *et al.*, 1981), na produção de taquizoítos em cultivos de *Toxoplasma gondii*, no isolamento e cultura da bactéria *Borrelia burgdoferi* (TYLEWSKA & CHMIELEWSKI, 1997). Em co-cultivo tem sido utilizada com células mononucleares do sangue periférico para avaliar a sua habilidade de estimulação (PAKALA & BENEDICT, 1999), com células mastóides para formular, *in vitro*, um modelo de estudo da psoríase (LEVI-SCHAFFER *et al.*, 1995). Usadas na detecção de agentes infecciosos (GENDELMAN *et al.*, 1985) e ainda para o isolamento e produção de antígeno no diagnóstico sorológico de lentivírus de pequenos ruminantes (ABREU *et al.*, 1998).

2.3 Vírus Maedi-Visna

O Maedi-Visna é um RNA-vírus de fita simples, não oncogênico que pertence à família *Retroviridae*, subfamília *Lentivirinae* e gênero *lentivirus* (CONFFIN, 1996). Integram este grupo: os vírus da Imunodeficiência Humana (HIV-1 e HIV-2); da Imunodeficiência Simian (SIV) (LETVIN *et al.*, 1987); da Imunodeficiência Felina (FIV) (PEDERSEN *et al.*, 1987); da Imunodeficiência bovina (BIV) (VAN DE MAATEN *et al.*, 1972); da Doença de Membrana (DJV) (WILCOX, 1997); da Anemia Infecciosa Equina (AIEV); da Artrite Encefalite Caprina-(CAEV) (CRAWFORD *et al.*, 1980) Maedi-visna (MVV) (SIGURDSSON, 1954).

2.3.1 Histórico

O vírus Maedi-visna foi descrito pela primeira vez em 1954, SINGURDSSON E COLABORADORES (1960) em rebanhos Islandeses causando pneumonite

intestinal progressiva e crônica (Maedi) e também, em alguns animais, uma leucoencefalomielite (Visna). Esta doença foi observada, mais tarde, em outras regiões do mundo, sendo a síndrome respiratória de maior prevalência. Vários nomes foram dados a esta enfermidade tais como: ZWOERGERZIEKTE na Holanda (DE BOER, 1975; HOUWERS, 1985), JAAGSIEKTE na África do Sul (VERWOERD *et al.*, 1983) e Doença Pulmonar de Montana ou Pneumonia Progressiva Ovina (PPO) nos Estados Unidos (CUTLIP *et al.*, 1976).

2.3.2 Estrutura vírica

O Maedi-Visna como os demais lentivírus são partículas esféricas, envelopadas com aproximadamente 100 nm de diâmetro com núcleo cônico e denso, no qual estão inseridas duas moléculas idênticas de RNA fita simples, uma molécula de transcriptase Reversa dependente de Mg^{2+} e proteínas do nucleocapsídeo (GONDA *et al.*, 1986). O envelope está associado covalentemente com as glicoproteínas transmembranárias (TM) e de superfície (SU). Outra estrutura presente na partícula viral é a matriz que está situada entre o capsídeo e o envelope (PEPIN *et al.*, 1998) (Figura 1).

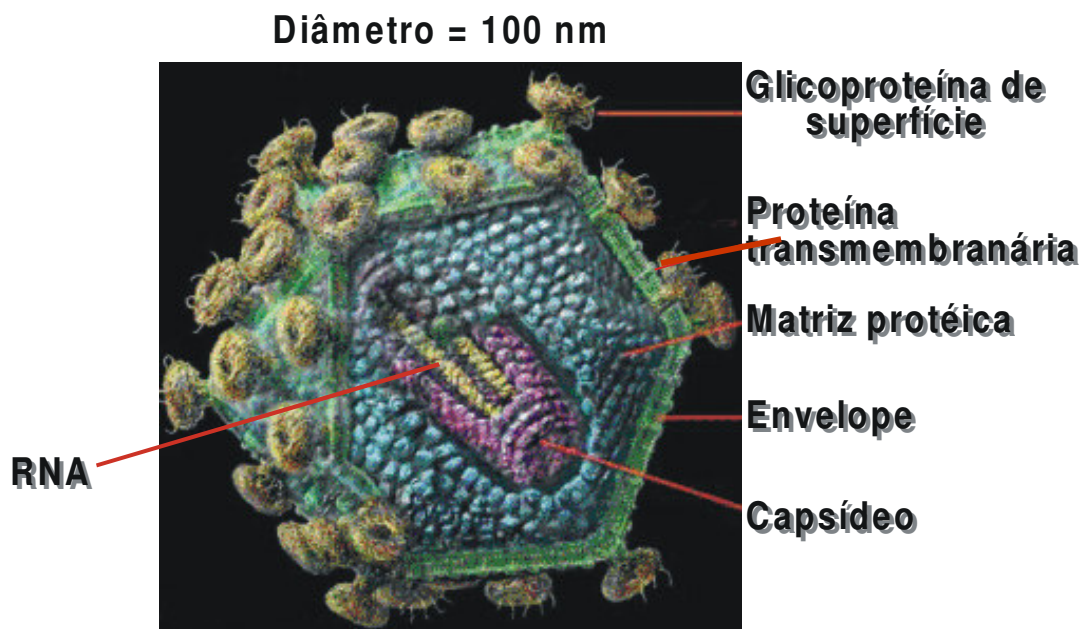


Figura 1. Esquema da partícula lentiviral (retirado do site www.virology.net, produzido por Russell Kightley, Austrália e adaptado de Coffin, 1996).

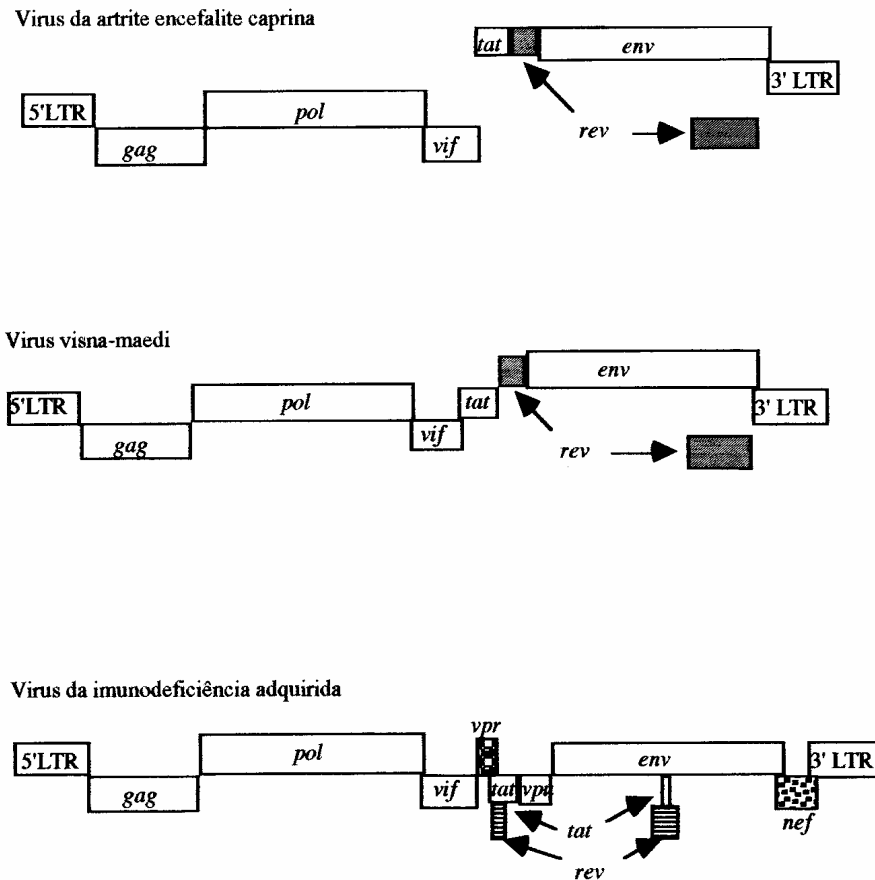


Figura 2: Estrutura dos provírus dos lentivírus CAEV, Maedi-Visna e HIV-1 (CLEMETS & PAYNE, 1994).

A estrutura genética vírica possui regiões que codificam proteínas, são elas: o gene *gag*, que codifica as proteínas internas não-glicosiladas com determinantes antigênicos específicos, da matriz, do capsídeo e as nucleoproteínas; *pol*, responsável por codificar as enzimas transcriptase reversa ou polimerase, proteases, integrases e UTPases e *env*, que codifica as glicoproteínas do envelope, SU, e a TM (QUERAT *et al.*, 1990). Em adição, há regiões com os genes acessórios como *tat*, essencial para a indução da patogenia e *Rev* e *vif* que participam da replicação viral (HARMACHE *et al.*, 1995 e 1998; CLEMETS & ZINK, 1996) (Figura 2).

2.3.3 Replicação viral

Os lentivírus de pequenos ruminantes penetram na célula por fusão da membrana plasmática celular rompendo-a parcialmente. O RNA é copiado pela transcriptase reversa, gerando um DNA de fita dupla que poderá integrar – se ao genoma celular pela ação das integrases e LTRs virais (HAASE *et al.*, 1974). Após a integração do genoma, a célula pode produzir o vírus ou permanecer latentemente infectada com baixa ou nenhuma expressão viral (FIELDS *et al.*, 1996). No caso de expressão ativa do vírus, ocorre a transcrição com produção RNAm(s) que serão codificados no citoplasma para a produção de proteínas reguladoras. O estágio final do ciclo envolve a reunião dos produtos dos genes estruturais, incorporação do RNA genômico às partículas víricas e aquisição do envelope viral, que em macrófagos é obtido pelo brotamento de vesículas citoplasmáticas, rompidas com o excesso de partículas virais. Nos fibroblastos, o envelope é obtido pelo brotamento da membrana plasmática. A Figura 3 demonstra a replicação dos lentivírus.

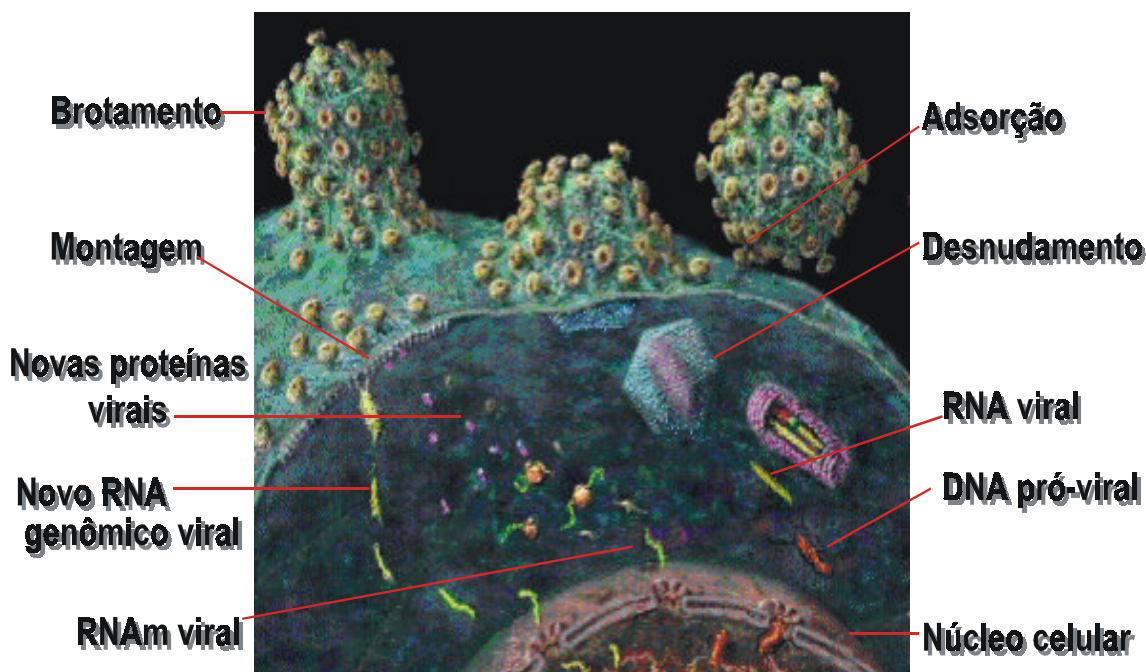


Figura 3: ciclo de replicação do retrovírus (retirado do site www.virology.net, produzido por Russell Kightley, Austrália e adaptado de Coffin, 1996).

O vírus Maedi-visna infecta ovinos e caprinos tanto naturalmente como experimentalmente (BANKS *et al.*, 1983; OLIVER *et al.*, 1985; DICKSON & ELLIS, 1989; LEROUX *et al.*, 1995, CASTRO *et al.*, 1999). Ele infecta *in vivo* células da linhagem de monócitos e macrófagos (NARAYAN & CLEMENTS, 1989), contudo já foi demonstrada a presença de RNA, DNA e proteínas virais em outros tipos celulares (GEORGSSON *et al.*, 1989; STASKUS, 1991), incluindo linfócitos, células do plasma, células endoteliais, fibroblastos e neuroglias (PÉTURSSON *et al.*, 1991), *In vitro*, estes patógenos podem replicar-se em cultivos de células fetais do plexo coróide (SIGURDSSON *et al.*, 1960), baço, timo, linfonodo escapular (NARAYAN *et al.*, 1980), membrana sinovial caprina (CRAWFORD *et al.*, 1980), do músculo cardíaco (LEROUX *et al.*, 1995), tecido epitelial (LEE *et al.*, 1996), de linhagens fibroblásticas caprinas imortalizadas (TEIXEIRA *et al.*, 1997) e células dendríticas (RYAN *et al.*, 2000).

2.3.4 Sintomatologia e transmissão

Os animais infectados pelo MVV apresentam perda de peso gradual com desenvolvimento de dispnéia, artrite (WATT *et al.*, 1994), mastite e em alguns casos de ataxia e paralisia culminando com a morte do animal sem que haja a presença de uma imunodeficiência severa (WEISS, 1999; RYAN *et al.*, 2000).

A transmissão ocorre através do contato direto com fluidos corporais, sendo a via respiratória uma possível fonte de infecção (CAREY & DIEZIEL, 1983) que pode ser facilitada por outras infecções no aparelho respiratório em animais confinados (PALSSON, 1976). A transmissão vertical é a de maior importância e ocorre principalmente via colostro e leite (WATT *et al.*, 1994) sendo facilitada em animais com mastite (ZINK & JOHNSON, 1994). A transmissão uterina da mãe ao feto é controversa. A venérea é possível já que o DNA pró-viral foi detectado por PCR no sêmen, além do mais estes vírus estão presentes em todos os fluidos corporais (PEPIN *et al.*, 1998).

2.3.5 Diagnóstico

O diagnóstico do MVV é baseado em testes laboratoriais, uma vez que os sinais clínicos observados não são patognômicos (RIMSTAD *et al.*, 1993). Eles são baseados na detecção, isolamento do vírus em cultivo ou co-cultivo e por provas sorológicas. Os testes laboratoriais como as técnicas de radioimunoensaio (RIA), imunoflorescência (ADAMS *et al.*, 1980), hibridização *in situ* (ZINK *et al.*, 1990), ensaios de imunoperoxidase em célula fixada (HECKERT *et al.*, 1992), imunohistoquímica (STORSET *et al.*, 1997), e PCR são utilizados como métodos de diagnósticos alternativos na detecção deste agente.

As provas sorológicas são baseadas na detecção de anticorpos contra as partículas virais inteiras, glicoproteínas de superfície, proteínas do capsídeo ou nucleoproteínas do MVV (KENNEDY-STOSKOPF & NARAYAN, 1989). Os testes mais utilizados são os ensaios imunoenzimáticos (ELISA) e a Imunodifusão em gel de agarose (IDGA). Este último é o mais empregado rotineiramente por ter como vantagens a praticidade tanto na execução como na leitura, custo relativamente baixo e razoável sensibilidade e excelente especificidade (ABREU *et al.*, 1998).

O isolamento e caracterização do vírus podem ser realizados através do cultivo primário de explantes de tecidos articulares, pulmonares, do sistema nervoso central, glândula mamaria, células imortalizadas, ou co-cultivo com células sangüíneas, colostro, leite, lavado bronco-alveolar e líquido cérebro-espinhal. Nestas células o vírus causa efeito citopático característico, que consiste na produção de sincício com formação de células gigantes multinucleadas com presença ou não de lise celular (CAREY & DIEZIEL, 1983). O sincício é o resultado da interação entre o envelope viral e a membrana celular que degeneram com o tempo (BLODIN, 1989). A formação de efeito citopático pode ocorrer em alguns dias ou meses (CRAWFORD *et al.*, 1980) e esta diretamente relacionado com a cepa viral e a célula utilizada (CALLADO, 1999). O MVV é mais infectivo em células autólogas do plexo coróide e membrana sinovial formando sincício a partir do partir de 4º dia de cultivo e com

destruição completa da monocamada em até 30 dias de cultivo (APRÍGIO, 2001), sendo, portanto, considerada uma cepa lítica (QUERAT *et al.*, 1984).

3. Justificativa

O cultivo celular é importante no diagnóstico sorológico para esclarecer as características do agente de enfermidades infecto-contagiosas.

A constante utilização de meios de cultivos comerciais eleva os custos cultivo celular o que incita a obtenção de meios alternativos mais acessíveis às condições regionais. A água de coco é um produto natural composta de substâncias nutritivas e fitohormônios que induzem o crescimento e diferenciação de células vegetais, o que torna possível a sua utilização como meio de cultivo para as células animais. Além disso, ela obteve bons resultados em cultivos de células vegetais e quando usada como diluidor de sêmen de caprino, ovino, suíno e de abelha. Caso o uso da água de coco em cultivo de células animais seja satisfatório, os custos desta técnica seriam diminuídos, facilitando ,assim, as pesquisas e o desenvolvimento de meios de diagnósticos mais precisos.

4. Objetivos

4.1 Objetivo geral:

Utilizar a água de coco como meio de cultivo alternativo na manutenção de células da membrana sinovial caprina infectadas ou não.

4.2 Objetivos específicos:

Observar o crescimento celular em MEM acrescidos em três diferentes concentrações de 25%, 50% e 75% de água de coco em cultivo de células não infectadas durante os períodos de 48, 72, 96 e 120 h;

Avaliar o crescimento celular utilizando a água de coco com pH ajustado para 7,5, osmolaridade de 275 mOsM isoladamente e com pH de 7,5 e osmolaridade de 270 mOsM em cultivo de células não infectadas nos períodos de 48, 72, 96 e 120 h;

Observar o efeito da água de coco no cultivo de células infectadas com vírus Maedi-Visna nos períodos de 2, 3, 5 e 7 dias pós-inoculação, utilizando 25%, 50% e 75% de água de coco em substituição ao MEM.

Experimento realizado

Artigo 1 – Uso da água de coco no cultivo de células da membrana sinovial caprina infectadas ou não com Vírus Maedi Visna (MVV) Cepa K1514

5. CAPITULO ÚNICO

USO DA ÁGUA DE COCO NO CULTIVO DE CÉLULAS DA MEMBRANA SINOVIAL CAPRINA INFECTADAS OU NÃO COM VÍRUS MAEDI VISNA (MVV) CEPA K1514

Cesarino Junior Lima APRÍGIO¹, Maria Fátima da Silva TEIXEIRA ², Ney de Carvalho ALMEIDA ³, Roberto Soares CASTRO⁴.

RESUMO: Este trabalho teve por objetivo avaliar a água de coco no cultivo primário de células da membrana sinovial caprina (MSC) infectadas ou não com o Vírus Maedi Visna. Para isto as células foram cultivadas, no experimento 1, em meio controle e testes M₁, M₂, M₃ com diferentes concentrações de água de coco e Meio Essenciais Mínimo (MEM). No experimento 2 as células foram mantidas em MEM (controle), água de coco *in natura* (T₁); água de coco com pH 7,5 (T₂); com osmolaridade de 275 mOsm (T₃) e com pH de 7,5 e osmolaridade de 270 mOsm (T₄). Nestes experimentos foram adicionados Soro Fetal Bovino, glutamina e antibióticos. Em seguida, cultivados por até 120 horas, incubadas com azul de tetrazólio (MTT) e lidas no espectrofotômetro. O experimento 3 utilizou microplacas contendo monocamada subconflente de células da MSC infectadas com o vírus Maedi-Visna cepa K1514. Neste experimento as células foram cultivadas em meio controle e teste G₁, G₂, G₃, G₄ contendo diferentes concentrações de MEM e água de coco, e suplementados com 2 % SFB, glutamina e antibióticos. As microplacas foram mantidas por um período de até 7 dias. Depois, foram coradas pelo método de May-Grumwald e Giemsa, respectivamente, nos dias 2, 3, 5 e 7 após a inoculação para visualizar o efeito do vírus nas células de MSC. O controle do experimento 1 apresentou uma maior absorção de MTT assim como um maior crescimento celular. Nos meios testes M₁ e M₂, houve um crescimento satisfatório das células mantidas

durante os 5 dias de cultivo. No experimento 2 houve degeneração da monocamada celular em 48 horas em todos os tratamentos. Na inoculação viral, experimento 3, foi observado no controle a produção de efeito citopático característico de sincício e nos meios testes G₂ e G₃ destruição da monocamada celular após o 4º dia de inoculação. Em conclusão, a água de coco pode ser utilizada na proporção de 1:1 com MEM para o crescimento das células de MSC por um período de até 5 dias. Além disso, na concentração de até 50% de água de coco no meio o Vírus Maedi Visna foi capaz de manter sua capacidade de replicação por um período de até quatro dias.

Ternos para indexação: Água de coco, cultivo celular, azul de tetrazólio, MVV

Abstract: The present paper had the objective to evaluate the coconut water on the primary cultivation of cells of the Caprine Synovial Membrane (CSM) infected and not by the Maedi Visna Virus Strain K1514. In order to do this the cells were cultivated, on the experiment 1, with control MEM and different concentrations of Coconut Water and MEM: M₁, M₂, M₃. On the Experiment 2 the cells were kept in MEM (control), coconut Water *in natura* (T₁); coconut water with pH 7,5 (T₂); with osmolarity of 275mOsm (T₃) and pH of 7,5 and osmolarity 270 mOsm (T₄). In These experiments were supplemented with Fetal Calf Serum (FCS), glutamine and antibiotics. Later cultivated for up to 120 hours, incubated with Tetrazolium Blue (MTT) and observed

on the spectrophotometer in a wavelength of 600nm. On the experiment 3, it was utilized microtiter plates containing subconfluent monolayers of the cells from CSM that were infected by MVV and then kept in media with Coconut Water G₁ and different concentrations of Coconut Water and MEM: G₂, G₃, G₄, later, supplemented with 2% FCS, glutamine and antibiotics. On the experiment 3 the microtiter were sustained for a period of up to 7 days, where a plate stained with May-Gruwald e Giemsa on days 2,3,5 and 7 after the inoculation to visualize the viral effect on the cell CSM. The MEM control presented, on the experiment 1, a greater absorption of MTT and happened a satisfactory growth of the cells kept on the test media M₁ and M₂ during the 5 days of cultivation. On the experiment 2, happened degeneration of the cell monolayer in 48 hours in all the treatments realized on this experiment. On the viral inoculation, it was observed in control (MEM + 2% of FCS) a production of cytopathic effect proper of syncytium of the virus in the media tests G₂ and G₃ destruction of the monolayer after the 4th day of inoculation. Concluding, the coconut water can be utilized in the rate of 1:1 with MEM to the growth of the cells of CSM for a period up to 5 days. Moreover, the concentration up to 50% of coconut water on the Maedi Visna Virus was capable to keep its capacity of replication for a period up to 4 days.

Index terms: coconut water, cell cultive, terazolium blue, MVV

¹ Méd. Veterinário, Pós-Graduando do PPGCV, bolsita - CAPES

² Méd. Veterinária, dr^a Prof. do Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias da UECE – Laboratório de Virologia (LABOVIR). AV. Parajana, 1700, Itapery, CEP: 60740-010, Fortaleza – Ce. Email: mfteixeira@hotmail.com * autora para correspondência

³ Méd. Veterinário, Pós-Graduando do PPGCV, bolsita - FUNCAP

⁴ Méd. Veterinário, Dr. Prof^o. Adjunto – Departamento de Méd. Veterinária (DMV) da UFRPE

INTRODUÇÃO

O vírus maedi visna (MVV) é um RNA vírus pertencente à família *Retroviridae*, gênero *Lentivirus*. Ele acomete ovinos e mais raramente caprinos causando, principalmente, uma pneumonia intersticial progressiva e crônica, em alguns casos podem ser observado artrite, mamite e problemas neurológicos. *In vivo* eles se replicam em monócitos e macrófagos. *In vitro* podem ser multiplicadas em células do plexo coróides (SIGURDSSON, 1960), músculo cardíaco (LEROUX *et al.*, 1995), tecido epitelial (LEE *et al.*, 1996), células dendríticas (RYAN, *et al.*, 2000), e mais comumente em fibroblastos da membrana sinovial de ovinos e caprinos cultivados a partir da técnica de *splants* ou em co-cultivos. Porém para cultivar estas células é essencial a utilização de meios de cultivos que atendam as necessidades para que a mesmas possam se manter e multiplicar.

A água de coco tem sido utilizada com sucesso como meio alternativo na cultura de tecidos vegetais. Ela representa 25% do peso total do fruto *Cocos nucifera* L. Apresentando-se na forma de uma solução natural estéril composta de sais minerais, açúcares, vitaminas, aminoácidos, gorduras neutras e fatores do crescimento. Por conter estes constituintes é utilizada em cultivos para fornecer fatores de crescimento a tecidos destinados ao estudo da biossíntese de vírus vegetais (PREVOT, 1968), pode também funcionar como diluente para vacina contra a doença de Newcastle (DARMINTO *et al.*, 1994), como meio de cultura de fungos (ANANDARAJ & SARMA, 1997), na manutenção de células de rim humano (RH) e replicação do vírus da poliomielite (SCHATZMAYR *et al.*, 1970). Na reprodução obteve bons resultados usando-a como diluidor de sêmen nas espécies caprina (NUNES, 1997), ovina (SOUSA *et al.*, 1994), suína (TONIOLLI, 1989) e canina (CARDOSO *et al.*, 2002). Podendo, ainda, ser usada como crioprotetor de folículos ovarianos caprinos e ovinos (SILVA *et al.*, 2000). Contudo, o uso em cultivos primário de células animais não foi convenientemente explorado, necessitando verificar com mais detalhes a sua eficácia neste tipo de cultivo. Portanto, este trabalho teve por objetivo avaliar a água de coco no cultivo primário de células da

membrana sinovial caprina não infectadas e ver sua ação na replicação do Vírus Maedi Visna cepa k1514.

MATERIAL E MÉTODOS

Cultivo celular

Para obtenção de células foram coletados fetos de cabras soro negativas no teste de Imunodifusão em Gel de Agarose (IDGA) para lentivirose de pequenos ruminantes (LVPR), oriundas de abatedouros da região metropolitana de Fortaleza, que foram acondicionados e encaminhados até o Laboratório de Virologia do Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias. Destes fetos, fragmentos da membrana sinovial da articulação carpal foram retirados, depositados assepticamente em garrafas de 25 cm² e incubados durante 30 minutos a 37°C. Após este período foi adicionado 5 mL de Meio Essencial Mínimo (MEM) acrescido de antibióticos, glutamina e 10% Soro Fetal Bovino (SFB) e cultivadas a 37°C em atmosfera de 5% de CO₂ até a formação de monocamadas celulares. Esse material foi posteriormente tripsinizado e mantido em MEM acrescidos de 10% SFB nas mesmas condições anteriormente descritas.

Água de coco

Cocos nucifera L., verdes da variedade anã, foram colhidos e selecionados aqueles que tivessem aproximadamente 5 meses de idade. Posteriormente, foi retirada a água de coco, feito um *pool*, depois filtrada em filtros de 0,22 µm de diâmetro e acondicionada a - 20 °C até a realização dos experimentos.

Vírus

O vírus Maedi–Visna foi cultivado utilizando a amostra K1514 isolada na Islândia (Sigurdsson *et al.*, 1960), que foi cedido gentilmente pelo Dr. Roberto Soares de Castro do laboratório Doenças Infecto-Contagiosas/Virologia da UFRPE.

Experimento 1 - MEM diluído com água de coco cultivando células de membrana sinovial não infectadas.

Microplacas de 96 poços foram semeadas com células da membrana sinovial caprina (MSC) em uma concentração de 10^5 cel/ml em meio MEM acrescidos de 10% SFB. Em seguida, as placas foram cultivadas a 37°C em atmosfera de 5% de CO_2 durante 48 horas para adesão celular. Após este período, foram lavadas duas vezes com solução salina a 0,85%, adicionado o controle C_1 (MEM) e os meios testes, todos acrescidos de 10% SFB, penicilina-estreptomicina, anfotericina B e glutamina. O experimento consistiu na deposição de 100 μL de meio teste M_1 (75% de MEM mais 25% de água de coco); de meio M_2 (50% de MEM mais 50% de água de coco) e de meio M_3 (25% de MEM mais 75% de água de coco), sendo que cada meio teste estava distribuído em 12 poços.

Experimento 2 - Água de coco com pH e Osmolaridade ajustada cultivando células de membrana sinovial não infectadas.

Para a realização deste experimento, células da membrana sinovial caprina foram distribuídas em microplacas de 96 poços a uma concentração de 10^5 cél/ml. Depois foram cultivadas durante dois dias em MEM suplementado com 10% de SFB a uma temperatura de 37°C e atmosfera de 5% de CO_2 . Após este período, as microplacas foram lavadas duas vezes com solução salina a 0,85%. Posteriormente, foi adicionado o controle C_1 (MEM) e os tratamentos de T_1 (água de coco *in natura*); T_2 (água de coco com pH ajustado para 7,5); T_3 (água de coco com osmolaridade estabilizada em 275) e T_4 (água de coco com pH ajustada para 7.5 e osmolaridade estabilizada em 270) todos acrescidos de 10% SFB, penicilina-estreptomicina, anfotericina B e glutamina. Os ajustes de pH e osmolaridade foram realizados com hidróxido de sódio e água destilada, respectivamente. Cem microlitros de controle MEM e de cada tratamento foi distribuído de modo que cada um tivesse na microplaca 12 repetições por tratamento.

Avaliação do crescimento celular pela incorporação de MTT

Para avaliação do crescimento celular as microplacas de 96 poços dos experimentos 1 e 2 foram cultivadas por um período de 48, 72, 96 e 120 horas. Ao término deste tempo, a monocamada foi avaliada, o sobrenadante desprezado, acrescentado 100 de μL azul de tetrazólio [3-(4,5-dimetiltiazol)-2,5-difenil-2H-bromido de tetrazólio] (MTT) a uma concentração de 0,4 mg/mL. As microplacas incubadas durante 4 h a uma temperatura de 37°C com 5% CO_2 para que houvesse a incorporação de MTT e formação de cristais de formazan. Posteriormente, os mesmos foram solubizados pela adição de 100 μL em uma solução de 95% de isopropanol e 5% ácido fórmico. A análise espectrofotométrica foi medida em um leitor de ELISA Meterteck $\Sigma 960$ a uma absorvância de 600 nm (EPSTEIN *et al.*, 1992).

Experimento 3 - avaliação do efeito da água de coco no cultivo de células da membrana sinovial de pequenos ruminantes infectados pelo vírus Maedi-Visna.

Microplacas de 96 poços com monocamada subconfluente de células MSC foram inoculadas com MOI de 0,1 mL do vírus Maedi-Visna cepa K1514 em uma TCID_{50} de $10^{-4,5}$ e incubados por 1 h a 37°C , ao término o sobrenadante foi desprezado, as placas lavadas com salina a 0,9%, acrescentado o meio controle MEM e meios testes [(G₁ – água de coco in natura), (G₂ – 75% de MEM + 25% de água de coco), G₃ -50% de MEM + 50% de água de coco e (G₄ - 25% de MEM + 75% de água de coco)], todos com 2% de SFB, glutamina e antibióticos, sendo que a distribuição dos experimentos foi semelhante a descrita no experimento 1.

Para avaliação do efeito viral 4 placas de 96 poços foram mantidas por 2, 3, 5 e 7 dias. Passado os tempos estipulados, os sobrenadantes foram colhidos e conservados a -20°C , depois as placas foram coradas em May-Grumwald e Giemsa e observadas em microscópio invertido. O critério adotado pelo laboratório

considerou positivos os poços que apresentassem pelo menos um síncicio com um mínimo 6 núcleos por campo até 7 dias após infecção. Caso o efeito citopático não fosse observado neste período. O sobrenadante colhido seria novamente inoculado em microplacas utilizando MEM a 2% de SFB em vez dos meios testes para observar se o vírus tinha se multiplicado

Análise estatística

Os resultados dos experimentos 1 e 2 obtidos foram avaliados pelo ANOVA e submetidos ao programa estatístico InStat da GraphPad. Os valores dos destes experimentos foram descritos em média e desvio padrão. O teste de Dunnett foi utilizado para comparar o meio controle com os tratamentos de cada experimento. As diferenças significativas foram dadas em $P < 0,05$.

RESULTADOS

Experimento 1 - MEM diluído com água de coco cultivando células de membrana sinovial não infectadas.

O controle MEM apresentou em 48 horas de cultivo, uma monocamada confluyente com células fusiformes e núcleo ovalado condizente com a morfologia de fibroblastos. Esta monocamada manteve-se durante o experimento. No sobrenadante foi observada pequena quantidade de células soltas e arredondadas.

Nos meios testes M_1 , M_2 e M_3 foi visualizado células com morfologia semelhante ao controle, contudo quanto mais se aumentava a concentração de água de coco, menos confluyente era a monocamada celular e maior o número de células com morfologia alterada e também no sobrenadante.

Após a análise morfológica da monocamada em microscópio invertido em uma aumento de 100 vezes, dois poços de cada tratamento foram escolhidos ao acaso, tripsinizados, as células distribuídas em outra placa de 96 poços e cultivadas em MEM acrescidos de 10% de SFB para verificar a capacidade de adesão e

multiplicação celular. A adesão celular ocorreu inicialmente nos meios controle, M₁ (75% de MEM e 25% de água de coco) e M₂ (50% de MEM e 50% de água de coco), sendo que o número de células aderidas decrescia do mesmo modo que a concentração de MEM diminui nos meios testes utilizados. As células ressuspensas se mantiveram viáveis por mais de 7 dias sem que houvesse manutenção do meio no cultivo.

A incorporação de MTT pelas células de MSC foi progressiva no controle e no meio M₂ durante os cinco dias de cultivo. A absorção de MTT, e conseqüentemente, multiplicação celular no meio controle foi significativamente maior que meio teste M₁ apenas no período de 72 horas, que no M₂ em 72 e 96 horas e que o M₃ durante todo o experimento 1. Porém, foi menor que M₁ em 48 e 120 horas mas não diferindo significativamente (Tabela 1).

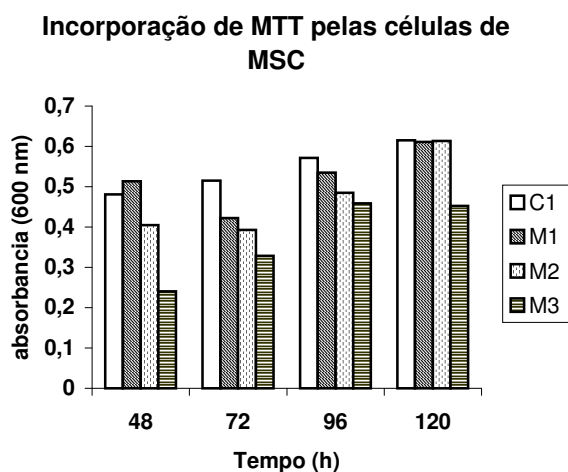


Gráfico 1. Avaliação da incorporação de MTT pelas células de MSC cultivadas nos períodos de 48 a 120 horas em Meios com MEM (C1); 75% de MEM +25% água de coco (M1); 50% de MEM + 50% de água de coco (M2) e 25% de MEM + 75% de água de coco (M3), todos suplementados com 10% de SFB e adicionados glutamina e antibióticos. As células foram cultivadas a uma temperatura 37°C em 5% de CO₂.

O meio teste M₁ mostrou maior absorção de MTT quando foi comparado com os meios teste M₂ e M₃, tendo um maior crescimento no quinto dia de cultivo ($0,6700 \pm 0,1283$) superior até que o controle, mas esta diferença não foi significativa (Gráfico1). O meio M₂ teve uma razoável incorporação de MTT no decorrer do experimento, tendo maior atividade celular em 120 horas de cultivo ($0,6138 \pm 0,1369$), que foi um pouco menor que o controle. Já o meio teste M₃ teve a menor incorporação de MTT no experimento, contudo as células mantiveram atividade estável nos períodos de 4 e 5 dias de cultivo (gráfico 1).

Tabela1. Avaliação da incorporação de MTT nas células de membrana sinovial caprina cultivada em diferentes meios.

Crescimento celular				
(Leitura da absorbância em filtro de 600 nm)				
Meios	Tempo em horas			
	48	72	96	120
Controle	0.4810 ± 0.0495	0.5149 ± 0.0364	0.5717 ± 0.0208	0.6150 ± 0.0906
M₁^a	0.5132 ± 0.1030	$0.4226 \pm 0.0203^{**}$	0.5348 ± 0.0342	0.6700 ± 0.1283
M₂^b	0.4046 ± 0.1098	$0.3929 \pm 0.0221^{**}$	$0.4849 \pm 0.0801^{**}$	0.6138 ± 0.1369
M₃^c	$0.2406 \pm 0.0543^{**}$	$0.3286 \pm 0.0620^{**}$	$0.4586 \pm 0.0840^{**}$	$0.4523 \pm 0.0847^*$

^a – 75 % de MEM + 25% de água de coco

^b – 50% de MEM + 50% de água de coco

^c – 25% de MEM + 75% de água de coco

Células foram cultivadas por até 5 dias a 37 °C em 5% CO₂. Os valores estão em média ± desvio padrão. Diferenças significativas com relação ao controle, foram de * P<0,05, ** P<0,01

Experimento 2 - Água de coco com pH e Osmolaridade ajustada cultivando células de membrana sinovial não infectadas

O *pool* da água de coco utilizada tinha um pH de 4,7 e osmolaridade de 490 mOsM. O pH foi ajustado para 7,5 com hidróxido de sódio e a osmolaridade com água destilada. As osmolaridades obtidas foram de 480 para água de coco com pH de 7,5 (tratamento T₂); 275 para água de coco com osmolaridade ajustada (tratamento T₃) e 270 para água de coco com pH 7,5 e osmolaridade ajustada (tratamento T₄).

Nas observações da morfologia celular, visualizou-se que o meio controle apresentou uma confluência da monocamada células nos períodos de 48, 96 e 120 horas. Em 48 horas o tratamento T₁ (água de coco *in natura*), apresentou uma monocamada subconflente, onde as células apresentavam-se com morfologia alterada, arredondadas culminando com o descolamento das mesmas ficando em suspensão no sobrenadante. No tratamento T₂, a confluência da monocamada era menor que a anteriormente mencionada com células afiladas e núcleo picnótico. No sobrenadante observou-se a presença tanto de células como morfologia arredondadas quanto afiladas. Nos tratamentos T₃ e T₄ a monocamada em sua grande parte estava descolada da parede da placa e as poucas células que permaneceram aderidas apresentavam morfologia irregular .

Com relação à incorporação de MTT, o meio controle foi muito superior que os tratamentos durante todo o período de cultivo apresentando maior absorção no quarto dia de cultivo (gráfico 2). E quando se comparou a incorporação do meio controle com os tratamentos foi observado que o meio controle foi significativamente maior que todos os tratamentos em todos os dias de cultivo (Tabela 2).

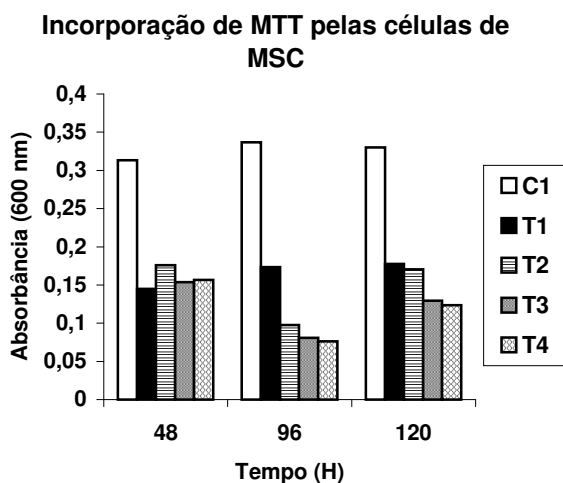


Gráfico 2. Avaliação da incorporação de MTT pelas células de MSC cultivadas nos períodos de 48, 96 e 120 horas em Meios com MEM (C1); água de coco *in natura* (T1); água de coco com pH 7,5 (T2); água de coco com osmolaridade de 275 (T3); água de coco com pH 7,5 e osmolaridade de 270 (T4), sendo todos aos meios acrescentado 10% de SFB, glutamina e antibióticos. As células foram cultivadas a uma temperatura 37°C em 5% de CO₂.

Tabela 2. Avaliação da incorporação de MTT nas células de membrana sinovial caprina cultivada em água de coco.

Meios	Crescimento celular (Leitura da absorbância em filtro de 600 nm)		
	Tempo em horas		
	48	96	120
Controle	0.3134±0.0627	0.3368±0.0638	0.3301±0.0559
Tratamento T₁	0.1451±0.0185**	0.1733±0.0430**	0.1775±0.0294**
Tratamento T₂	0.1758±0.0345**	0.0974±0.0207**	0.1706±0.0418**
Tratamento T₃	0.1538±0.0219**	0.0809±0.0336**	0.1296±0.0315**
Tratamento T₄	0.1566±0.0378**	0.0763±0.0211**	0.1237±0.0324**

Células foram cultivadas por até 5 dias a 37 °C em 5% CO₂. Os valores estão em média± desvio padrão. Diferenças significativas com relação ao controle, foram de * P<0,01.

Tratamento T₁ – água de coco *in natura*

Tratamento T₂ - água de coco com pH 7,5

Tratamento T₃ - água de coco com osmolaridade de 275

Tratamento T₄ – água de coco com pH 7,5 e osmolaridade de 270

Experimento 3 - avaliação do efeito da água de côco no cultivo de células da membrana sinovial de pequenos ruminantes infectados pelo vírus Maedi-Visna.

Para a realização do experimento 3, foram utilizadas células de MSC de alta passagem (20^a passagem). Durante a avaliação do experimento foram observados níveis satisfatórios de produtividade e permissividade a replicação da amostra viral MVV - K1514. Apesar de serem células heterólogas (células caprinas), o vírus Maedi-Visna induziu a formação de células multinucleadas com 4 núcleos já no terceiro dia após inoculação no meio controle MEM. A partir do 4^o dia foi visualizado sincícios com células gigantes apresentando 6 núcleos acompanhada de lise celular, que aumentaram em quantidade até o termino do período estipulado (Figura 1).

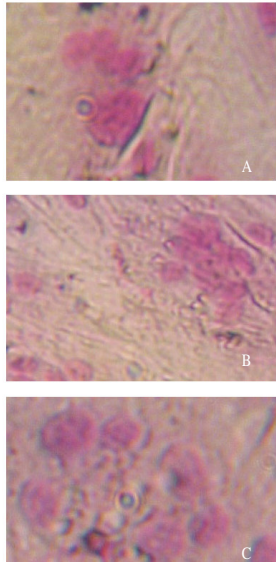


Figura 1. Efeito do vírus Maedi-Visna infectando células da Membrana sinovial caprina (MSC) após 72 (A); 120 (B) e 144 horas (C) da inoculação do vírus no meio controle (MEM) suplementado com 10% SFB. Placas coradas pelo método de May-Grumwald e Giemsa.

Nos meios testes G_1 , G_2 e G_3 , foi observado em 48 horas, após a inoculação viral, alteração e destruição parcial da monocamada celular, com presença de células com formato irregular (Figura 2). No terceiro dia de cultivo houve nos meios G_2 , G_3 presença de células arredondadas que no quarto dia foram completamente destruídas. No meio com 75% de água de coco e 25% de MEM (G_4) houve até o quinto dia a presença de células aderidas com formato irregular, contudo não houve formação de sincício.

O sobrenadante de cada meio foi colhido em 48, 120 e 144 horas após inoculação, depois diluído na proporção de 1:3, novamente inoculado em outra microplaca contendo células da MSC e mantidos em MEM suplementado por 2% SFB. Após 3 dias de cultivo, verificou-se no meio controle uma intensa multiplicação viral com formação de sincícios característicos e lise celular que aumentava em quantidade com o tempo de colheita realizado. Já nos meios testes foi visualizada uma reação inversa, onde nos meios G_1 e G_4 houve destruição da monocamada celular e nos meios testes G_2 e G_3 formação de células com 3 núcleos e lise celular.

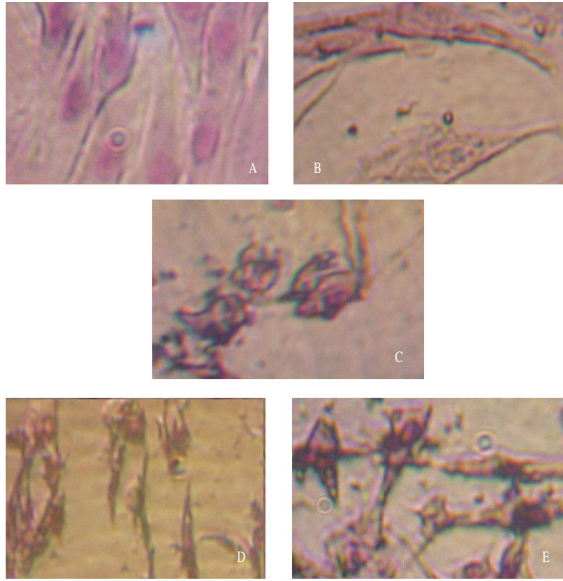


Figura 2. Morfologia da camada de células de Membrana sinovial caprina (MSC) cultivadas no período de 48 horas em meio MEM (A); água de coco *in natura* (B); 75% MEM + 25% de água de coco (C); 50% de MEM + 50% de água de coco (D) e 25% de MEM + 75% de água de coco (E) infectadas com o vírus Maedi-visna. Monocamada foi corada pelo Método de May-Grumwald e Giemsa e visualizada em um aumento de 100X.

DISCUSSÃO

No experimento 1, que utilizou MEM diluído em água de coco, foi observado um crescimento praticamente em todos os meios deste experimento durante o período de cultivo. Porém, quando as células foram tripsinizadas e re-cultivadas em MEM acrescidos de 10% SFB a adesão e multiplicação celular ocorreram apenas nas células ressuspensas do meio controle, M₁ e M₂. Estes resultados nos dão indícios que a proporção de 1:1 de MEM e água de coco *in natura* poderia ser utilizada para o cultivo destas células. Estes resultados estão de acordo com FERRI (1979), que em seu estudo mostrou que ao avaliar vários extratos e sucos de plantas que a água de coco era o melhor meio para cultivar tecidos vegetais. SCHATZMAYR *et al.*, (1970), utilizaram a água de coco diluída em salina Hanks a uma porcentagem de 25% e demonstraram que a mesma poderia ser utilizada como meio de manutenção em células de linhagem de rim humano (RH) por um período de até 15 dias.

Reforçando assim a possibilidade de utilizar a água de coco como meio de manutenção em cultivos celulares.

Avaliando a morfologia celular no experimento 1 verificou-se que a medida que elevava a concentração de água de coco no meio e o tempo de cultivo, também aumentava o número de células com morfologia alterada, assim como a quantidade de células soltas no sobrenadante. SCHATZMAYR et al., (1970), tentou utilizar água de coco a 25% em salina Hanks como meio de crescimento nas células RH, porém estas células degeneraram irreversivelmente após 4 replicações, mesmo quando a água de coco era dialisada. Este mesmo autor, também tentou utilizar o mesmo meio na manutenção de células fibroblásticas de pintos, mas a monocamada celular degenerou em poucas horas. As necessidades adequadas de nutrientes para que a célula entre na divisão celular é bastante diversificada para cada tipo celular. Isto vale, também, para a diferenciação celular que quanto mais indiferenciada maior a atividade celular e, conseqüentemente, maior necessidade de nutrientes para desempenhar as suas funções. Os resultados obtidos no trabalho podem indicar que pode haver déficit de nutrientes na água de coco que seriam supridos pelo MEM.

O experimento 2 utilizou água de coco *in natura* (Tratamento T₁) água de coco com pH ajustado para 7,5 (Tratamento T₂), osmolaridade de 275 (Tratamento T₃) e pH de 7,5 e osmolaridade de 270 (Tratamento T₄) todos adicionados de 10 %SFB, 0,1% de glutamina e antibióticos. Inicialmente para ajustar a osmolaridade e pH, utilizou a metodologia descrita por NUNES (1997), o qual utilizava o citrato a 5% como tampão, entretanto ao adicioná-lo na água de coco *in natura* para ajuste da osmolaridade, observou-se que a monocamadas de células de MSC arredodavam nos tratamentos T₃ e T₄ alguns minutos após distribuição. Desta forma o ajuste do pH e da osmolaridade foi realizado com hidróxido de sódio e água destilada apenas obtendo se assim uma maior viabilidade celular para realização deste experimento.

Os tratamentos utilizados neste experimento apresentaram monocamadas celulares com células de morfologia alterada (T₁), células fragilizadas com núcleo picnótico (T₂) e/ou desprendimento da monocamada celular (T₃ e T₄) que após recultivadas em meio MEM acrescidos de 10% SFB não se multiplicavam. Apesar da água de coco ter tido ótimos resultados no cultivo de células vegetais, como descrito

por PREVOT (1968), não teve o mesmo sucesso no cultivo de células da membrana sinovial de caprinos na metodologia aplicada. Além disso, a água de coco mesmo possuindo grande quantidade de componentes existentes nos meios convencionais, a concentração destes constituintes seria insuficiente para a nutrição deste tipo celular. Alguns estudos mostraram que com a variação da idade do fruto, época do ano e a região onde o vegetal foi plantado pode haver uma variação nos seus constituintes, assim como o pH e osmolaridade isto poderia influenciar diretamente no crescimento celular. Outra explicação seria que a água de coco contém em sua constituição fitohormônios que são essências para a diferenciação e multiplicação de células vegetais e com o desenvolvimento do fruto aumentam ou diminuem a concentração destas substâncias, que por sua vez podem ser ativados por uma variação de pH ou mesmo pela concentração de íons utilizados. Um destes fitohormônios, a 1,3 difeniluréia, uma citocinina que é utilizada como herbicida, quando ativada poderia ter sido uma das causas da toxicidade nas células de MSC utilizadas neste experimento.

No experimento 3 que utilizou o vírus Maedi-Visna para infectar as células da MSC e posteriormente mantê-los em meios com diferentes concentrações de MEM e água de coco, foi verificada no meio controle a replicação viral com efeito citopático característico com formação de sincício no quarto dia após a infecção. Apesar de serem células heterólogas (células caprinas) o vírus se replicou bem mostrando a sua capacidade de também infectar células caprinas (BANKS *et al.*, 1983; CALLADO, 1999). A ação viral na monocamada utilizando o meio controle foi caracterizada, predominantemente, por formação de sincício com pouca lise celular durante os 7 dias em que foram cultivadas, o que caracteriza esta amostra viral citopática em um primeiro momento e como lítica após nova inoculação em células MSC (*rapid/high*) (Querát *et al.*, 1984). Porém, quando o sobrenadante do meio controle foi colhido e novamente inoculado em células de MSC, verificou-se formação de sincício com lise celular já em 72 horas após a inoculação viral, mostrando alta infectividade deste vírus nestas células.

Nos meios testes G₁ (água de coco *in natura*) e G₄ (75% de água de coco e 25% de MEM) foi observado destruição da monocamada com poucas células

isoladas aderidas com formato irregular que se mantiveram por um período de até 5 dias sem que houvesse formação de células multinucleadas. Apesar da existência de células, que poderiam servir para a replicação do vírus, esta pode ter sido inibida pela grande concentração da água de coco existente no meio, uma vez que quando o sobrenadante destes meios utilizado para inocular outras células o vírus tornou a multiplicar-se causando destruição celular em 72 horas. Diferentemente foi visualizado nos meios testes G₂ (75% de MEM + 25% de água de coco) e G₃ (50% de MEM + 50% de água de coco), onde foi observadas destruição parcial da monocamada com regiões apresentando focos celulares no período de até 72 horas e a partir de 96 horas houve destruição total das células. A concentração da água de coco nestes meios poderia por sua vez agir de modo inverso fragilizando a célula permitindo assim que o vírus infectasse com maior intensidade. Quando os sobrenadantes destes meios foram utilizados para infectar outra monocamada de células da MSC observou-se já em três dias lise celular e formação de células com três núcleos, mostrando que o vírus estava presente nestes meios. Resultados similares foram observados por SCHATZMAYR E COLABORADORES (1970), o qual cultivou por 48 horas o Poliovírus em células de rim humano em salina Hanks suplementado com 25% de água de coco. Ele observou que o vírus mantinha suas característica de infectividade quando sobrenadante colhido do meio com água de coco era novamente inoculando em uma nova monocamada de células renais mantidas em meio Eagle com 2% SFB.

A utilização de meios com diferentes concentrações de Meio Essencial Mínimo e água de coco apresentou uma redução de 21,3% nos custos para a realização do cultivo celular. Quando se utiliza a água de coco *in natura*, os custos podem diminuir para até 40% tabela 3. Contudo, a viabilidade celular reduz consideravelmente. Por isto tem a necessidade de se fazer mais estudos para verificar os fatores que possam interferir no cultivo de células animais.

Tabela 3. Custo dos meios de cultivo celular.

Meios de cultivo (100 mL)	Preço (Reais)	Redução de preço (%)
MEM +10% SFB	18,70	-
Água de coco + 10% SFB	11,21	41,16
50% de água de coco +50% de MEM e SFB	14,72	21,3

CONCLUSÕES

Em conclusão, a água de coco mostrou-se pouco eficaz quando utilizada sozinha no cultivo de células da membrana sinovial caprina mesmo ajustando o pH e a osmolaridade para a fisiologia das células *in vitro*. Porém, foi capaz de manter a multiplicação das células da MSC por um período de até 5 dias, quando utilizando uma proporção de até 1:1 de MEM e água de coco desde que também fosse adicionados soro fetal bovino e glutamina. Na porcentagem de até 50% de água de coco o vírus Maedi -Visna pode replicar-se em células de membrana sinovial até a destruição da monocamada, que se deu em 4 dias de cultivo

AGRADECIMENTOS

A CAPES (Coordenação e aperfeiçoamento de Pessoal do Ensino Superior) pela concessão de bolsa de estudo, ao Dr. José Ferreira Nunes do Laboratório de Tecnologia de Sêmen do PPGCV pela ajuda na padronização da idade do coco e utilização de equipamentos.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ANANDARAJ, M.; SARMA, YR, Mature coconut water for mass culture of biocontrol agents. **Journal of Plantation Crops**. 25:1, p. 112-114, 1997.

BANKS, K. L.; ADAMS, D. L.; McGUIRE, T. C.; JAM, N; CARLSON, B. S. Experimental infection of sheep by caprine arthritis-encephalitis virus and goats by progressive pneumonia virus. **American Journal Veterinary Research.**, v.44. n. 2, p. 2307-2310, 1983.

CALLADO, A. K.C. Caracterização preliminar da infecção de células de membrana sinovial por amostras brasileiras de lentivírus de pequenos ruminantes. 1999. 50 f. **Dissertação (Mestrado em Produção e Reprodução de pequenos ruminantes)** – Universidade Estadual do Ceará, Fortaleza.

CARDOSO, R.T.S.; SILVA, A.C.; UCHOA, D.C.; SILVA, L.D.M. Cryopreservation of canine sêmen using a coconut water extender with egg yolk and three different glycerol concentrations. **Theriogenology**. 8697:1-9, 2002.

DARMINTO; RONOARDIJO, P.; SAURI, S.;SURYANA, N. Utilization of coconut juice (coconut water) for diluent of Newcastle disease vaccines. **Penyakit-hewan**, v.48:6-18, 1994.

EPSTEIN, D.; WYSOCKI, M.; BIDDLE, W.; STRECK, R.J.; ROLF, M.M.; PAULY, J.L. A serum-free culture medium for monocyte/macrophage studies. **Focus**, v.13, n. 4, p. 120-124, 1992.

FERRI, M. G.. Fisiologia Vegetal. 4 ed, São Paulo; EDUSP, 1979.

LEE, W. C.; McCONNELL, I.; BLACKLAWS, B. A. Electron microscope studies of the replication of a British isolate of Maedi-visna virus in macrophages and skin cell lines. **Veterinary Microbiology**, v. 43, p. 93-104, 1996.

LEROUX, C.; CORDIER, G.; MERCIER, I.; CHASTNG, J.; LION, M.; QUERAT, G.; GREENLAND, T.; VIGNE, R. MORNEX, J. F. Ovine aortic smooth muscle cell allow the replication of Visna-maedi virus *in vitro*. **Archives of Virology** v.140, p. 1-11, 1995.

NUNES, J. F. Utilização da água de coco como diluidor de sêmen de caprinos e ovinos. **Ciência Animal**, v. 7, n 2, p. 62-69, 1997.

PREVOT, P. L'utilisation du lait de côco comme accelerateur de croissance des vegetaux aleogineux, v. 23 n. 3, p. 177-186, 1968.

QUERÁT, G.; BARBAN, V.; SAUZE, N., FILLIPPI, P., VIGNE, R.; RUSSO, P.; VITU, C. Highly lytic and persistent lentiviruses naturally present in sheep with progressive pneumonia are genetically distinct. **Virology**, 52:672-697, 1984.

RYAN, S.; TILEY, L.; McCONNELL, I.; BLACKLAWS, B. Infection of dendritic cell by the Maedi-Visna Lentivirus. **Journal of Virology**, v.74, n.21, p.10096-10103, 2000.

SCHATZMAYR, H.G.; HOMMA, A.; LOUREIRO, M.L.P. O uso da água e coco verde para o cultivo de células animais. In **Rev. Brasil. Biol.** 36(1):97-100, 1970.

SIGURDSSON, B.; THORMAR, H.; PALSSON, P. A. Cultivation of visna virus in tissue culture. **Archives Gesante Virusforsch**, v 10, p. 368 -381, 1960.

SILVA, J.R.V.; LUCCI, C.M.; CARVALHO, F.C.A., BÁO, S.N.; COSTA, S.M.F.; SANTOS, R.R.; FIGUEIREDO, J.R. Effect of coconut water and Braun-collins solutions at different temperatures and incubations times on the morphology of goat preantral follicles preserved in vitro. **Theriogenology**, 54:809-822, 2000.

SOUSA, N.M.; TEIXEIRA, M.D.A.; OLIVEIRA, L.F. Água de coco sob a forma de fração ativada liofilizada adicionada ou não de gema de ovo e gel, como diluidores do sêmen ovino. In XXIII Congresso Brasileiro de Medicina Veterinária. Olinda, p.576, 1994.

TONIOLLI, R. Conservação de sêmen suíno em água de coco. **Anais do VIII Congresso Brasileiro de Reprodução Animal**. Belo Horizonte - MG, 1989.

6. CONCLUSÕES GERAIS

A água de coco quando utilizada sozinha em cultivo de células da MSC não foi satisfatória;

Quando diluída na proporção de até 50% em MEM e suplementado com SFB, a água de coco foi efetiva no crescimento das células de MSC por um período de cinco dias;

O vírus Maedi-Visna foi capaz de multiplicar-se em meio MEM contendo 50% de água de coco e 2% de SFB até a destruição completa da monocamada celular.

7. PERSPECTIVAS

Apesar da água de coco não ter sido eficaz no cultivo celular quando utilizada sozinha, os resultados mostraram a possibilidade dela ser usada no cultivo quando diluída em MEM. Isto faria com que os custos diminuíssem em até 50% e ainda aquisição do produto seria facilitada, tornando mais viável a realização do cultivo celular. Contudo, para elevar a eficácia da água de coco como meio de cultivo celular são necessários estudos mais aprofundados com relação a sua composição, verificando com exatidão os seus constituintes para assim adequar às necessidades nutricionais a cada tipo celular.

8. BIBLIOGRAFIA GERAL

ABREU, S. R. O.; CASTRO, R. S.; NASCIMENTO, S. A.; SOUZA, M. G. Produção de antígeno nucleoprotéico do vírus da Artrite Encefalite Caprina e comparação com o vírus Maedi-visna para a utilização em testes de Imunodifusão em ágar gel. **Pesquisa Veterinária Brasileira.**, v.11, n.2, p. 57-60, 1998.

ADAMS, D. S.; CRAWFORD, T. B.; BANKS, K. L.; McGUIRE, T. C.; PERRYMAR, L. E. Immune response of goats persistently infected with caprine arthritis-encephalitis virus. **Infection and Immunopathology.**, 28, p. 421-427, 1980.

ALBERTS, B; BRAY, D; LEWIS, J; RAFF, M; KEIT,R; WATSON, J.D. Isolamento e cultivo de células *in vitro*. ALBERTS, B; BRAY, D; LEWIS, J; RAFF, M; KEIT,R; WATSON, J.D In. **Biologia molecular da célula**. 3 ed. Editora: Artes Médicas, 1997, p156-162.

ALBERTS, B; BRAY, D; LEWIS, J; RAFF, M; ROBERTS, K; WATSON, J. D. Differentiated cells and the Maintenance of tissues. IN. **Molecular Biology of the cell**. 3 ed. Editora: Garland Publishing.Inc.. p. 1139-1194, 1991.

ANANDARAJ, M.; SARMA, YR, Mature coconut water for mass culture of biocontrol agents. **Journal of Plantation Crops**. 25:1, p. 112-114, 1997.

APRIGIO, C. J. L. Produção e padronização de kit experimental para IDAG para o Diagnóstico de Lentivirus de Pequenos Ruminantes. 2001. 30 f. **Monografia de estágio supervisionado do curso de Medicina Veterinária** – Universidade Estadual do Ceará (UECE), Fortaleza .

BANKS, K. L.; ADAMS, D. L.; McGUIRE, T. C.; JAM, N; CARLSON, B. S. Experimental infection of sheep by caprine arthritis-encephalitis virus and goats by progressive pneumonia virus. **American Journal Veterinary Research.**, v.44. n. 2, p. 2307-2310, 1983.

BLONDIN, I.; GRILLET, C.; THIOGANE, Y.; Formation de syncytia en culture et analyse de la composition protéique de plusieurs souches de virus de l' arthrite et de l'encéphalite de la chèvre (CAEV). **Annales recherche Vétérinaire**, v. 20, p.153-158, 1989.

BLUME, H. Cultivo e criopreservação de embriões murineos em água de coco. **Dissertação de mestrado em reprodução Animal** - Universidade Federal de Minas Gerais - UFMG, 49p, 1994.

CALLADO, A. K.C. Caracterização preliminar da infecção de células de membrana sinovial por amostras brasileiras de lentivírus de pequenos ruminantes. 50 f. **Dissertação (Mestrado em Produção e Reprodução de pequenos ruminantes)** – Universidade Estadual do ceará, Fortaleza, 1999.

CAMARGO, A.C. Água de coco na conservação de sêmen de abelha. **Informativo técnico do Centro Nacional de Pesquisa de coco**, n 27, p. 3, 1978.

CARDOSO, R.T.S.; SILVA, A.C.; UCHOA, D.C.; SILVA, L.D.M. Cryopreservation of canine sêmen using a coconut water extender with egg yolk and three different glycerol concentrations. **Theriogenology**. 8697:1-9, 2002.

CAREY, N.; DIEZIEL, R. G. The biology of Maedi-visna virus. An overview . **Brazilian Veterinary Journal**.,v.149, p., 437-454, 1983.

CASTRO, R. S.; LEITE, R.C.; RESENDE, M.; MARTINS, A.; GOUVEIA, A. M. G. Isolamento e identificação pela Imunofluorescência direta e reação em cadeia de polimerase do vírus da artrite-encefalite caprina , v. 51, n.3, p. 235-240, 1999.

CHILD, R. Coconut. London: **Longmans**. 1964, 216p.

CLEMENTS, J. E.; ZINK, M. C.; Molecular biology and pathogenesis of animal lentivirus. **Clinical. Microbiology Veterinary.**, v. 9, p. 100-117, 1996.

CoFFIN, J. M. Retroviridae: the virus and their of replication. In: FIELDS, B.N.; KNIPE, D. M.; HOWLEY,P. M; CNANOCK, R. M.; MELNICK, J. L.; MONATH, T. P.; ROIZMAN, B.; STRAUS, S. E. (ed). **Fields Virology**, Philadelphia, Lippincoh-Raven, p.1767-1847, 1996.

CONTI, F.; MARTI, L.C.; BRAUND, Y.F.; WONCHOCKIER, R.; GLINA, S.; COZZI, T. Água de coco como solução crioprotetora de espermatozóides humanos. **J. Bras. Urol.**, 23:85 – 87, 1997.

CORMARCK, D.H. Tecidos conjuntivo frouxo e adiposo. CORMARCK, D. H IN. **Histologia**, Rio de Janeiro. Editora Guanabara Koogan S.A., 1984, 388p.

CRAWFORD, T. B.; ADAMS, D.S.;CHEEVERS, W. P.; CORK, L. C. Chronic arthritis in goats caused by a retrovirus. **Science**, 207, p. 997-999, 1980.

CUNNINGHAN, C.H. *IN. Virologia Practica*. Editora Acribia. Espanha, p 102-110, 1971.

CUTLIP, R. C.; LAIRD, G. A. Isolation and characterization of a vírus associated with progressive pneumonia (Maedi) of sheep. **American Journal Veterinary Research**, v. 37, p. 1377-1382, 1976.

DARMINTO; RONOARDIJO, P.; SAURI, S.; SURYANA, N. Utilization of coconut juice (coconut water) for diluent of Newcastle disease vaccines. **Penyakit-hewan**, v.48:6-18, 1994.

DE BOER, G.F. Zwoergerziekte virus, the causative agent for progressive interstitial pneumonia (maedi) and meningo-leucoencephalitis (visna) in sheep. **Research Veterinay Science**, v. 18, p. 15-25, 1975.

DICKSON, J.; ELLIS, T. Experimental caprine retrovirus infection in sheep. **Veterinary Record**, v. 125, p. 649, 1989

DUA, I.S.; CHAMDRA. The infection and isolation of plant growth reguting substances from liquid endosperm of cocus nucifera – advances in coconut research and developed. New Delli, sn., p. 219 – 227, 1993.

EPSTEIN, D.; WY SOCKI, M.; BIDDLE, W.; STRECK, R.J.; ROLF, M.M.; PAULY, J.L. A serum-free culture medium for monocyte/macrophage studies. **Focus**, v.13, n. 4, p. 120-124, 1992.

FERRI, M. G.. **Fisiologia Vegetal**. 4 ed, São Paulo; EDUSP, 1979.

FIELDS, B. N.; KNIPE, D. M.; HOWLEY, P. M.; CHANOCK, R. M.; MELNICK, J. L.; MONATH, T. P.; ROIZMAN, B.; STRAUS, S. E. Retroviridae: The viruses and their replication. IN. **Fields virology**. Ed. Lippincotl-Raven, 3 ed., v. 1, p. 1767-1847, 1996.

FREMOND, Y.; ZILLER, R.; NUCE DE LAMOTHE, M. **The coconut Palm**. Bereu/Switzerland International Potash Istitute, 1966, 227p.

GENDELMAN, H. E.; NARAYAN, O.; MOLINEUAX, S.; CLEMENT, J. E. G. Slow persistent replication of lentivirus: role tissue macrophages and macrophages

precursors in bone marrow. **Proceeding National Academy Science**. USA., v. 82, p. 7086-7090, 1985.

GEORSSON, G.; HOUMERS, D.J.; PALSSON, P.A.; PETURSSON, G. Expression of viral antigens in the central nervous system of visna-infected by virus strains increased neurovirulence. **Acta Neurophatologica**. 77: 299 – 306, 1989.

GONDA, M. A.; BRAUM, M. J.; CLEMENTS, J. E.; PYPER, J. M.; WONGSTAAL, F.; GALLO, R. C.; GILDEN, R. V. Human T-cell lymphotropic virus type III shares sequence homology with a family of pathogenic lentiviruses **Proceeding National Academy Science**. USA, v. 83, p. 4007-4011, 1986.

HAASE, A. T. Pathogenesis of lentivirus infections. **Nature**, p.130-136, 1986.

HAASE, A. T.; GARAPIN, A. C.; FARAS, A. J.; VARMUS, H. E., BISHOP, J. M., Characterization of nucleic acid of the visna virus RNA dependent DNA polymerase.. **Virology**, v. 57, p. 251-258, 1974.

HARMACHE, A.; VITU, C.; GUINGUEN, F.; RUSSO, P.; BERTONI, G.; PEPIN, M.; VIGNE, R.; SUZAN, M. Priming with tat-deleted Caprine Arthritis Encephalitis Virus (CAEV) proviral DNA or live virus protects goats from challenge with pathogenic CAEV. **Journal Virology**, v. 72, n.8, p. 6796-6804, 1998.

HARMACHE, A.; VITU, C.; RUSSO, P.; BOUYAC, M.; HIEBLOT, C.; PEVERI, P.; VIGNE, R.; SUZAN, M. The caprine arthritis-encephalitis virus tat gene is dispensable for efficient viral replication in vitro and in vivo. **Journal Virology**, v.69, n. 9, p.5445-5454, 1995.

HECKERT, R.A.; MCNAB, W.B.; RICHARDSON, S.M; BRISCOE, M.R. Evolution of an enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of antibodies to caprine

arthritis-encephalitis virus in goats serum. **Canadian Journal Veterinary Research**, v. 56, p. 237-241, 1992.

HENRIQUEZ, D.; PIRAS, R.; PIRAS, M.M. The effect of surface membrane modification of fibroblastic cell on the entry process of *Trypanosoma cruzi*, trypomastigotes. **Molecular and Biochemical Parasitology**, 2:359-366, 1981.

HOLTZMAN, E & NOVIKOFF, A. B. Células e estruturas celulares. Ed. Guanabara. p. 414-419, 1985.

HOUWERS, D .J. Experimental maedi-visna control in the Netherlands. In Sharp J. M. Holf-Jorgensen R (eds). Slow virus in sheep, goats and cattle, Luxembourg. **Commision of the European Communities**, p 115-121, 1985.

KENNEDY – STSKOPF, S.; ZINK, C., NARAYAN,O. Pathogenesis of lentivirus-induced arthritis:phenotypic evaluation of T lymphocytes in sinovial fluid, sinovium and peripheral circulation. **Clin. Immunol. Immunopathol.**, 52:323-330, 1989.

LAGUNA, L. E. Determinações físicoquímicas da água de côco verde em duas variedades (*Cocus nucifera*, L) coco da praia e anão. **Monografia de especialização**-Universidade Estadual do Ceará - UECE, 1996.

LAGUNA, L. E.; NUNES, J. F. Determinação físicoquímica da água de côco verde em duas variedades de *Cocus nucifera*, L.. **Ciência Animal** .Fortaleza, v.2, n.2, p. 105. 1992.

LEE, W. C.; McCONNELL, I.; BLACKLAWS, B. A. Electron microscope studies of the replication of a British isolate of Maedi-visna virus in macrophages and skin cell lines. **Veterinary Microbiology**, v. 43, p. 93-104, 1996.

LEROUX, C.; CORDIER, G.; MERCIER, I.; CHASTNG, J.; LION, M.; QUERAT, G.; GREENLAND, T.; VIGNE, R. MORNEX, J. F. Ovine aortic smooth muscle cell allow

the replication of Visna-maedi virus *in vitro*. **Archives of Virology** v.140, p. 1-11, 1995.

LETVIN, N. I.; DANIEL, M. D.; SENGAL, P. K.; DESROSIERS, R. C.; HENT, R. D.; WALDREN, L. M.; MACKEY, J. J.; SCHIMIDI, D. K.; CHALIFOEX, L. V.; KING, N. W. Induction of AIDS like disease in macaque monkey with T-cell tropic retrovirus STLV-H. **Science**, v. 230, p. 71-73, 1987.

LEVI-SCHAFFER, F.; KALAPHOZ, L.; WEINRAUCH, L.; SHALIT, M. Coculture of mast cell with psoriatic fibroblasts: an experimental system for studying the two cell interactions. **Journal on the European Academy of Dermatology and Venereology**, 4:230-234, 1995.

MARQUES, A. L. Um produto de mil e uma utilidades "água de coco". IN. **Informativo técnico da Emater-SE sobre água de coco**. n. 7, p. 4, 1979.

METIVIER, J.R. **Fisiologia Vegetal e Citocinina**. 4ed. São Paulo, EDUSA, p. 93-127 1979.

MONTEZUMA, Jr., P.A.; VIANA NETO, R.; NUNES, J.F., Utilização da água de coco *in natura* com adição de gema e ovo como diluente de congelação do sêmen canino, em paillets de 0,5 mL. In. **XXIII Congr. Bras. Med. Vet.** Olinda, p.535, 1994.

NARAYAN, O.; CLEMENTS, J. E.; STRANBERG, J. D.; CORK, L. C.; GRIFFIN, D. E. Biological characterization of virus causing leucoencephalitis and arthritis in goats. **Journal Genetic Virology** ,v. 50, p. 69-79, 1980.

NARAYAN, O.; CLEMENTS, J.E. Biology and pathogenesis of lentivirus. **Journal General of Virology**, v. 70, p.1617-1639, 1989.

NOGUEIRA, R.D.M.; VASCONCELOS, P.R.L. Água de coco como meio de cultura em conservante de córnea: estudo experimental em coelhos. *Ver. Brás. Oftal.* V.59, n.6, p.395 – 401, 2000.

NUNES, J. F. Utilização da água de côco como diluidor de sêmen de caprinos e ovinos. **Ciência Animal**, v. 7, n 2, p. 62-69, 1997.

NUNES, J. F; COMBARNOUS, Y. Utilização da água de côco e suas frações ativas como diluidor do sêmen dos mamíferos domésticos. IN. **I SIMPOSIO DE BIOTECNOLOGIA DA REPRODUÇÃO DE ANIMAIS DOMÉSTICOS**. Fortaleza, p. 53-63, 1994.

OLIVER, R. E., CATHCART, A. McNIVEN, R., POOLE, W., ROBATI, G. Infection of lambs with CAEV by feeding milk from infected goats. **Veterinary Record**. v. 19, p. 83, 1985.

PAKALA, R.; BENEDICT, C.R.; Endothelial cells regulate the proliferation of monocytes in vitro. **Atherosclerosis**, 147:25-32, 1999.

PALSSON, P.A. Maedi-visna in sheep , in **Kimberlin R.H (ED)**, *Slow Virus Diseases of Animal and Man*, Amsterdan, p., 17-43, 1976.

PEDERSEN, N .C.; HO, E. W.; BROWN, M. L.; YAMAMOTO, J. K. Isolation of a lynpho-tropic virus form domestic cats with an immunodeficiency-like syndrome. **Science**, v. 235, p. 790-793, 1987.

PEPIN, M.; VITU, C.; RUSSO,P.;MORNEX, J.P.;PETERHANS, E. Maedi – visna virus infections in sheep: a review. **Veterinary Research**, v.29, p. 341-367, 1998.

PÉTURSSON, G.; ANDRÉSDÓRTTIR, V.; ANDRÉSSON, O.; TORSTEINSDÓTTIR, S.; GEORGSSON, G.; PÁLSSON, P.A. Human and ovine

Lentiviral infections compared. **Comp. Immunn. Microbiol. Infect. Dis.**, v. 14, n. 4, p.277 – 287, 1991.

PICADO, C. El água de coco como meio de cultivo . Costa Rica, **Bol. Ofic. Sanit. Pan Americ.**, v.12, p. 960 – 965, 1942.

PREVOT, P. L'utilisation du lait de côco comme accelerateur de croissance des vegetaux aleogineux, v. 23 n. 3, p. 177-186, 1968.

PROVENZA, D. V. Tejidos básicos (Histologia). PROVENZA, D.V. **Histología y Embriología Ondotologica**. 1Ed., méxico, Editora Interamericana, 272p, 1974,.

QUÉRAT, G.; AUDOLY, G.;SONIGO, P., VIGNE, R. Nucleotide sequence analysis of AS-OMVV, a visna-related ovine lentivirus: philogenetic history of lentiviruses. **Virology**, v.175, p. 434-447, 1990.

QUERÁT, G.; BARBAN, V.; SAUZE, N., FILLIPPI, P., VIGNE, R.; RUSSO, P.; VITU, C. Highly lytic and persistent lentiviruses naturally present in sheep with progressive pneumonia are genetically distinct. **Virology**, 52:672-697, 1984.

RIMSTAD, E.; EAST, N. E.; TORTEN, M;HIGGINS, J.; DEROCK, E.; PEDERSEN, N. C. Delayed soroconversion following naturally acquired caprine arthritis-encephalitis virus infectious goats. **American Journal Veterinary Research**, v. 54, n.11, p. 1858-1862, 1993.

RYAN, S.; TILEY, L.; McCONNELL, I.; BLACKLAWS, B. Infection of dentritic cell by the Maedi-Visna Lentivirus. **Journal of Virology**, v.74, n.21, p.10096-10103, 2000.

SCHATZMAYR, H.G.; HOMMA, A.; LOUREIRO, M.L.P. O uso da água e coco verde para o cultivo de células animais. In **Rev. Brasil. Biol.** 36(1):97-100, 1970.

SIGURDSSON, B. Maedi, a slow progressive pneumonia of sheep: an epizootiological and a pathological study. **British Veterinary Journal**, v. 110, p. 225-270, 1954.

SIGURDSSON, B.; THORMAR, H.; PALSSON, P. A. Cultivation of visna virus in tissue culture. **Archives Gesante Virusforsch**, v 10, p. 368 -381, 1960.

SILVA, J.R.V.; LUCCI, C.M.; CARVALHO, F.C.A., BÁO, S.N.; COSTA, S.M.F.; SANTOS, R.R.; FIGUEIREDO, J.R. Effect of coconut water and Braun-collins solutions at different temperatures and incubations times on the morphology of goat preantral follicles preserved in vitro. **Theriogenology**, 54:809-822, 2000.

SOUSA, N.M.; TEIXEIRA, M.D.A.; OLIVEIRA, L.F. Água de coco sob a forma de fração ativada liofilizada adicionada ou não de gema de ovo e gel, como diluidores do sêmen ovino. **In XXIII Congresso Brasileiro de Medicina Veterinária**. Olinda, p.576, 1994.

STASKUS, K.A.; COUCH, L.; BITTERMAN, P.; RETZEL, E.F.; ZUPANCIC, M.; LIST, J.; HAASE, A.T. In site amplification of visna virus DNA in tissue sections reveals a reservoir of latency infected cell. **Microbiol. Pathogenesis.**, 11:67, p. 76, 1991.

STORSET, A. K.; EVERSEN, O.; RIMSTAD, E. Immunohistochemical identification of caprine arthritis-encephalitis virus in parafin-embedded specimens for naturally infected goats. **Veterinary Pathology**, v. 34 n. 3, p. 180-188, 1997.

TEIXEIRA, M. F. S.; VERONIQUE, L.; MSEBLI-LAKAHL, L.; CHETTAB, A., CHEBLOUNE, Y.; MORNEX, J. F. Imortalization of caprine fibroblasts permissive for replication of small ruminant lentiviruses. **American Journal Veterinary Research**, v.58 n 6, p. 579-584, 1997.

THOMAS, C.; FINN, M.; TWIG, L.; DEALAZES, P.; Microsporidia (*Encephalitozoon cuniculi*) in Wild rabbit in Australian. **Australian Veteriunary Journal**. v. 75, n.11, p. 808-810, 1997.

TONIOLLI, R. Conservação de sêmen suíno em água de côco. **Anais do VIII Congresso Brasileiro de Reprodução Animal**. Belo Horizonte - MG, 1989.

TYLEWSKA, W. S. & CHMIELEWSKI, T. Zentralblatt Fur. Bacteriologie, v. 286 n. 3, p. 263-370, 1997.

VAN DE MAATEN, M. J.; BOOTHE, K. D. SEGER, G. L Isolation of a virus form cattle with persistent lymphocithosis. **J. Nat. Canc. Inst.**, v. 49, p. 1649-1657, 1972.

VAN OVERBEEK, J. Cytokinins. Plants Growth and Development. 2 ed. Copyright, USA. 1942.

VERWOERD, D.W.; PAYNE, A. L.; YORK D. F.; MYER, M. S. Isolation and preliminar characterization of the Jaagsiekte retrovirus (JSRV). **Onderstepoort Journal Veterinary Research**, v.50, p. 309-316, 1983.

WATT, N. J.; SCOTT,P.; COLLIE, D. D. S. Maedi-visna virus infectious in practice, In. **Practice**. September, p. 139-247, 1994.

WEISS, R.A. Lentivirus tropism and patogénesis. **Immunology Lettes**. 66:3 – 5, 1999.

WILCOX, G.E.; Jembrana Disease. **Aust. Vet. J.**, v. 75, n.7, p.492-493, 1997.

YU, Y.S.; SUN, X.S.; JIAN, H.N.; HAN, Y.; ZHAO, C.B.; TAN, J.H. Studies of the cell cycle of in vitro cultured skin fibroblast in goats: work in progress. **Theriogenology**, 59:1277 – 1289, 2003.

ZANG, L.; LIU, S.; LUO, C.B; SUNG, G. **Journal of Veterinary science and Technology**, v. 26;3, p. 21-22, 1996.

ZINK, M. C.; YAGER, J. A.; MYERS, J. D. Pathogenesis of caprine arthritis encephalitis virus. Celular localization of viral transcripts in tissues of infected goats. **American Journal Pathology** v.136, p. 843-854, 1990.

ZINK, M.C.; JOHNSON, L.K. Pathobiology of lentivirus infections of sheep and goats. **Virus Research**., p., 139-154, 1994.