

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM PATOLOGIA**

**Análise morfométrica e da expressão de genes na apoptose
induzida pelo vírus da doença de Gumboro**

JANAÍNA DE JESUS BATISTA

Belo Horizonte
Faculdade de Medicina – UFMG
2007

JANAINA DE JESUS BATISTA

**Análise morfométrica e da expressão de genes na apoptose
induzida pelo vírus da doença de Gumboro**

Tese apresentada à Faculdade de Medicina da
Universidade Federal de Minas Gerais, como
requisito parcial para a obtenção do grau de
Doutora em Patologia.

Área de Concentração: Patologia Geral

Orientador: Prof. Dr. Anilton César Vasconcelos

Co-orientadores: Prof.^a Dra. Luciana Moro
Prof. Dr Almir S. Martins

Belo Horizonte
Faculdade de Medicina – UFMG
2007

Dedico este trabalho aos meus pais, Jaine e José Márcio, pelo amor, apoio e incentivo constante até ao final desta caminhada. Ao Roberto e ao Hernane pelo carinho e companheirismo. A todos muito obrigada.

*Cada um de nós compõe a sua história
Cada ser em si carrega o Dom de ser capaz,
De ser feliz !*

Almir Sater / Renato Teixeira

AGRADEÇO

A Deus pela força e pela presença constante nos momentos difíceis.

Ao professor Anilton e ao professor Almir, pela oportunidade e ensinamentos.

À professora Luciana Moro, pela ajuda e sugestões que muito contribuíram para execução do trabalho.

Ao professor José Sérgio Resende - Setor de Aves do Departamento de Medicina Veterinária Preventiva da Escola de Veterinária da UFMG – pela colaboração e orientação no uso da incubadora e pela titulação da amostra viral usada neste trabalho.

Aos colegas do Laboratório de Apoptose, em especial à Paula pela amizade, agradável convivência e incentivo nas horas de cansaço.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Tecnológico e Científico – CNPq, pela bolsa de estudo.

A todos meus amigos e companheiros de jornada, meus mais profundos e sinceros agradecimentos.

SUMÁRIO

	RESUMO.....	11
	ABSTRACT.....	13
	PREFÁCIO.....	15
1.	CAPÍTULO I – Apoptose na Doença Infecciosa da Bolsa cloacal	
1.1	Apoptose.....	18
1.2	Doença Infecciosa da Bolsa Cloacal.....	25
1.3	Apoptose e Doença Infecciosa da Bolsa Cloacal.....	30
2.	CAPÍTULO II – Avaliação morfológica da apoptose induzida pela VDIB em aves SPF	
2.1.	Introdução.....	32
2.2.	Material e Métodos	32
2.3.	Resultados e Discussão	34
2.4.	Conclusões.....	39
3.	CAPÍTULO III – Avaliação da expressão da VP2 (proteína viral) e dos genes das caspases 3 e 8 e <i>bcl-2</i> na apoptose da BC induzida pelo VDIB	
3.1.	Introdução.....	40
3.2.	Material e Métodos.....	41
3.3.	Resultados e Discussão.....	46
3.4.	Conclusões.....	57
4.	CONSIDERAÇÕES FINAIS	59
5.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	60

LISTA DE FIGURAS

CAPÍTULO I

- Figura 1.1** Seqüência de eventos na apoptose. Através de um mecanismo ainda não totalmente conhecido, o estímulo apoptótico ativa a expressão de “genes letais” que induzirão à síntese e ativação de caspases, de uma endonuclease Ca^{+2} e Mg^{+2} dependente, e de uma transglutaminase entre outras. A endonuclease causará a fragmentação internucleossômica do DNA, levando ao clássico “padrão em escada” na eletroforese em gel de agarose. A transglutaminase aumenta as ligações cruzadas das proteínas celulares, aumentando a estabilidade da membrana plasmática, limitando assim o vazamento de constituintes citoplasmáticos durante a fragmentação celular em corpos apoptóticos. As caspases participarão na transdução dos sinais **24**

2. CAPÍTULO II

- Figura 2.1** Bolsa cloacal mostrando células em apoptose (setas). (A) animal controle; (B) 24 horas p.i.; (C) 48 horas p.i.; (D) 72 horas p.i.; (E) 96 horas p.i.; (F) BC de animal controle.; (G) BC 96 horas p.i., (Barra = 10 μm). Coloração: HE (A, B,C,D,E) e TUNEL (F e G). **36**
- Figura 2.2** Bolsa cloacal corada pelo Tricrômico de Gomori. (A) animal controle; (B) 72 horas p.i. (Barra = 10 μm). Observar que os folículos linfóides (indicados pelas setas) diminuem de tamanho e há uma alteração do epitélio de revestimento das pregas bursais que se tornou mais irregular. **38**

3. CAPÍTULO III

- Figura 3.1** Resultado da curva padrão para a proteína viral VP2. *Slope* mostra que a eficiência da reação é de 100%, e o $r=0,995$, próximo de 1. A curva de dissociação apresentada à direita demonstra as temperaturas de fusão e pureza dos fragmentos gerados neste ensaio. Ct em torno de 17 ciclos. A curva foi realizada como parte do programa estabelecido no *ABI Prism 7000 SDS*. **49**
- Figura 3.2** Resultado da curva padrão para o gene anti-apoptótico *bcl-2*. *Slope* mostra que a eficiência da reação é de 100%, e o $r=0,994$, próximo de 1. A curva de dissociação apresentada à direita demonstra as temperaturas de fusão e pureza dos fragmentos gerados neste ensaio. Ct em torno de 20 ciclos. A curva foi realizada como parte do programa estabelecido no *ABI Prism 7000 SDS*. **50**
- Figura 3.3** Resultado da curva padrão para caspase 3. *Slope* mostra que a eficiência da reação é de 100%, e o $r=0,989$, próximo de 1. A curva de dissociação apresentada à direita demonstra as temperaturas de fusão e pureza dos fragmentos gerados neste ensaio. Ct em torno de 23 ciclos. A curva foi realizada como parte do programa estabelecido no *ABI Prism 7000 SDS*. **51**
- Figura 3.4** Resultado da curva padrão para caspase 8. *Slope* mostra que a eficiência da reação é de 100%, e o $r=0,982$, próximo de 1. A curva de dissociação apresentada à direita demonstra as temperaturas de fusão e pureza dos fragmentos gerados neste ensaio. Ct em torno de 23 ciclos. A curva foi realizada como parte do programa estabelecido no *ABI Prism 7000 SDS*. **52**

Figura 3.5	Resultado da curva padrão para GAPDH. <i>Slope</i> mostra que a eficiência da reação é de 100%, e o $r=0,996$, próximo de 1. A curva de dissociação apresentada à direita demonstra as temperaturas de fusão e pureza dos fragmentos gerados neste ensaio. Ct em torno de 24 ciclos. A curva foi realizada como parte do programa estabelecido no <i>ABI Prism 7000 SDS</i>	53
Figura 3.6	Resultado da curva padrão para S26. <i>Slope</i> mostra que a eficiência da reação é de 100%, e o $r=0,986$, próximo de 1. A curva de dissociação apresentada à direita demonstra as temperaturas de fusão e pureza dos fragmentos gerados neste ensaio. A curva foi realizada como parte do programa estabelecido no <i>ABI Prism 7000 SDS</i>	54
Figura 3.7	Esquema do processo de infecção de linfócitos de galinha pelo VDIB. Observar que as partículas virais, ao infectarem a célula, determinam o desencadeamento da apoptose por duas vias diferentes. A primeira via envolve a participação de caspases (9 e 3) diretamente e a segunda, envolve a produção e liberação de citocinas que agem em células não infectadas pelo vírus, fazendo com que estas ativem a caspase 8 e uma outra caspase executora que não a 3.....	58

LISTA DE GRÁFICOS

2.	CAPÍTULO II	
Gráfico 2.1	Análise dos IAs nos grupos controle e infectados. Observar que houve aumento do índice apoptótico nos diferentes tempos experimentais, com exceção para os tempos de 24 e 48 horas p.i. O asterisco indica os grupos que mostraram diferenças estatisticamente significativas.	37
Gráfico 2.2	Análise da relação parênquima:estroma nos grupos controle e infectados. Observar que houve diminuição da relação nos diferentes tempos experimentais, com exceção para os controle e 24 horas p.i. e para os grupos 72 horas e 96 horas p.i. O asterisco indica os grupos que mostraram diferenças estatisticamente significativas	39
3.	CAPÍTULO III	
Gráfico 3.1	Expressão absoluta de VP2. Observar que existe uma diferença significativa ($p < 0,05$) nos grupos 48, 72 e 96 horas p.i. (indicadas por asterisco) quando comparados com o grupo 24 horas p.i. Entre os grupos 48, 72 e 96 horas não houve diferença significativa quando comparados entre si.	50
Gráfico 3.2	Expressão absoluta de <i>Bcl-2</i> . Observar que existe uma diferença significativa ($p < 0,01$) nos grupos 48, 72 e 96 horas p.i. (indicadas por asterisco) quando comparados com o grupo controle. Entre os grupos controle e 24 horas p.i. não houve diferença significativa ($p > 0,05$). Houve diferença também ($p < 0,01$, •) entre os grupos 24, 48, 72 e 96 horas pi. Já os grupos 72 e 96 horas p.i não mostraram diferenças entre si.	51
Gráfico 3.3	Expressão absoluta de caspase 3. Observar que existe uma diferença significativa ($p < 0,01$) entre os grupos 24, 48, 72 e 96 horas p.i. (indicadas por asterisco) quando comparados com o grupo controle entre os grupos 24 e 48 horas p.i. quando comparados entre si. Entre os grupos 48, 72 e 96 horas não houve diferença significativa ($p > 0,05$).	52
Gráfico 3.4	Expressão absoluta de caspase 8. Observar que existe uma diferença significativa ($p < 0,001$) entre os grupos controle e 48 horas p.i. (indicadas por asterisco). Entre os grupos 24, 48, 72 e 96 horas houve diferença significativa ($p < 0,001$, •).	53
Gráfico 3.5	Expressão absoluta de GAPDH. Observar que existe uma diferença significativa ($p < 0,01$) entre os grupos controle e 48 horas p.i. (indicadas por asterisco). Entre os grupos 24, 48, 72 e 96 horas houve diferença significativa ($p < 0,01$, •).	54
Gráfico 3.6	Expressão absoluta de S26. Observar que existe uma diferença significativa entre os grupos controle e 24 horas p.i. ($p < 0,001$) e entre os grupos controle e 48, 72 e 96 horas p.i. ($p < 0,01$).	55

LISTA DE TABELAS

3. CAPÍTULO III

Tabela 3.1	Determinação das concentrações das amostras de RNA de tecido da bolsa cloacal (BC) pela leitura da densidade óptica (OD) em dois comprimentos de onda (λ) no espectrofotômetro <i>GeneQuant</i> . Aliquotas de 5 μ l do RNA total foram diluídas em 95 μ l (1:20) de água DEPC SF e lidas em cubeta de quartzo específica. As concentrações foram calculadas considerando-se a diluição e o fator de 40 μ g/mL por densidade óptica de RNA.....	47
Tabela 3.2	Seqüências de oligonucleotídeos usadas para síntese dos <i>iniciadores</i> (25 nt para S26 e 21 nt para os demais) com os respectivos tamanhos dos seus produtos de amplificação. Para obter um resultado favorável no PCR em tempo real sugere-se fragmentos de tamanhos 80 – 100 pb.	48

LISTA DE ABREVIATURAS	
μl	microlitro
μm	micrômetro
μm^2	micrômetro quadrado
BC	Bolsa cloacal
cDNA	Ácido desoxirribonucleico complementar
DIB	Doença infecciosa da bursa
DLE	Dose letal embrionária
DNA	Ácido desoxirribonucleico
g	grama
GAPDH	Gliceraldeído fostato dehidrogenase
HE	Hematoxilina-eosina
IA	Índice apoptótico
kDa	Kilodaltons
M	molar
mL	mililitro
Mm	milimolar
RNA _m	Ácido ribonucleico mensageiro
ng	nograma
nt	nucleotídeo
p.i	Pós-inoculação
pb	Pares de base
PCR	Reação em cadeia da polimerase (do inglês <i>Polimerase Chain Reaction</i>)
pmol	picomol
RNA	Ácido ribonucleico
RT	Transcrição reversa
RT-PCR	Transcrição reversa seguida de Reação em cadeia da polimerase
S26	Proteína ribossomal S26
SPF	Livre de patógenos específicos (do inglês <i>Specific Pathogen Free</i>)
TUNEL	Terminal deoxynucleotidil transferase Uracyl Nick End Labeling
VDIB	Vírus da doença infecciosa da bolsa
VP2	Proteína viral 2
μg	Micrograma

RESUMO

A Doença Infecciosa da Bursa de Fabrício (DIB) é causada por um birnavírus (VDIB) sendo uma infecção aguda e altamente contagiosa de aves galináceas. A imunossupressão vista nesta doença está vinculada ao fato do vírus induzir apoptose em linfócitos em galinhas. O objetivo do presente trabalho foi avaliar a expressão dos genes das *caspases 3 e 8*, *bcl-2*, proteína viral VP2, enzima Gliceraldeído Fosfato Dehidrogenase (GAPDH) e S26, juntamente com a análise da ocorrência precoce da apoptose. Vinte e nove pintos SPF de um dia foram inoculados com o VDIB. Os animais foram divididos em 5 grupos: 1-controle; 2 a 5- com 24, 48, 72 e 96 horas pós inoculação, respectivamente. Após cada intervalo experimental, os animais foram pesados e eutanasiados e submetidos à necropsia. Fragmentos da BF foram colhidos para análise histológica e para a extração de RNA e transcrição reversa e posterior amplificação pela real-time PCR com o uso do kit SYBR GREEN PCR, sendo a reação desenvolvida em ABI Prism 7000 SDS. Lâminas coradas em HE, TUNEL e em Tricrômico de Gomori foram utilizadas na morfometria do índice apoptótico e na determinação da relação parênquima/estroma. Os índices apoptóticos cresceram progressivamente, indicando uma relação na atrofia bursal causada pelo vírus da doença infecciosa da Bursa de Fabricius (VDIB). Paralelamente, houve uma diminuição da relação parênquima/estroma nos grupos infectados quando comparados ao grupo controle. Ainda que de forma discreta, houve uma substituição do tecido linfóide por tecido conjuntivo fibroso, caracterizando a hipotrofia do órgão. A expressão do Bcl-2 mostrou uma queda ao longo dos intervalos de tempo, não diferindo somente entre os grupos controle e 24 horas p.i e entre 72 horas p.i e 96 horas p.i. A expressão da caspase 3 mostrou um pico 24 horas p.i e uma queda 48 horas p.i, mantendo-se sem diferença significativa em 48, 72 e 96 horas p.i. A caspase 8 mostrou um pico de expressão 48 horas p.i. Pode concluir que o VDIB interfere junto a expressão de genes que controlam a apoptose. Paralelamente, os resultados da PCR em tempo real demonstraram queda da carga viral nas células linfóides da bursa nos diferentes intervalos de tempo do experimento. Os genes para os alvos GAPDH e S26, apesar de constitutivos, mostraram uma variação na expressão de forma muito intensa e tiveram que ser descartados como

normalizadores das reações de PCR em tempo real. Os resultados sugerem que a apoptose é um evento presente já nos momentos mais precoces após a inoculação viral, sendo portanto mais que um simples mecanismo para a imunossupressão e atrofia bursal na DIB e que a replicação do VDIB leva a uma alteração significativa da expressão dos genes-alvo.

Palavras-chave: apoptose; VDIB; Bursa de Fabricius; real-time RT-PCR; caspases 3 e 8; bcl-2; GAPDH e S26.

ABSTRACT

The Infectious Bursal Disease (IBD) is caused by a birnavirus (IBDV) and is an acute and highly contagious chicken disease. The immunosuppression commonly seen in this disease is related to the fact that IBDV induces apoptosis in chicken lymphocytes. The objective of this work was to evaluate the expression of the genes of caspases 3 and 8, Bcl-2, viral protein VP2, enzyme Glyceraldehyde-3-Phosphate Dehydrogenase (GAPDH) and S26, together with the analysis of the early occurrence of apoptosis. Twenty and nine SPF one day old chicks were inoculated with the IBDV. The animals were splitted in 5 groups: 1-control; 2 the 5- with 24, 48, 72 and 96 hours after inoculation, respectively. After each experimental interval, the animals were weighed, killed and submitted to the necropsy. Fragments of the BF were collected for histological analysis and for RNA extration with posterior reverse transcription. The cDNA obtained were used for amplification in Real-time PCR using a SYBR GREEN PCR kit, in ABI Prism 7000 SDS. Histological sections were stained with HE, TUNEL and in Gomori Trichrome and evaluated by morphometry, in order to obtain an apoptotic index and to determinate a parenchyma/stroma ratio. The apoptotic indices increased gradually, indicating a relation with bursal atrophy caused by IBDV. Also, parenchyma/stroma ratios in infected groups decreased when compared with the control group. Lymphoid tissues were substituted by fibrous connective tissue, indicating atrophy. Expression of the Bcl-2 gene decreased along the experiment and did not show differences between the Control and 24 hours p.i groups and also between 72 hours p.i and 96 hours p.i. The expression of caspase 3 showed to a peak 24 hours p.i and then dropped 48 hours p.i, remaining itself without a significant difference in 48, 72 and 96 hours p.i. Caspase 8 showed an expression peak 48 hours p.i. Therefore IBDV intervenes with the expression of genes that control apoptosis. Furthermore the results of the real time PCR demonstrated decreased viral load in lymphoid cells of bursa in the different intervals of the experiment. The genes for the targets GAPDH and S26, although constituent, showed an intense variation in the expression and then were discarded as normalizators of real time PCR. The results showed that apoptosis is an

early event occurring soon after the viral inoculation, indicating that is more than a simple mechanism for the immunosuppression and bursal atrophy in the IBD. Also IBDV replication seems to cause a significant alteration of the expression of the target genes.

Key Words: Apoptosis; IBDV; Bursa of Fabricius; Real-time RT-PCR; caspases 3 and 8; Bcl-2; GAPDH and S26.

PREFÁCIO

A apoptose é um tipo de morte celular individual e ativa caracterizada pela fragmentação nuclear e celular em vesículas apoptóticas (Cohen, 1991). Ao contrário da necrose, não há liberação do conteúdo celular no interstício e, conseqüentemente, não há inflamação ao redor das células apoptóticas (Wyllie, 1981). Esse tipo de auto-destruição celular pode ser induzido por estímulos fisiológicos e patológicos. Muitas infecções virais podem desencadear apoptose (Ameisen & Capron, 1991; Jeurissen et al., 1992; Meyaard et al., 1992; Vasconcelos, 1995; Vasconcelos & Lam, 1994; Sarli et al., 1998; Moro et al., 2003).

Pouco tem sido publicado pela literatura científica sobre a apoptose no sistema linfóide de aves. Entretanto, acredita-se que o grau de substituição celular e a involução do timo e da bolsa cloacal (BC) sejam mediados por apoptose. A BC, uma modificação da parede dorsal da cloaca das aves, tem um importante papel no sistema populacional de células B em galinhas. Este órgão contém mais de 90% de células B e à idade de seis semanas apresenta um elevado índice de proliferação celular com mais de 6% das células B entrando em mitose por hora (Reynolds, 1987). Paradoxalmente, somente 1 a 5% das células produzidas por dia deixam o órgão, sendo que o restante, aparentemente, morre *in situ* (Lassila, 1989; Ratcliffe, 1989) por apoptose (Motyka & Reynolds, 1991).

A doença infecciosa da bolsa cloacal (DIB) é uma infecção aguda e altamente contagiosa de aves jovens causada pelo vírus da doença infecciosa da bolsa cloacal (VDIB), que afeta particularmente o tecido linfóide da BC (linfócitos do tipo B), que é um dos órgãos responsáveis pelo desenvolvimento do sistema imunitário das aves. Esta virose conduz a intensa imunossupressão causando grandes perdas econômicas para a indústria avícola (Kibenge et al, 1988; Sharma et al., 2000). A imunossupressão se deve, em parte, ao fato do VDIB induzir apoptose de linfócitos em galinhas (Vasconcelos & Lam, 1994). Porém, ainda não se conhece como o VDIB estimularia a via apoptótica.

Os frangos são os principais hospedeiros naturais do VDIB. O vírus também já foi isolado de perus e patos (hospedeiros suscetíveis). A principal porta de entrada do VDIB é a via oral, podendo ocorrer também por via respiratória e ocular. A morbidade

pode chegar a 100% e a mortalidade a 80% dependendo da linhagem das aves, de sua suscetibilidade e do manejo. A DIB pode ser facilmente diagnosticada através da observação de lesões típicas da bolsa cloacal, observadas durante o estágio agudo da doença. Devido à capacidade do VDIB induzir imunossupressão, ele pode atuar como fator predisponente para outras infecções, tais como dermatite gangrenosa, síndrome de anemia aplástica, síndrome hemorrágica, hepatite por corpúsculo de inclusão e distúrbios respiratórios (Kneipp, 2002).

A presente tese aborda o estudo morfológico da apoptose induzida pelo VDIB e a expressão de genes envolvidos nesse processo de morte celular.

A tese é estruturada na forma de capítulos, sendo o primeiro capítulo uma revisão de literatura – que está sendo submetido à publicação em revista indexada no Brasil. O segundo capítulo enfoca as características morfológicas da apoptose induzida pelo VDIB através da determinação do índice apoptótico, estudo da relação parênquima:estroma e marcação *in situ* da apoptose pela técnica de TUNEL. O terceiro capítulo envolve o estudo molecular da expressão de genes anti-apoptótico (*bcl-2*) e apoptóticos (*caspases 3 e 8*) na via de apoptose induzida pelo VDIB.

Objetivo geral:

- Estudar a expressão dos genes envolvidos na via de apoptose induzida por vírus da doença infecciosa da bolsa cloacal em tecidos linfóides de pintinhos SPF.

Objetivos específicos:

1. Selecionar regiões-alvo conservadas nos genes das *caspases 3 e 8*, *bcl-2*, *GAPDH*, *S26* e região *VP2* viral, e determinar pares de oligonucleotídeos iniciadores para transcrição reversa (RT) e reação em cadeia da polimerase (PCR) em tempo real.
2. Desenvolver um protocolo para a quantificação de RNA mensageiro para os genes das *caspases 3 e 8*, *bcl-2*, *GAPDH*, *S26* e para a região *VP2* do vírus da doença de Gumboro.

3. Determinar o índice apoptótico e a relação parênquima:estroma em cortes histológicos da bolsa cloacal de pintinhos SPF infectados pelo VDIB e de aves usadas como controle.
4. Estudar a participação e o comportamento dos genes *bcl-2* e dos genes para as *caspases 3* e *8* na via apoptótica induzida por VDIB em tecidos linfóides de pintinhos SPF.

CAPÍTULO I – Apoptose na Doença de Gumboro

1. APOPTOSE

A apoptose ou morte celular programada é um tipo de morte celular caracterizado por profundas modificações estruturais e funcionais (Wyllie, 1992). Trata-se de um mecanismo fisiológico de controle da população celular que regula o tamanho dos tecidos, exercendo um papel oposto ao da mitose (Vasconcelos, 1995).

Segundo Ellis (1991), a apoptose pode ocorrer fisiologicamente em cinco situações: em células que já não possuem funções no organismo, quando há excesso de células, em células que se desenvolvem de forma inadequada, em células que já desempenharam suas funções e naquelas que podem ser prejudiciais e devem ser eliminadas.

Segundo Vasconcelos (2001), a apoptose é caracterizada morfológicamente por retração celular e perda de adesões entre células e membrana basal (anoiquia); zeiose ou formação de projeções digitiformes da membrana citoplasmática; condensação do citoplasma com diminuição do teor hídrico e do volume celular; condensação nuclear com a compactação da cromatina em massas densas uniformes, alinhadas no lado interno da membrana nuclear (crescentes) (Peitsch et al., 1993); convolução e posterior fragmentação da membrana nuclear (sem cariorrexe ou ruptura) e, finalmente, pela fragmentação celular com a formação dos corpos apoptóticos (Kerr et al., 1972), que serão fagocitados pelas células circunjacentes (Savill et al., 1993), antes mesmo da lise celular (“canibalismo celular”). Os corpos apoptóticos podem conter todos os elementos celulares em diferentes combinações tais como organelas, elementos citosólicos e fragmentos nucleares (Hacker, 2000). Segundo Arends & Wyllie (1991), os corpos apoptóticos são facilmente identificados ao microscópio óptico quando têm fragmentos do núcleo, apresentando-se como estruturas arredondadas e basofílicas na coloração de HE. Como não ocorre ruptura de células (Savill et al., 1993), não há liberação de componentes celulares no espaço extracelular e, por conseguinte, não há inflamação

(Fadok & Henson, 1998). Possivelmente, a célula em apoptose fortalece a sua membrana contra o risco de lise por ativação de uma enzima, a transglutaminase (Fesus et al., 1987) que promove a ligação cruzada de enzimas do citoesqueleto fortalecendo, assim, a sua membrana.

Segundo Amarante-Mendes & Green (1999), o processo de apoptose pode ser dividido em quatro fases distintas. A primeira fase envolve a ativação de moléculas regulatórias que têm participação no estímulo inicial. Esse estímulo transmite sinais de estresse celular para as mitocôndrias que, dependendo da intensidade (fase de julgamento), podem sinalizar a ativação da apoptose. A fase efetora ou de execução da apoptose ocorre a seguir, com a ativação de cascatas enzimáticas que culminam com a fragmentação do genoma, do núcleo e da célula, formando os corpos apoptóticos. Finalmente, há o reconhecimento e eliminação dos corpos apoptóticos resultantes ou fase de enterro. Na fase de execução, estão concentradas as alterações morfológicas que caracterizam a apoptose. Essa fase ocorre em um curto período de tempo durante a morte celular (Jacobson et al., 1997). O intervalo entre o aparecimento das primeiras modificações celulares até o estímulo para a fagocitose é de aproximadamente uma ou duas horas (Wyllie, 1994), dependendo do sistema celular envolvido.

O processo de apoptose requer a ativação de genes cuja expressão controla a síntese de várias enzimas, tais como: caspases, transglutaminases e endonucleases (Fesus et al., 1987; Arends & Wyllie, 1991; Tenniswood et al., 1994). Algumas das famílias de genes associados à apoptose são *c-myc*, *bcl-2*, *p53*, e *ras*. Ainda não se conhece totalmente o mecanismo através do qual esses genes influenciam a célula para desencadear o processo apoptótico (Wyllie, 1992).

A principal característica molecular do processo de apoptose é a fragmentação internucleossômica do DNA por endonucleases dependentes de Ca^{+2} e Mg^{+2} . Esta clivagem internucleossômica resulta em fragmentos oligonucleossomais que podem ser demonstrados por eletroforese do DNA em gel de agarose, produzindo o clássico padrão em escada (Wyllie et al., 1980; Cohen & Duke, 1992). A fragmentação internucleossômica do genoma gera inicialmente fragmentos de 50 a 300 kb e posteriormente de múltiplos de ~180-200 pb (Wyllie et al., 1980)

A maioria das mudanças morfológicas observadas no processo de apoptose é mediada por uma cascata enzimática envolvendo “proteases específicas de aspartato de cisteína” ou cisteíno-proteases chamadas caspases. As caspases têm em comum um sítio ativo formado pelo pentapeptídeo QACRG (glutamina, alanina, cisteína, arginina e glicina) que incorpora o resíduo ativo de cisteína. Elas são sintetizadas como precursores inativos que são clivados proteoliticamente para gerar subunidades ativas. Cada caspase contém sequências conservadas importantes para a atividade proteolítica, clivando o substrato a partir de Asp-Xxx produzindo resíduos específicos, o que caracteriza cada caspase bioquimicamente (Thornberry et al., 1997). Em seu estágio inativo, as caspases existem como uma cadeia polipeptídica única com um pró-domínio e um domínio catalítico. As caspases se ativam por clivar resíduos aspárticos e, quando ativadas, formam dímeros com duas subunidades catalíticas.

A ativação das caspases promove o aparecimento das alterações estruturais que caracterizam a apoptose, como desmonte da membrana nuclear e do arcabouço de lamina, condensação da cromatina e degradação proteolítica das estruturas nucleares e citoplasmáticas (Figura 1.1). As caspases não ativadas são substratos para outras caspases e a análise da estrutura destas enzimas sugere que as mesmas têm preferência por determinadas caspases conforme uma hierarquia, reforçando a idéia de que a ativação sequencial constitui um mecanismo em cascata em que os sucessivos substratos (caspases) sofrem uma proteólise limitada. As caspases que participam no processo de apoptose são divididas em duas classes: as iniciadoras (caspases 2, 8, 9 e 10) e as executoras (caspases 3, 6 e 7) (Cohen, 1992).

A apoptose pode ser engatilhada tanto por estímulos fisiológicos quanto patológicos. A apoptose participa na regulação e funcionamento do sistema imunológico de animais saudáveis (Cohen, 1991; Golstein et al., 1991) destruindo linfócitos imaturos e células excedentes, durante a maturação dos órgãos linfóides. Também atua na destruição de clones de células T auto-reativas durante o desenvolvimento da tolerância imunológica (Hacker, 2000). Além disso, é importante na eliminação de células-alvo pelos linfócitos T (Cohen et al., 1992).

Hormônios como os glicocorticóides provocam a apoptose de linfócitos *in vitro* (Wyllie & Morris, 1982; Wyllie et al., 1984). Garvy et al. (1993) demonstraram que a elevação crônica de corticosterona plasmática pode provocar a apoptose dos linfócitos B da medula óssea. Os glicocorticóides também induzem a apoptose nas células linfocitárias malignas (Arends & Wyllie, 1991; Kerr et al., 1994). De acordo com Compton et al. (1991), para que ocorra imunossupressão induzida por corticosteróide endógenos ou exógenos, há necessidade de que essas substâncias atinjam em torno de 80 vezes a concentração sanguínea normal. Quando isto acontece, há imediata lise de linfócitos imaturos da bolsa cloacal e do timo nas aves (Compton et al., 1990b; Kamiya et al., 1997), ocasionando hipotrofia dos referidos órgãos e involução precoce do tecido linfóide.

O padrão hematológico de linfopenia encontrado em aves estressadas pode se correlacionar com os achados de Mishler & Emerson (1977) e Terashima et al. (1998), que observaram linfopenia e granulocitofilia em pacientes humanos submetidos a estresse ou tratados com corticosteróides. Os autores afirmaram que este quadro se deve à mobilização de células da série granulocítica retidas na medula óssea. Tal mobilização é mediada pela ação de um fator estimulante da formação de colônias de granulócitos (G-CSF), produzido pelas células endoteliais em situações de estresse (Jilka et al., 1998). A apoptose de linfócitos induzida por corticóides é um evento geneticamente regulado, havendo ativação de receptores que ativam a expressão de genes indutores do programa de morte. Os hormônios esteróides atravessam a membrana plasmática por difusão passiva, difundem-se no citoplasma, onde se ligam a receptores para glicocorticóides livres e formam um complexo esteróide/receptor (Alnemri & Litwack, 1993). Este complexo é ativado e expõe o “zinc finger”, isto é, um motivo estrutural presente em proteínas ligadoras de DNA composto de uma alça de cadeia peptídica torcida e ligada a um átomo de zinco (Alberts et al., 1994). O complexo hormônio-receptor ativado atravessa os microporos do núcleo e se liga a elementos capazes de responder ao hormônio tais como o fosfatidil inositol e a fosfolipase C, produzindo diacilglicerol que, por sua vez, estimula uma esfingomielinase ácida produzindo ceramida. Esta substância ativa caspases que promovem a transcrição genética para

síntese protéica (Cifone et al., 1999). Em seguida, há ativação do RNAm que é translado para o citoplasma e promove a síntese de proteínas. Tais proteínas, quando aumentadas, desencadeiam a resposta celular ao hormônio. Entre estas se incluem a interrupção das atividades celulares durante a fase denominada “citostática” da apoptose, na qual o linfócito responde aos glicocorticóides com alterações bioquímicas e fisiológicas. Há inibição do aporte de glicose, de aminoácidos e de outros glicosídios para o interior da célula. Há também supressão da síntese de macromoléculas, bem como redução das sínteses de ATP, fosfolípidos, poliaminas e fatores de crescimento. Além disso, há diminuição da oxidação dos ácidos graxos, diminuição da taxa de proliferação e parada do ciclo celular, preferencialmente na fase G1 (Alnemri & Litwack, 1993). Outras proteínas importantes no controle das funções gerais do organismo como, por exemplo, a adaptação ao estresse também são sintetizadas. Em alguns casos, pode ocorrer também a supressão de *bcl-2*, um gene sabidamente antiapoptótico (Alnemri & Litwack, 1993).

Depois de cessada a síntese de macromoléculas, inicia-se a “fase citolítica” da apoptose induzida por glicocorticóides. Esta fase é caracterizada pela clivagem do DNA por endonucleases (Arends & Wyllie, 1991; Peitsh et al., 1993; Alnemri & Litwack, 1993). A clivagem do DNA é seguida de condensação da cromatina, formação das projeções na membrana citoplasmática e morte celular (Arends & Wyllie, 1991). Sabe-se também que o núcleo de linfócitos tímicos imaturos possui uma proteína de 130kD com atividade endonucleásica, que provavelmente faça parte da topoisomerase II. Esta enzima, juntamente com a topoisomerase I, atua sobre os filamentos de DNA (Hotz et al., 1994) desempenhando papel importante, tanto na fragmentação como na reorganização dos fragmentos nucleares (Arends & Wyllie 1991; Hotz et al., 1994). Outras enzimas que possuem envolvimento com as alterações nucleares no curso da apoptose de linfócitos são as DNases I e II (Barry et al., 1993; Peitsh et al., 1993). As duas fases, citostática e citolítica juntas, demandam, *in vitro*, um período variável de três a seis horas em linfócitos de animais de laboratório e até 72 horas em alguns linfócitos neoplásicos cultivados (Alnemri & Litwack, 1993). Também foi descrito que na apoptose causada por glicocorticóide há aumento sérico, imediato e transitório de

ubiquitina, uma proteína endógena, aparentemente indispensável no processo de fragmentação do genoma (Kamiya et al, 1997).

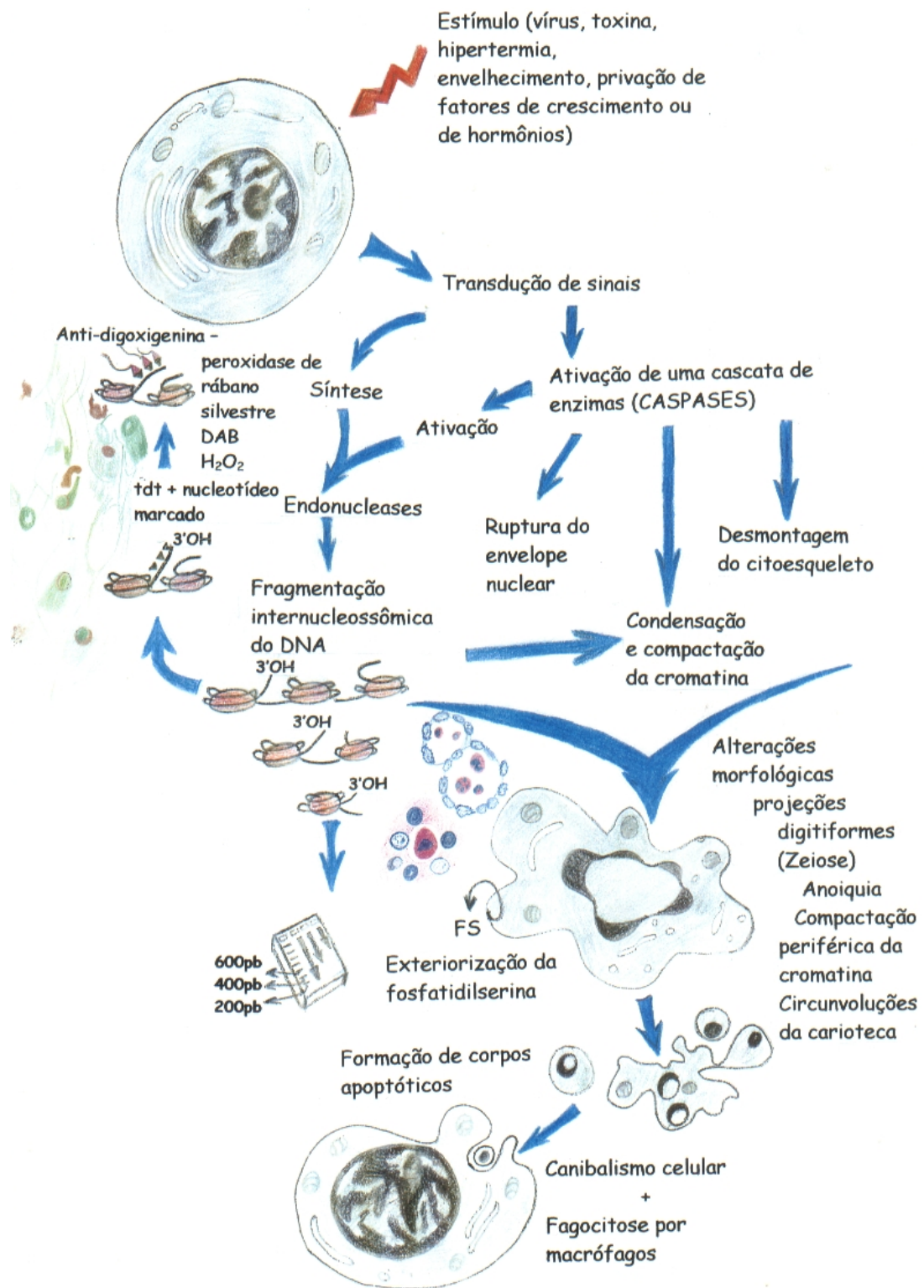


Figura 1.1 Sequência de eventos na apoptose. Através de um mecanismo ainda não totalmente conhecido, o estímulo apoptótico ativa a expressão de “genes letais” que induzirão à síntese e ativação de caspases, de uma endonuclease Ca^{+2} e Mg^{+2} dependente, e de uma transglutaminase entre outras. A endonuclease causará a fragmentação internucleossômica do DNA, levando ao clássico “padrão em escada” na eletroforese em gel de agarose. A transglutaminase aumenta as ligações cruzadas das proteínas celulares, aumentando a estabilidade da membrana plasmática, limitando assim o vazamento de constituintes citoplasmáticos durante a fragmentação celular em corpos apoptóticos. As caspases participarão na transdução dos sinais.

2. DOENÇA INFECCIOSA DA BOLSA CLOACAL

A Doença de Gumboro ou Doença Infecciosa da bolsa cloacal (DIB) é causada pelo vírus da doença infecciosa da bolsa cloacal (VDIB). Essa virose caracteriza-se por ser aguda e altamente contagiosa, com intenso efeito de imunossupressão, causando grandes perdas econômicas para a indústria avícola (Kibenge et al, 1988; Sharma et al., 2000). Afeta aves jovens causando destruição das células linfóides (linfócitos do tipo B) na bolsa cloacal(BC), que é um dos órgãos responsáveis pelo desenvolvimento do sistema imunitário das aves e agride também outros órgãos linfóides (Lukert & Saif, 1991) tais como tonsilas cecais e baço (Tanimura & Sharma, 1997).

Hipotetizou-se que os primeiros casos da DIB, nos EUA, teriam se originado por mutação de um *Aquabirnavirus* do tipo vírus infeccioso da necrose pancreática que ocorre em peixes marinhos. A farinha de peixe era adicionada à ração de frangos de corte da região de Delmarva, durante os anos 50 e 60 (Ito et al., 2001). A nomenclatura da doença foi definida pelo local onde ocorreu a primeira descrição desta enfermidade, em granjas adjacentes à cidade de Gumboro (Delaware, EUA), por Cosgrove em 1962, sendo a DIB mais conhecida como doença de Gumboro. A identificação do agente etiológico da DIB foi feita na tentativa de se obter um novo isolado do vírus da bronquite infecciosa (VBIG – família *Coronaviridae*) de rins de galinhas em casos clínicos de nefrite – nefrose. Por serem o quadro clínico e as lesões renais apresentadas nessas aves semelhantes àsquelas encontradas com a estirpe Gray do VBIG (Cavanagh & Naqi, 1997), este foi inicialmente considerado como sendo o agente etiológico dos casos de nefrite-nefrose descritos por Cosgrove em 1962 (Winterfield & Hitchner, 1962). Após estudos de isolamento e cultivo do VDIB em ovos embrionados de galinhas (OEG) livres de patógenos específicos (SPF), Dobos et al (1979) concluíram que o isolado tratava-se de um *Birnavirus*. Esse vírus foi identificado como sendo o verdadeiro causador da DIB e a estirpe Gray, posteriormente, foi identificada como sendo um isolado do VBIG com tropismo pelo tecido do trato urinário de aves. O termo DIB foi proposto por Hitchner (1970) como o nome da doença caracterizada por lesões

específicas na bolsa cloacal. A mesma doença foi denominada de nefrose aviária devido aos danos encontrados em rins de aves causados pela infecção (Cosgrove, 1962).

O VDIB pertence à família Birnaviridae (Murphy et al, 1995). O vírus é cosmopolita, afeta galinhas e perus e é altamente resistente no ambiente, fato que torna muito difícil sua erradicação do meio avícola. A ave elimina o vírus para o ambiente por meio das fezes. A transmissão é tida como unicamente horizontal, ocorrendo via oral (Simon & Ishizuka, 2000). O vírus pode chegar ao ambiente das aves pela contaminação da água, ração, equipamentos, insetos e outros animais. A DIB nas aves mais jovens pode provocar atrofia da BC e imunossupressão, que pode ser irreversível. Por outro lado, quando a infecção ocorre em aves mais velhas, observa-se hipotrofia da BC e imunossupressão, que pode ser reversível. Em ambos os casos, as aves tornam-se mais suscetíveis aos patógenos do ambiente e não respondem adequadamente às vacinações. A maioria das aves infectadas não exibe sinais clínicos da doença, apresentando a forma subclínica, que é caracterizada, microscopicamente, por destruição dos linfócitos B (Okoye, 1984).

O VDIB é bem conhecido como agente imunossupressor de aves, mas o seu mecanismo de ação ainda não está completamente esclarecido. Aparentemente, o VDIB produz um efeito citopático direto nos linfócitos B imaturos, causando necrose e depleção linfocitária (Muller, 1986; Burkhardt & Muller, 1987). Entretanto, há casos em que a BC infectada sofre uma atrofia muito rápida e extensa sem nenhuma ou mesmo muito pouca resposta inflamatória (Sharma et al., 1989; Snyder, 1990; Lukert & Saif, 1991). Um mecanismo alternativo que ajuda a explicar tais fenômenos baseia-se na ocorrência de fragmentação internucleossômica do DNA, evento bastante característico de apoptose, no DNA isolado de linfócitos periféricos e da bolsa cloacal de aves leghorn infectadas com a cepa Lukert do VDIB (Vasconcelos & Lam, 1994; Vasconcelos & Lam, 1995) e com a cepa GB do Vírus da Doença de Newcastle (Lam & Vasconcelos, 1994; Lam et al., 1995).

O VDIB possui dois sorotipos, sendo a maioria dos isolados de galinha do sorotipo 1, enquanto os isolados de perus são do sorotipo 2. Ambos podem infectar galinhas e perus, mas a doença clínica só é observada em galinhas. O sorotipo 1 foi descrito por

Winterfield & Thacker (1978) e o sorotipo 2 por Mcferran et al. (1980). O sorotipo 2 não é patogênico para aves (Gardin, 2000). O VDIB sorotipo 1 está espalhado por todo o mundo, sendo considerado cosmopolita e presente em todas as áreas com intensa produção avícola. Praticamente, todas as aves estão expostas ao vírus durante os estágios iniciais de vida, devido aos programas de vacinação serem abrangentes e massivos, todas as galinhas estão, atualmente, soropositivas ao VDIB. O VDIB sorotipo 2 está amplamente disseminado e pode infectar galinha, peru e pato. Nenhuma estirpe do sorotipo 2 foi caracterizada como patogênica ou imunossupressora (Lukert & Saif, 1997).

De acordo com a variação antigênica e virulência, o sorotipo 1 pode ser classificado em diferentes grupos: cepa clássica, virulenta, cepa variante antigênica e cepa hipervirulenta (Lukert & Saif, 1991). As cepas hipervirulentas causam lesões típicas da DIB e são antigenicamente similares às cepas clássicas (Mcferran et al., 1980; Jackwood et al., 1987). Conhece-se muito pouco sobre as propriedades biológicas das cepas hipervirulentas, mas quando comparadas às cepas clássicas, a excepcional virulência destes vírus pode estar ligada à capacidade de replicação dentro e fora da bolsa cloacal (Tanimura, & Sharma, 1997). A alteração macroscópica mais característica da infecção pelos vírus hipervirulentos é a presença de edema gelatinoso envolvendo a BC (Gardin, 2000; Tessari et al., 2001). À microscopia, a BC apresenta-se com uma intensa redução de linfócitos e o período de mortalidade se estende por três a sete dias, com um pico no terceiro dia (Tessari et al., 2001).

O VDIB é um vírus RNA de fita dupla não envelopado que consiste de dois segmentos, designados A (maior – 3400 pb) e B (menor – 2800 pb), dentro de um capsídeo icosaédrico simples composto de 32 capsômeros de 60-70 nanômetros de diâmetro (Nagarajan & Kibenge, 1997). A estrutura viral é composta por cinco proteínas designadas por VP1, VP2, VP3, VP4 e VP5 (Becht et al., 1988). As proteínas estruturais virais estão localizadas principalmente no segmento A (Muller et al., 1979; Steger et al., 1980). A superfície externa do vírion é composta de subunidades triméricas formadas pela proteína VP2 e o capsídeo é revestido internamente de subunidades formadas pela proteína VP3 (Bottcher et al., 1997; Caston et al., 2001). A

VP2 corresponde ao maior sítio antigênico responsável por induzir a produção de anticorpos neutralizantes e pela especificidade do sorotipo (Nagarajan & Kibenge, 1997). Segundo Brandt et al. (2001), a VP2 abriga a maioria dos receptores celulares para linfócitos B e contém marcadores de virulência e fenótipo patogênico do vírus, estando envolvida também no tropismo celular. A VP3 é responsável pela conformação estrutural do vírus e corresponde ao antígeno grupo específico que é reconhecido por anticorpos não neutralizantes, sendo que alguns deles reagem com os sorotipos 1 e 2 (Becht et al., 1988). Esta proteína é a segunda maior proteína estrutural do vírion (32 KDa) (Bottcher et al., 1997). A VP3 apresenta uma porção carboxi terminal que pode interagir com o genoma RNA fita dupla, atuando como uma proteína intermediária entre as proteínas VP2 e VP1 (Bottcher et al., 1997; Hudson et al., 1986) e parece estar envolvida também na replicação e montagem da partícula viral (Tacken et al., 2002). A VP1 expressa a função de RNA polimerase do segmento B e pode ter relação com a expressão de virulência (Ito, 1990). Acredita-se que ela esteja ligada a um resíduo de guanina na porção 5' terminal dos segmentos do genoma (Nagarajan & Kibenge, 1997) e que possa participar na encapsidação de partículas virais (Lombardo et al., 1999). Além disso, Brandt et al. (2001) demonstraram que VP1 pode conter determinantes para o tropismo celular em células Vero. A VP4 é uma protease viral que não é incorporada na partícula viral (Ito, 1990). A VP5 é uma pequena proteína não estrutural que não é essencial para a replicação viral, mas parece ter um papel na regulação do ciclo viral ou na liberação do vírus da célula infectada, podendo também estar envolvida na apoptose de células infectadas (Ito et al., 2001).

Di Fabio (2001) relatou que as regiões mais importantes do vírus são a VP2 e VP3 e que o antígeno VP2 contém epitopos que induzem a produção de anticorpos que neutralizam o vírus, existindo assim uma correlação direta entre o título de anticorpos neutralizantes específicos para a fração VP2 do vírus e a proteção conferida às aves. A expressão de VP2 induz apoptose em uma variedade de células de mamíferos (Fernandez-Arias et al., 1997). Segundo Yao e Vakharia (2001), tanto a VP2 quanto a VP5 estão envolvidas na indução de apoptose de fibroblasto de embrião de galinha e de células da linhagem RP9 de linfócitos B de galinha.

Os isolados do VDIB do tipo antigênico apresentam mudanças de aminoácidos em uma região específica da proteína VP2 (região hipervariável), o que levou a uma mudança parcial na antigenicidade (Snyder, 1990). Isolados do vírus hipervirulento (mvVDIB), primeiramente isolados na Europa, apresentam a mesma estrutura antigênica que as amostras clássicas, mas com a virulência aumentada (Chettle et al., 1989). Diferenças de aminoácidos entre as proteínas virais de isolados mvVDIB e clássicos são vistas em todas as proteínas virais, sendo a maior parte dessas diferenças encontrada na região hipervariável da VP2 (Brown & Skinner, 1996). Mutações específicas na proteína VP2 (proteína externa do capsídeo viral) resultam na mudança do tropismo celular (Mundt, 1999) e na atenuação (Yamaguchi et al., 1996). Embora a VP2 seja um fator chave na virulência, ela não é a única proteína predominante de um fenótipo muito virulento (Boot et al., 2000).

Como a DIB afeta principalmente aves jovens e é economicamente importante para a indústria avícola (Van den Berg, 2000) vários tipos de vacina e programas de vacinação têm sido desenvolvidos a fim de se prevenir essa doença. Solano et al. (1986) avaliaram o efeito dos títulos de anticorpos maternos em aves na primeira vacinação contra a DIB e relataram uma melhor resposta de anticorpos quando as aves foram vacinadas aos 28 dias de idade. Já Kumar et al. (2000) consideram 21 dias de idade como a idade ideal para a vacinação, uma vez que os anticorpos maternos não são mais detectados e, logo, não podem interferir na replicação do vírus vacinal. Algumas vacinas são capazes de induzir lesões bursais similares ou mais graves do que aquelas causadas por cepas virais de campo. Um estudo realizado por Moraes et al. (2004) com vacinas comerciais brasileiras (intermediária, intermediária plus e virulenta – “hot”) e aves de 21 dias de idade revelou que as vacinas intermediária plus e virulenta causaram uma lesão severa na BC, resultando em depleção linfocitária de aproximadamente 90%. A maioria das vacinas consideradas eficientes *in vitro* contra DIB, revelaram-se ineficientes *in vivo* (Gardin, 2000). Segundo Tessari et al (2001), devido à alta mortalidade causada pelas cepas hipervirulentas, qualquer erro cometido na elaboração e implantação do programa de controle é ratificado pelo aparecimento de mortalidade, logo, tal virose constitui uma ameaça para toda a avicultura e obrigará os avicultores e

as autoridades sanitárias a adotar uma nova abordagem preventiva, no sentido de determinar a implantação de novas vacinas, novos programas de vacinação e aplicação de medidas de biossegurança.

3. APOPTOSE NA DOENÇA INFECCIOSA DA BOLSA CLOACAL

Os mecanismos de apoptose induzida pelo VDIB permanecem desconhecidos. Sabe-se que a infecção resulta na depleção linfocitária e uma destruição final da BC como característica predominante da patogênese da DIB (Kaufer & Weiss, 1980; Burkhardt & Muller, 1987; Becht & Muller, 1991). Junto ao processo de necrose, foi observada uma intensa atrofia da BC infectada na ausência de resposta inflamatória (Rosenberger, 1985). Isso sugere o envolvimento do processo apoptótico na patogênese dessa doença. A indução de apoptose em linfócitos do sangue periférico de galinhas infectadas com o VDIB também foi relatada por Vasconcelos & Lam (1994). A apoptose também foi observada *in vitro* em células Vero infectadas pelo VDIB e em células de embrião de galinha (Tham & Moon, 1996). A infecção de galinhas suscetíveis pelo VDIB resulta na indução de apoptose de células da bolsa cloacal (Vasconcelos & Lam, 1995; Lam, 1997; Ojeda et al, 1997; Tanimura & Sharma, 1997; Nieper et al, 1999) bem como de células do timo (Inoue, et al, 1994; Tanimura & Sharma, 1998).

Segundo Nieper et al. (1999), há uma correlação entre replicação do VDIB e apoptose em células da BC. O envolvimento de mecanismo indireto foi sugerido por Inoue et al (1994), uma vez que o processo de apoptose foi observado em células T do timo de galinhas infectadas, enquanto o antígeno de VDIB foi encontrado principalmente em infiltrados de células B ou em células reticulares. Ao examinar secções seriadas da BC infectada pelo VDIB, Tanimura e Sharma (1998) observaram células apoptóticas não somente em folículos bursais antígeno-positivos, mas também em antígeno-negativos. Dados recentes (Liu & Vakharia, 2006) mostram que o VDIB induz apoptose no tecido bursal via ativação de caspases, do fator nuclear κB e da proteína não estrutural VP5 (esta no estágio mais tardio de infecção) em fibroblastos de

embriões de galinha. Permanece, ainda, por se descobrir quais mecanismos são ativados na apoptose induzida pelo VDIB.

A utilização e otimização de técnicas mais sofisticadas já disponíveis no campo científico, como a reação em cadeia da polimerase em tempo real, permitirão o estudo da expressão dos genes envolvidos na via de apoptose induzida pelo VDIB, contribuindo para o conhecimento da patogenia da imunossupressão induzida pela DIB.

CAPÍTULO II - Avaliação morfológica da apoptose induzida pelo vírus da doença infecciosa da bolsa cloacal em aves SPF

2.1. INTRODUÇÃO

A apoptose é um tipo de morte celular individual e ativa caracterizada pela fragmentação nuclear e celular em vesículas apoptóticas (Cohen, 1991). Ao contrário da necrose, não há liberação do conteúdo celular no interstício e, conseqüentemente, não há inflamação ao redor das células apoptóticas (Wyllie, 1981). Esse tipo de auto-destruição celular pode ser induzido por estímulos fisiológicos e patológicos. Muitas infecções virais podem desencadear apoptose (Ameisen & Capron, 1991; Jeurissen et al., 1992; Meyaard et al., 1992; Vasconcelos, 1995; Vasconcelos & Lam, 1994; Sarli et al., 1998; Moro et al., 2003). A doença infecciosa da bolsa cloacal (DIB) é uma infecção viral aguda e altamente contagiosa de aves jovens, que afeta particularmente o tecido linfóide da bolsa cloacal (linfócitos do tipo B), que é um dos órgãos responsáveis pelo desenvolvimento do sistema imunitário das aves. Esta virose conduz a intensa imunossupressão causando grandes perdas econômicas para a indústria avícola (Kibenge et al., 1988; Sharma et al., 2000). A imunossupressão, nesse caso, se deve, em parte, ao fato do vírus da doença infecciosa da bolsa cloacal (VDIB) induzir apoptose em linfócitos de galinhas (Vasconcelos & Lam, 1994). Porém, ainda não se conhece como o VDIB estimularia a via apoptótica. Os objetivos deste estudo foram determinar o índice apoptótico e a relação parênquima:estroma em cortes histológicos da bolsa cloacal de pintinhos SPF infectados pelo VDIB e de aves usadas como controle.

2.2. MATERIAL E MÉTODOS

Os ovos embrionados livres de patógenos específicos (SPF), obtidos da Sadia S.A (Uberlândia, Minas Gerais), foram incubados no Setor Doença de Aves do Departamento de Medicina Veterinária Preventiva da Escola de Veterinária da UFMG. Após a eclosão dos ovos, vinte e nove pintos Leghorn (SPF) de um dia de idade foram divididos, ao acaso, em cinco grupos experimentais: Grupo 1: Controle (n=5) e Grupos

2 a 5: animais eutanasiados após 24, 48, 72 e 96 horas da inoculação (n=6), respectivamente. As aves foram inoculadas com amostra viral tipificada (A-BH83) e titulada na Escola de Veterinária da UFMG ($0,5 \times 10^3$ DLE₅₀/ave).

Após cada intervalo experimental, os animais de cada grupo foram pesados e eutanasiados pelo método de decapitação e submetidos à necropsia. Fragmentos da BC foram colhidos para processamento histológico. Lâminas com secções de 5 µm foram coradas em HE para determinação do índice apoptótico, e em Tricrômico de Gomori para análise da relação parênquima:estroma. A quantificação da apoptose foi feita em um número mínimo representativo de campos, definido pela avaliação da evolução dos erros padrões de acordo com o aumento da amostragem (Sampaio, 1998; Moro et al., 2003).

Determinou-se o Índice Apoptótico (IA= somatório das células com morfologia de apoptose/ somatório das células totais x 100) em HE a partir da contagem de células no número máximo obtido de campos tomados aleatoriamente. Os campos foram contados em objetiva planacromática de 40x. Desses, formaram-se amostras crescentes de campos de 5 em 5 (5, 10 ,15, etc) retirados aleatoriamente com reposição. Essas amostras foram caracterizadas por suas médias e respectivos erros padrões. Assim, o IA foi determinado em 10 campos/lâmina (calculados através da análise do erro padrão) tomados aleatoriamente para cada animal. Na quantificação do IA, foram consideradas células em apoptose somente aquelas que apresentaram pelo menos três dos seguintes critérios morfológicos de inclusão (Vasconcelos, 2001): anoiquia (retração celular e perda de adesões entre células e membrana basal), condensação do citoplasma, condensação nuclear (compactação da cromatina nuclear em massas densas uniformes, alinhadas no lado interno da membrana nuclear, inclusive com aspecto de crescentes), fragmentação nuclear (convolução e fragmentação da membrana nuclear – sem cariorrexe ou ruptura), fragmentação celular (com formação dos corpos apoptóticos), fagocitose dos corpos apoptóticos pelas células adjacentes ("canibalismo celular") e ausência de inflamação.

A relação parênquima:estroma foi determinada em cinco campos histológicos para cada lâmina. Em cada campo com área total de $871.392 \mu\text{m}^2$, mediram-se a área folicular e de espaços vazios. Subtraindo-se essas áreas da área total do campo obteve-

se a área do estroma. A relação parênquima:estroma foi obtida pela divisão da área folicular (parênquima) pela área de estroma. Foi estabelecida a proporção percentual do parênquima, ou seja, parênquima:estroma x 100, analisando sua médias e respectivos erros-padrões.

Um outro grupo de lâminas foi preparado para a reação de TUNEL que marca *in situ* as extremidades 3'-OH do DNA fragmentado no processo de apoptose. A fragmentação *in situ* do genoma foi detectada usando-se o kit *the Oncor–ApopTag™ in situ apoptosis detection kit* (número de catálogo: # S7100-KIT). A reação foi feita como descrita pelo fabricante: as secções foram incubadas com 20µg/mL de proteinase K (SIGMA) e a peroxidase endógena foi inativada com água oxigenada a 2% em metanol. Após a adição dos desoxinucleotídeos, as lâminas foram incubadas em câmara úmida a 37° C por 3 horas. A reação foi bloqueada com o tampão de parada, os cortes foram tratados com streptoavidina peroxidase, a revelação da reação foi feita com 3,3-diaminobenzidina e a contra-coloração com verde de metila.

O delineamento experimental foi inteiramente ao acaso, sendo os dados paramétricos e com distribuição normal analisados pela análise de variância (ANOVA) para grupos independentes, adotando $p \leq 0,05$. Para análise da variação entre os grupos, foi aplicado o teste de comparação múltipla de Newman-Keuls, adotando $p \leq 0,001$.

2.3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

2.3.1 Análise do Índice Apoptótico (IA)

A coloração pela HE mostrou-se eficiente para a caracterização morfológica da apoptose, conforme os critérios de inclusão definidos na metodologia. Características peculiares do processo de apoptose tais como anoiquia, condensação da cromatina nuclear (formação de crescentes), retração citoplasmática e fragmentação nuclear e/ou citoplasmática (caracterizando a formação de corpos apoptóticos) foram observadas como mostram as figuras 2.1A, 2.1B, 2.1C, 2.1D, 2.1E. A análise de variância mostrou que houve diferença significativa ($p \leq 0,05$) entre os grupos (gráfico 2.1). Quando os resultados foram submetidos ao teste de Newman-Keuls ($p \leq 0,001$), observou-se uma

variação do IA entre os grupos, isto é, houve aumento do mesmo quando comparou-se o grupo controle com os demais grupos infectados, com exceção dos grupos infectados por 24 e 48 horas, nos quais não houve diferença significativa ($p > 0,05$). No grupo controle, os folículos linfóides mostraram-se mais celularizados e com definição clara entre as regiões cortical e medular. Já nos grupos infectados pelo VDIB, foi observada uma rarefação celular difusa que foi se intensificando nos grupos, tanto na região cortical quanto na medular. Notou-se ainda a presença de corpos apoptóticos no interior de espaços vazios e de vários linfócitos com cromatina condensada (apoptose). As características dos linfócitos em apoptose observadas neste estudo foram semelhantes às descritas por Arai et al (1996).

Apesar de necrose e de infiltrado de heterófilos serem descritos na literatura (Burkhardt & Muller, 1987; De Paula et al., 2004) como achados histológicos conseqüentes da infecção viral, no presente trabalho tais características não foram observadas de forma intensa e a morte celular se desenvolveu na ausência de inflamação, que é característico da apoptose (Gerschenson & Rotello, 1992; Leist & Nicotera, 1998). Há casos em que a BC infectada sofre uma atrofia muito rápida e extensa sem nenhuma ou mesmo muito pouca resposta inflamatória (Rosenberger et al., 1985; Sharma et al., 1989; Snyder, 1990; Lukert & Saif, 1991).

A apoptose foi também demonstrada através da técnica de TUNEL (figuras 2.1F e 2.1G). Essa técnica permite a confirmação da presença da apoptose por marcação da fragmentação internucleossômica do DNA (Gavrieli et al., 1992; Migheli et al., 1995; Mundle & Raza, 1995; Sanders & Wride, 1996). Quase todas as células marcadas exibiam morfologia característica da apoptose. Poucas células com morfologia característica da apoptose não estavam marcadas e isso pode ser explicado pela presença de ligações protéicas cruzadas durante o processo de fixação tecidual que é um dos mecanismos responsáveis pela baixa sensibilidade do TUNEL (Gold et al., 1994; Labat-Moleur et al., 1998). Negoescu et al. (1996) e Labat-Moleur et al. (1998) sugeriram que a sensibilidade do TUNEL pode ser avaliada através da comparação com os resultados obtidos em microscopia óptica. Para Kerr et al. (1972), a presença da morfologia padrão de apoptose, envolvendo a condensação da cromatina e a fragmentação citoplasmática em corpos apoptóticos, seria suficiente para identificação histológica da apoptose.

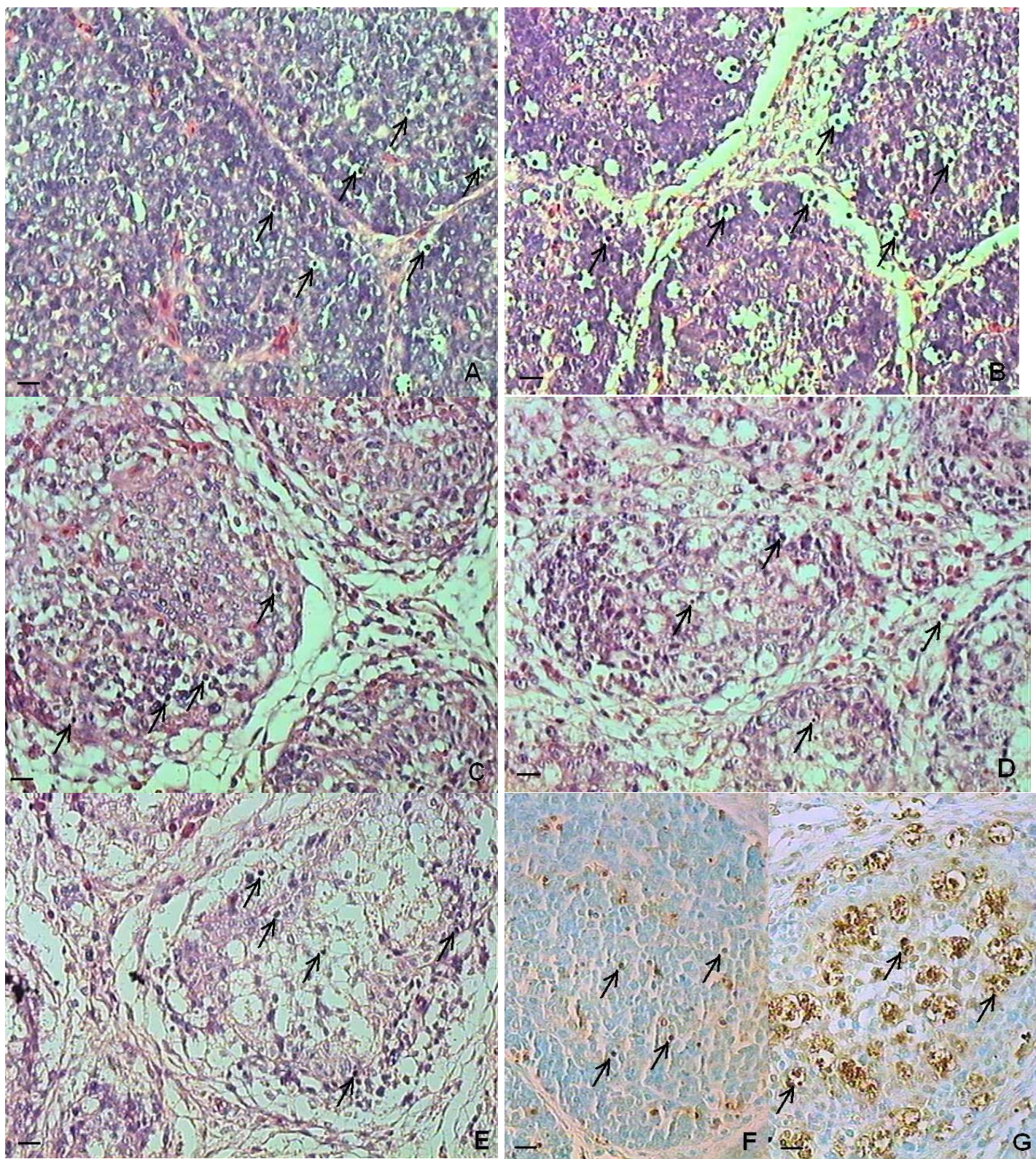


Figura 2.1. Bolsa cloacal mostrando células em apoptose (setas). (A) animal controle; (B) 24 horas p.i.; (C) 48 horas p.i.; (D) 72 horas p.i.; (E) 96 horas p.i.; (F) BC de animal controle; (G) BC 96 horas p.i., (Barra = 10 μ m, aumento de 40x). Coloração: HE (A, B,C,D,E) e TUNEL (F e G).

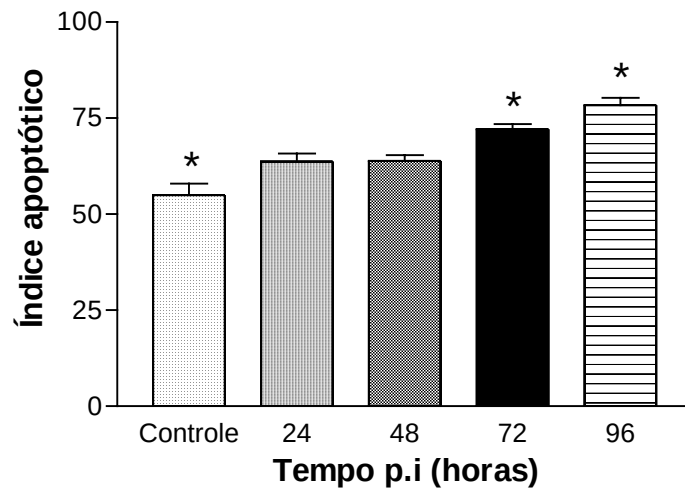


Gráfico 2.1. Análise dos índices apoptóticos (IA) nos grupos controle e infectados. Observar que houve aumento do IA nos diferentes tempos experimentais, com exceção para os tempos de 24 e 48 horas p.i. O asterisco indica os grupos que mostraram diferenças significativas ($p \leq 0,001$).

A análise dos resultados da relação parênquima /estroma (gráfico 2.2) revelou que só não houve diferença significativa da relação entre os grupos controle e 24 horas p.i. ($p > 0,05$) e entre os grupos 72 e 96 horas p.i. A figura 2.2 mostra duas secções nas quais se evidencia a alteração morfológica dos folículos linfóides com perda da sua estrutura poliédrica com septos normais e uma diminuição de tamanho dos mesmos. Ainda que de forma discreta, houve uma substituição do tecido linfóide por tecido conjuntivo fibroso, caracterizando a hipotrofia do órgão. Houve uma alteração do epitélio de revestimento das pregas bursais que se tornou mais irregular nos grupos tratados.

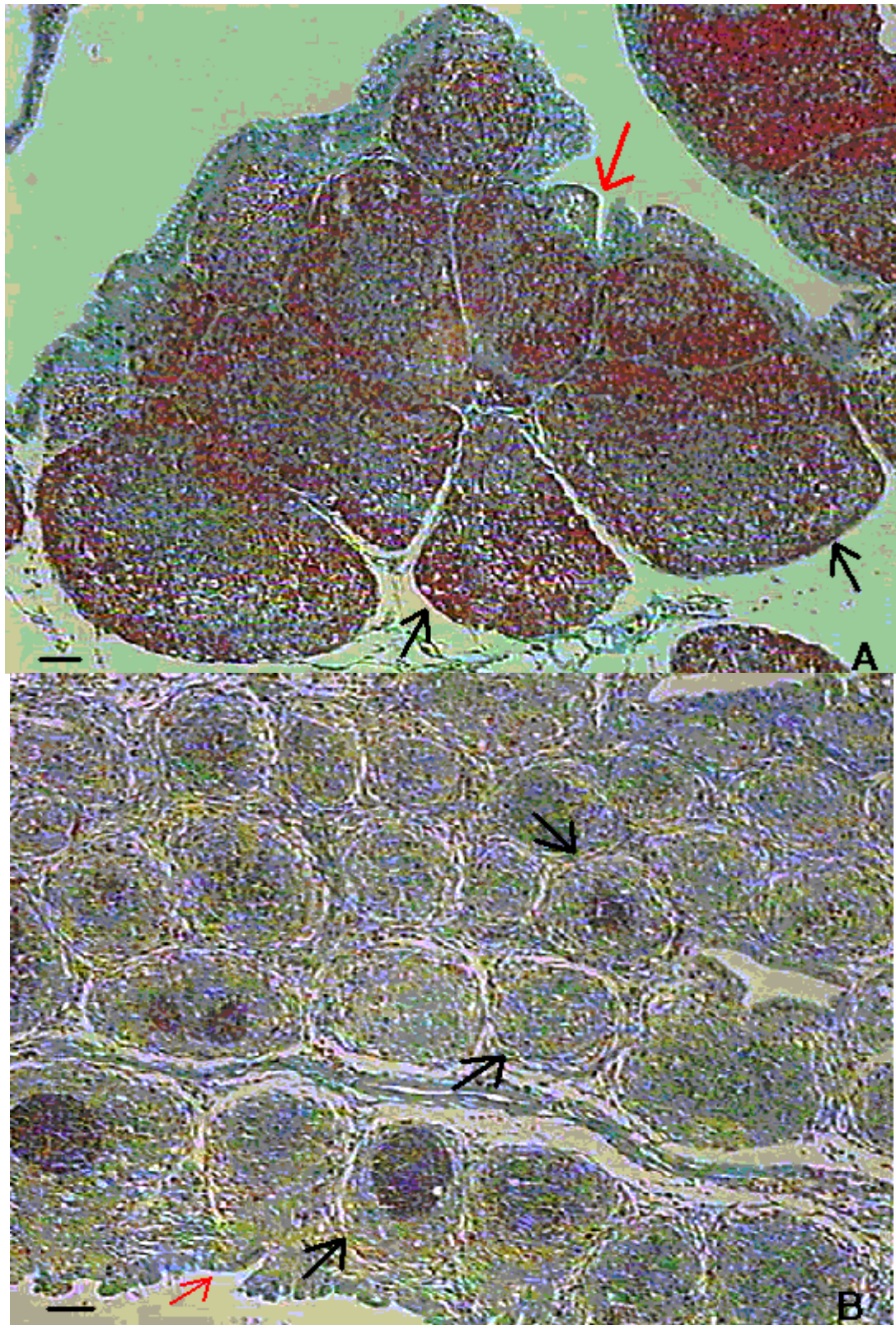


Figura 2.2: Bolsa cloacal corada pelo Tricrômico de Gomori. (A) animal controle; (B) 72 horas p.i. (Barra = 10 μ m, 40x). Observar que os folículos linfóides (indicados pelas setas) diminuem de tamanho e há uma alteração do epitélio de revestimento das pregas bursais que se tornou mais irregular (setas vermelhas).

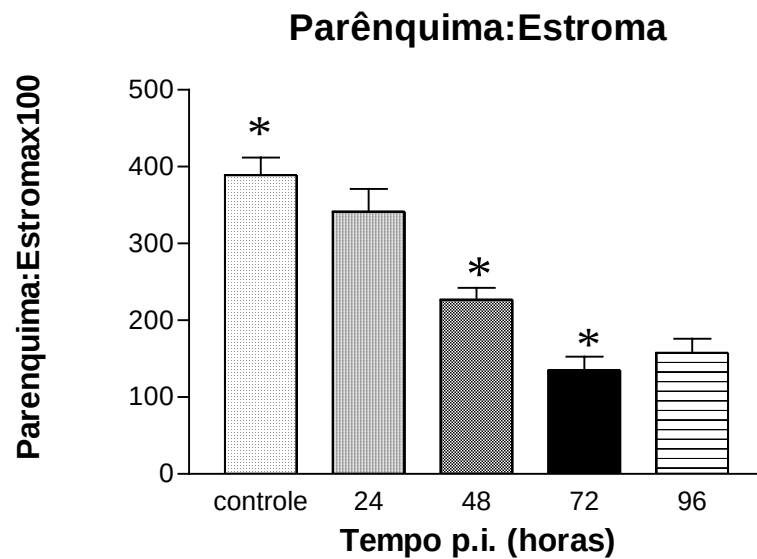


Gráfico 2.2. Análise da relação parênquima:estroma nos grupos controle e infectados. Observar que houve diminuição da relação nos diferentes tempos experimentais, com exceção para os controle e 24 horas p.i. e para os grupos 72 horas e 96 horas p.i. O asterisco indica os grupos que mostraram diferenças estatisticamente significativas ($p \leq 0,001$).

2.4. CONCLUSÕES

O aumento do índice apoptótico está diretamente associado à presença e replicação do vírus da doença infecciosa da bolsa cloacal nas células linfocitárias da bolsa cloacal, levando a uma imunossupressão das aves e à alteração morfológica dos folículos linfóides com uma atrofia dos mesmos.

CAPÍTULO III –

Avaliação da expressão da proteína viral VP2 e dos genes das caspases 3 e 8 e *bcl-2* na apoptose da bolsa cloacal induzida pelo vírus da doença infecciosa da bolsa

3.1. INTRODUÇÃO

A Doença de Gumboro ou Doença Infecciosa da Bursa (DIB) é causada pelo vírus da doença infecciosa da bolsa cloacal (VDIB). Essa virose caracteriza-se por ser aguda e altamente contagiosa, com intenso efeito de imunossupressão causando grandes perdas econômicas para a indústria avícola (Kibenge et al., 1988; Sharma et al., 2000). Afeta aves jovens causando destruição das células linfóides (linfócitos do tipo B) na bolsa cloacal (BC), que é um dos órgãos responsáveis pelo desenvolvimento do sistema imunitário das aves e agride também outros órgãos linfóides (Lukert & Saif, 1991) tais como tonsilas cecais e baço (Tanimura & Sharma, 1997). A imunossupressão se deve, em parte, ao fato do VDIB induzir apoptose em linfócitos em galinhas (Vasconcelos e Lam, 1994; Vasconcelos e Lam, 1995; Lam, 1997; Ojeda et al., 1997; Tanimura e Sharma, 1997; Nieper et al., 1999). Segundo Nieper et al. (1999), há uma correlação entre replicação do VDIB e a ocorrência de apoptose na BC. O processo de apoptose requer a ativação de genes cuja expressão controla a síntese de várias enzimas, tais como caspases, transglutaminases e endonucleases (Ellis et al., 1986; Fesus et al., 1987; Arends & Wyllie, 1991; Tenniswood et al., 1994). Algumas das famílias de genes associados à apoptose são *c-myc*, *bcl-2*, *p53*, e *ras*.

A maioria das mudanças morfológicas observadas no processo de apoptose é mediada por uma cascata enzimática envolvendo cisteíno-proteases chamadas caspases. As caspases têm em comum um sítio ativo formado pelo pentapeptídeo QACRG (glutamina, alanina, cisteína, arginina e glicina) que incorpora o resíduo ativo de cisteína. Elas são sintetizadas como precursores inativos que são clivados proteoliticamente para gerar subunidades ativas. Cada caspase contém seqüências conservadas importantes para a atividade proteolítica, clivando o substrato a partir de

Asp-Xxx produzindo resíduos específicos, o que as caracteriza bioquimicamente (Thornberry et al., 1997).

A ativação das caspases promove o aparecimento das alterações estruturais que caracterizam a apoptose, como desmonte da membrana nuclear e do arcabouço de lâmina, condensação da cromatina e degradação proteolítica das estruturas nucleares e citoplasmáticas. As caspases não ativadas são substratos para outras caspases e a análise da estrutura destas enzimas sugere que as mesmas têm preferência por determinadas caspases conforme uma hierarquia, reforçando a idéia de que a ativação sequencial constitui um mecanismo em cascata em que os sucessivos substratos (caspases) sofrem uma proteólise limitada (Cohen, 1991). As caspases que participam no processo de apoptose são divididas em duas classes: as iniciadoras (caspases 2, 8, 9 e 10) e as executoras (caspases 3, 6 e 7).

Neste estudo, procurou-se avaliar a expressão absoluta dos genes das caspases 3 e 8 (genes apoptóticos) e do gene anti-apoptótico *bcl-2* na apoptose induzida pelo VDIB através da extração de RNA, transcrição reversa e amplificação do cDNA pela PCR em tempo real.

3.2. MATERIAL E MÉTODOS

Os ovos embrionados livres de patógenos específicos (SPF), obtidos da Sadia S.A. (Uberlândia, Minas Gerais), foram incubados no Setor de Doença de Aves do Departamento de Medicina Veterinária Preventiva da Escola de Veterinária da UFMG. Após a eclosão dos ovos, vinte e nove pintos Leghorn (SPF) de um dia de idade foram divididos, ao acaso, em cinco grupos experimentais: Grupo 1: Controle (n=5) e Grupos 2 a 5: animais eutanasiados após 24, 48, 72 e 96 horas da inoculação (n=6), respectivamente. Os animais foram inoculados com amostra viral tipificada (A-BH83) e titulada na Escola de Veterinária da UFMG ($0,5 \times 10^3$ DLE₅₀/ave).

Após cada intervalo experimental, as aves de cada grupo foram pesadas e eutanasiadas pelo método de decapitação e submetidos à necropsia. Fragmentos da BC foram colhidos e congelados à -80°C.

3.2.1 Extração de RNA total

Para a extração de RNA total foi utilizada a técnica descrita por Chomczynski & Sacchi (1987) com algumas modificações. Amostras de 200mg de tecido foram homogeneizadas em 1mL de solução D e transferidos para tubos de 4mL. Adicionou-se ao homogenato 0,1mL de acetato de sódio 2M pH 4, 1mL de fenol (água-saturado), 1mL de clorofórmio: álcool isoamílico (49:1). A suspensão foi agitada por 10 segundos, resfriada em gelo por 15 minutos e centrifugada por 20 minutos a 10000g/4°C. A fase aquosa foi transferida para novos tubos. Adicionou-se 1 mL de isopropanol e armazenou-se a -20°C/1h, seguida de centrifugação a 10000g/20 min/4°C. Os *pellets* de RNA foram dissolvidos em 0,3mL de solução D, transferidos para um tubo de 1,5mL e precipitados com 1 volume de isopropanol (0,3mL) a -20° C. O precipitado foi centrifugado a 14000g/4°C por 10 minutos e os *pellets* de RNA ressuspensos em etanol a 75% e centrifugado novamente. Os *pellets* foram secos na bancada e ressuspensos em 50µl de água DEPC à 60°C por 10 minutos. As concentrações das amostras de RNA foram determinadas pela leitura da densidade óptica (OD) em comprimento de onda de 260nm em espectrofotômetro *GeneQuant*. Resumidamente, alíquotas de 5µl do RNA total foram diluídas em 95µl (1:20) de água para PCR estéril filtrada para quantificação em cubeta de quartzo específica. Os resultados das concentrações determinadas são apresentados na tabela 3.1. O RNA extraído das amostras de bolsa cloacal foi usado para o estudo da expressão dos genes VP2 do VDIB, caspase 3 e caspase 8, *bcl-2*, GAPDH e S26 através da transcrição reversa e da técnica de PCR em tempo real.

Solução de Desnaturação (Solução D):

4M isotiocianato de guanidina

25mM citrato de sódio pH 7,0

0,5% sarcosil

0,1M 2-mercaptoetanol.

Água DEPC:

Água mili-Q (1 L) contendo 0,5mL de dietilpirocarbonato.

Autoclavar após 24 horas.

1.0 de O.D.₂₆₀ = 40µg/mL para RNA (OD₂₆₀/OD₂₈₀ deve ser = 1.8)

3.2.2 Seleção de Oligonucleotídeos Iniciadores para RT-PCR e PCR em tempo real

Os iniciadores foram selecionados com base na análise das seqüências dos cDNAs das caspases 3 e 8, *bcl-2*, GAPDH, VP2 e S26 descritas no GeneBank, obtidas por meio do programa BLASTn do National Center for Biotechnology Information- (NCBI) (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/blast.cgi>). Os iniciadores escolhidos com seus respectivos tamanhos e seqüências são mostrados na tabela 3.2.

3.2.3. Transcrição Reversa (RT)

A reação de transcrição reversa foi realizada segundo protocolo previamente descrito por Martins et al. (1995) com pequenas alterações. Em cada tubo de reação, 2,0µg de RNA total foram aliquotados e o volume foi completado com água para PCR estéril filtrada para 8µl. Foram adicionados 1,0µl (1pmol/µl) do iniciador reverso VP2 e do gene-alvo, 5µl de oligo dT₁₈ (50pmol/µl), e a mistura foi incubada à 37°C por 10 minutos. Após incubação, as amostras foram colocadas em gelo e acrescentaram-se seqüencialmente 2 µl de tampão reação 10x, 2µl de dNTP mix (1,25mM/µl), 2µl de DTT 0,1M, 2µl (20 U/µl) de transcriptase reversa (RT). As amostras foram incubadas a 41°C por 60 minutos e, em seguida, foram colocadas em gelo e depois armazenadas à – 20°C.

3.2.4. Reação em cadeia da polimerase (PCR)

Neste trabalho, a PCR foi baseada no método descrito por Mullis & Faloona (1987) adaptado para a amplificação das amostras neste trabalho e foi realizada somente com o intuito de verificar a eficiência e a especificidade dos *iniciadores* selecionados para a PCR em tempo real. Utilizou-se PCR convencional com algumas modificações. Resumidamente, a reação foi realizada em *pools* de amostras utilizando-se para cada gene alvo um tubo contendo 15,5µl de água mili-Q, 2,5µl de tampão PCR 10x; 2µl de dNTP mix (200µM cada dNTP), 1µl de MgCl₂ a 50mM, 1,5µl de cada *iniciador* (1 pmol/µl), 0,125µl (5 U/µl) de Taq DNA polimerase (Laboratório Phoneutria) e 0,5µl da reação de transcrição reversa (cDNA), num volume total de 25µl de reação. A reação foi desenvolvida em termociclador *MJ Research Minicycler* com o seguinte programa: 95°C/5 min.; seguido de 52°C/2 min. e 72°C/2 min.; seguidos de 05 ciclos de 94°C/1 min.; 56°C/1 min. e 72°C/1 min.; seguidos de 40 ciclos de: 93°C/ 1 min.; 56°C/ 1 min. e 72°C/1 min.; com extensão final a 72°C/4 min. A verificação dos *amplicons* foi feita utilizando-se alíquotas de 5 µl da PCR para eletroforese em gel de poliacrilamida à 8% a partir de uma solução estoque à 30%, corado com nitrato de prata.

3.2.5. Purificação dos *amplicons* dos genes alvo

Com o objetivo de se obter um fragmento de PCR puro e específico de cada gene alvo para quantificação e utilização como padrão na PCR em tempo real, 40µl do fragmento obtido no PCR convencional foram gel-purificados em agarose à 1,2%. A eletroforese foi realizada a 100 volts por aproximadamente 60 minutos de corrida em tampão TBE 1x. Com o auxílio de uma lâmina de bisturi estéril, as bandas dos fragmentos específicos foram cortadas do gel, evitando-se excesso de agarose. As bandas foram colocadas em tubos de microcentrífuga de 1,5mL contendo um filtro de 0,45µm, com 1mL de tampão TBE 0,5x. Os fragmentos de agarose contendo os *amplicons* foram congelados à -20°C, fragmentados e submetidos à separação por centrifugação a 4°C por 30 minutos e posterior purificação por extração orgânica com

fenol:clorofórmio; álcool isoamílico e precipitação com etanol. Os fragmentos de PCR dos diferentes genes foram ressuspensos em água estéril filtrada e alíquotas analisadas em espectrofotômetro *GeneQuant* para quantificação dos fragmentos de DNA em OD₂₆₀. Após a purificação foi feito um gel de poliacrilamida com 2µl (200ng) de marcador 50pb DNA *ladder* e 10µl dos fragmentos purificado para confirmação da integridade e pureza dos mesmos. Essas amostras purificadas foram utilizadas na construção das curvas de calibração no PCR em tempo real com diluições seriadas de 1ng, 10⁻¹ng, 10⁻³ ng, 10⁻⁵ ng.

3.2.5. Escolha de um gene normalizador para PCR em tempo real

Dois pares de iniciadores de oligonucleotídeos foram selecionados como normalizadores (controle endógeno) da PCR em tempo real (tabela 3.2). Os alvos escolhidos foram os genes para GAPDH (Gliceraldeído Fosfato Dehidrogenase) com 82 pb e para fração ribossomal S26 com 83 pb. Ambos são genes constitutivos e não devem ter sua expressão variando na célula entre tecidos diferentes em condições variadas.

3.2.6. PCR em tempo real

Para a reação de PCR em tempo real foi utilizado o kit *SYBR GREEN PCR core Reagents* da PE Biosystems (No. Cat. 4304886; Warrington, UK). Adotou-se um protocolo básico mantendo-se as concentrações usuais de reagentes em um volume final de reação de 20µl. Resumidamente, a reação consistiu-se de: 6,0µl de água para PCR; 10µl de tampão (*10x SYBR Green PCR buffer*); 3µl de iniciador mix (senso e antisenso-1,5pmol cada) para GAPDH, VP2, caspases 3 e 8; S26 e *bcl-2*; 0,15µl (5 U/µl) de enzima AmpliTaq GoldTM e 1µl de cDNA da reação de transcrição reversa. Os controles negativos foram feitos substituindo-se as amostras pelo mesmo volume de água na reação. A reação em tempo real foi realizada no aparelho *ABI Prism 7000 SDS* no seguinte ciclo termal: [estágio 1] um ciclo de 50°C/2 min.; [estágio 2] um ciclo a

95°C/10 min.; [estágio 3] 40 ciclos de 95°C/0,15 min. e 60°C/1 min. Como controle positivo e para posterior quantificação dos resultados, curvas de calibração de todos dos *amplicons* (GAPDH, VP2, caspases 3 e 8; S26 e *bcl-2*) foram construídas a partir de diluições seriais dos mesmos. Para confirmação do tamanho dos fragmentos amplificados por PCR em tempo real foi realizada uma curva de dissociação como parte do programa estabelecido no *ABI Prism 7000 SDS* e os fragmentos amplificados também foram posteriormente visualizados através de eletroforese em gel de poliacrilamida corado com nitrato de prata.

3.3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.3.1. Extração de RNA Total

A tabela 3.1 mostra os resultados da quantificação de RNA total obtidos por espectrofotometria. As leituras de densidade óptica (OD) nos comprimentos de ondas de 260nm para ácido nucléico e 280nm para contaminantes protéicos são apresentadas nesta tabela bem como sua relação.

	$\lambda = 260$	$\lambda = 280$	$^{260}/_{280}$	Concentração ($\mu\text{g}/10\text{ }\mu\text{l}$)
BC-1	0,367	0,194	1,892	2,94
BC-3	0,849	0,457	1,858	6,79
BC-6	0,310	0,169	1,834	2,48
BR-7	2,630	1,415	1,859	21,04
BC-8	0,378	0,191	1,979	3,02
BC-11	0,459	0,229	2,004	3,67
BC-13	1,058	0,555	1,906	8,46
BC-14	2,819	1,528	1,845	22,55
BC-15	1,804	0,956	1,887	14,43
BC-21	2,401	1,293	1,920	19,20
BC-22	1,240	0,660	1,879	9,92
BC-23	1,651	0,874	1,889	13,20
BC-28	1,018	0,530	1,921	8,14
BC-30	1,130	0,592	1,909	9,04
BC-31	0,855	0,450	1,9	6,84

Tabela 3.1- Determinação das concentrações das amostras de RNA de tecido da bolsa cloacal (**BC**) pela leitura da densidade óptica (**OD**) em dois comprimentos de onda (λ) no espectrofotômetro *GeneQuant*. Alíquotas de 5 μl do RNA total foram diluídas em 95 μl (1:20) de água DEPC SF e lidas em cubeta de quartzo específica. As concentrações foram calculadas considerando-se a diluição e o fator de 40 $\mu\text{g}/\text{mL}$ por densidade óptica de RNA.

3.3.2 Seleção dos iniciadores para obtenção das seqüências alvo da PCR em Tempo Real

A tabela 3.2 mostra a seqüência de iniciadores escolhidos para a RT e para a PCR em tempo real. Os iniciadores de 21 nucleotídeos (nt) foram criteriosamente selecionados, levando-se em consideração regiões com conteúdo satisfatório de GC. As seqüências escolhidas para confecção dos oligonucleotídeos iniciadores foram pesquisadas no *Blastn* (NCBI) para garantir a exclusão de regiões homólogas com os alvos pesquisados. Esta estratégia foi fundamental para o sucesso de amplificação pelo PCR convencional, bem como pelo PCR em tempo real neste trabalho. A utilização da região de junção para *splicing*, contendo um intron, na seleção dos iniciadores reduz a possibilidade de influência durante a amplificação de possíveis contaminações por DNA genômico das preparações de RNA total. Contaminação por DNA genômico poderia interferir na etapa de PCR, posterior à transcrição reversa, levando a uma falsa

interpretação da expressão do RNAm reverso-transcrito. Portanto, nossa estratégia reduz a possibilidade de amplificação inespecífica de DNA genômico e isto permitiu a obtenção de fragmentos puros e específicos para os genes escolhidos.

	<i>Iniciadores</i>	<i>T_m</i> (°C)	<i>Tamanho dos fragmentos</i>
Caspase 3	5' CCT GAT GAC AGT TAC AGA ATG 3' (Senso) 5' TCC GGT ATC TCG GTG GAA GTT 3' (Anti-senso)	74	84 pb
Caspase 8	5' GCT GCT CTT CGT GAT CAG CGA 3' (Senso) 5' ACA GTG ACG TGC TCC AGG CTG 3' (Anti-senso)	83,5	81 pb
Bcl-2	5' GCT GCG AGG ATG GAA GTG CTG 3' (Senso) 5' GAC ACA AGC TCC TTG TCA GTG 3' (Anti-senso)	83,8	95 pb
VP2	5' GAC GAT CCA CGG TGG CAA CTA 3' (Senso) GAC CGT AAC GAC AGA TCC TGT (Anti-senso)	82,1	91 pb
GAPDH	5' CTA AGC GTG TTA TCA TCT CAG 3' (Senso) 5' GAC TTG TCA TAT TTC TCA TGG 3' (Anti-senso)	81,1	82 pb
S26	5' TTC GTC ATC AGG AAC ATC GTG GAG G 3' (Senso) 5' TTG GGC AGG ACA TAG GAG TCG AAG A 3' (Anti-senso)	83	83 pb

Tabela 3.2. Sequências de oligonucleotídeos usadas para síntese dos iniciadores (25 nt para S26 e 21 nt para os demais) com os respectivos tamanhos dos seus produtos de amplificação. Para obter um resultado favorável na PCR em tempo real sugere-se fragmentos de tamanhos 80 – 100pb.

3.3.3 PCR em tempo real

Os resultados da PCR em Tempo Real das amostras de bursas de Fabricius são apresentados nas figuras 3.1 a 3.6. Os fragmentos amplificados em triplicata a partir do cDNA de amostras bursais apresentaram a clássica curva logarítmica com um total de ciclos (Ct) variando de acordo com cada fragmento. Estes dados demonstram que a expressão de cada amostra pode ser quantificável. Além disso, os resultados das curvas de dissociação e da PCR em tempo real dessas amostras confirmam a pureza, qualidade, tamanho e especificidade dos fragmentos amplificados pela PCR em Tempo Real.

Os *amplicons* para os genes alvos obtidos após eletroeluição dos fragmentos de PCR convencional foram utilizados para a construção das curvas de calibração. Os resultados

das curvas de calibração, neste trabalho, demonstraram uma boa qualidade de pipetagem, diluição, sensibilidade e reproducibilidade. O Ct foi mantido, logaritmicamente, com as diluições dos padrões dos genes para as caspases 3 e 8, *Bcl-2*, proteína viral VP2, normalizadores S26 e GAPDH. Este resultado é fundamental para futuras quantificações absolutas da expressão desses genes em tecidos de frangos.

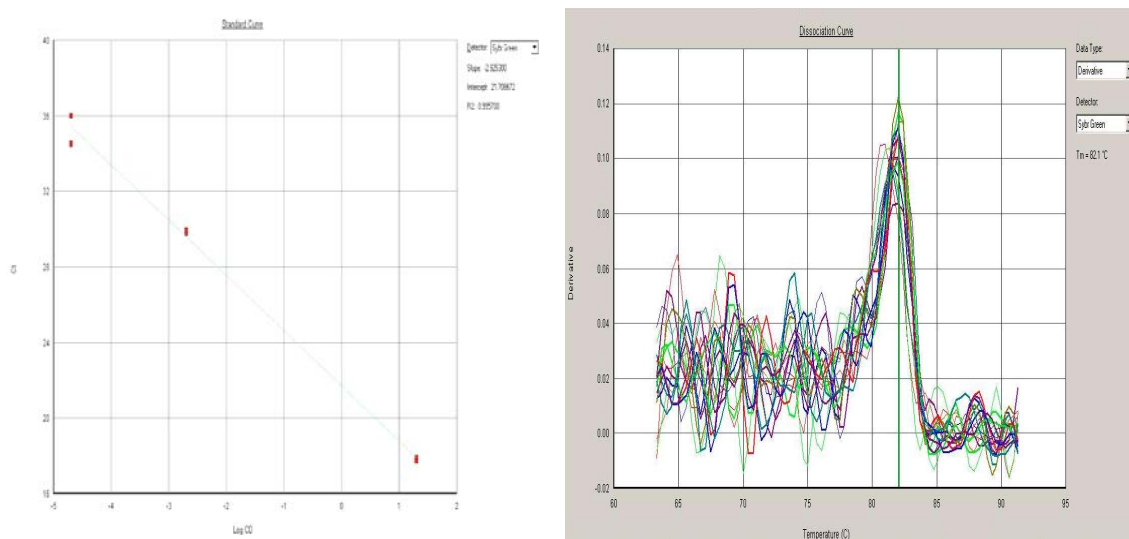


Figura 3.1. Resultado da curva padrão para a proteína viral VP2. *Slope* mostra que a eficiência da reação é de 100%, e o $r=0,995$, próximo de 1. A curva de dissociação apresentada à direita demonstra as temperaturas de fusão e pureza dos fragmentos gerados neste ensaio. Ct em torno de 17 ciclos. A curva foi realizada como parte do programa estabelecido no *ABI Prism 7000 SDS*.

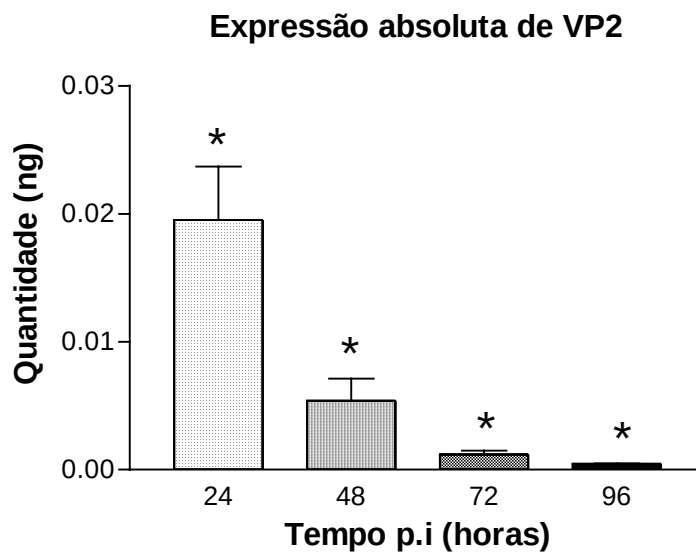


Gráfico 3.1. Expressão absoluta de VP2. Observar que existe uma diferença significativa ($p \leq 0,05$) nos grupos 48, 72 e 96 horas p.i. (indicadas por asterisco) quando comparados com o grupo 24 horas p.i. Entre os grupos 48, 72 e 96 horas não houve diferença significativa ($p > 0,05$) quando comparados entre si.

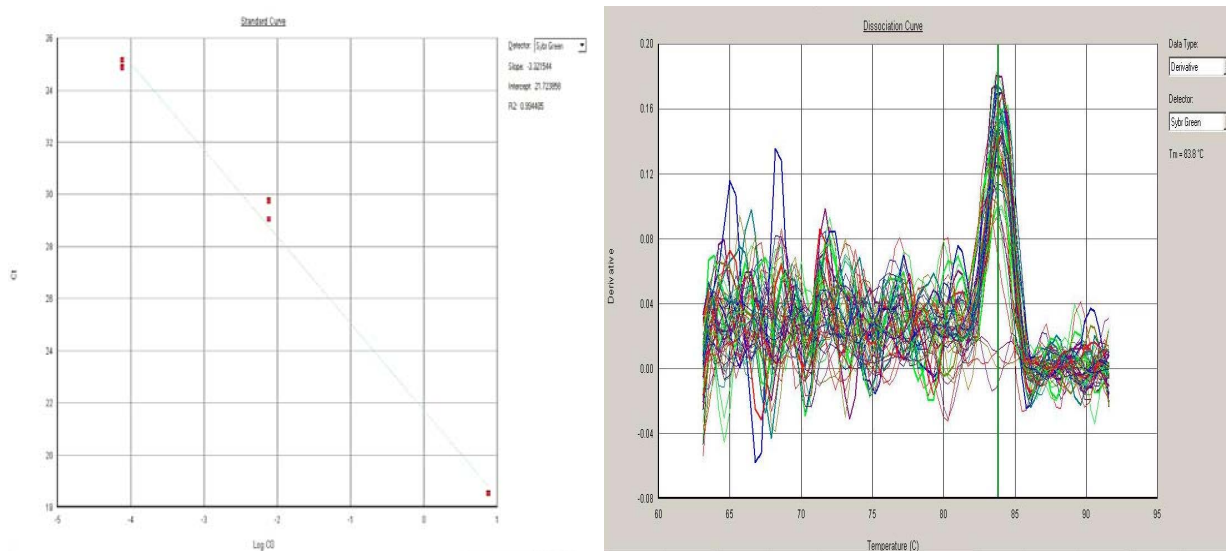


Figura 3.2. Resultado da curva padrão para o gene anti-apoptótico *Bcl-2*. *Slope* mostra que a eficiência da reação é de 100%, e o $r=0,994$, próximo de 1. A curva de dissociação apresentada à direita demonstra as temperaturas de fusão e pureza dos fragmentos gerados neste ensaio. Ct em torno de 20 ciclos. A curva foi realizada como parte do programa estabelecido no *ABI Prism 7000 SDS*.

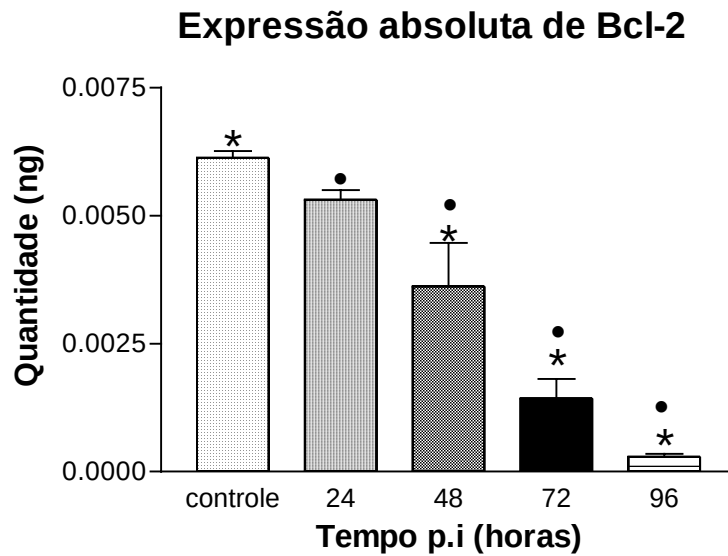


Gráfico 3.2: Expressão absoluta de *bcl-2*. Observar que existe uma diferença significativa ($p \leq 0,05$) nos grupos 48, 72 e 96 horas p.i. (indicadas por asterisco) quando comparados com o grupo controle. Entre os grupos controle e 24 horas p.i. não houve diferença significativa ($p > 0,05$). Houve diferença também ($p \leq 0,05$, •) entre os grupos 24, 48, 72 e 96 horas pi. Já os grupos 72 e 96 horas p.i não mostraram diferenças entre si.

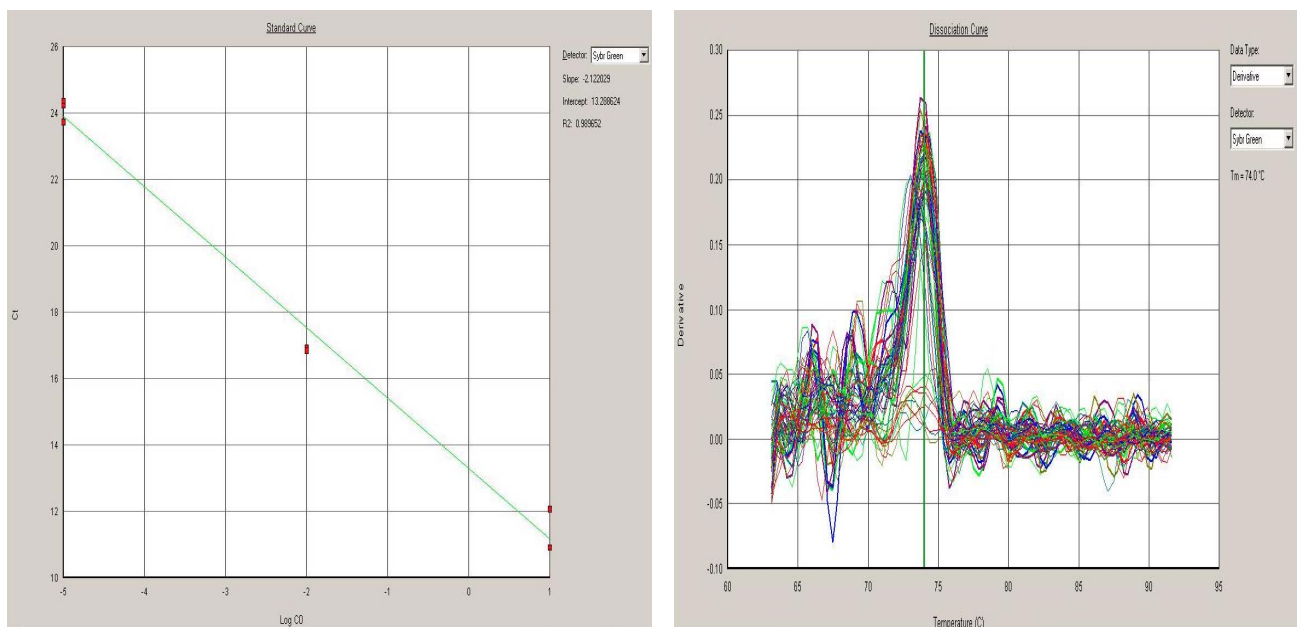


Figura 3.3: Resultado da curva padrão para caspase 3. *Slope* mostra que a eficiência da reação é de 100%, e o $r=0,989$, próximo de 1. A curva de dissociação apresentada à direita demonstra as temperaturas de fusão e pureza dos fragmentos gerados neste ensaio. Ct em torno de 23 ciclos. A curva foi realizada como parte do programa estabelecido no ABI Prism 7000 SDS.

Expressão absoluta de caspase 3

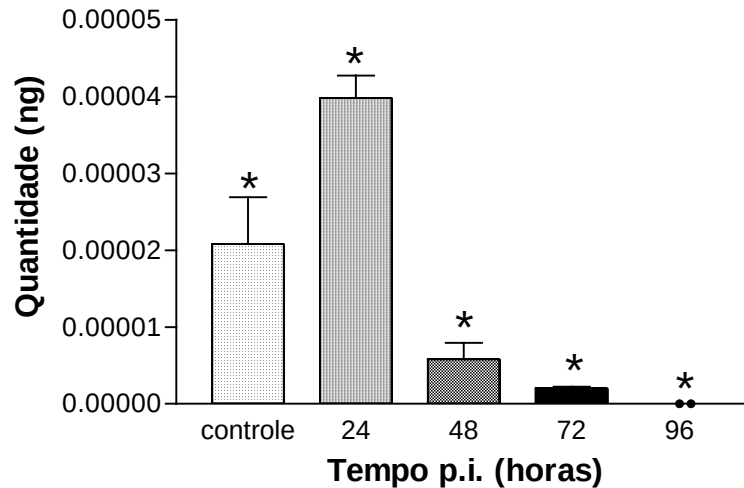


Gráfico 3.3. Expressão absoluta de caspase 3. Observar que existe uma diferença significativa ($p < 0,001$) entre os grupos 24, 48, 72 e 96 horas p.i. (indicadas por asterisco) quando comparados com o grupo controle entre os grupos 24 e 48 horas p.i. quando comparados entre si. Entre os grupos 48, 72 e 96 horas não houve diferença significativa ($p > 0,05$).

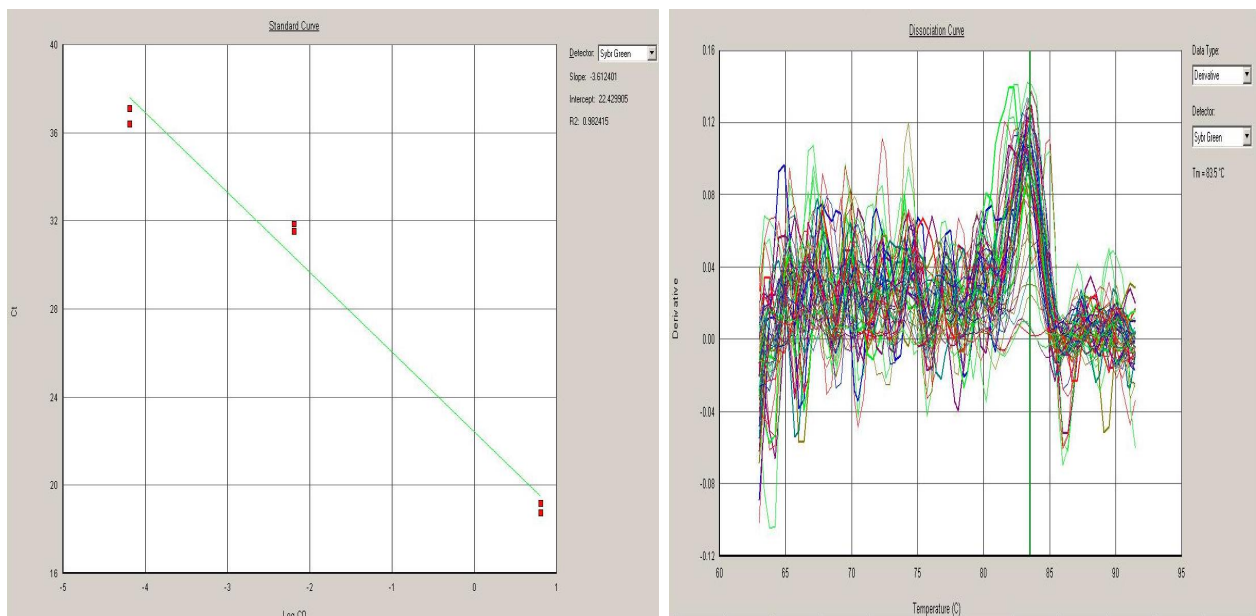


Figura 3.4. Resultado da curva padrão para caspase 8. *Slope* mostra que a eficiência da reação é de 100%, e o $r=0,982$, próximo de 1. A curva de dissociação apresentada à direita demonstra as temperaturas de fusão e pureza dos fragmentos gerados neste ensaio. Ct em torno de 23 ciclos. A curva foi realizada como parte do programa estabelecido no *ABI Prism 7000 SDS*.

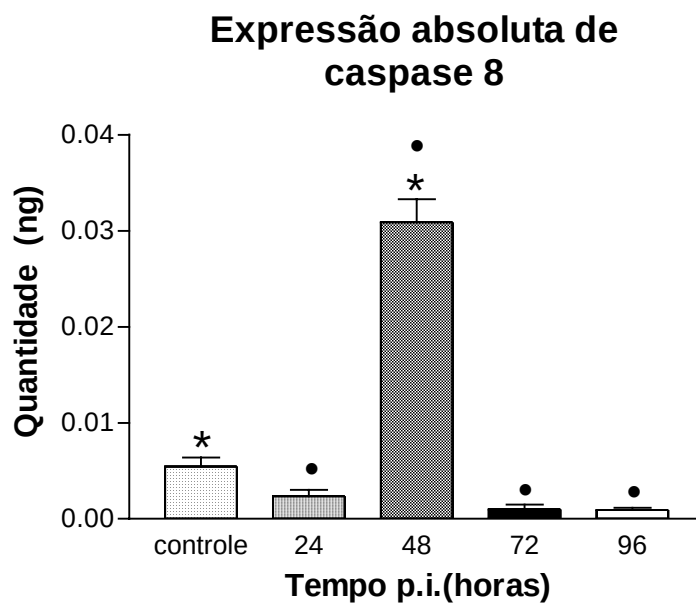


Gráfico 3.4. Expressão absoluta de caspase 8. Observar que existe uma diferença significativa ($p < 0,01$) entre os grupos controle e 48 horas p.i. (indicadas por asterisco). Entre os grupos 24, 48, 72 e 96 horas houve diferença significativa ($p < 0,001$, •).

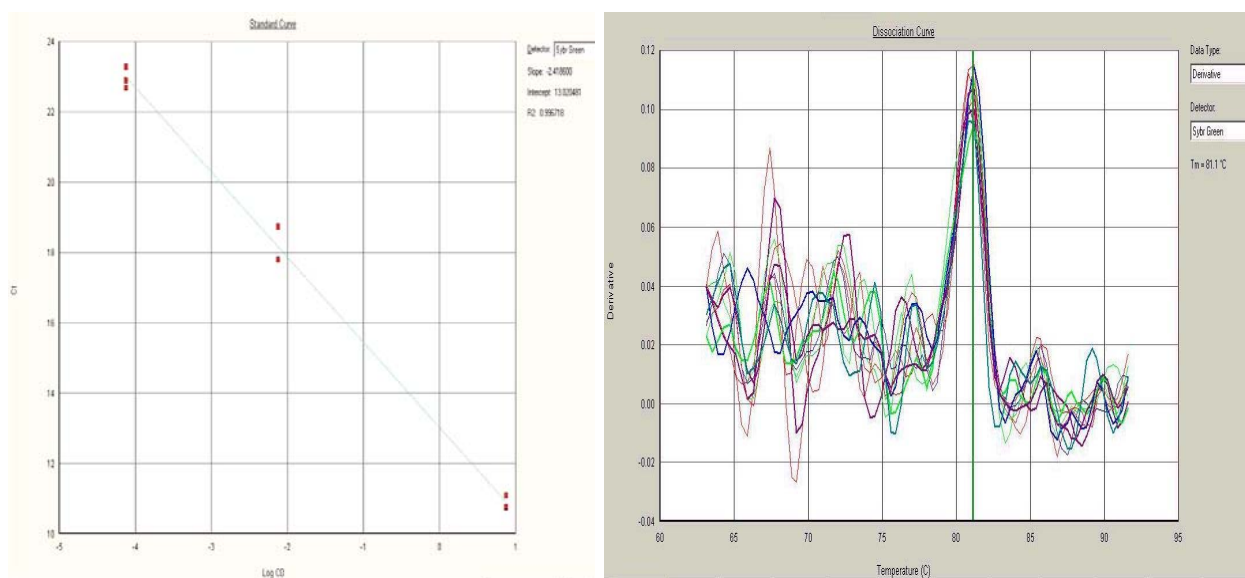


Figura 3.5. Resultado da curva padrão para GAPDH. *Slope* mostra que a eficiência da reação é de 100%, e o $r=0,996$, próximo de 1. A curva de dissociação apresentada à direita demonstra as temperaturas de fusão e pureza dos fragmentos gerados neste ensaio. Ct em torno de 24 ciclos. A curva foi realizada como parte do programa estabelecido no *ABI Prism 7000 SDS*.

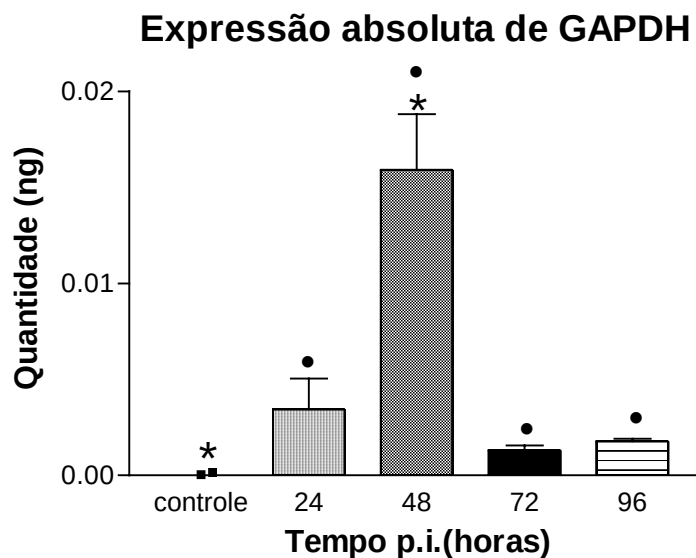


Gráfico 3.5. Expressão absoluta de GAPDH. Observar que existe uma diferença significativa ($p < 0,001$) entre os grupos controle e 48 horas p.i. (indicadas por asterisco). Entre os grupos 24, 48, 72 e 96 horas houve diferença significativa ($p < 0,01$, •).

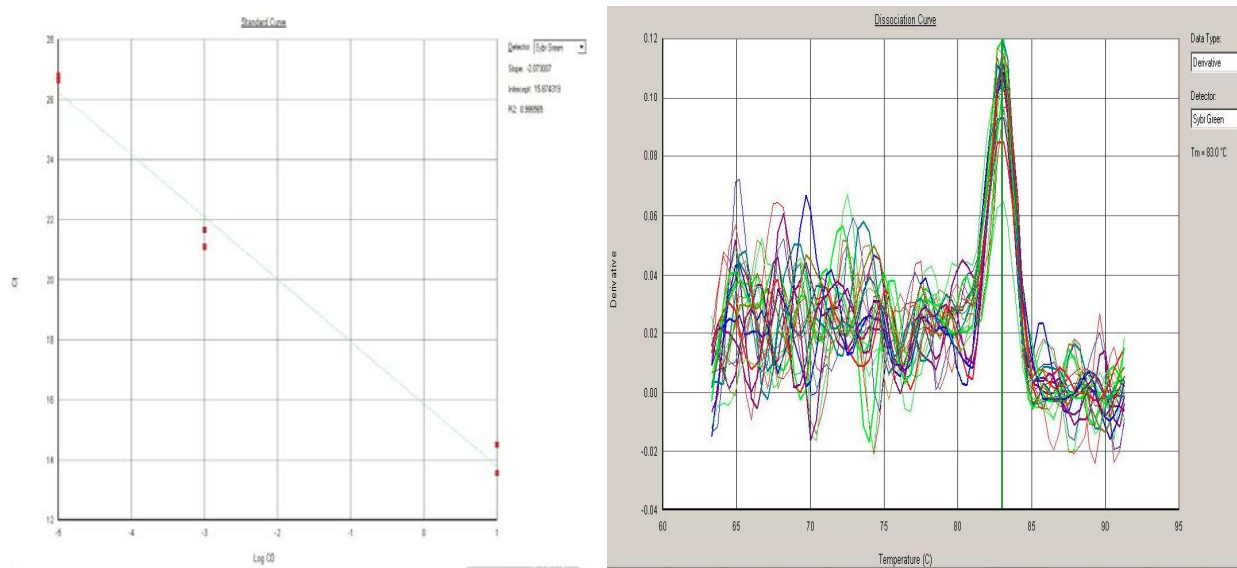


Figura 3.6. Resultado da curva padrão para S26. *Slope* mostra que a eficiência da reação é de 100%, e o $r=0,986$, próximo de 1. A curva de dissociação apresentada à direita demonstra as temperaturas de fusão e pureza dos fragmentos gerados neste ensaio. A curva foi realizada como parte do programa estabelecido no *ABI Prism 7000 SDS*.

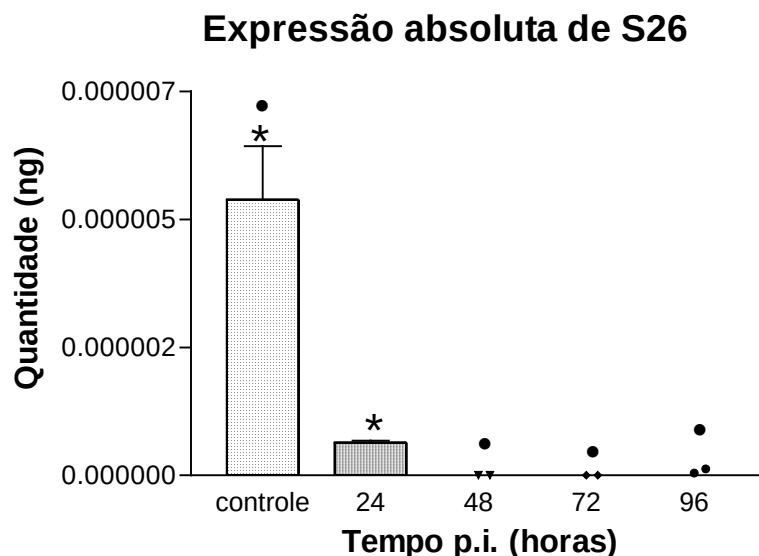


Gráfico 3.6. Expressão absoluta de S26. Observar que existe uma diferença significativa entre os grupos controle e 24 horas p.i. ($p < 0,01$) e entre os grupos controle e 48, 72 e 96 horas p.i. ($p < 0,01$).

A proteína viral VP2 apresentou um pico de expressão 24 horas após a inoculação viral e uma queda nos períodos subsequentes. A ocorrência de apoptose aumenta enquanto a expressão da proteína viral VP2 diminui, sugerindo que a apoptose tenha um papel como mecanismo de defesa contra a replicação viral. De fato, especula-se que os mecanismos associados à degradação do genoma na apoptose – como a ativação das endonucleases - poderiam também agir no sentido de suprimir ou inibir a replicação viral nas células linfocitárias da bolsa cloacal. O aumento do número de células em apoptose seria um mecanismo de proteção contra a replicação viral, já que o vírus necessita de células hospedeiras ativas para copiar o seu material genético. Assim, faz sentido que as células infectadas abortem a replicação viral pela ativação da morte celular programada. Um dos mecanismos de defesa em resposta à infecção viral é a ativação da apoptose em estágios iniciais da infecção viral, limitando a propagação viral. Entretanto, em alguns casos, alguns vírus desencadeiam a apoptose num estágio mais tardio de replicação viral para facilitar a liberação de partículas virais (Hay & Kannourakis, 2002).

Os gráficos 3.3 e 3.4 mostram a expressão das caspases 3 e 8, respectivamente, envolvidas na via de apoptose. A caspase 3 é efetora do processo de apoptose e mostrou um pico de expressão no grupo de animais controles (sem infecção), mantendo-se aumentada 24 horas p.i. Nos tempos experimentais seguintes, a caspase 3 teve sua expressão diminuída e não houve variação estatisticamente significativa nos tempos subseqüentes. A caspase 8 (iniciadora do processo) mostrou uma expressão aumentada nos grupos controle e experimentais, diminuindo sua expressão no grupo de 96 horas p.i. A comparação das expressões absolutas das caspases 3 e 8 com o IA, que aumenta a partir de 48 horas p.i., mostra que a apoptose ocorre em dois momentos diferentes: o primeiro (até 24 horas p.i) se dá por ativação das caspases 3 e 8; o segundo (a partir de 24 horas) pode ser desencadeado por fatores teciduais liberados pelas células de defesa em resposta à presença do vírus ou pelo estresse celular durante a infecção viral, sugerindo um mecanismo indireto para indução de apoptose (Jungmann et al., 2001). Liu e Vakaria (2006), em um estudo com fibroblasto de embrião de galinha, mostraram que a apoptose induzida pela infecção por IBDV ativa as caspases 3 e 9 (e não caspase 8) num estágio tardio da replicação viral (entre 12 e 14 horas p.i. *in vitro*).

A expressão de *bcl-2* (gene anti-apoptótico) também variou nos grupos estudados. Sua expressão foi maior nos animais controles, diminuindo no grupo 24 e 96 horas p.i.

O gráfico 3.5 mostra a expressão da GAPDH que, inicialmente, foi escolhida como um normalizador da reação, por ser um gene constitutivo. Um outro fato observado foi que a expressão do GAPDH variou de forma muito intensa nos vários grupos experimentais, mostrando um pico 48 p.i. coincidindo com a expressão diminuída da proteína viral VP2. Logo, há necessidade de se escolher um outro gene que possa ser usado como normalizador interno da reação. A escolha da proteína ribossomal S26 foi realizada com o intuito de normalizar as reações de expressão dos genes via PCR em tempo real. Porém, como mostrado no gráfico 3.6, a expressão do S26 também variou muito e descartou-se o uso desse gene como *housekeeping*, ou seja, como normalizador interno das reações. Um outro gene muito utilizado como normalizador interno em biologia molecular é o gene para β -actina, porém, sendo a β -actina uma proteína do citoesqueleto que sofre alterações durante o processo de apoptose, esse gene foi logo

descartado. Em decorrência da falta de um normalizador interno que pudesse corrigir os valores da expressão dos genes alvos, os valores apresentados nos gráficos para os genes alvo são absolutos. Uma possível tentativa de normalizar a reação, isto é, calcular a expressão gênica em valores relativos, seria introduzir um controle exógeno nas reações. Tal controle teria sua expressão já conhecida e seria adicionado em cada reação.

3.4 CONCLUSÕES

O VDIB induz apoptose que aumenta com o tempo de infecção e o gene que codifica para VP2 tem expressão elevada nas primeiras 24 horas após a inoculação do vírus. Já *bcl-2* tem sua expressão gradualmente diminuída pela infecção. A ativação da apoptose se dá na BC com participação de caspase 3 e uma outra caspase iniciadora que não a 8. Num segundo momento, a apoptose parece ser ativada por liberação de citocinas no ambiente tecidual levando a ativação da caspase 8 e uma outra caspase executora como a caspase 7, por exemplo (figura 3.7).

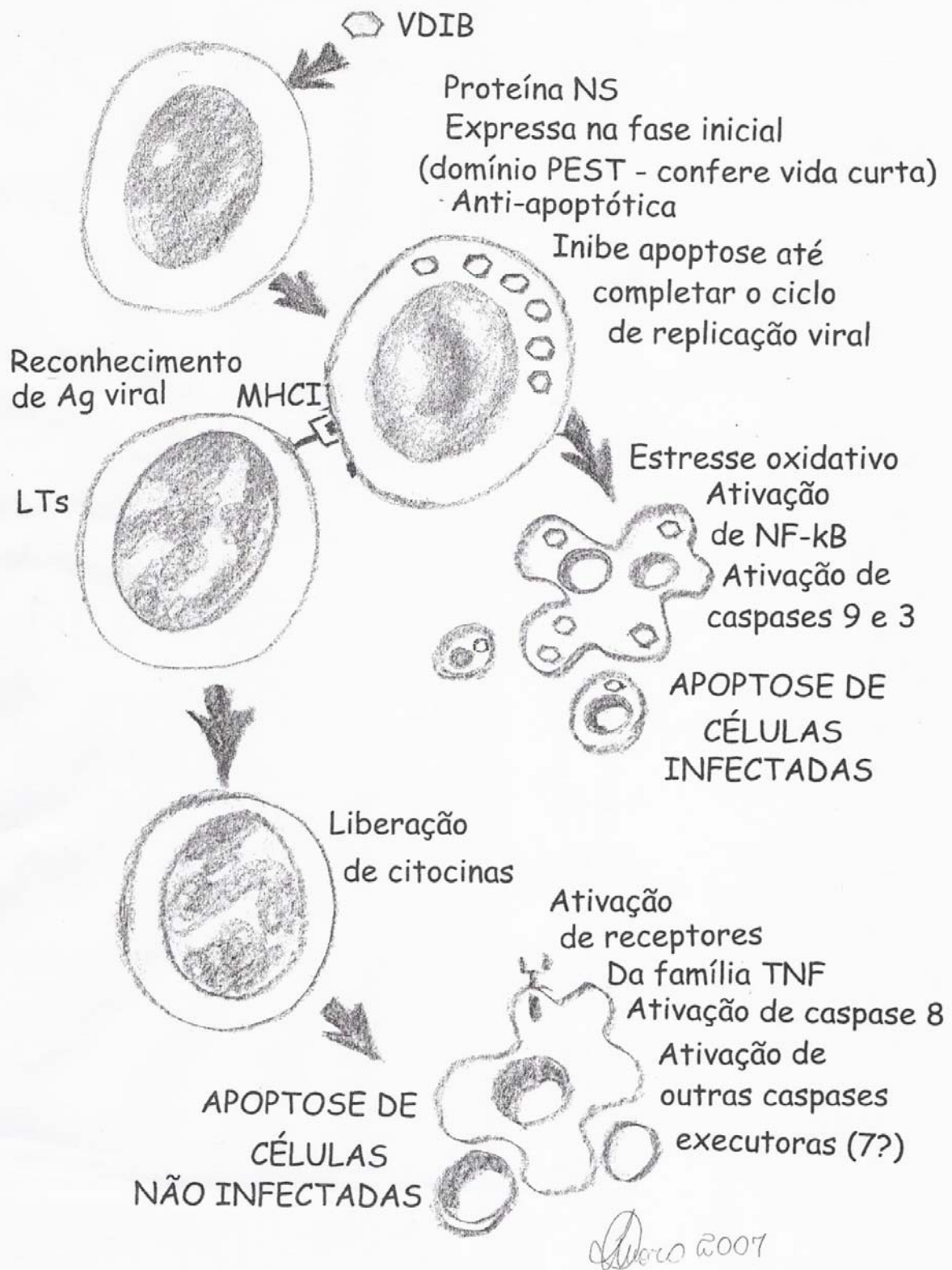


Figura 3.7. Esquema do processo de infecção de linfócitos de galinha pelo VDIB. Observar que as partículas virais, ao infectarem a célula, determinam o desencadeamento da apoptose por duas vias diferentes. A primeira via envolve a participação de caspases (9 e 3) diretamente e a segunda, envolve a produção e liberação de citocinas que agem em células não infectadas pelo vírus, fazendo com que estas ativem a caspase 8 e uma outra caspase executora que não a 3.

4. CONSIDERAÇÕES FINAIS

O VDIB é o principal agente causador de imunossupressão em aves na fase inicial da infecção leva à imunossupressão por induzir a apoptose na BC. Sabe-se que a apoptose, nesse caso, pode ser desencadeada via ativação de caspases ou pela via independente de caspase por moléculas que são liberadas pelas células em decorrência da presença do vírus. Os mecanismos pelos quais o VDIB causa apoptose devem ser mais explorados em estudos futuros, sendo importante para se entender melhor o comportamento do vírus no tecido hospedeiro e se estabelecer critérios e programas de vacinação mais eficientes contra a doença.

4. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALBERTS, B; BRAY, D; LEWIS, J; RAFF, M; ROBERTS, K; WATSON, JD. *Mol. Biol. of the cell*. 3ed. Garland Publishing, Inc. NY, 1294p. 1994.

ALNEMRI, ES; LITWACK, G. Glicocorticoid-induced programmed cell death (apoptosis) in leukemia and pré-B cells. IN: LAVIN, M. & WATTERS, D. (ED) *Programmed cell death – the cellular and molecular biology of apoptosis*. HARWOOD ACADEMIC PUBLISHERS USA, p.99-110, 1993.

AMARANTE-MENDES, GP; GREEN, DR The regulation of apoptotic cell death. *Braz. J. Med. Biol. Res.*, v.32, p.1053-1061, 1999.

AMEISEN, J.C.; CAPRON, A. Cell dysfunction and depletion in AIDS: the programmed cell death hypothesis. *Immunol. Today*, v.12, p.102-105, 1991.

ARAI, S; KOWADA, T; TAKEHANA, K et al. Apoptosis in the chicken bursa of Fabricius induced by X-irradiation. *J. Vet. Med. Sci.*, v. 58, n. 10, p.1001-1006, 1996.

ARENDS, M. J., WYLLIE, H. A. Apoptosis: mechanisms and roles in pathology. *Int. Rev. Exp. Pathol.*, v.32, p. 223-254, 1991.

ARENDS, MJ; MORRIS, RG; WYLLIE, H Apoptosis. The role of the endonuclease. *Am. J. Pathol.*, v. 136, n. 3, p.593-608, 1990.

BARRY, M.A; REYNOLDS, J.E; EASTMAN, A. Etoposide-induced apoptosis in human HL-60 cells is associated with intracellular acidification. *Cancer Res.*, v.53, n.10, p.2349-2357, 1993.

BECHT, H.; MULLER, H. Infectious bursal disease – a B cell dependent immunodeficiency syndrome in chicken. *Behring Institute Mitteilungen*, v.89, p.217-225, 1991.

BECHT, H.; MULLER, H.; MULLER, H.K. Comparative studies on structural and antigenic properties of two serotypes of infectious bursal disease virus. *J. Gen. Virol.*, v.69, p.631-640, 1988.

BOOT, H.J.; HUURNE, A.H.M.; HOEKMAN, A.J.W. et al. Rescue of very virulent and mosaic infectious bursal virus from cloned cDNA: VP2 is not the sole determinant of the very virulent phenotype. *J. Virol.*, v.74, p.6701-6711, 2000.

BOTTCHER, B.; KISELE, N. A.; STELMASHCHUK, V. Y. et al. Three-dimensional structure of infectious bursal disease virus determined by electron cryomicroscopy. *J. Virol.*, v.71, p.325-330, 1997.

BRANDT, M.; YAO, K.; LIU, M. et al. Molecular determinants of virulence, cell tropism and pathogenic phenotype of infectious bursal disease virus. *J. Virol.*, v.75, p.11974-11982, 2001.

BROWN, M.D.; SKINNER, M.A. Coding sequences of both genome segments of a European “very virulent” infectious bursal disease virus. *Virus Res.*, v.40, p.1-15, 1996.

BURKHART, E.; MULLER, H. Susceptibility of chicken blood lymphoblasts and monocytes to infectious bursal disease virus (IBDV). *Arch. of Virol.*, n.94, p.297-303, 1987.

CASTON, J.R., MARTINEZ-TORRECUADRADA, J.L.; MARAVER, A. et al. C terminal of infectious bursal disease virus major capsid protein VP2 is involved in definition of the T number for capsid assembly. *J. Virol.*, v.75, p.10815-10828, 2001.

CAVANAGH, D.; NAQI, S.A. Infectious bronchitis. In: CALNEK, B. W. Et al., eds. *Dis. of Poult.*, 10 ed. Ames: Iowa State University Press, 1997, p.511-526.

CHETTLE, N.J.; STUART, J.C.; WYETH, P.J. Outbreaks of virulent infectious bursal disease in East Anglia. *Vet. Rec.*, v.125, p. 271-272, 1989.

CHOMCZYNSKI, P.; SACCHI, N. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal. Biochem.*, n.162, pp.156-159, 1987.

CIFONE, MG; MIGLIORATI, G; PARRONI, R; MARCHETTI, C. Dexamethasone-induced thymocyte apoptosis: Apoptotic Signal involves the sequential activation of phosphoisitide-specific phospholipase-C, acidic sphingomyelinase, and caspases. *Blood*, v.93, n.7, p.2282-2296, 1999.

COHEN, J.J. Programmed cell death in immune system. *Adv. Immunol.*, v.50, p.55-58, 1991.

COHEN, J.J.; DUKE, R.C. Apoptosis and programmed cell death in immunity. *Annu. Vet. Immunol.*, v.10, p.267-293, 1992.

COHEN, J.J; FADOK, V.A; SELLINS, K.S. Apoptosis and programmed cell death in immunity. *Ann. Rev. Immunol.*, v.10, n.1, p.267-293, 1992.

COMPTON, M.M; JOHNSON, L.R; GIBBS, P.S. Activation of thymocyte deoxyribonucleic acid degradation by endogenous glucocorticoids. *Poult. Sci.*, v.70, n.3, p.521-529, 1991.

COSGROVE, A.S. A apparently new disease of chickens – avian nephrosis. *Avian Dis.*, v.6, p.385-389, 1962.

De PAULA, M.B.C; YOKOSAWA, J.; COUTINHO, M.D.B. et al. Identification and molecular characterization of the infectious bursal disease virus (IBDV) from in outbreak in a broiler flock in midwestern Brazil. *Braz. J. Microbiol.*, v.35, p.352-358, 2004.

DI FABIO, J. Gumboro: Vacinação no incubatório. In: CONFERÊNCIA APINCO 2001 DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA AVÍCOLAS, 2001, Campinas, SP. *Anais*. Campinas: 2001, p.195-205.

DOBOS, P.; HILL, B.J.; HALLETT, R. et al. Biophysical and biochemical characterization of five animal virus with bisegmented double-stranded RNA genomes. *J. Virol.*, v.32, p.593-605, 1979.

ELLIS, H.M; HORVITZ, H.R. Genetic control of programmed cell death in the nematode *C. elegans*. *Cell*, v. 44, p. 817, 1991.

FADOK, V.A., HENSON, P.M. Apoptosis: getting rid of the bodies. *Curr. Biol.*, v.8, p.R693-R6951, 1998.

FERNANDEZ-ARIAS, A.; MARTINEZ, S.; RODRIGUEZ, J.F. The major antigenic protein of infectious bursal disease virus, VP2, is an apoptotic inducer. *J. Virol.*, v.71, p.8014-8018, 1997.

FESUS, L., THOMAZY, V., FALUS, A. Induction and activation of tissue transglutaminase during programmed cell death. *FEBES Lett.*, v. 224, n. 15, p. 104-108, 1987.

GARDIN, Y. Gumboro: cepas muito virulentas - patogenia e controle. IN: CONFERÊNCIA APINCO DE CIÊNCIA AVÍCOLA, I, 2000, Campinas. *Anais*. Campinas: 2000, p.59-78.

GARVY, B.A.; TELFORD, W.G.; KING, L.E. Glucocorticoids and irradiation-induced in normal murine bone marrow B-lineage lymphocytes as determined by flow cytometry. *Immunol.*, v.79, p.270-277, 1993.

GAVRIELI, Y; SHERMAN, Y; BEN-SASSON, SA Identification of programmed cell death *in situ* via specific labeling of nuclear DNA fragmentation. *J. Cell Biol.*, v. 119, n. 3, p.493-501, 1992.

GERSCHENSON, LE; ROTELLO, RJ Apoptosis: a different type of cell death. *Faseb J.*, n. 6, p.2450-2455, 1992.

GOLD, R; SCHMIED, M; BREITSCHPF, H. et al. Differentiation between cellular apoptosis and necrosis by the combined use of *in situ* tailing and nick translation techniques. *Lab. Invest.*, v. 71, n. 2, p.219-227, 1994.

GOLSTEIN, P; OJCIUS, D.M; YOUNG, D.E. Cell death mechanisms and the immune system. *Immunol. Rev.*, v.121, n.1, p.29-65, 1991.

HÄCKER, G. The morphology of apoptosis. *Cell Tissue Res.*, v.301, n.1, p.5-17, 2000.

HAY, S.; KANNOURAKIS, G. A time to kill: viral manipulation of the cell death program. *J. Gen. Virol.*, v.83, p.1547-1564, 2002.

HERNANDEZ-VERDUN, D; ROUSSEL, P. Cell biological basis of AgNOR staining. *Virchows Arch.*, v. 427, p.326-327, 1995.

HITCHNER, S.B. Infectivity of infectious bursal disease virus for embryonating eggs. *Poultry Science*, v.49, p.511-516, 1970.

HOTZ, M.A; GONG, J; TRAGANOS, F; DARZYNKIEWCZ, Z. Flow cytometric detection of apoptosis: comparison of the assays of in situ DNA fragmentation and chromatin changes. *Citometry*, v.15. p.237-244, 1994.

HUDSON, P.J.; MCKERN, N.M.; POWER, B.E. et al. Genomic structure of the large RNA segments of infectious bursal disease virus. *Austral. Vet. J.*, v.11, p.689-694, 1986.

INOUE, M.; FUKUDA, M.; MIYANO, K. Thymic lesions in chicken infected with infectious bursal disease virus. *Avian Dis.*, v.38. p. 839-846, 1994.

ITO, N.M.K. Infectious bursal disease: A case report. *Bras. J. Vet. Res. Sci.*, v.27, p.99-110, 1990.

ITO, N.M.K.; MIYAJI, C.I., LIMA, E.A. et al. *Doença de Gumboro: Revisão de literatura: avanços em biotecnologia e novos conhecimentos*. Campinas: Spave Consultoria/co, 2001. 76p. Manual Técnico.

JACKWOOD, D.H.; SAIF, Y.M. Antigenic diversity of infectious bursal disease viruses. *Avian Dis.*, v.31, p.766-770, 1987.

JACOBSON, M.D., WEIL, M., RAFF, M.C. Programmed cell death in animal development. *Cell*, v.88, n.3, p.347-354, 1997.

JEURISSEN, S.H.M.; WAGENAAR, F.; POL, J.M.A.; VAN DER EB, A.J.; NOTEBORN, M.H.M. Chicken anemia virus causes apoptosis of thymocytes after *in*

vivo infection and of cell lines after *in vitro* infection. *J. Virol.*, n.66, p.7383-7388, 1992.

JILMA, B; STOHLAWETZ, P; PERNERSTRFER, T. et al Glicocorticoids dose-dependently, increase plasma levels of granulocyte colony stimulating factor in man. *J. Clin. Endocrinol. Metabol.*, v.83, n.3, p.1037-1040, 1998.

JUNGSMANN, A.; NIEPER, H.; MULLER, H. Apoptosis is induced by infectioius bursal disease virus replication in productively infected cells as well as in antigen-negative cells in their vicinity. *J. Gen. Virol.*, v.82, p.1107-1115, 2001.

KAMIYA, S; DOI, O; NAKAMASU, F; AKAYAMA, T; NAKAMURA, T. Contribution of Ubiquitin to glicocorticoid-induced apoptosis in the bursa of Fabricius. *An. Sci. Tecnol. (Japan)*, v.68, n.1, p.13-17, 1997.

KAUFER, I.; WEISS, E. Significance of bolsa cloacalas target organ in infectious bursal disease of chickens. *Infect. Immunity*, v.27, p.364-367, 1980.

KERR, J. F. R.; WINTERFORD, C. M.; HARMON, B. V. Apoptosis. Its significance in cancer and cancer therapy. *Cancer*, v. 73, p. 2013-2026, 1994.

KERR, J. F. R.; WYLLIE, A. H.; CURRIE, A. R. Apoptosis: basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Brit. J. Cancer*, v. 26, p.239-257.1972.

KIBENGE, F.S.B.; DHILLON, A.S.; RUSSELL, R.G. Biochemistry and immunology of infection bursal desease virus. *J. Gen. Virol.*, v.69, p.1757-1775, 1988.

KNEIP, C.A.F. Doença de Gumboro no Brasil. IN: SIMPÓSIO DE SANIDADE AVÍCOLA, 2, 2002, Santa Maria, RS. *Anais*. Santa Maria: 2002, p.79-88.

KUMAR, K.; SINGH, K.C.P.; PRASAD. Immune response to intermediate strain IBD vaccine at different levels of maternal antibody in broiler chicken. *Tropical Animal Health and Production*, v.32, n.6, p.357-360, 2000.

LABAT-MOLEUR, F; GUILLERMET, C; LORIMIER, P. et al. TUNEL apoptotic cell detection in tissue sections: critical evaluation and improvement. *J. Histochem. Cytochem.*, v. 46, n. 3, p.327-334, 1998.

LAM, K. M. Morphological evidence of apoptosis in chickens infected with infectious bursal disease virus. *J. Comp. Pathol.*, v. 116, n.4, p.367-77, 1997.

LAM, K.M.; VASCONCELOS, A.C. Newcastle disease virus-induced apoptosis in chicken peripheral blood lymphocytes. *Vet. Immunol. Immunopathol.*, v.44, p.45-56, 1994.

LAM, K.M.; VASCONCELOS, A.C.; BICKFORD, A.A. Apoptosis as a cause of death in chicken embryos inoculated with Newcastle disease virus. *Microbiol. Pathog.*, v.19, p.169-174, 1995.

LASSILA, O. Emigration of B cells from chicken bursa of Fabricius. *Europ. J. of Immunol.*, v.19, p.955-958, 1989.

LEIST, M.; NICOTERA, P. Apoptosis, excitotoxicity, and neuropathology. *Exp. Cell Res.*, v.239, 1998.

LIU, M.; VAKHARIA, N. Nonstructural protein of infectious bursal disease virus inhibits apoptosis at the early stage of virus infection. *J. Virol.*, p.3369-3377, 2006.

LOMBARDO, E.; MARAVER, A.; CASTEN, J.R. et al. VP1 the putative RNA-dependent RNA polymerase of infectious bursal disease virus, forms complexes with the capsid protein VP3 leading to efficient encapsidation into virus like particles. *J. Virol.*, v.73, p.6973-6983, 1999.

LUKERT, P.D.; SAIF, Y.M. Infectious bursal disease. In: Diseases of Poultry. 10^a ed. B.W. Calnek, ed. Iowa State University Press, Ames, IA. 1997, p.721-738.

LUKERT, P.D.; SAIF, Y.M. Infection bursal disease. In: Calnek, B.W.; Barnes, H.J.; Beard, C.W.; Reid, W.M.; Yoder, Jr., H.W. (Eds), Diseases of Poultry, 9th ed., Iowa State University Press, 1991, p.648-663.

MARTINS, A. S.; GREENE, L. J.; YOHO, L.; MILSTED, A. The cDNA encoding canine dihydrolipoamide dehydrogenase contains multiple termination signals. *Gene*, v.161, p.253-257, 1995.

MCFERRAN, J.B.; MCNULTY, M.S.; MCKILLOP, E.R. et al. Isolation and serological studies with infectious bursal disease virus from fowl, turkey and duck: Demonstration of a second serotype. *Avian Pathol.*, v.9, p.395-404, 1980.

MEYAARD, L.; OTTO, S.A.; JONKER, R. R. et al. Programmed death of T cells in HIV-1 infection. *Science*, v. 257, p.217-219, 1992.

MIGHELI, A; ATTANASIO, A; SCHIFFER, D. Ultrastructural detection of DNA strand breaks in apoptotic neural cells by *in situ* end-labeling techniques. *J. Pathol.*, v. 176, p.27-35, 1995.

MISHLER, J.M; EMERSON, P.M. Development of neutrophilia by serially increasing doses of dexamethasone. *British J. Haematol.*, v.36, n.1, p.249-257, 1977.

MORAES, H.L.S.; SALLE, C.T.P; PADILHA, A.P. et al. Infectious bursal disease: Evaluation of pathogenicity of commercial vaccines from Brazil in specific pathogen free chickens. *Braz. J. Poult. Sci.*,v.6, n.4, p.243-247, 2004.

MORO, L. *Apoptose na patogenia da cinomose canina*. 2001, 213f. (Tese – Doutorado em Patologia). Faculdade de Medicina. Universidade Federal de Minas Gerais. 2001.

MORO, L., MARTINS, A. S., ALVES, C. M. et al. Apoptosis in canine distemper. *Arch. Virol.*, v. 148, p. 153-164, 2003.

MOTYKA, B.; REYNOLDS, J.D. Apoptosis is associated with the extensive B cell death in the sheep ileal Peyer's patch and chicken bursa of Fabricius: A possible role in B cell selection. *Europ. J. Immunol.*, v.21, p.1951-1958, 1991.

MULLER, H. Replication of infectious bursal disease virus in lymphoid cells. *Arch. of Virol.*, n.87, p.191-203, 1986.

MULLER, H.; SCHOLKTISSEK, C.; BECHT, H. Genome of infectious bursal disease virus consists of two segments of double-stranded RNA. *J. Virol.*, v.31, p.584-589, 1979.

MULLIS, K.B. ; FALOONA, F.A. Specific synthesis of DNA *in vitro* via a polymerase-catalyzed chain reaction. In: WU, R. (Ed). *Methods in enzymology*, Vol. 155. San Diego: Academic Press, 1987, p 335-350.

MUNDLE, S.D; RAZA, A. The two *in situ* techniques do not differentiate between apoptosis and necrosis but rather reveal distinct patterns of DNA fragmentation in apoptosis. *Lab. Inv.*, v. 72, n. 5, p.611-613, 1995.

MUNDT, E. Tissue culture infectivity of different strains of infectious bursal disease virus is determined by distinct amino acids in VP2. *J. Gen. Virol.*, v.80, p.2067-2076, 1999.

MURPHY, H.N.; FAUQUET, C.M.; BISHOP, D.H.L. et al. *Virus Taxonomy. Classification and Nomenclature of Viruses*. International Committee on Taxonomy of Virus. Springer, Wien New York, p.240-244, 1995.

NAGARAJAN, M.M; KIBENGE, F.S.B. Infectious bursal disease virus: a review of molecular basis for variation in antigenicity and vice. *Can. J. Vet. Res.*, v.61, p.81-88, 1997.

NEGOESCU, A; LORRIMIER, P; LABAT-MOLEUR, F. et al. In situ apoptotic cell labeling by the TUNEL method: improvement and evaluation on cell preparations. *J. Histochem. Cytochem.*, v.44, p.959-968, 1996.

NIEPER, H.; TEIFKE, J.P.; JUNGSMANN, A. et al. Infected and apoptotic cells in the IBDV-infected bursa of Fabricius by double-labelling techniques. *Avian Pathol.*; v.28, p. 279-285, 1999.

OJEDA, F.; SKARDOVA, I.; GUARDA, M.I. et al. Proliferation and apoptosis in infection with infectious bursal disease virus: a flow cytometry study. *Avian Dis.*, v.41, p.312-316, 1997.

OKOYE, J.O.A. Infectious bursal disease of chickens. *Vet. Bull.*, v.54, n.6, p.425-436, 1984.

PEITSH, M. C., POLZAR, B., STEPHAN, H., COMPTON, T., MacDONALD, H. R., MANNHERZ, H. G. TSCHOOP, J. Characterization of the endogenous

deoxyribonuclease involved in nuclear DNA degradation during apoptosis (programmed cell death). *EMBO J.*, v. 12, p. 371-377, 1993.

RATCLIFFE, M.J.H. Development of the avian B lymphocyte lineage. Critical Reviews in Poultry. *Biology*, v.2, p.207-234, 1989.

REYNOLDS, J.D. Mitotic rate maturation in the Peyer's patches of fetal sheep and in the bursa of Fabricius of the chicken embryo. *Europ. J. Immunol.*, v.17, p.503-510, 1987.

ROSEMBERGER, J.K.; CLOUD, S.S; GELB, J. et al. Sentinel bird survey of Delmarva broiler flocks, *Proceeding 20 th Natl Meet Poultry Health Condemn*, Ocean City, MD, p.94-101, 1985.

SAMPAIO, I. B. M. *Estatística Aplicada à Experimentação Animal*. Belo Horizonte: Fundação de Ensino e Pesquisa em Medicina Veterinária e Zootecnia, 1998, 221p.

SANDERS, E.J; WRIDE, M.A. Ultrastructural identification of apoptotic nuclei using the TUNEL technique. *Histochem. J.*, v.28, p.275-281, 1996.

SARLI, G.; DELLA SALDA, L.; ZACCARO, L. et al. Apoptotic fraction in lymphoid tissue of FIV-infected SPF cats. *Vet. Immunol. Immunopathol.*, v.64, p.33-34, 1998.

SAVILL, J., FADOK, V., HENDSON, P., HASLETT, C. Phagocyte recognition of cells undergoing apoptosis. *Immunol. Today*, v. 14, p. 131-136, 1993.

SHARMA, J.M.; DOHMS, J.E.; METZ, A. L. Comparative pathogenesis of serotype 1 and variant serotype 1 isolates of infectious bursal disease virus and the effect of those viruses on humoral and cellular immune response of specific-pathogen-free chickens. *Avian Dis.*, n.33, p.112-124, 1989.

SHARMA, J.M.; KIM, I.J.; RAUTENSCHLEIN, S.; YEH, H.Y. Infectious bursal disease virus of chicken: pathogenesis and immunosuppression. *Dev. Comp. Immunol.*, v.24, n.2-3, p.223-235, 2000.

SIMON, V.A.; ISHIZUDA, M.M. Doença infecciosa da bolsa de Fabrício – DIB. IN: BERCHIERI JÚNIOR, A.; MARCARI, M. (Ed). Doença de Aves. Fundação Apinco de Ciência e Tecnologia Avícolas, p. 301-314, 2000.

SNYDER, D.B. Changes in the field status of infectious bursal disease virus. *Avian Pathol.*, n.19, p.419-423, 1990.

SOLANO, W.; GIAMBRONE, J.J.; WILLIAMS, J.C. et al. Effect maternal antibody on timing of initial vaccination of young White Leghorn chickens against infectious bursal disease virus. *Avian Dis.*, v.30, n.4, p.648-652, 1986.

STEGER, D.; MULLER, H.; RIESNER, D. Helix-core transitions in double-stranded viral RNA: Fine resolution melting and ionic-strength dependence. *Biochim. Biophys. Acta*, v. 606, p.274-285, 1980.

TACKEN, M.G.; PEETERS, B.P.; THOMAS, A.A. et al. Infectious bursal disease virus capsid protein VP3 interacts both with VP1, the RNA-dependent RNA polymerase, and with viral double-stranded RNA. *J. Virol.*, v.76, p.11301-11311, 2002.

TANIMURA, N.; SHARMA, J. M. Appearance of T cells in the bursa of Fabricius and cecal tonsils during acute phase of infectious bursal disease virus infection in chickens. *Avian Dis.*, v.41, p.638-645, 1997.

TANIMURA, N.; SHARMA, J.M. In situ apoptosis in chicken infected with infectious bursal disease virus. *J. Comp. Pathol.*, v.118, p.15-27, 1998.

THAM, K.M.; MOON, C.D. Apoptosis in cell culture induced by infectious bursal disease virus following *in vitro* infection. *Avian Dis.*, v.40, p.109-113, 1996.

TENNISWOOD, M., TAILLEFER, D., LAKINS, J. Control of gene expression during apoptosis in hormone-dependent tissues. In: TOMEI, L. D., COPE, F. O., (eds.). *Apoptosis II: The molecular basis of apoptosis in disease*. New York: Springer, 1994, p. 283-311.

TERASHIMA, T; ENGLISH, D; HOGG, J.C; VanEDEN, S.F. Release of polymorphonuclear leukocytes from the bone marrow by interleukin-8. *Blood*, v.92, n.3, p.1062-1069, 1998.

TESSARI, E.N.C.; CASTRO, A.G.M.; CARDOSO, A.L.S.P. et al. Ocorrência da doença de Gumboro em aves de postura causadas por cepas hipervirulentas. *Arq. Int. Biol.* v.68, n.1, p.115-117, 2001.

THORNBERRY, N. A. et al. A combinatorial approach defines specificities of members of the caspases family and granzyme B: Function relationships for key mediator of apoptosis. *J. Biol. Chem.*, v.272, p.17907-17911, 1997.

VAN DEN BERG, T.P. Acute infectious bursal disease in poultry: a review. *Avian Pathol.*, v.29, p.175-194, 2000.

VASCONCELOS, A. C.; LAM, K. M. Apoptosis In Chicken Embryos Induced By The Infectious Bursal Disease Virus. *J. Comp. Pathol.*, v. 112, p. 327-338, 1995.

VASCONCELOS, A. C. ; LAM, K. M. . Apoptosis Induced By The Infectious Bursal Disease Virus. *J. Gen. Virol.*, v. 75, p. 1803-1806, 1994.

VASCONCELOS, A. C. Apoptose ou morte celular programada e sua importância em patologia Veterinária. In: Encontro Nacional de Patologia Veterinária, 7, 1995, Belo Horizonte. Anais... Belo Horizonte: p. 69, 1995.

VASCONCELOS, A. C. Métodos aplicados ao estudo da Apoptose, Belo Horizonte: Instituto de Ciências Biológicas da UFMG, 2001, 17p. Print out do Curso PAG 807 – Métodos de Estudo aplicados à Apoptose.

WINTERFIELD, R.W.; HITCHNER, S.B. Etiology of an infectious nephritis-nephrosis syndrome of chickens. *Am. J. Vet. Res.*, v.23, p.1273-1279, 1962.

WINTERFIELD, R.W.; THACKER, H.L. Immune response and pathogenicity of different strains of infectious bursal disease virus applied as vaccines. *Avian Dis.*, v.22, p.721-731, 1978.

WYLLIE, .AH. Apoptosis. Death gets a brake. *Nature*. v.369, n.6478, p.272-273, 1994.

WYLLIE, A. H. Apoptosis and the regulation of cell numbers in normal and neoplastic tissues: an overview. *Cancer Metast. Rev.*, v. 11, p. 95-103, 1992.

WYLLIE, A. H. Cell death: A new classification separating apoptosis from necrosis. In: Bowen, I.D. & Lockshin, R.A. (Eds) *Cell Death In Biology and Pathology*, Chapman & Hall, 1981, p.9-34.

WYLLIE, A. H., MORRIS, R. G. Hormone-induced cell death. Purification and properties of thymocytes undergoing apoptosis after glucocorticoid treatment. *Am. J. Path.*, v. 109, n. 1, p. 78-87, 1982.

WYLLIE, A. H., MORRIS, R. G., SMITH, A. L. Et al. Chromatin cleavage in apoptosis: association with condensed chromatin morphology and dependence on macromolecular synthesis. *J. Pathol.*, v. 142, p. 67-77, 1984.

WYLLIE, A.H., KERR, A.H.; CURRIE, A.R. Cell death: the significance of apoptosis. *Int. Rev. Cytol*, v.68, p.251-306, 1980.

YAMAGUCHI, T.; OGAWA, M.; INOSHIMA, Y.; MIYOSHI, M.; FUKUSHI, H.; HIRAI, K. Identification of sequence changes responsible for the attenuation of highly virulent infectious bursal disease virus. *Viol.*, v.223, p.219-223, 1996b.

YAO, K.; VAKHARIA, V. Induction of apoptosis *in vitro* by the 17-kDa nonstructural protein of infectious bursal disease virus: Possible role in viral pathogenesis. *Viol.*, 285, p.50-58, 2001.