

Obtenção de NKs sanguíneas: Em relação à avaliação das células NK esplênicas, os baços dos animais foram removidos cirurgicamente após anestesia e mantidos em solução de RPMI estéril e gelado. Este órgão foi, então, lavado três vezes em RPMI estéril e macerado. Eppendorfs foram utilizados para a realização da contagem de células em câmara de Neubauer e só foram utilizadas as amostras que apresentaram viabilidade maior que 95%. A partir desta contagem, as células foram marcadas com anticorpos conjugados a fluorocromos para análise por citometria de fluxo. Células NK foram marcadas com CD49b conjugado com APC, CD3 conjugado com FITC e NpK46 conjugado com PE BD PharMingen (San Jose, CA). **Análise dos níveis séricos de IFN- γ :** os níveis séricos de IFN- γ foram analisados pela técnica de Elisa. **Análise estatística:** Os dados foram avaliados pelo teste de Bartlett para determinação da homogeneidade das variâncias, ou seja, se são paramétricos ou não paramétricos. Os dados paramétricos foram analisados por análise de variâncias (ANOVA) de uma via seguida pelo teste de Newman-Keuls de comparações múltiplas, para avaliação de contrastes. Os resultados não paramétricos foram analisados pelo teste "U" de Mann-Whitney ou por Kruskal-Wallis com sua própria resolução. O nível de significância adotado foi de 0,05. Todos os cálculos foram realizados com o emprego do *Software* estatístico *GraphPad Prism*.

Resultados: O bloqueio dos receptores beta-adrenérgicos afeta a migração de NKs para o baço e o estresse modifica o perfil de citocinas.

Conclusões: No modelo de estresse psicológico murino de convivência com companheiros doentes há uma supressão da imunidade inata, dados também observados em humanos, tais como em caregivers. Neste trabalho foi constatado que a migração de NKs foi afetada por uma via beta-adrenérgica dependente que altera os níveis de citocinas séricas nos animais que conviveram com coespecíficos doentes.

Apoio financeiro: CAPES e FAPESP

MORFODIFERENCIAÇÃO DO ÓRGÃO DE GENÉ, DURANTE O PROCESSO REPRODUTIVO DO CARRAPATO *AMBLIOMMA SCULPTUM* (ACARI:IXODIDAE)

SANTOS, MARCELO FRANCISCO DOS^{1,2}; SOARES, MAGNA APARECIDA MALTAURO¹; LALLO, MARIA ANETE²; BARROS-BATTESTI, DARCI MORAES³; SPADACCI-MORENA, DIVA DENELLE¹

¹ Laboratório de Fisiopatologia, Instituto Butantan, São Paulo, SP, Brasil.

² Universidade Paulista - UNIP, São Paulo, SP, Brasil.

³ Laboratório Especial de Coleções Zoológicas, Instituto Butantan, São Paulo, SP, Brasil.

Introdução e Objetivos: Carrapatos ixodídeos apresentam grande importância na transmissão de doenças infecciosas para o homem e para os demais animais, sendo considerado como o segundo vetor mais prevalente [1]. A oviposição, essencial para a disseminação desse artrópode, envolve uma estrutura especializada denominada órgão de Gené, encontrada exclusivamente em carrapatos. [2]. Trata-se de uma estrutura em forma de saco, que se everte durante a oviposição e que está localizada na região anterior do idiossoma dorsal das fêmeas, entre a base do gnatossoma e o escudo, na emarginação [3]. Esse órgão produz uma secreção cerosa que fornece aos ovos proteção contra a perda de água e o crescimento de microorganismos [4]. Ainda, tem a propriedade de manter os ovos agrupados e reduzir a absorção de pesticidas do ambiente [5]. Quando esse órgão é impedido de secretar essa substância sobre os ovos, a taxa de eclosão diminui notavelmente, mesmo em condições adequadas de temperatura e umidade [6]. Apesar do órgão de Gené já ter sido descrito em algumas espécies de carrapatos, o conhecimento da sua morfologia, desenvolvimento e função ainda não foram esclarecidos na

espécie *A. sculptum*. Portanto, este trabalho teve como objetivo a descrição morfológica do órgão de Gené, nas etapas iniciais do processo reprodutivo da espécie *A. sculptum*. Adicionalmente, técnicas histoquímicas permitiram a identificação de substâncias presentes no citoplasma das células que compõem esse órgão e que podem constituir a sua secreção. **Materiais e Métodos:**

Foram utilizados carrapatos *A. sculptum*, adultos, provenientes de uma colônia mantida no laboratório. Os carrapatos foram alimentados em coelhos (CEUAIB 1279/14). As fêmeas, ingurgitadas, foram utilizadas no momento que caíram do hospedeiro (oh de queda) e no 5º dia de queda. Foram utilizadas também fêmeas virgens/jejum. O órgão de Gené foi dissecado e fixado em formol-cálcio, para avaliação da morfologia (azul de metileno), para localização de glicoproteína (PAS) e de proteína total (azul bromofenol), e incluídos em historesina. A demonstração de lipídeos foi realizada pelo Sudan Black. Para tanto, o material foi fixado em formol-cálcio e pós-fixado em solução aquosa de tetróxido de ósmio a 1%. Para impedir a extração dos lipídeos o material não foi desidratado, passando imediatamente para uma mistura de água e historesina (1:1) e, em seguida, para historesina, quando foi incluído. O órgão foi disposto em molde de inclusão contendo historesina de tal forma que ficou distendido para a obtenção de cortes ao longo do maior eixo. Para o exame ao microscópio eletrônico de varredura (MEV), o órgão foi fixado em glutaraldeído a 2% em tampão cacodilato de sódio, pós-fixado em OsO₄ a 1% e processado de forma rotineira. No 5º dia de queda, o órgão também foi processado para microscopia eletrônica de transmissão (MET). Para tanto, foi fixado em glutaraldeído a 2% em tampão cacodilato de sódio, pós-fixado em OsO₄ a 2%, desidratado em etanol, em concentrações crescentes, e incluído em Epon. **Resultados e Discussão:** Os resultados obtidos revelaram que o órgão de Gené das fêmeas virgens/jejum, sob lupa e ao MEV, era uma estrutura saculiforme, constituída de um corpo e dois cornos posteriores (Figura 1A e 1B). Tanto ao MEV como nos cortes histológicos, foi observada a presença de um par de glândulas não desenvolvidas (broto glandular), em cada lado do órgão, que correspondia às glândulas cranial e caudal (Figura 1C, 1D e 1E). Nos cortes histológicos foi constatado que a estrutura saculiforme era constituída por células epiteliais e uma camada amorfa, cuticular, além de uma luz em direção à emarginação (Figura 1E). A reação para PAS foi positiva na região dos brotos glandulares (Figura 1F). Não foram observadas inclusões lipídicas. Em oh de queda, na região do broto glandular, foi registrado o início de desenvolvimento de glândulas constituídas por túbulos simples, contíguos ao corpo do órgão de Gené (Figura 2A). As células aí presentes eram cúbicas, com núcleo contendo um ou dois nucléolos proeminentes e citoplasma com poucas inclusões lipídicas, como observadas com o Sudan Black (Figura 2B, 2C e 2D).

Na região de transição entre as células de revestimento do órgão e aquelas que estão formando as glândulas, foi observada reação positiva para PAS (Figura 2E), mas não para Sudan (Figura 2D). No 5º dia de queda, as glândulas se apresentaram em maior número, mais desenvolvidas e ramificadas (Figura 3A e 3B). As células que compunham as glândulas, colunares, apresentaram núcleo com cromatina condensada e presença de nucléolo (Figura 3C). Na luz das glândulas foi observada a presença de uma substância amorfa (Figura 3C e 3E). Entre essas células havia uma região mais clara que correspondia a interdigitações, como observada ao MET (Figura 3D). No citoplasma, a reação para PAS era positiva na maioria das células (Figura 3E). A reação para Sudan Black positiva foi observada principalmente na região apical das células (Figura 3F). Com relação às análises histoquímicas para proteínas totais (Azul de Bromofenol), o resultado foi negativo para os três grupos estudados.

Conclusões: Os resultados obtidos mostraram que a morfologia do órgão de Gené de *A. sculptum*, em animais virgens, é semelhante à de outros ixodídeos já estudados e que o desenvolvimento das glândulas se faz de maneira contínua e progressiva até o início da oviposição.

Referências

[1] SUCEN. Superintendência de Controle de Endemias. *Boletim Epidemiológico Paulista*, ago. 2006. Suplemento especial.

[2] SCHÖL, H. et al. Morphology and structural organization of Gené's organ in *Dermacentor reticulatus* (Acari: Ixodidae). *Exp. Appl. Acarol.*, Amsterdam, v. 25, n. 4, p. 327-352, 2001.

[3] BOOTH, T, F. Observation on the composition and biosynthesis of egg wax lipids in the cattle tick, *Boophilus microplus*. *Exp. Appl. Acarol.*, Amsterdam, v. 14, n. 2, p. 137-149, May 1992.

[4] BARROS-BATTESTI, D. M.; ARZUA, M.; BECHARA, G. H. *Carrapatos de importância médico-veterinária da Região Neotropical. São Paulo: Instituto Butantan, 2006.*

[5] BOOTH, T, F. Wax lipid secretion and ultrastructural development in the egg-waxing (Gené's) organ in ixodid ticks. *Tissue Cell*, v. 21, n. 1, p. 113-122, 1989.

[6] KAKUDA, H.; MÖRI, T.; SHIRAIISHI, S. Functional morphology of Gené's organ in *Haemaphysalis longicornis* (Acari: Ixodidae). *Exp. Appl. Acarol.*, Amsterdam, v. 16, n. 3, p. 263-275, Dec. 1992.

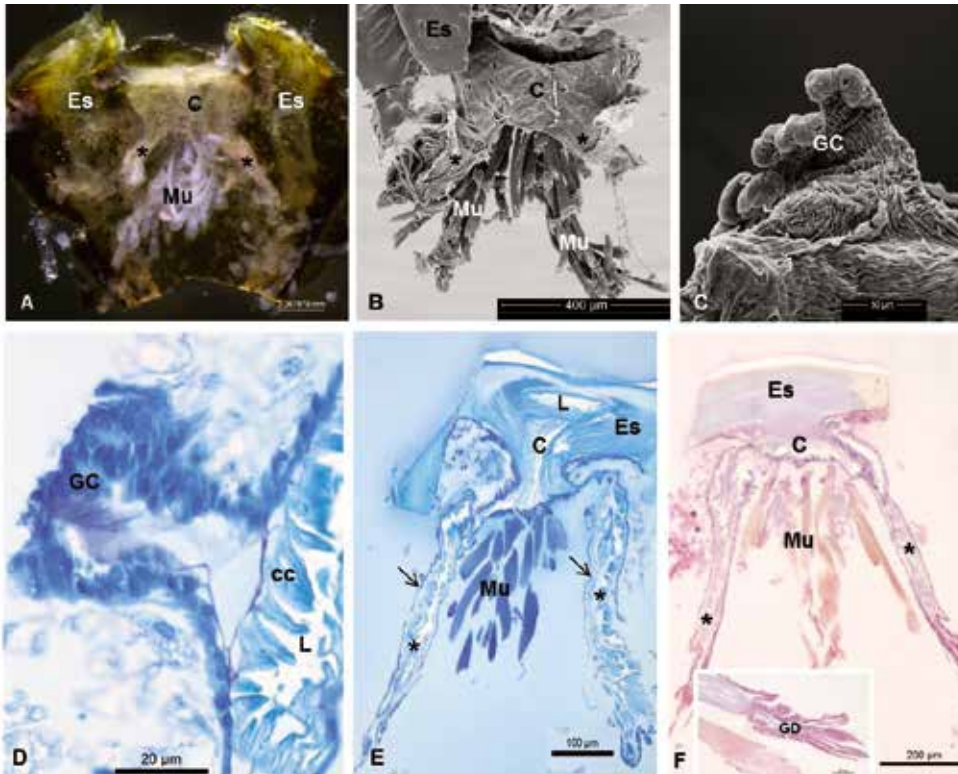


Figura 1 - Órgão de Gené de animal virgem/jejum

A - Órgão de Gené sob lupa. Corpo (C). Cornos posteriores (*). Músculos retratores (Mu). Escudo (Es).

B - Órgão de Gené onde é possível observar o corpo (C) e parte dos dois cornos posteriores (*). Músculos retratores (Mu). Escudo (Es). MEV.

D - Detalhe da glândula cranial não desenvolvida (GC). Cutícula (cc) Míúsculo (Mu). Escudo (Es). Luz (L). Azul de metileno.

F - Corte histológico do órgão de Gené. Corpo (C). Cornos posteriores (*). Músculo (Mu). Luz (L). Escudo (Es). PAS.

Inserto - Detalhe da glândula caudal não desenvolvida (GD). PAS.

Figura 2 - Oh de queda do hospedeiro

A - Notar a formação de glândulas tubulares (G). MEV.

B - Corte histológico mostrando uma parte do corpo (C) do órgão de Gené e início da formação de uma glândula tubular (G). Músculos retratores (Mu). Azul de metileno.

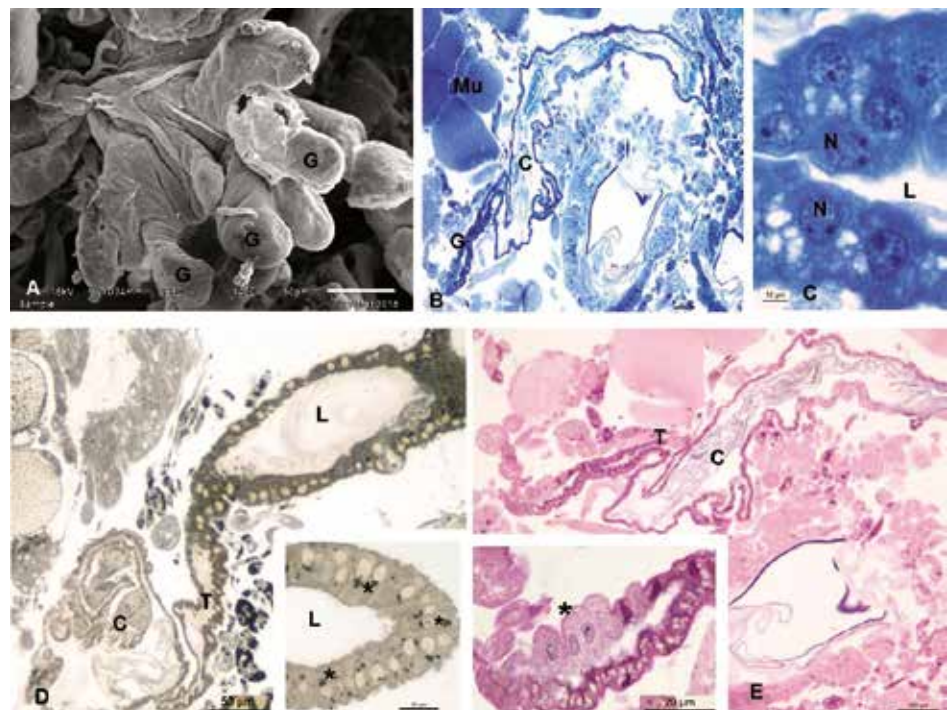
C - Detalhe das glândulas tubulares simples cujas células apresentam núcleos (N) com um ou mais nucléolos. Luz (L). Sudan Black.

D - Corte histológico mostrando parte do corpo (C) e transição de células de revestimento para células glandulares (T) Luz (L). Sudan Black.

Inserto - Detalhe mostrando inclusões lipídicas (*). Sudan Black.

E - Região de transição de células pavimentosas para cúbicas (T) onde as células são PAS positivas. Corpo (C).

Inserto - Detalhe da região de transição (T). Notar o aparecimento de células (*) que não são PAS positivas.



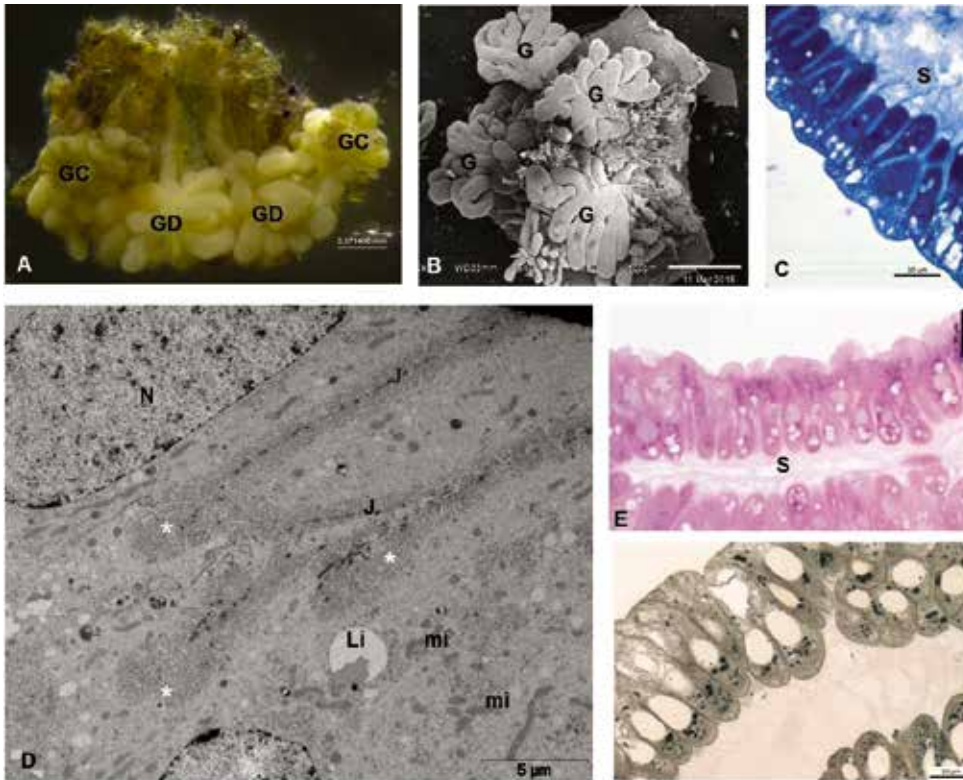


Figura 3 - 5º dia de queda do hospedeiro

A- Órgão de Gené sob lupa. Glândulas craniais (GC) e glândulas caudais (GD) já desenvolvidas.
B- Glândulas (G) com numerosas peças tubulares longas e ramificadas. MEV.
C- Detalhe das células que compõem as glândulas. Substância amorfa (S). Azul de metileno.
D- Nesta eletromicrografia, é possível observar que as regiões mais claras entre as células, observadas na fig.C, correspondem a interdigitações (*). N- núcleo. mi- mitocôndria. Li- inclusão lipídica. J- junção. MET.
E- Notar que as células são positivas para PAS. Presença de substância amorfa (S), na luz das glândulas.
F- Grande quantidade de inclusões lipídicas são observadas no citoplasma das células que constituem as glândulas, mostradas pelas reação por Sudan Black.

PROJETO EM ANDAMENTO: NEUROINVASIVIDADE E NEUROVIRULÊNCIA DO VÍRUS DA RAIVA EM AMOSTRAS DE SISTEMA NERVOSO CENTRAL DE BOVINOS

CENTOAMORE, NATALIA HELENA FRADA¹; MAIORKA, PAULO CÉSAR¹; ASANO, KAREN MIYUKI²; ACHKAR, SAMIRA MARIA²; SCHEFFER, KARIN CORRÊA²; FAHL, WILLIAN DE OLIVEIRA²; MORI, CLÁUDIA MADALENA CABRERA¹; MORI, ENIO²

¹ Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, SP, Brasil.

² Instituto Pasteur, São Paulo, SP, Brasil.

Introdução e Objetivos: A raiva está presente em todo o território brasileiro e possui importância na maioria dos estados, seja pelo seu caráter zoonótico (saúde pública), ou pelo seu caráter econômico, uma vez que é responsável por perdas à pecuária. O ataque de morcegos hematófagos aos bovinos acarreta em sérios prejuízos à pecuária, pois além dos animais mortos pela doença, os agredidos perdem peso e apresentam lesões em diversas partes do corpo, o que prejudica a qualidade do couro.[1] O vírus da raiva (RABV) não infecta todas as estruturas do sistema nervoso central (SNC) de modo uniforme. Vários estudos com resultados discordantes discutem quais seriam os fragmentos mais indicados para a detecção de antígenos virais. Os fragmentos que contêm antígenos de RABV com maior frequência podem variar de acordo com a patogenidade, tropismo da amostra viral em questão e de acordo com a espécie animal.[2] O Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA), recomenda que para o diagnóstico da raiva sejam enviados fragmentos do cerebelo, córtex, medula oblonga, hipocampo e tálamo. [3] Com base nesses dados, o presente estudo foi delineado para verificar a neuroinvasividade, neurovirulência e carga viral do RABV em amostras de SNC de bovinos provenientes do Setor de Diagnóstico da Raiva do Instituto Pasteur.

Materiais e Métodos: Serão utilizadas amostras de encéfalo (tálamo, córtex, cerebelo e tronco encefálico – mesencéfalo, bulbo e ponte) de bovinos naturalmente infectados, provenientes do Setor de Diagnóstico da Raiva do Instituto Pasteur, durante o período de abril de 2015 a abril de 2016. A confirmação da presença do antígeno do vírus da raiva será realizada com o emprego da reação de imunofluorescência direta, tendo como parâmetros a distribuição antigênica e a intensidade das reações. O isolamento viral, tanto por inoculação intracerebral em camundongos, quanto em cultura celular (células de neuroblastomamurino - N2A), será realizado pelo Setor de Virologia do Laboratório de Diagnóstico do Instituto Pasteur/SP. Além destas técnicas de confirmação da presença de antígeno viral, também serão realizadas a imunistoquímica, a RT-PCR convencional e a RT-PCR em tempo real, que permitirão a obtenção da carga viral. Os fragmentos serão submetidos à avaliação histopatológica com a coloração de HE. **Resultados parciais:** Até o presente das amostras de SNC colhidas de 59 bovinos houve 16 animais que apresentaram positividade para o antígeno do vírus da raiva na técnica de IFD, representando 26,7% do total.

Há muita discussão a respeito da melhor região do SNC a ser utilizada para a realização do diagnóstico da raiva pela demonstração do da presença de antígeno viral. A observação de uma distribuição antigênica mais na região de bulbo olfatório, tálamo e córtex, além disso o cerebelo apresentaria uma distribuição irregular e em pequena quantidade, variando de fraco positivo a negativo.⁴ Porém, de acordo com o que pôde ser observado até o presente momento, o cerebelo não possui uma intensidade antigênica distinta das outras regiões analisadas (Tabela 1)

Há indicações de que a região de predileção de maior intensidade antigênica do RABV seria o tronco encefálico e particularmente o tálamo, sendo que outras regiões, como hipocampo, cerebelo e córtex poderiam resultar em falsos negativos.[3]