



Trabalhos Distinguidos com Menção Honrosa

Categoria Painel

Uso de Células Mesenquimais Diferenciadas em *Neuron-Like Cells* na Propagação de Vírus Neurotrópicos

Okamura LH¹, Gameiro R¹, Táparo CV¹, Rezende GCD¹, Curci VCM², Cardoso TC¹

¹Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Medicina Veterinária de Araçatuba, SP, Brazil

²Agência Paulista de Tecnologia Agropecuária Alta Noroeste, APTA, Araçatuba, São Paulo, Brazil

Introdução: As células mesenquimais indiferenciadas foram originalmente identificadas a partir de células mononucleares da medula óssea de camundongos. São encontradas em pequenas quantidades, mas podem ser isoladas e expandidas, e quando induzidas podem diferenciar-se em múltiplas linhagens com grande potencial para o uso na regeneração de tecidos e órgãos. Essas células podem ser embrionárias, do cordão umbilical e da medula óssea (células adultas). Todas são pluripotentes, entretanto sua capacidade de proliferação, auto-renovação e diferenciação diminui com a idade, o que valoriza o uso de células embrionárias. O cordão umbilical é uma fonte dessas células, principalmente na geléia de Wharton. Recentemente, essas células foram induzidas à diferenciação em *neuron-like cells* com sucesso na replicação do *Herpesvirus* bovino tipo 5, considerado o modelo biológico para o estudo do neurotropismo. Considerando que os diferentes vírus neurotrópicos tem como modelos experimentais a infecção *in vivo* de animais, como camundongos, coelhos, e em alguns casos, ruminantes, cães e gatos, e até ovos embrionados de galinhas SPF (*specific pathogen free*). O presente estudo visa ampliar os conhecimentos na diferenciação celular como modelo biológico alternativo aos modelos de infecção viral tanto em animais como em humanos.

Objetivos: Promover a diferenciação de células mesenquimais de cordão umbilical bovino em *neuron-like cells* e avaliar a sua susceptibilidade aos vírus neurotrópicos *Herpesvirus* bovino tipo 1 e 5, *Paramyxovirus* aviário além do vírus da raiva, como modelos experimentais neurotropismo viral

Metodologia: As células do cordão umbilical bovino foram obtidas como descrito anteriormente e induzidas a diferenciação neuronal com suplementos STEMPRO-Neurogenic[®] (Invitrogen[®]) segundo as normas do fabricante. Após o período de indução por 21 dias, as células foram caracterizadas quanto à morfologia, proliferação, característica fenotípica e por fim, submetidas à infecção com os vírus neurotrópicos. O título viral foi calculado como multiplicidade ótima de infecção (MOI) de 1, e adsorção seguida de 1h de incubação. A cinética de replicação foi conduzida nos períodos de 6, 12, 24, 36 e 56 horas após a infecção. A presença de antígenos virais foram confirmados com imunofluorescência indireta com respectivos anticorpos monoclonais para BoHV-1 e 5, PMVA -1 e anti-nucleoproteína do vírus rábico, respectivamente. As imagens foram capturadas e analisadas em relação às células não infectadas. Para detecção genômica foi realizada a reação em cadeia da polimerase e no caso dos vírus de RNA com a transcrição reversa. Para análise estatística foi realizada Análise de Variância (ANOVA) com medidas repetidas e teste de Tukey para comparação de médias entre os grupos. O nível de significância adotado foi de 5% (P<0,05), empregando-se o programa SAS (Statistical Analysis System; Cary, NC, USA).

Resultados: A diferenciação das células mesenquimais em *neuron-like cells* foi confirmada pela marcação de receptores neuronais como GFAP (proteína glial fibrilar ácida), MAP2, β -tubulina, neurofilamento 200, CXR4 e neurotropina 3 (NT3),



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
Campus de Araçatuba
Workshop para Animais de Biotério
21 a 23 de agosto de 2013



como já descrito anteriormente. Durante os períodos estudados, os BoHV-1 e 5 tiveram tanto a detecção antigênica (glicoproteína C) bem como a amplificação do gene US9 em maior concentração as 24 horas após a infecção, resultado comum aos *α-herpesvirus* com ciclo de replicação rápido. Entretanto, o *Paramyxovirus* aviário apresentou produção antigênica após 36 horas de infecção, entretanto amplificação do gene da hemaglutinina viral ocorreu em todos os períodos estudados. Por último, o vírus da raiva, amostra de laboratório, apresentou produção antigênica e detecção genômica somente, 56 horas após a infecção, sem nenhum efeito citopático aparente comum ao gênero *Lyssavirus*. Em relação aos efeitos citopáticos observados em ambos os modelos BoHV-1 e 5 e *Paramyxovirus* aviário, os mesmos se caracterizaram por arredondamento celular e aumento no citoplasma das células neuronais.

Conclusão: A diferenciação de células mesenquimais da geléia de Wharton de cordão umbilical de animais domésticos pode contribuir para o estudo da neuropatogenicidade de vírus neurotrópicos, diminuindo o uso de modelos animais devido ao seu potencial de diferenciação. Ademais, as mesmas também podem ser usadas para estudos de terapia e toxicidade de anti-virais.

Apoio Financeiro: FAPESP (2011/17395-2) 2012/16715-6 CNPq

Nº Protocolo CEUA: 009876/09

A Influência do Treinamento Físico Resistido no Tecido Ósseo de Ratos Osteopenicos Induzidos por Suspensão pela Cauda

**Oliveira BRSM¹, Coêlho JCA, Oliveira MT¹, Souza BS¹, Peres MJ², Medeiros RA²,
Florindo PL¹, Louzada MJQ^{1, 2}**

¹Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Medicina Veterinária de Araçatuba, SP, Brazil;

²Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Odontologia de Araçatuba, SP, Brazil

Introdução: A carga mecânica sobre o osso é um importante regulador de maturação, manutenção e força esquelética e o exercício físico resistido favorece a osteogênese.

Objetivo: O objetivo deste estudo foi determinar a influência do treinamento físico resistido em tíbias de ratos osteopênicos induzidos.

Metodologia: O experimento foi realizado com 30 ratos Wistar. Ao completarem 100 dias foram distribuídos aleatoriamente em três grupos: controle (GC), suspenso (GS) por 21 dias e em seguida colocado em solo por mais 21 dias; (GSE) suspenso por 21 dias e em seguida submetido a exercício em escada (8 séries de exercício), com peso equivalente a 80% da sua força máxima, 5 vezes na semana, durante 21 dias. Após o período experimental os animais foram eutanasiados, as tíbias submetidas à densitometria óssea e ensaio mecânico, para avaliação da densidade mineral óssea - DMO (g/cm^2) e Rigidez (kN/m), respectivamente. Os resultados passaram por análise estatística – ANOVA e Teste de Tukey (5%).

Resultados: Os resultados, apresentados como média e desvio padrão, demonstram que a suspensão pela cauda provocou diminuição das propriedades ósseas com DMO do GS ($0,131 \pm 0,008 \text{g}/\text{cm}^2$) e do GC ($0,145 \pm 0,013 \text{g}/\text{cm}^2$) e Rigidez do GS ($119,08 \pm 17,47 \text{ kN}/\text{m}$) e do GC ($149,36 \pm 21,02 \text{ kN}/\text{m}$). Observou-se também que a suspensão seguida do exercício, GSE, restaurou os valores de DMO e Rigidez [$(0,166 \pm 0,012 \text{ g}/\text{cm}^2)$; ($142,63 \pm 22,02 \text{ kN}/\text{m}$)] quando comparados com o GC.

Conclusão: A prática do exercício resistido preveniu a diminuição das características ósseas provocadas pela ausência de carga.

Protocolo CEUA: 2012-02398



Trabalhos Distinguidos com Menção Honrosa

Categoria Oral

Doença Respiratória Crônica Murina e Intervenção na Pesquisa: Relato De Caso

Arenales AAT¹, Almeida ACO¹, Luvizotto MCR¹

¹ Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Medicina Veterinária de Araçatuba, SP, Brazil

A Doença Respiratória Crônica Murina (DRCM) ocorre em ratos criados em biotérios e tem importância em estudos prolongados. É causada por vários agentes, em particular pela bactéria *Mycoplasma pulmonis*. O diagnóstico da DRCM inclui o exame anatomopatológico e testes auxiliares. Este relato refere-se ao exame necroscópico de ratos (*Rattus norvegicus*) provenientes de um biotério, onde animais utilizados em uma pesquisa de longa duração demonstraram resultados insatisfatórios, incluindo um óbito em procedimento anestésico. Ao exame macroscópico, nos brônquios e traqueia havia conteúdo mucoso e no parênquima pulmonar, múltiplos cistos de 0,5 centímetros de diâmetro distribuídos aleatoriamente, preenchidos por muco. Na microscopia (HE) observou-se bronquiectasia acentuada, bronquite linfoplasmocitária e hiperplasia do epitélio, sendo estes compatíveis com a DRCM. O diagnóstico diferencial nesta apresentação da DRCM são o *Mycoplasma pulmonis* e o CAR *bacillus*. A exclusão do CAR *bacillus* foi realizada com a negatividade para a coloração a base de prata, sendo então chamada de Mycoplasmosse Respiratória Murina. Para o controle de surtos e profilaxia da DRC recomenda-se a higienização mais freqüente das gaiolas, redução da densidade de animais e controle dos níveis de amônia ambiental. Conclui-se que a DRCM é um importante fator interferente em pesquisas, especialmente nos procedimentos anestésicos, e pode evoluir com óbito do animal.

Avaliação da influência do ácido tranexâmico na osseointegração de implantes de titânio sem estabilidade primária

Capalbo BC¹, Louzada MJQ², Alves-Claro APR³, De Oliveira JAG³, Alves-Rezende MCR¹

¹ Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Odontologia de Araçatuba, SP, Brazil

² Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Medicina Veterinária de Araçatuba, SP, Brazil

³ Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Engenharia de Guaratinguetá, SP, Brazil

Introdução: o titânio é largamente empregado na fabricação de implantes dentários graças às propriedades mecânicas e químicas. A ativação da cascata de coagulação é imediata à implantação de biomateriais em tecidos e seu contato com sangue. Atribui-se à trombogenicidade do titânio papel decisivo na osseointegração.



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
Campus de Araçatuba
Workshop para Animais de Biotério
21 a 23 de agosto de 2013



Objetivos: Avaliou-se o efeito do ácido tranexâmico na geração do coágulo sanguíneo, formação óssea e osseointegração de implantes dentários.

Metodologia: Defeitos com 2,2 mm de diâmetro e 3,2 mm de comprimento foram criados na tíbia direita de 20 ratos. Metade dos defeitos não receberam tratamento, e a outra metade recebeu tratamento com ácido tranexâmico. Implantes de 2,0 mm de diâmetro e 3,0 mm de comprimento foram colocados em todos os defeitos. As peças foram processadas em metilmetacrilato (azul de Stevenel / vermelho de alizarina's). Para avaliar o percentual periimplantar reparacional foi realizada análise de imagens obtidas por microscópio óptico acoplado a câmera digital/software leica/adobe Photoshop qwin. Os dados foram analisados estatisticamente (significância 5%).

Resultados: Histomorfometria mostrou 61,59% de contato osso/implante no grupo que não recebeu tratamento e 70,89% para o grupo que recebeu o ácido tranexâmico..

Conclusão: Os resultados obtidos sugerem favorecimento da geração do coágulo sanguíneo, formação óssea e osseointegração pela ação do ácido tranexâmico, aumentando a capacidade osteogênica dos implantes.

Apoio Financeiro – Fundunesp 91349-13

Nº Protocolo CEUA - 00265/12