

PARTÍCULAS VIRAIS EM CULTURA DE CÉLULAS BHK-21: ULTRAESTRUTURA, OCORRÊNCIA E SIGNIFICADO *

Marli UEDA **
Hatune TANAKA **
Dalton R. WEIGL **
Paulo P. JOAZEIRO **

RIALA6/550

UEDA, M.; TANAKA, H.; WEIGL, D.R. & JOAZEIRO, P.P. — Partículas virais em cultura de células BHK-21: ultraestrutura, ocorrência e significado. *Rev. Inst. Adolfo Lutz*, 42(1/2):71-75, 1982.

RESUMO: Em culturas de células BHK-21, são descritas partículas semelhantes a vírus, cuja morfologia característica corresponde às "partículas R" constantes da literatura internacional. Por meio de fotomicrografias eletrônicas, são documentados a formação dessas partículas por brotamento nas membranas do retículo endoplasmático, bem como, detalhes da sua ultraestrutura.

DESCRITORES: vírus; "partícula R", detecção, ultraestrutura; célula BHK-21, cultura; microscopia eletrônica.

INTRODUÇÃO

Células BHK-21, ou seja, fibroblastos de rim de hamster recém-nascidos são amplamente utilizadas em virologia.

No curso de observações realizadas na Seção de Microscopia Eletrônica do Instituto Adolfo Lutz, em células BHK-21 experimentalmente inoculadas em vários laboratórios, que trabalham na área de virologia, freqüentemente eram detectadas partículas semelhantes a vírus, cuja morfologia não correspondia ao vírus objeto da pesquisa. A ocorrência destas partículas nas amostras examinadas determinou cuidados especiais por parte dos autores, no sentido de conhecer sobre a ocorrência, estrutura e aspectos da formação destas partículas, a fim de que pudessem operar livres de erros que viessem comprometer os trabalhos em andamento.

A realização do presente trabalho tem como objetivo fornecer elementos que possam servir de auxílio, em nosso meio, aos estudos que são realizados em laboratórios que utilizam culturas celulares.

MATERIAL E MÉTODOS

Culturas de células BHK-21, em meio Eagle, fornecidas pela Seção de Culturas Celulares do Instituto Adolfo Lutz, tiveram sua monocamada raspada cuidadosamente da superfície por bastão de vidro com coifa de borracha em uma das pontas. Foram, então, submetidas a baixa centrifugação durante 10 minutos. O sedimento desta operação foi mantido em geladeira durante 4 horas numa solução fixadora (PH 7.2, 360 mOsm/l) de glutaraldeído a 2% em tampão cacodilato de sódio. Em seguida, o sedimento foi submetido, durante 40 minutos, a um processo de pós-fixação pelo ácido ósmico a 1% em tampão cacodilato, tendo sido mantidas as mesmas condições de temperatura, pH e osmolaridade.

Após lavagem, o material permaneceu durante 12 horas em solução de acetato de uranila a 0,5%, tendo sido então processada a inclusão em resina Polylyte (WEIGL & KISIELIUS¹⁰), de acordo com as técnicas de preparação para microscopia eletrônica.

* Realizado na Seção de Microscopia Eletrônica do Instituto Adolfo Lutz, São Paulo, SP.

** Do Instituto Adolfo Lutz.

Os cortes ultrafinos, obtidos em micrótomo* de avanço mecânico, usando-se navalhas de vidro, foram colhidos em grades previamente recobertas por Formvar e corados por acetato de uranila e citrato de chumbo⁷. Foram examinados e documentados, utilizando-se microscópios eletrônicos** operando a 60 kV.

RESULTADOS

As observações documentadas através da microscopia eletrônica revelam a presença de partículas semelhantes a vírus, esféricas, apresentando um diâmetro de cerca de 80 nm. O *core* central, com diâmetro de aproximadamente 37 nm, revela-se sempre elétron-denso e envolto por uma camada elétron-transparente, delimitada por uma nítida membrana envoltória. Entre o *core* da partícula e a membrana delimitante são observadas finas estruturas que cruzam a camada elétron-transparente, dando ao conjunto um aspecto radial (fig. 1).

As partículas, ora em grupos ora isoladas, não foram detectadas em todas as células de uma mesma cultura. Quando presentes, localizavam-se na luz de cisternas do retículo endoplasmático (RE), tendo sido muitas vezes documentados, nas observações realizadas, aspectos de um processo característico de sua formação, qual seja, por brotamento para a luz do RE (fig. 2 e 3). Notou-se, também, um aumento exagerado no espaço perinuclear o qual, freqüentemente, é ocupado por inúmeras partículas (fig. 4).

Não foi constatado qualquer indício de processo de brotamento na membrana citoplasmática da célula, isto é, brotamento para fora da célula. Também não foram observadas, nas inúmeras inclusões realizadas, partículas virais na matriz citoplasmática, bem como não houve evidências morfológicas que sugerissem o envolvimento do núcleo na formação das partículas.

DISCUSSÃO E CONCLUSÃO

BERNHARD & TOURNIER² foram os primeiros a descrever partículas semelhantes a vírus que causam infecções inaparentes nas culturas de células BHK-21. SHIPMAN *et alii*³, nestas mesmas linhagens de células, descreveram partículas semelhantes e denominaram-nas "partículas R" devido ao aspecto radial característico do *core* dessas partículas. DE HARVEN⁴ descreveu, também, a "partícula R" em culturas de células BHK-21.

ROSSIGNOL *et alii*⁵ estudaram a atividade bioquímica associada à "partícula R" em cultura de células de hamster, enquanto BERGMANN & WOLFF¹ estudaram a ação de drogas induzindo a formação de "partículas R" em BHK-

21 clone-F. A atividade bioquímica desta partícula foi muito explorada por vários autores, atribuindo-lhe alguns um caráter oncogênico em hamster.

A ocorrência de partículas contaminantes é fenômeno freqüente nas culturas celulares e geralmente, tratando-se de infecções inaparentes, isto é, sem manifestações de efeitos citopáticos, somente é detectável através da microscopia eletrônica.

No laboratório de microscopia eletrônica do Instituto Adolfo Lutz, preparações inoculadas de BHK-21, inoculadas tanto com o vírus Rocio como com o vírus da rubéola, mostraram que "partículas R" e os vírus em questão coexistem perfeitamente, diferenciando-se pelos seus caracteres morfológicos, nada sugerindo qualquer inibição, interação ou interferência. Entretanto, outras culturas de BHK-21, inoculadas com vírus da coriomeningite linfocitária, apresentaram somente "partículas R", não sendo possível inferir, já que as observações se basearam apenas em dados morfológicos, um provável fenômeno de inibição.

Os resultados obtidos neste trabalho coincidem com os de MURPHY *et alii*⁵ e CROMACK³. O primeiro, trabalhou com células BHK inoculadas com o vírus da rubéola, enquanto que o segundo, trabalhando com um arbovírus (WEE), utilizou cultura de células de embrião de galinha; nestas, ocorrem partículas virais distintas das "partículas R" por apresentarem formação por brotamento da membrana citoplasmática, ou seja, para fora da célula.

As partículas virais presentes nas observações ultraestruturais apresentadas neste trabalho, e apontadas nas figuras que ilustram o mesmo, são semelhantes às descritas pela literatura citada.

A ocorrência de células que não apresentam "partícula R", entre células altamente infectadas, não pôde ser explicada, uma vez que, entre outras razões, foram levadas em consideração a aleatoriedade do plano de corte ou possíveis diferenças existentes entre células de uma mesma cultura.

A presença das "partículas R" em culturas de células BHK-21 é problema internacional e parece escapar aos cuidados na cultura celular, uma vez que o vírus deve estar ligado a fatores genéticos da própria célula.

AGRADECIMENTOS

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico pela complementação salarial concedida a Hatune Tanaka para a realização de parte deste trabalho. À Seção de Fotomicrografia do Instituto Adolfo Lutz, pelos serviços prestados.

* Servall, mod. Porter-Blum.

** Philips EM-200 e EM-400.



FIGURA 1 — A seta indica “partícula R” com morfologia característica. Finas estruturas radiais cruzam a camada elétron-transparente, entre o *core* da partícula e a membrana delimitante. N = núcleo.

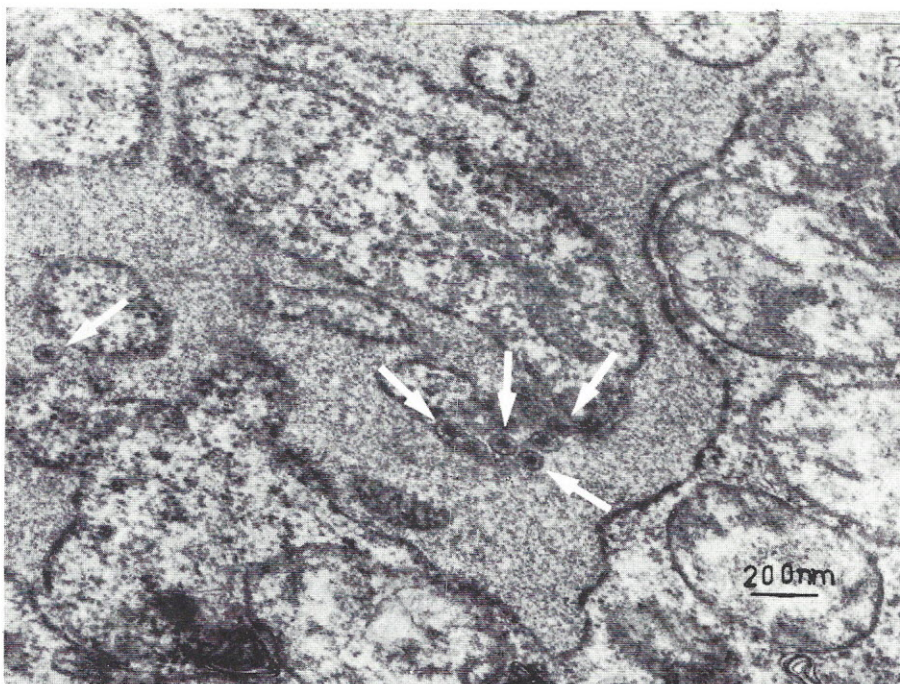


FIGURA 2 — Fotomicrografia eletrônica de célula BHK-21. As setas mostram grupo de “partículas R” em cisterna do retículo endoplasmático.

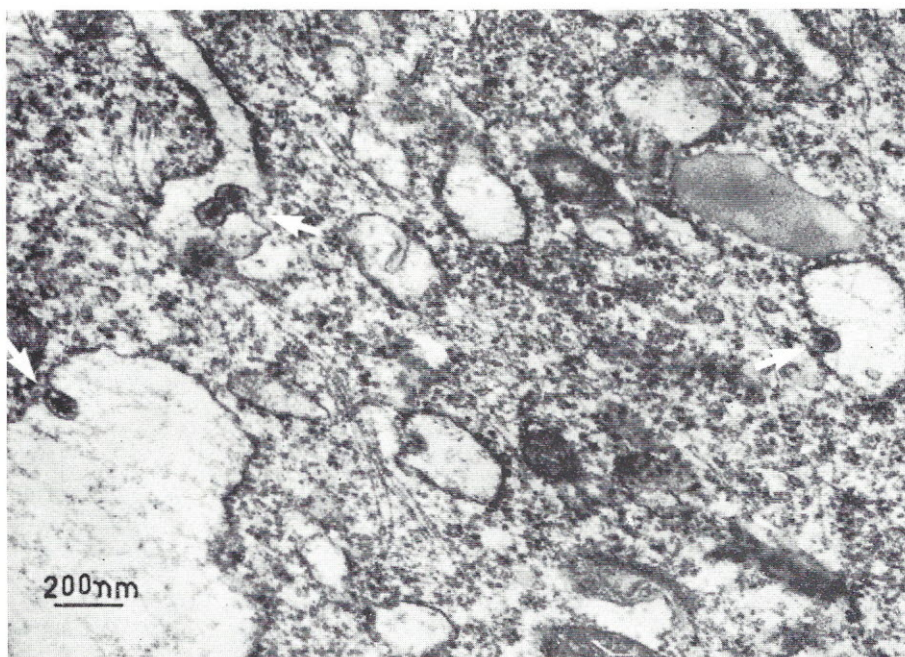


FIGURA 3 — Fotomicrografia eletrônica de célula BHK-21, cujas setas apontam "partículas R" em brotamento para o interior das cisternas de retículo endoplasmático.

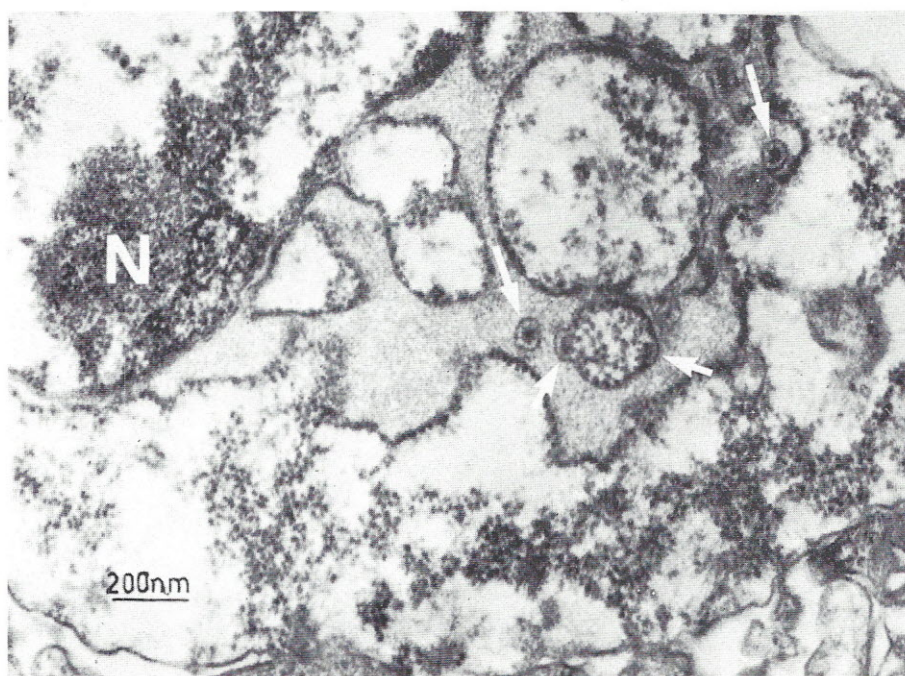


FIGURA 4 — Fotomicrografia eletrônica de partículas R" no espaço perinuclear. N = núcleo.

RIALAG/550

UEDA, M.; TANAKA, H.; WEIGL, D.R. & JOAZEIRO, P.P. — Ultrastructure, occurrence and interpretation of virus-like particles in BHK-21 cells. *Rev. Inst. Adolfo Lutz*, 42(1/2):71-75, 1982.

ABSTRACT: Electron microscopy of cultures of BHK-21 cells disclosed virus-like particles resembling the "R" particles observed by other authors. Particles seemingly originated through budding of the endoplasmic reticulum membrane. Fully grown particles were usually found in the lumen of the endoplasmic reticulum or in the perinuclear space.

DESCRIPTORS: virus-like particle; R-type virus-like particle, detection, structure; cell, BHK-21, culture; electron microscopy.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. BERGMANN, D.G. & WOLFF, D.A. — Production of R-type virus-like particles in hamster cells. *Intervirology*, 16:61-70, 1981.
2. BERNHARD, W. & TOURNIER, P. — Infection virale inapparente de cellules de hamsters décelée par la microscopie électronique. *Ann. Inst. Pasteur, Paris*, 107: 447-51, 1964.
3. CROMACK, A.S. — An electron microscope study of virus-like particles in chick embryo and L cells cultures. *J. gen. virol.*, 2:195-8, 1968.
4. DE HARVEN, E. — Identification of tissue culture contaminants by electron microscopy. In: FOGH, J., ed. — *Contamination in tissue culture*. New York, Academic Press, 1973. p. 205-31.
5. MURPHY, F.A.; HALONEN, P.E. & HARRISON, A.K. — Electron microscopy of development of Rubella virus in BHK-21 cells. *J. Virol*, 2:1223-7, 1968.
6. MUSSGAY, M.; RECZKO, E. & AHL, R. — Demonstration of virus-like particles in a bovine cell line. *J. gen. Virol.*, 4:445-7, 1969.
7. REYNOLDS, E.S. — The use of lead citrate at high pH as an electron-opaque stain in electron microscopy. *J. Cell. Biol.*, 17: 208-12, 1963.
8. ROSSIGNOL, J.M.; KRESS, M. & RECONDO, A.M. — Reverse transcriptase activity associated with R-type virus-like particles of SV 40 — transformed hamster cells (TSV₅ clone 2). *Intervirology*, 5: 273-92, 1975.
9. SHIPMAN, C.J.; VANDER WEIDE, G.C. & ILMA, B. — Prevalence of type R virus-like particles in clones of BHK-21 cells. *Virology*, 38:707-10, 1969.
10. WEIGL, D.R. & KISIELIUS, J.J. — A resina Polylyte na microscopia eletrônica. *Cienc. Cult.*, São Paulo, 24(6, supl.): 212, 1972.

Recebido para publicação em 4 de maio de 1982.

